(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 332 T2** 2006.02.02

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 728 210 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 332.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/13104**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 901 894.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/013385**
(86) PCT-Anmeldetag: **14.11.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **18.05.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.08.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **13.04.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.02.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/57*** (2006.01)
C12N 9/74 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

152657	**12.11.1993**	**US**
258038	**10.06.1994**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Gilead Sciences, Inc., Foster City, Calif., US

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(72) Erfinder:
GIBBS, Craig S., San Francisco, US; LEUNG, Lawrence L.K., Hillsborough, US; TSIANG, Manuel, Foster City, US

(54) Bezeichnung: **THROMBIN MUTANTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0001] Thrombin, ein Schlüsselenzym bei der Hämostase, besitzt basierend auf seinen unterschiedlichen Substratspezifitäten sowohl prokoagulatorische als auch antikoagulatorische Eigenschaften. Thrombin wird von der Leber als Prothrombin, ein inaktives Zymogen, sezerniert, das durch die Gerinnnungsfaktoren Va und Xa zum Erhalt des maturen α-Thrombins aktiviert wird. Dieser Vorgang kann in vitro durch die proteolytische Spaltung von Prothrombin mit verschiedenen Schlangengiften, wie zum Beispiel dem Gift von Echis carinatus, nachgeahmt werden.

[0002] Thrombin wirkt durch die proteolytische Spaltung von Fibrinogen als ein Prokoagulans, das letztendlich zur Bildung eines unlöslichen Fibringerinnsels, der Aktivierung der Gerinnungscofaktoren Faktor V und Faktor VIII bis FVa und FVIIIa, der Spaltung von Faktor XI zum aktivierten Faktor XIa (der zur weiteren Aktivierung der Faktoren IX und X und der Aufrechterhaltung der Gerinnung führt) und der Spaltung des Thrombozyten-Thrombinrezeptors führt, was in der Thromozytenaktivierung resultiert. Wenn andererseits Thrombin an Thrombomodulin (TM), ein integrales Membranprotein an vaskulären Endothelzellen, bindet, unterliegt das Thrombin einer Konformationsänderung dergestalt, dass Thrombin seine prokoagulatorische Aktivität verliert und anstelle dessen die Fähigkeit erwirbt, ein als Protein C (PC) bezeichnetes Plasmaprotein in aktiviertes Protein C (aPC) umzuwandeln. aPC, eine Serinprotease, wirkt durch Inaktivierung von aktiviertem FV (FVa) und FVIII (FVIIIa), zwei essenziellen Cofaktoren in der Gerinnungskaskade, als ein potentes Antikoagulans. aPC inaktiviert auch den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), den bedeutenden physiologischen Hemmer des tPA (Gewebsplasminogenaktivators), wobei es folglich die normale Fibrinolyse potenziert. Dieser Mechanismus kann der Gewährleistung dienen, dass die Blutkoagulation an der Verletzungsstelle lokalisiert bleibt. Kleinkinder mit vollkommenem PC-Mangel sind mit einer als Purpura fulminans des Neugeborenen bezeichneten zum Tode führenden thrombotischen Erkrankung im Wesentlichen nicht lebensfähig; einige Patienten mit einer partiellen PC-Defizienz leiden an rezidivierender Thrombose. Viele neuere Tiermodelle, die sich aPC-Infusionen zunutze machten, haben darauf hingewiesen, dass exogenes aPC ein antithrombotisches und antiinflammatorisches Molekül darstellt.

[0003] Humanes Thrombin wird aus einem Präkursor-Polypeptid, Prothrombin, mit ca. 579 maturen Aminosäuren (vorbehaltlich der potenziellen allelen Variation oder N-terminalen Mikroheterogenität), einschließlich einer Präsequenz von ca. 43 Resten gebildet (Degen et al., „Biochemistry" 22:2087 [1993]). Die Präsequenz wird während des Expressions- und Sekretionsvorgangs von Prothrombin von der Zelle proteolytisch entfernt. Prothrombin ist ein Zymogen oder eine inaktive Protease, das durch proteolytische Spaltung aktiviert wird. Mindestens drei basische Orte unterliegen der Spaltung. Prothrombin wird in vivo zwischen den Resten R271 und T272 (Degen et al., Restenummern) durch Faktor Xa bei Vorliegen von Faktor Va, Phospholipid und Calciumionen gespalten, um Präthrombin 2 und Fragment 1.2 zu ergeben. Prothrombin wird vom gleichen System zwischen R320 und I321auch proteolytisch gespalten, um Meizothrombin zu ergeben, das wiederum zwischen R155 und S156 zur Bildung von Fragment 1 (1–155) und Meizothrombin-des-1 (einem Disulfid-verknüpften Dipeptid, das sich von Rest 156 bis zum Carboxy-Terminus von Prothrombin, gespalten an R323, erstreckt) autolytisch gespalten wird. Thrombin wird schließlich durch proteolytische Spaltung zwischen R320 und I321aus Präthrombin 2 oder aus Meizothrombin-des-1 durch proteolytische Spaltung zwischen R271 und T272 gebildet. Thrombin autolysiert dann selbst die Spaltung zwischen T284 und T285, um den maturen N-Terminus der A-Kette herbeizuführen. Für die Zwecke hierin wird der mature N-terminale Rest der Thrombin-A-Kette (Degen, T285) als „T1a" bezeichnet und wird dann bis zum Argininrest an R36a konsekutiv durchnummeriert. Die B-Kette wird von ihrem N-terminalen Rest I1 (Degen, I321) bis E259 durchnummeriert. Die beiden Thrombinpeptide sind durch eine Disulfid-Verküpfung zwischen C9a und C119 kovalent gebunden.

[0004] Für Thrombin sind außer dem auf DNA-basierenden System von Degen et al. zwei distinkte Nummerierungssysteme in Gebrauch. Eines basiert auf der Alignment mit Chymotrypsinogen (Bode et al., „EMBOJ" 8:3467 (1989). Ein zweites wird von Sadler und Mitarbeitern an der University of Washington bevorzugt. In dieser Beschreibung findet das Nummerierungsschema nach Sadler Verwendung. Unter diesem Protokoll beginnt die B-Kette des Thrombins mit I1 und erstreckt sich bis E259, während die A-Kette, die mit „a"-Postskripta, wie vorstehend in T1a bis R36a angemerkt, bezeichnet wird. Dieses Thrombin wird als „Bezugssequenzthrombin" bezeichnet, und seine vollständige Sequenz ist in **Fig. 1** ersichtlich. Wu et al., („PNAS USA" 88:6775, (1991)) offenbaren zum Beispiel mehrere Thrombin-Mutanten, die gemäß dem Sadler-Schema nummeriert sind. Die Mutanten nach Wu et al. und das entsprechende Chymotrypsinogen bzw. die Restenummern nach Degen et al. werden sequenziell wie folgt gezeigt: H43 (57, 363), K52 (60f 372), N53 (60g, 373), R62 (67,382), R68 (73,388), R70 (75, 390), D99 (102, 419) und S205 (195, 525).

[0005] Es ist aus der Literatur bekannt, dass die Thrombin-Bindungsorte für die Aktivierung von Fibrinogen und Protein C überlappen, aber nicht identisch sind. Dies beruht auf einer kleinen Anzahl von Thrombin-Mutanten (Wu et al., op. cit.). Wu et al. berichteten, dass ein Polypeptid, das die Sequenz des Thrombins, aber mit der Glutaminsäure an der Stellung 52 (K52E) substituiert aufwies, bei der Bildung von aktiviertem PC um das ca. 2,5fache aktiver war als das Wildtyp-Thrombin und nur ca. 17 % der normalen Fibrinogengerinnungsaktivität des Wildtyp-Thrombins besaß. Umgekehrt besaß ein Polypeptid mit der Sequenz von Thrombin, aber mit der Glutaminsäure an der Stellung 70 (R70E) substituiert, Berichten zufolge die Fibrinogengerinnungsaktivität des Wildtyp-Thrombins, aber nur ca. 7 % der PC-Aktivierungsfähigkeit des Wildtyp-Thrombins. Nach Wu et al. verlor das R68E-Protein weitgehend beide Funktionen.

[0006] Für andere Polypeptide mit einer Sequenzhomologie zu Thrombin siehe: Le Bonniec et al., „JBC" 268(25):19055 (1993); Le Bonniec et al., „JBC" 266(21):13796 (1991); Le Bonniec et al., „PNAS USA" 88:7371 (1991); Sheehan et al., „JBC" 268(5):3639 (1993); Horrevoet et al., „JBC" 268(2):779 (1993); Suzuki et al., „JBC" 266(28):18498 (1991); Sheehan et al., „Thrombosis and Haemostasis" 69: Abstract 1784 (1993); Gan et al., „Thrombosis and Haemostasis" 69:Abstract 1783 (1993); Gan et al., „Thrombosis and Haemostasis" 69:Abstract 1787 (1993) und Naray-Szabo et al., „Theochem" 59:401 (1989).

[0007] Die pivotale Rolle von Thrombin bei der Blutgerinnung hat dieses Protein zu einem Target bei der Entwicklung von Mitteln zur Behandlung von Thrombose gemacht. Die meisten Bemühungen haben sich auf die direkte Hemmung der proteolytischen Aktivität des Thrombins konzentriert, und zahlreiche Hemmer der prokoagulatorischen Aktivitäten von Thrombin weisen faktisch eine antikoagulatorische Wirkung auf (Hirsh, 1991; Hirsh, 1991a). Die Potenz dieser Hemmer könnte jedoch durch die konkomitierende Hemmung der antikoagulatorischen Aktivität von Thrombin begrenzt sein. Im Gegensatz dazu wurde eine antikoagulatorische Wirkung durch Augmentierung oder Stimulierung dieses antikoagulatorischen Thrombinpfades, d. h. durch Verabreichung von löslichem TM (Gomi, et al., „Blood" 75:1396–1399, 1990; and Light, D., WO 93/15755) oder aktiviertem Protein C („aPC") Dreyfus et al., 1991; Gruber et al., 1990; Gruber et al., 1991; Taylor et al., 1987) erreicht. Diese Strategie blockiert nicht die laufende Koagulation, die sich aus dem zuvor aktivierten Thrombin ergibt.

[0008] Bode et al., EMBO J8:3467 (1989), vorstehend, offenbaren die gereinigte Kristallstruktur (1,9 Ångstrom) von humanem α-Thrombin in Relation zu einem zwischen humanem α-Thrombin und D-Phe-Pro-Arg-Chlormethylketon gebildeten stöchiometrischen Komplex, womit folglich die Signifikanz eines Tyr-Pro-Pro-Trp-Insertionssegments gezeigt werden konnte.

[0009] Padmanabhan et al., J. Biol. Chem. 268/24, (1993) 17651–17654, offenbaren die Struktur von α-Thrombin, das durch ein 15-mer einsträngiges DNA-Aptamer bei einer Auflösung von 2,9 Ångstrom gehemmt wurde, und offenbaren gemäß dem Chymotrypsinogen-Nummerierungssystem von Bode et al., 1992, vorstehend, Arg75- zu Glu- und Lys149E- zu Ala-Mutanten.

[0010] Gegenstand dieser Erfindung ist die Herstellung neuer Polypeptide, die verbesserte physiochemische oder biologische Aktivitäten besitzen.

[0011] Gegenstand dieser Erfindung ist weiter die Herstellung neuer Polypeptide, bei denen die prokoagulatorischen und antikoagulatorischen Aktivitäten von Thrombin im Wesentlichen segregiert wurden und die auch optional gegen die Heparin-vermittelte Antithrombin III-Hemmung (AT-III-Hemmung) beständig sind.

[0012] Ein anderer Gegenstand dieser Erfindung ist der Erhalt solcher Polypeptide, die in der rekombinanten Zellkultur in gesteigerten Ausbeuten exprimiert werden können.

[0013] Ein zusätzlicher Gegenstand dieser Erfindung ist die Bereitstellung neuer Polypeptide, die für die Protein C-Aktivierung oder Fibrinogen substratspezifisch sind, aber Poplypeptide, bei denen es sich in der Regel nicht um Thrombinsubstrate handelt, im Wesentlichen nicht proteolysieren.

[0014] Ein anderer Gegenstand dieser Erfindung ist die Bereitstellung neuer kovalent modifizierter Polypeptide, die beim Screening auf Substanzen, bei denen es sich um Agonisten oder Antagonisten der prokoagulatorischen oder antikoagulatorischen Aktivitäten des Thrombins handelt, nützlich sind.

[0015] Ein weiterer Gegenstand ist die Bereitstellung neuer Polypeptide, die Protein-C aktivieren, aber im Wesentlichen keine oder eine reduzierte proteolytische Aktivität gegen jedwedes eine oder mehr von Fibrinogen, dem Thrombin-Thrombozytenrezeptor und/oder Faktoren XIII, V, XI oder VIII besitzen.

[0016] Ein noch weiterer Gegenstand ist der Erhalt neuer Polypeptide, die bei der Reinigung von Thrombin-interaktiven Polypeptiden, wie zum Beispiel TM oder aPC aus Zellkulturen oder nativen Quellen, nützlich sind.

[0017] Ein anderer Gegenstand ist die Identifikation neuer Polypeptide, die mindestens einen wesentlichen Grad der gewünschten proteolytischen Aktivität von Thrombin, einschließlich der kcat und Km von Thrombin für das gewünschte Substrat beibehalten.

[0018] In einem weiteren Gegenstand sind neue Polypeptide bereitgestellt, die im Vergleich zum Wildtyp-Thrombin eine verbesserte PAI-1-Inaktivierungsaktivität aufweisen.

[0019] Ein weiterer Gegenstand ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Identifikation von Defizienzen in der Thrombomodulinfunktion bei Patienten mit Gerinnungsstörungen.

[0020] In anderen Gegenständen werden neue Polypeptide zur Behandlung von Thrombose, insbesondere von mit septischem Schock einhergehender Thrombose, zur Therapie von soliden Tumoren und zur Herstellung von verbesserten Wundverbänden oder für Therapien und diagnostische Verwendungszwecke, die sich auf eine Eigenschaft des Thrombins verlassen, bereitgestellt.

[0021] Ein anderer Gegenstand ist die Identifikation neuer Analoga des Thrombins, die eine verbesserte oder reduzierte Fähigkeit hinsichtlich der Stimulation der Zellproliferation aufweisen (Ben-Sharit et al., „PNAS USA" 83:976–980 (1986)).

[0022] Diese und andere erfindungsgemäße Gegenstände werden erkannt werden, wenn man diese Beschreibung als ein Ganzes in Erwägung zieht.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0023] Gegenstand dieser Erfindung sind neue Polypeptide (hierin nachstehend „NPs"), worin die Eigenschaften von Thrombin segregiert sind, d. h. worin die Polypeptide keinen erheblichen Grad von einer oder mehr unerwünschten Eigenschaft(en) des Thrombins besitzen, aber dennoch eine oder mehr erwünschte Eigenschaften des Thrombins beibehalten. Ein erfindungsgemäßer Gegenstand ist außerdem NPs, bei denen targetierte Thrombinreste mutagenisiert wurden.

[0024] Aus dem Umfang der NPs spezifisch ausgeschlossen sind bekannte Aminosäuresequenz-Varianten von Thrombin, spezifisch von Thrombin R70E, Thrombin R68E, Thrombin K154A, Thrombin K252E, Thrombin K174E, Thrombin R180E, Thrombin D99A, Thrombin D99N, Thrombin E202Q, Thrombin E25K, Thrombin R245E, Thrombin S205A, R197E, D199E, Thrombin N151D, K154E, Thrombin des-P48,P49,W50, Thrombin des-E146,T147,W148, Thrombin des-T147-S158, die Thrombine von WO 93/13208, worin mindestens ein Aminosäurerest in der Thrombin-Aktivierungsstelle mutiert wurde, und Thrombin, worin Schleifen F19-E25 durch eine äquivalente Schleife aus dem Gewebsplasminogenaktivator ersetzt werden. Thrombin K52E ist jedoch lediglich in dem Ausmaß ausgeschlossen, dass seine Herstellung auf dem Stand der Technik ermöglicht wird. Variante Thrombine am Aktivierungsort sind lediglich in dem Ausmaß ausgeschlossen, wie durch den Begriff „Aktivierungsort" definiert und in WO 93/13208 offenbart ist. Auch ausgeschlossen aus dem Umfang der erfindungsgemäßen neuen Polypeptide sind die Fusionen solcher bekannten Thrombine mit einem Nichtthrombin-Polypeptid oder einem Präprothrombin- oder Prothrombin-Polypeptid. Nicht ausgeschlossen aus dem Umfang der NPs sind jedoch NPs, die bekannte Thrombine darstellen, worin zusätzliche Aminosäuresubstitutionen, -insertionen oder -deletionen vorgenommen wurden.

[0025] Auch ausgeschlossen aus dem Umfang der neuen Polypeptide sind natürlich vorkommende Thrombine, einerlei ob von Menschen oder Tieren (einschließlich natürlich vorkommender Allele), die nicht aus Blut oder anderem Körpergewebe isoliert oder gereinigt wurden, d. h. bei denen es sich um natürliche vorkommende Produkte handelt. Man muss jedoch zur Kenntnis nehmen, dass die erfindungsgemäßen NPs allele Variationen aus der Thrombin-Bezugssequenz zusätzlich zu den hierin in Betracht gezogenen Mutationen einschließen.

[0026] In bestimmten erfindungsgemäßen Ausführungsformen stellen wir neue, proteolytisch aktive Polypeptide bereit, die ein Verhältnis von Protein C-Aktivierung zu Fibrinogengerinnung aufweisen, das sich vom Wildtyp-Thrombin unterscheidet. Es werden insbesondere zwei allgemeine Klassen neuer Polypeptide bereitgestellt. In der ersten Klasse, als „Protein C-Aktivatoren" oder „PCA" bezeichnet, werden neue Polypeptide bereitgestellt, die ein Verhältnis von antikoagulatorischer Aktivität zu prokoagulatorischer Aktivität von größer als

2 besitzen. PCA-Polypeptide sind zur Aktivierung von Protein C in der Lage, sind aber weitgehend unfähig, Fibrinogen zu spalten. Unsere experimentellen Studien an Tieren weisen überraschend nach, dass selbst restliche Spiegel der prokoagulatorischen Aktivität im PCA gut vertläglich sind und nicht zu irgendwelchen Hinweisen einer disseminierten intravasalen Koagulation oder anderen klinisch unerwünschten prokoagulatorischen Responses führen. Wir waren überdies unerwartet dazu in der Lage, PCA zu definieren, denen es in unserem Assay an jeglicher nachweisbarer prokoagulatorischer Aktivität mangelt, die aber noch zu einer erheblichen Protein C-Aktivierung fähig sind. Eine erfindungsgemäße Ausführungsform umfasst folglich die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Dosis eines PCA an einen Patienten mit Bedarf an einer antikoagulatorischen Therapie.

[0027] In einer Erweiterung der vorstehenden Ausführungsform wird ein PCA hergestellt und verabreicht, dessen antikoagulatorische Aktivität durch einen prädeterminierten Thrombinhemmer, wie zum Beispiel Heparin und AT-III, im Wesentlichen hemmungsresistent ist. In einer Ausführungsform wird der PCA in vivo zusammen mit Heparin verabreicht. Heparin hemmt die prokoagulatorische Aktivität des endogenen Thrombins ohne Auswirkung auf die antikoagulatorische Aktivität des PCA, was in einer potenten antikoagulatorischen Wirkung resultiert. Diese erfindungsgemäße Ausführungsform weist einen zusätzlichen Vorteil insofern auf, dass erwartet wird, dass der verabreichte PCA gegen die AT-III-Heparin-Clearance in vivo resistent ist und folglich eine längere biologische Halbwertzeit aufweist.

[0028] In anderen Ausführungsformen sind PCAs bereitgestellt, die eine reduzierte proteolytische Aktivität gegenüber dem Thrombozyten-Thrombinrezeptor aufweisen und folglich keine Thrombozyten in therapeutischen Dosen aktivieren. Es werden PCAs bereitgestellt, die eine EC50 zur Stimulation der Thrombozytenaggregation von größer als 10 nM, im Allgemeinen größer als 20 nM aufweisen. EC50, die größer als die des Wildtyp-Thrombins sind, reduzieren oder eliminieren nachweislich die Thrombozytenaggregation durch den PCA, wenn der PCA in Dosen angewendet wird, die zur Aktivierung von Protein C fähig sind.

[0029] Eine zweite Gruppe erfindungsgemäßer neuer Polypeptide wird als „Fibrinogenggerinnungsproteine" oder „FCP" bezeichnet. Diese Polypeptide besitzen ein Verhältnis von antikoagulatorischer Aktivität zu prokoagulatorischer Aktivität von weniger als 0,5. Diese NPs enthalten Mutationen in den Protein C-aktivierenden Domänen von Thrombin, welche die antikoagulatorische Aktivität des sich ergebenden Polypeptids auf weniger als ca. die Hälfte der des Wildtyp-Thrombins reduzieren, aber die Fähigkeit zum Koagulieren des Fibrinogens beibehalten. Diese Polypeptide sind zum Beispiel in der Diagnostik, bei Präparationsverfahren und für hämostatische chirurgische Gegenstände nützlich. Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform umfasst die Verabreichung eines FCP in einer therapeutisch wirksamen Dosis an einen Patienten mit Bedarf an einer prokoagulatorischen Therapie.

[0030] Insofern, dass eine vollständige Offenbarung („enabling disclosure") eines FCP oder eines PCA in der Literatur aus dem Stand der Technik erschienen ist, sind solche Polypeptide aus dem Stand der Technik in den vorstehenden erfindungsgemäßen therapeutischen Verfahren nützlich.

[0031] Folglich wird gemäß einem ersten erfindungsgemäßen Aspekt ein proteolytisch aktives neues Polypeptid (NP) bereitgestellt, das mindestens eine ca. 80%ige Aminosäuresequenz-Homologie mit Bezugssequenzthrombin aufweist und ein Verhältnis von Protein C-aktivierender Aktivität zu Fibrinogengerinnungsaktivität aufweist, das ca. um Zweifache größer als das für Bezugssequenzthrombin ist, worin mindestens ein Aminosäurerest für mindestens einen der folgenden Thrombin-Aminosäurereste substituiert wurde, oder mindestens einer der folgenden Thrombin-Aminosäurereste deletiert wurde, oder ein Aminosäurerest unmittelbar benachbart zu mindestens einem der folgenden Thrombin-Aminosäurereste insertiert wurde: W50, D51 R93, E94, R98, D122, R123, E124, S128, Q131, E169, K174, D175, S176, T177, D183, D193, K196, A200, N216, W227, E229, D232, R233, D234, G235, K236, Y237, F239 oder W249, jedoch vorausgesetzt, dass das NP nicht Thrombin K174E oder Thrombin des-P48P49W50 darstellt.

[0032] In weiteren erfindungsgemäßen Aspekten ist auch eine das NP kodierende Nukleinsäure, ein die Nukleinsäure umfassender replizierbarer Vektor, eine den Vektor umfassende rekombinante Zelle und ein Verfahren, umfassend das Kultivieren der Zelle und Rückgewinnung des NP aus der Zellkultur bereitgestellt.

[0033] Es ist auch eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitgestellt, welche ein proteolytisch aktives NP zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

[0034] In einem noch weiteren erfindungsgemäßen Aspekt ist eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Anwendung in einem Verfahren zur Behandlung thrombotischer Erkrankungen oder Zustände bereitgestellt,

umfassend eine therapeutisch wirksame Menge eines proteolytisch aktiven NP und proteolytisch aktiven NP zur Anwendung in der Therapie oder zur Anwendung bei der Behandlung thrombotischer Erkrankungen oder Zustände.

[0035] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist in einem weiteren Aspekt auch die Verwendung eines proteolytisch aktiven NP zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung thrombotischer Erkrankungen oder Zustände.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0036] Fig. 1 erläutert die Nukleotidsequenz für DNA, kodierend das Bezugssequenzthrombin (auf das auch als auf Wildtyp-Thrombin verwiesen wird), seine komplementäre Sequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz des Bezugssequenzthrombins (Sadler-System).

[0037] **Fig.** 2A und 2B vergleichen die Aktivitäten von rekombinantem humanem Wildtyp-Thrombin (**Fig.** 2A) und dem K52A-PCA (**Fig.** 2B) in Kaninchen. Diese Studie zeigt, dass das neue Polypeptid im Vergleich zu humanem Wildtyp-Thrombin keine signifikante Reduktion des zirkulierenden Fibrinogens herbeiführt, aber zur Induktion von Antikoagulation, wie anhand der aktivierten PTT-Bestimmung gemessen, fähig ist.

[0038] **Fig.** 3 zeigt, dass der K52A-PCA eine signifikante Halbwertzeit in vivo aufweist, die eine antikoagulatorische Aktivität für eine Dauer bis zu ca. 150 Minuten nach der Verabreichung verleiht.

[0039] **Fig.** 4 vergleicht die antikoagulatorischen Aktivitäten von zwei Dosen eines erfindungsgemäßen neuen Polypeptids (PCA-2, E229A-PCA) bei Cynomolgus-Affen.

[0040] **Fig.** 5 vergleicht die antikoagulatorischen Aktivitäten von zwei erfindungsgemäßen PCAs (K52A und E229A) bei Cynomolgus-Affen.

[0041] **Fig.** 6 erläutert die fortgesetzte Thrombomodulin-Abhängigkeit von zwei erfindungsgemäßen NPs, K52A und E229A.

[0042] **Fig.** 7 veranschaulicht die im Wesentlichen reduzierte Potenz zur Thrombozytenaktivierung von zwei der erfindgunsgemäßen NPs im Vergleich zum Wildtyp-Thrombin.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0043] Die erfindungsgemäßen neuen Polypeptide weisen eine Polypeptidsequenz auf, die mindestens eine ca. 80%ige Aminosäuresequenz-Homologie (im Allgemeinen mindestens ca. 90%ig und bevorzugt mindestens ca. 95%ig) mit Bezugssequenzthrombin aufweist, aber eine signifikante qualitative oder quantitative Eigenschaft besitzt, die das Bezugssequenzthrombin, wie hierin an anderer Stelle beschrieben, nicht besitzt.

[0044] „Homologie" ist als der prozentuale Anteil von Resten in einer Kandidaten-Aminosäuresequenz definiert, die mit den Resten im Bezugssequenzthrombin nach dem Aligning der beiden Sequenzen und gegebenenfalls Einführen von Gaps zum Erreichen der maximalen prozentualen Homologie identisch sind. Verfahren und Computer-Programme zum Alignment sind aus dem Stand der Technik überall bekannt. Ein Computer-Programm, das verwendet oder für die Zwecke der Bestimmung angepasst werden kann, ob eine Kandidatensequenz in diese Definition fällt, stellt „Align 2" dar, erstellt von Genentech, Inc., das am 10. Dezember 1991 mit der Gebrauchsdokumentation beim United States Copyright Office, Washington, DC 20559, angemeldet wurde.

[0045] Bei der Berechnung der Aminosäuresequenz-Homologie werden die Kandidaten- und Bezugssequenzen auf eine Weise aligned, die die maximale Anzahl an aligned Resten, mit Insertionen und Deletionen von Resten herbeiführt, die durch Gaps in den aligned Sequenzen dargestellt sind. So wird zum Beispiel berechnet, dass ein aus 120 Resten bestehendes Polypeptid, enthaltend ein Thrombin-Bezugssequenzfragment mit 100 Resten, das an seinem N-Terminus an eine heterologe Bakteriensignalsequenz mit 20 Resten, aber mit einer einzelnen Substitution im Thrombinfragment fusioniert ist, zu 99% homolog mit der Thrombin-Bezugssequenz ist, da die Sequenz des Fragments, mit Ausnahme einer Substitution eines einzelnen Restes und der N-terminalen Fusion der 20 Reste genau der maximal aligned Thrombin-Bezugssequenz entspricht. Wenn folglich der Alignment-maximierende Vergleich der Kandidaten- und Bezugssequenzen eine Insertion (oder Deletion) von einem oder mehr Aminosäurerest(en) zu erkennen gibt, dann bleiben diese Reste zum Zweck der Berechnung

der Homologie unberücksichtigt.

[0046] In einem anderen Beispiel versteht man unter der Bezeichnung „E202A NP", wie hierin verwendet, dass das so bezeichnete Polypeptid eine Alanin-Substitution an der B-Kettenstelle 202 des Thrombins, einschließlich jedwedes des Folgenden einschließt: eine mature humane Thrombin-B-Kette (A-kettenfrei), humanes Prothrombin, enthaltend sowohl eine A- als auch eine B-Kette, eine Fusion eines Bakterien-Polypeptids mit dem humanen B-Ketten-Thrombin oder eine Stelle mit 202-enthaltendem Fragment der humanen Thrombin-B-Kette, so lange jedes dieser Derivate die Fähigkeit beibehält, zur Bildung eines Gerinnsels Protein C zu aktivieren oder Fibrinogen zu spalten oder verarbeitet werden kann, um dazu in der Lage zu sein. Fragmente der A- oder B-Ketten des Thrombins, insbesondere der B-Kette, sind auch eingeschlossen, wiederum vorausgesetzt, dass das Polypeptid in seiner Ganzheit mindestens fähig ist, ein Gerinnsel zu bilden, Protein C zu aktivieren oder Fibrinogen zu spalten. Die Thrombinfragmente liegen in einem Bereich von ca. 10, 20, 30, 50, 100 oder mehr Resten. NPs, die mehr als eine Substitution in der Thrombinsequenz enthalten, schließen im Allgemeinen auch die intervenierende Thrombinsequenz ein.

[0047] Die Analyse der Homologie basiert auf einer oder mehr der Sequenzen, die der zum Exprimieren des NP verwendeten Nukleinsäure, der Sequenz des als ersten in vitro hergestellten Produktes, oder der Sequenz nach jeder posttranslationalen Modifikation zugeschrieben werden. Wenn folglich die Bezugs- und Kandidatensequenzen beim Exprimieren identisch sind, ein Glutaminrest aber später zu Glutaminsäure desaminiert wird, ist der erste Kandidat 100%ig homolog, während dies bei der desaminierten Sequenz nicht der Fall ist.

[0048] Für die Zwecke hierin ist „prokoagulatorische Aktivität" als die Aktivität definiert, die anhand des Fibrinogengerinnungsassays von Beispiel 2.3 bestimmt und zur Normalisierung der Konzentration von NP und des entsprechenden Wildtyp-Thrombins bereinigt wird.

[0049] Für die Zwecke hierin wird „antikoagulatorische Aktivität" als die Aktivität definiert, die anhand des Protein C-Aktivierungsassays von Beispiel 2.4 bestimmt und zur Normalisierung der Konzentration von NP und des entsprechenden Wildtyp-Thrombins bereinigt wird.

[0050] Die Konzentration von NP und Thrombin wird anhand von jeglichem geeignetem Assay bestimmt. Tabelle 1a nachstehend berichtet Ergebnisse, worin die Konzentrationen von NP und Thrombinproteinen aus der amidolytischen Aktivität gefolgert werden. Ein Immunassay ist jedoch für diesen Zweck auch zufriedenstellend. So kann zum Beispiel immobilisiertes PPAK zum Capturing von NP und Thrombin verwendet werden, und die gebundenen Proteine mittels eines markierten gegen Thrombin gerichteten Antikörpers nachgewiesen werden. Wenn das NP oder Thrombin im Wesentlichen homogen ist, dann können makroskopische Protein-Assays, wie zum Beispiel das überall bekannte Lowry-Verfahren, zur Bestimmung ihrer Konzentration in der Testprobe verwendet werden.

[0051] Unter dem „entsprechenden" Wildtyp-Thrombin versteht man ein Protein, das weitgehend nach dem gleichen Verfahren wie der Analyt NP hergestellt wurde und die gleiche Sequenz wie das NP mit der Ausnahme aufweist, dass im NP gefundene Mutationen zurück zur Sequenz mutieren, die im Bezugssequenzthrombin gefunden wird.

[0052] In einigen Ausführungsformen besitzen neue Polypeptide (a) mindestens ein Immunepitop, das im Wesentlichen zur Kreuzreaktion mit einem gegen das Bezugssequenzthrombin gebildeten Antikörper fähig ist, (b) zwei mit den A- und B-Ketten des Bezugssequenzthrombin homologe Ketten, die durch eine einzelne Disulfidverknüpfung gebunden sind, (c) die Reste S205, H43 und D99 am aktiven Thrombinort, (d) gegebenenfalls ein kcat für Fibrinogen oder Protein C, das mindestens 20%, bevorzugt mindestens ca. 75% und am bevorzugtesten größer als das oder gleich dem der Bezugssequenz ist, (e) gegebenenfalls eine Km für Fibrinogen oder Protein C, die höchstens ca. 150 %, bevorzugt ca. 100 % und am bevorzugtesten höchstens ca. 50 % und bevorzugt mindestens ca. 75 %, von derjenigen der Bezugssequenz beträgt, (f) proteolytische Aktivität, wie anhand der S-2238-Hydrolyse gemessen, die größer als ca. 50 % des Bezugssequenzthrombins, bevorzugt größer als ca. 75 % und am bevorzugtesten größer als ca. 90 % des Bezugssequenzthrombins ist und/oder (g) das im Wesentlichen keine breitere Substratspezifität als das Bezugssequenzthrombin besitzt, das z. B. zum Spalten humaner Proteine mit Ausnahme der nativen Thrombinsubstrate in vivo bei einer Rate von nicht mehr als ca. 150 % und bevorzugt nicht mehr als 120 % der Bezugssequenz fähig ist.

[0053] Der erfindungsgemäße PCA besitzt in der Regel (a) prokoagulatorische Aktivität, die gleich der oder weniger als ca. 50, 25, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 oder 1 % der des Bezugssequenzthrombins ist, (b) ein Verhältnis von antikoagulatorischer Aktivität zu prokoagulatorischer Aktivität, die im Vergleich zu Bezugssequenz-

thrombin größer als ca. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 25 oder 50 ist und (c) antikoagulatorische Aktivität, die gleich der oder größer als ca. 5, 10, 15, 25, 50, 75 oder 100 % der antikoagulatorischen Aktivität des Bezugssequenzthrombins ist.

[0054] Das erfindungsgemäße FCP besitzt in der Regel (a) antikoagulatorische Aktivität, die gleich der oder weniger als ca. 50, 25, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 oder 1 % der des Bezugssequenzthrombins ist, (b) ein Verhältnis von antikoagulatorischer Aktivität zu prokoagulatorischer Aktivität, die im Vergleich mit dem Bezugssequenzthrombin weniger als 0,5; 0,25; 0,15; 0,10; 0,09 oder 0,08 ist und (c) prokoagulatorische Aktivität, die gleich der oder größer als ca. 5, 10, 15, 25, 50, 75 oder 100 % der prokoagulatorischen Aktivität des Bezugssequenzthrombins ist.

[0055] Die erfindungsgemäßen neuen Polypeptide umfassen Substitutionen für Deletionen oder Insertionen von jedwedem Aminosäurerest, der sich unmittelbar benachbart zu jedweder der in Tabelle 1 oder 1b nachstehend gezeigten Orte von Aminosäureresten der Bezugssequenz befindet. Tabelle 1 erläutert die Ergebnisse einer Studie, in der Thrombinreste mit Alanin substituiert wurden. Bei Substitutions-NPs handelt es sich um diejenigen, bei denen mindestens ein Aminosäurerest in der Bezugssequenz entfernt und eine unterschiedliche Aminosäure an der gleichen Position anstelle dessen insertiert wurde. Die Substitutionen können einzeln sein, wobei nur eine Aminosäure im Molekül substituiert wurde, oder sie können mehrfach sein, wobei zwei oder mehr Aminosäuren an zwei oder mehr Thrombinorten substituiert wurden. Die Spalten von Tabelle 1, von links nach rechts, erläutern unsere Code-Nummer, die substituierten Reste, zwei Spalten mit S2238-Hydrolysedaten (ein Maß der proteolytischen Aktivität von Thrombin und ein Beleg für die durch die Substitution herbeigeführte Konformationsdisruption), Fibrinogengerinnung (ein Maß der prokoagulatorischen Aktivität), Protein C-Aktivierng (ein Maß der antikoagulatorischen Aktivität), das Verhältnis von Protein C-Aktivierung zu Fibrinogengerinnungsaktivität und Heparin-abhängige AT-III-Hemmung (ein Maß der Fähigkeit des NP, sich der Inaktivierung durch AT-III in Gegenwart von Heparin zu widersetzen). In unserem System konnte die Expression von NPs Mt3 und Mt37c nicht nachgewiesen werden.

TABELLE 1

NPs Einheit	Reste substituiert	Chymo-trypsinogen	Spez. amidolytische Aktivität Slot-Blot	Spez. amidolytische Aktivität Western-Blot	Fibrinogen-Gerinnung (FC)	Protein C-Aktivierung (PA)	PA/FC	Heparin-abhängige ATIII-Hemmung
Wildtyp	mit Alanin	Nummerierung	Wildtyp (%)	Wildtyp (%)	Wildtyp (%)	Wildtyp (%)		Restliche Aktivität (%)
			99,09	100,00	100,00	100,00	1,00	18,15
Mt1	S4a, E6a, D8a	1E, 1C, 1A	281,58	58,32	165,45	93,07	0,56	
Mt2	K17a, K18a, S19a	9, 10, 11	104,78	99,27	84,78	96,94	1,14	
Mt3	K23a, R26a, E27a	14A, 14D, 14E	-	-	-	-	-	
Mt3a	K23a	14A	111,94	91,46	110,54	87,39	0,79	
Mt3b	R26a	14D	96,42	79,02	92,48	99,36	1,07	
Mt3c	E27a	14E	61,87	70,23	46,34	59,74	1,29	
Mt4	E30a, D34a	14H, 14L	96,97	93,86	80,08	102,71	1,28	
Mt5	E3, D6	18, 21	101,61	93,44	85,57	97,23	1,14	
Mt6	R20	35	136,11	92,16	79,95	67,73	0,85	
Mt7	K21	36	92,13	90,77	30,91	14,24	0,46	
Mt8	S22, Q24, E25	37, 38, 39	129,96	90,30	158,49	11,85	0,07	
Mt8a	S22	37	109,65	69,36	74,82	47,90	0,64	
Mt8b	Q24	38	122,15	70,13	135,51	12,54	0,09	
Mt8c	E25	39	101,06	81,87	119,98	104,42	0,87	
Mt9	D35	49	233,65	92,52	133,46	112,81	0,85	
Mt10	W50, D51	60D, 60E	43,73	76,57	12,68	24,98	1,97	
Mt10a	W50	60D	49,37	71,40	5,15	35,56	6,90	
Mt10b	D51	60E	110,80	75,17	96,50	69,08	0,72	
Mt11	K52	60F	122,22	85,22	38,17	134,70	3,53	
Mt12	N53, T55	60G, 60I	76,22	70,51	42,60	99,58	2,34	
Mt13	N57, D58	62, 63	83,94	90,14	47,90	71,77	1,50	
Mt13a	N57	62	96,64	92,93	75,17	100,14	1,33	
Mt13b	D58	63	93,34	71,98	58,11	87,75	1,51	
Mt14	K65	70	110,97	100,76	1,85	5,64	3,04	
Mt14.5	H66	71	55,45	103,45	2,00	12,30	6,14	
Mt15	R68	73	99,53	78,01	20,25	34,12	1,68	
Mt16	T69	74	120,84	107,33	77,04	58,26	0,76	
Mt17	R70A	75	108,39	93,34	77,51	14,01	0,18	
Mt17a	R70E	75	105,69	95,31	76,86	63,29	0,82	

NPs Einheit	Reste substituiert	Chymo-trypsinogen	Spez. amidolytische Aktivität Slot-Blot	Spez. amidolytische Aktivität Western-Blot	Fibrinogen-Gerinnung (FC)	Protein C-Aktivierung (PA)	PA/FC	Heparin-abhängige ATIII-Hemmung
Wildtyp	mit Alanin	Nummerierung	Wildtyp (%)	Wildtyp (%)	Wildtyp (%)	Wildtyp (%)		Restliche Aktivität (%)
Mt17b	R68, R70	73, 75	109,32	69,25	6,70	13,31	1,99	
Mt18	Y71	76	87,95	102,03	0,31	5,28	17,11	
Mt19	R73	77A	91,74	99,34	16,65	26,38	1,58	
Mt20	N74, K77	78, 81	127,70	124,90	10,59	12,92	1,22	
Mt20a	N74	78	94,97	86,47	59,33	82,47	1,39	
Mt20b	K77	81	80,46	82,47	27,05	12,71	0,47	
Mt21	E82, K83	86, 87	124,83	139,61	71,83	62,45	0,87	
Mt22	R89, R93, E94	93, 97, 97A	142,67	95,11	54,92	61,10	1,11	59,24
Mt22.5	R98	101	186,13	46,67	124,06	62,50	0,50	
Mt23	K106, K107	109, 110	107,35	102,01	13,15	31,42	2,39	
Mt23a	K106	109	86,92	93,24	50,25	72,35	1,44	
Mt23b	K107	110	106,96	92,38	46,93	44,92	0,96	
Mt24	D113	116	122,36	90,97	80,15	88,41	1,10	
Mt25	D122, R123, E124	125, 126, 127	92,57	71,47	84,21	84,44	1,00	
Mt26	S128, Q131	129B, 131	75,74	109,30	85,40	89,80	1,05	
Mt27	K145, T147, W148	145, 147, 148	111,11	98,07	65,81	84,40	1,28	
Mt28	T149, N151	149, 149B	81,88	98,90	74,36	76,63	1,03	
Mt29	K154	149E	88,57	87,07	118,76	95,47	0,80	
Mt30	S158	153	86,86	92,30	97,96	97,50	1,00	
Mt31	E169, K174, D175	164, 169, 170	111,22	205,21	43,97	69,56	1,58	32,86
Mt32	R178, R180, D183	173, 175, 178	61,62	58,44	90,35	102,37	1,13	56,52
Mt33	D193, K196	186A, 186D	99,65	108,75	28,87	60,27	2,09	
Mt34	E202	192	40,33	25,40	37,22	93,81	2,52	
Mt35	N216, N217	204B, 205	177,29	92,87	41,64	77,56	1,86	
Mt36	E229, R233, D234	217, 221, 222		0,75	0,00	0,00		
Mt36a	E229	217	42,70	23,73	0,58	13,22	22,91	
Mt36b	R233	221	75,90	83,93	2,31	25,16	10,87	
Mt36c	D234	222	51,82	75,33	27,37	59,64	2,18	

NPs Einheit	Reste substituiert	Chymo-trypsinogen	Spez. amidolytische Aktivität Slot-Blot	Spez. amidolytische Aktivität Western-Blot	Fibrinogen-Gerinnung (FC)	Protein C-Aktivierung (PA)	PA/FC	Heparin-abhängige ATIII-Hemmung
Wildtyp	mit Alanin	Nummerierung	Wildtyp (%)	Wildtyp (%)	Wildtyp (%)	Wildtyp (%)		Restliche Aktivität (%)
Mt37	R245, K248, Q251	233, 236, 239		0,73	0,00	0,00		
Mt37a	R245	233	135,96	26,22	72,57	70,39	0,97	
Mt37b	K248	236	143,41	73,41	76,89	76,86	1,00	
Mt37c	W249	237	-	-	-	-	-	
Mt37d	Q251	239	105,24	96,55	60,45	68,79	1,14	
Mt38	K252, D255, Q256	240, 243, 244	92,80	94,98	65,07	63,74	0,98	

[0056] Den hervorstechendsten Parameter in Tabelle 1 stellt das PA/FC-Verhältnis dar. Je mehr dieses Verhältnis von 1,0 variiert, um so größer ist die Segregation der prokoagulatorischen und PC-aktivierenden Eigenschaften der Mutanten. Die mit dem höchsten arithmetischen Wert sind insbesondere nur für den Zweck der PC-Aktivierung bestimmt, während die mit dem niedrigsten Wert nur für den Zweck der prokoagulatorischen Funktion bestimmt sind. Es ist jedoch im erfindungsgemäßen Umfang, zusätzlich zu jedweden Aminosäurerest mit Ausnahme von Alanin, an den Orten von Tabelle 1 z. B. einen der nachstehend offenbarten 20 natürlich vorkommenden Reste zu substituieren. Zu optimalen antikoagulatorischen therapeutischen Verwendungszwecken sollten die PC-aktivierenden Fähigkeiten des NP, ungeachtet des PA/FC-Verhältnisses, mindestens ca. 5 %, gewöhnlich 10 %–30 % des Bezugssequenzthrombins betragen, so dass man gewährleisten kann, dass eine ausreichende Aktivität des Enzyms zum Ausüben eines physiologischen oder diagnostischen Effekts vorhanden ist. Die absolute Fibringerinnungsaktivität des PCA sollte idealerweise außerdem weniger als ca. 10 % des Bezugsthrombins, im Allgemeinen weniger als ca. 5 % und im Allgemeinen weniger als ca. 3 % und bevorzugt weniger als ca. 1 % des Wildtyps betragen, um bei der Gewährleistung der klinischen Sicherheit zu helfen. Es ist nicht notwendig, dass das NP den gleichen Spiegel der Protein C-aktivierenden Aktivität als Bezugssequenzthrombin beibehält, weil der niedrigeren Potenz bei der Therapie durch einfache Verabreichung einer größeren Menge des Enzyms ohne weiteres begegnet werden kann. Besonders attraktiv sind in dieser Hinsicht die E229- and R233-PCAs.

[0057] Außer den in Tabelle 1 gezeigten Alanin-Substitutionen fällt die Substitution anderer Reste in die Thrombin-Bezugssequenz in diesen erfindungsgemäßen Umfang. Die in die Sequenz insertierten Reste stellen im Allgemeinen natürlich vorkommende Aminosäuren, häufig G, A, Y, V, L, I, S, T, D, E, Q, C, M, N, F, P, W, K, R oder H (unter Verwendung eines üblichen einbuchstabigen Codes; EP 323,149) dar. Geeignete Reste zur Insertion schließen auch Hydroxyprolin, β-Hydroxyasparaginsäure, γ-Carboxyglutaminsäure, Hydroxylysin oder Norleucin ein, die als Alternativen für ihre „Namensvettern" eingesetzt werden können.

[0058] Diese Substitutionen können insofern konservativ sein, dass der substituierende Rest strukturelle oder funktionelle Ähnlichkeit mit dem substituierten Rest aufweist. Andere Substitutionen sind insofern weniger konservativ, indem sie einen Austausch zwischen verschiedenen strukturellen oder funktionellen Resteklassen konstituieren. Für die Zwecke hierin sind diese Klassen wie folgt: 1. Elektropositiv: R, K, H; 2. Elektronegativ: D, E; 3. Aliphatisch: V, L, I, M; 4. Aromatisch: F, Y, W; 5. Klein: A, S, T, G, P, C; 6. Geladen: R, K, D, E, H; 7. Polar: S, T, Q, N, Y, H, W; und 8. Klein, hydrophil: C, S, T. Intergruppen-Substitutionen weisen im Allgemeinen größere Wirkungen auf die Proteinfunktion als konservative (Intraklassen)-Substitutionen auf. Folglich befindet sich die Einführung konservativer Substitutionen in die Stellen von Tabelle 1 oder 1b und, wenn die Ergebnisse nicht zufriedenstellend sind, eine Einführung nicht konservativer Substitutionen an diesen Stellen, insbesondere im erfindungsgemäßen Umfang. Prolin, -Glycin- und Cystein-Substitutionen oder -Insertionen in die Sequenz sind in der Regel jedoch nicht bevorzugt.

[0059] Gegenstand dieser Erfindung ist der Erhalt von NPs, die bei Menschen minimal immunogen oder nicht immunogen sind. In dieser Beziehung sind Substitutionen oder Insertionen von K- oder R-Resten in die Se-

quenz nicht bevorzugt.

[0060] Substitutionen werden bevorzugt an in Tabelle 1aufgelisteten Orten vorgenommen, wo die Alanin-Substitution zu einem PA/FC-Verhältnis führt, das größer als 2,0 oder weniger als 0,5 (W50, K52, E229, R233, D234 und R98) ist.

[0061] Vier dieser Orte werden zur Sättigungsmutagenese (E229, R233, W50 und K52) ausgewählt. Außerdem wurden Doppel- und Dreifachmutationen abwechselnd in die Orte W50, K52, R233, E229, E202, K106, K107, D193 und K196 eingeführt. Diese NPs wurden hergestellt und in einer rekombinanten Zellkultur auf die gleiche Weise wie die Mutanten von Tabelle 1 exprimiert und dann auf Expressionsspiegel, amidolytische Aktivität, aPC und die Fibrinogengerinnungsaktivität analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1a („INF" = annähernde Unendlichkeit; NP-Leerwerte wurden bisher noch nicht charakterisiert).

TABELLE 1a

NPs Einheit	Expressionsspiegel Wildtyp (%)	Spez. amidolytische Aktivität Western-Blot Wildtyp (%)	Protein C-Aktivierung (PA) Wildtyp (%)	Fibrinogen-Gerinnung (FC) Wildtyp (%)	PA/FC-Verhältnis
S205A	83,50	0,26	0,01	0,00	
WT	100,00	100,00	100,00	100,00	1,00
W50A/K52A	24,50	94,90	77,57	6,87	11,28
W50A/E229A	55,50	7,28	1,45	0,00	INF
W50A/R233A	3,90	267,50	-0,13	0,00	0,00
K52A/E202A					
K52A/E229A	4,30	41,87	6,79		
K52A/R233A	14,40	94,29	18,50	0,00	INF
K52A/K106A/K107A	2,20	171,02	15,92		
K52A/D193A/K196A					

NPs Einheit	Expressionsspiegel Wildtyp (%)	Spez. amidolytische Aktivität Western-Blot Wildtyp (%)	Protein C-Aktivierung (PA) Wildtyp (%)	Fibrinogen-Gerinnung (FC) Wildtyp (%)	PA/FC-Verhältnis
E229A/R233A	45,00	10,90	0,57	0,00	INF
E229A	62,50	33,44	5,25	0,33	15,81
E229C	0,00				
E229D	45,00	185,00	10,21	0,00	INF
E229F	11,00	40,57	2,89	0,00	INF
E229G	100,00	3,48	-2,97	0,00	0,00
E229H					
E229I					
E229K	16,00	23,29	3,95		
E229L	22,50	79,20	44,62	20,98	2,13
E229M					
E229N	61,00	101,83	12,19		
E229P	113,00	6,26	1,84	0,00	INF
E229Q					
E229R					
E229S	30,00	52,91	25,83	0,53	48,75
E229T	16,00	56,36	14,37	5,32	2,70
E229V	16,00	58,25	9,16	12,62	0,73
E229W	20,00	34,57	29,05	0,00	INF
E229Y	8,50	38,17	33,43	0,00	INF
R233A	81,00	113,71	55,04	3,04	18,11
R233C	52,00	58,06	6,38	0,00	INF
R233D	75,00	84,93	15,20	0,00	INF
R233E	52,00	229,46	67,61	1,04	65,10
R233F	100,00	59,91	9,24	0,00	INF
R233G	50,00	110,77	10,25	0,87	11,76
R233H	96,00	94,96	25,15	4,59	5,48
R233I	77,50	73,22	31,36	6,27	5,00
R233K					
R233L	96,00	79,47	10,82	7,15	1,51
R233M	200,00	46,78	10,04	1,15	8,69
R233N	52,00	242,15	80,61	1,06	76,12
R233P	50,00	5,49	-0,74	0,00	0,00
R233Q	96,00	91,05	14,90	4,96	3,00
R233S	80,00	94,86	12,87	0,90	14,33
R233T	80,00	98,91	6,95	1,46	4,76

NPs Einheit	Expressionsspiegel Wildtyp (%)	Spez. amidolytische Aktivität Western-Blot Wildtyp (%)	Protein C-Aktivierung (PA) Wildtyp (%)	Fibrinogen-Gerinnung (FC) Wildtyp (%)	PA/FC-Verhältnis
R233V	50,00	122,85	28,02	23,15	1,21
R233W	0,00				
R233Y	106,00	27,46	-0,83	0,00	0,00
W50A	53,60	123,04	50,84	5,17	9,83
W50C	25,00	48,63	20,38	0,00	INF
W50D	32,46	220,03	9,99	7,64	1,30
W50E	36,36	185,62	9,30	0,00	INF
W50F	22,08	112,74	91,55	49,44	1,85
W50G	50,00	160,05	55,51	6,08	9,13
W50H	8,05	222,75	16,47	39,28	0,42
W50I					
W50K	82,72	65,39	61,38	3,27	18,77
W50L	60,00	172,05	103,19	10,97	9,41
W50M	50,00	149,44	81,72	14,06	5,81
W50N	3,90	1078,41	27,48	3,46	7,94
W50P	0,00				
W50Q	120,00	134,58	52,80	24,93	2,12
W50R	40,00	107,57	201,34	23,75	8,48
W50S	16,88	255,68	36,81	9,12	4,04
W50T	60,00	139,15	48,19	14,65	3,29
W50V	9,09	229,78	18,06	2,33	7,75
W50Y	40,00	184,77	195,64	65,05	3,01
K52A	41,50	125,60	151,70	48,77	3,11
K52C	40,00	8,92	5,17	0,00	INF
K52D	0,00				
K52E	0,00				
K52F	12,98	313,25	86,15	20,41	4,22
K52G	0,00				
K52H	155,00	64,46	153,40	31,27	4,91
K52I	4,00	483,02	225,74	144,68	1,56
K52L	26,40	134,75	216,98	170,79	1,27
K52M	50,00	51,07	70,05	65,38	1,07
K52N	32,00	47,56	72,77	28,69	2,54
K52P	0,00				
K52Q	93,50	74,21	85,14	64,08	1,33
K52R	480,00	41,54	22,31	9,47	2,36

NPs Einheit	Expressionsspiegel Wildtyp (%)	Spez. amidolytische Aktivität Western-Blot Wildtyp (%)	Protein C-Aktivierung (PA) Wildtyp (%)	Fibrinogen-Gerinnung (FC) Wildtyp (%)	PA/FC-Verhältnis
K52S	48,00	71,61	167,01	48,06	3,48
K52T	86,00	66,63	140,99	70,48	2,00
K52V	70,00	72,06	210,17	87,30	2,41
K52W	41,00	124,20	30,24	6,46	4,68
K52Y	26,40	51,60	73,37	36,08	2,03

[0062] Die Daten in Tabelle 1a wurden wie in Tabelle 1 bereitgestellt erhalten, und dann wurden die Aktivitäten (Protein C-Aktivierung und Fibrinogengerinnung) durch die amidolytische Aktivität, außer denen in Tabelle 1a, wenn die spezifische amidolytische Aktivität von NP weniger als 75 % des entsprechenden Wildtyp-Thrombins betrug, normalisiert; die NP-Aktivitätswerte für die Protein C-Aktivierung und die Fibrinogengerinnung wurden durch Multiplizieren mit der entsprechenden amidolytischen Aktivität des NP (ausgedrückt als % des Wildtyps) bereinigt. Es sollte zur Kenntnis genommen werden, dass sich die Zahlenwerte für die PA- und FC-Aktivität zwischen Tabellen 1 und 1a für in beiden Tabellen erscheinende NPs unterscheiden. Hierbei handelt es sich um das Ergebnis von zwei Faktoren. Erstens, die Ergebnisse in Tabelle 1a stellen im Allgemeinen das Ergebnis von nur 1 oder 2 Wiederholungsassay(s) dar, wohingegen die von Tabelle 1auf bis zu 4 Wiederholungen basieren. Da der Variationskoeffizient von den PA- und FC-Assays im Bereich von ca. 10–20 % liegt, kann erwartet werden, dass die Ergebnisse in Tabelle 1a von denen in Tabelle 1 für die gleichen NPs variieren. Zweitens, die Ergebnisse in Tabelle 1a werden für die auf dem Western-Blotting basierende Proteinkonzentration bereinigt, wenn die amidolytische Aktivität, wie vorstehend beschrieben, weniger als 75 % des Wildtyp-Thrombins beträgt. Dies ermöglicht einen sinnvolleren Vergleich unter den verschiedenen NPs in Tabelle 1a, da die Ergebnisse auf die, wie durch den Western-Blot bestimmt, gleiche Proteinkonzentration bereinigt werden. Die Bereinigung war mit den NPs von Tabelle 1 größtenteils unnötig, weil die Alanin-Mutanten den größten Teil der proteolytischen Aktivität des Bezugssequenzthrombins beibehielten.

[0063] Bemerkenswerte PCAs wurden insbesondere in Tabelle 1a identifiziert; die Daten deuten auf die Retention von mindestens etwas aPC-Aktivität, weitgehend aber die vollständige Elimination nachweisbarer FC-Aktivität in unserem Assay (600 Sekunden ohne Gerinnung) hin. Bei diesen handelte es sich um die Doppelmutanten W50A,E229A und E229A,R233A; und die Einzelmutanten E229D (die sich in bemerkenswerter Weise nur vom Wildtyp-Enzym durch eine einzelne Methylengruppe unterscheiden), E229F, E229S, E229W, E229Y, R233E, R233G, R233M, R233N, R233S, W50E, W50K, W50C und K52C.

[0064] Die PCAs von Tabellen 1 und 1a sind nur für NPs repräsentativ, in denen Thrombinreste mutiert sind, um besonders sichere und potente PCAs herzustellen. Andere solcher PCAs werden ohne weiteres anhand der hierin beschriebenen Verfahren oder anderen vom Durchschnittsfachmann erkannten Verfahren identifiziert. So werden zum Beispiel multiple Variationsorte durch die Additivität von Aktivitäten ausgewählt und andere vielversprechende Orte, die anhand des Alanin-Scannings identifiziert werden, werden zur Auswahl der optimalen Modifikation der Sättigungsmutagene unterzogen. Da erkannt werden wird, dass andere NPs mit den gewünschten prokoagulatorischen und antikoagulatorischen Eigenschaften erfolgreich identifiziert werden können, wäre ihre Identifikation und Isolation lediglich eine Angelegenheit der Routineexperimentierung.

[0065] Es ist aus Tabellen 1 und 1a ersichtlich, dass E229 und R233 wichtige Reste für PCAs darstellen. Die Modifikation von Thrombinresten in van der Waals-Kontakt mit E229 oder R233, Resten in der Nähe von E229 oder R233 und Resten in Kontakt mit der Domäne, enthaltend R233 und die Schleife, die E229 enthält, kann sich auf die Fibringerinnung und Protein C-Aktivierung auf eine Weise auswirken, die zur direkten Substitution von E229 oder R233 durch Veranlassung der Änderung der Stellung oder Richtung von E229 oder R233 oder durch Unterbrechung von in der Regel mit E229 oder R233 assoziierten intramolekularen Interaktionen analog ist. Zur Identifikation von Resten, deren Substitution die Substitution von E229 nachahmen könnte, wurden die Reste in enger Annäherung zu E229 in der dreidimensionalen Struktur von Thrombin (Bode, W. et al, EMBO J. 8:3467:3475 (1989)) kartiert. Reste, deren Ca sich innerhalb von einer Ca von E229 umgebenden 10-Å-Sphäre befinden, sind in der nachstehenden Tabelle 1b aufgelistet.

TABELLE 1B

Rest	Distanz von Cα bis Cα E229 (Å)	Mutation in Tabelle 1	PA/FC
E146	10,06	-	
S176	9,93	-	
T177	8,28	-	
R178	10,31	Mt 32	1,13
I179	10,03	-	
D199	10,91	-	
A200	10,90	-	
C201	9,74	-	
E202	10,06	Mt 34	2,52
W227	7,27	-	
G228	3,82	-	
G230	3,73	-	
C231	6,69	-	
D232	8,88	-	
R233	7,94	Mt 36b	10,87
D234	10,64	Mt 36c	2,18
G235	10,41	-	
K236	6,96	-	
Y237	7,75	-	
G238	7,88	-	
F239	9,32	-	

[0066] Bei einem der durch diese Analyse unabhängig identifizierten Ort handelt es sich um R233, von dem durch die in Tabelle 1 berichteten Ergebnisse nachgewiesen wird, dass er eine signifikante Rolle bei der PCA-Spezifität spielt. Drei andere Orte wurden im in Tabelle 1 berichteten Original-Screen berichtet, und alle drei von ihnen ergaben ein PA/FC-Verhältnis von größer als 1, wodurch wiederum die entscheidende Rolle dieser Domäne beim Segregieren der Substratspezifität des Thrombins in Richtung der aPC-Aktivität bestätigt wurde. Demgemäß liegt die Herstellung von NPs im erfindungsgemäßen Umfang, bei denen der Rest an jedwedem einen oder mehr der in Tabelle 1 geplanten Reste unmittelbar benachbart dazu insertiert, substituiert oder deletiert wird. Von besonderem Interesse sind insbesondere Reste, die innerhalb von 10 Ångstrom des E229 Cα oder R233 Cα, und noch mehr die, die innerhalb von 8 Ångstrom liegen. C201 und C231 sind jedoch keine bevorzugten Orte, da sie zur Bildung einer Disulfid-Bindung in nativem Thrombin gepaart sind. G228, G230, G235 und G238 sind ebenfalls nicht bevorzugt. Bevorzugte Reste in Tabelle 1b zur Substitution, Insertion oder Deletion sind demgemäß S176, T177, W227, D232, K236, Y237 und G239. Substitutionen für die Reste von Tabelle 1b sind gegenüber Deletionen oder Insertionen bevorzugt und werden aus Gliedern der Klasse mit Ausnahme des einen hergestellt, zu dem der native Rest gehört, oder die Substitutionen können aus anderen Gliedern aus der Klasse der nativen Reste bestehen. Im Allgemeinen werden Cystein, Prolin und Glycin jedoch nicht anstelle von irgendwelchen Resten in Tabelle 1b substituiert. Die 10-Ångstrom-Reste für R233 überlappen viele der proximalen E229-Reste und zusätzliche, die nicht überlappen, werden ohne weiteres unter Verwendung der dreidimensionalen Struktur von Bode identifiziert (op. cit.).

[0067] PCA-Polypeptide sind im Allgemeinen Polypeptide, in denen Reste an einem oder mehr der folgenden Thrombinorte für die entsprechenden Bezugssequenzreste substituiert wurden: K52, W50, E229, D234 und R233. Die unabhängig bevorzugten Reste K52 und/oder K196 werden mit einem natürlich vorkommenden Aminosäurerest, wie z. B., G, A, V, L, I, S, T, D, N, E, Q, C, M, F, Y, P, W, R oder H substituiert. K52 wird gewöhnlich mit Cystein, Glycin, Alanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Asparagin oder Glutamin, in einigen Fällen mit jedwedem natürlich vorkommenden Aminosäurerest mit Ausnahme von Glutaminsäure, oder in anderen Ausführungsformen mit einem Rest mit Ausnahme von Glutaminsäure oder Asparaginsäure substituiert,

während K196 in der Regel mit Alanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin oder Histidin subsitutiert wird.

[0068] W50 wird bevorzugt mit einem natürlich vorkommenden Aminosäurerest, wie z. B. G, A, V, L, I S, T, D, E, Q, C, M, F, P, N, K, R, Y, oder H, in der Regel Cystein, Alanin, Phenylalanin, Lysin, Arginin oder Histidin substituiert.

[0069] R233 wird bevorzugt mit einem natürlich vorkommenden Aminosäurerest, z. B. G, A, V, L, I, S, T, W, D, Q, C, M, F, P, N, K, E, Y oder H, in der Regel Alanin, Lysin, Asparagin, Glutamin, Glutaminsäure, Threonin, Histidin oder Serin substituiert.

[0070] NPs, die Kombinationen aus dem Vorstehenden darstellen, befinden sich im erfindungsgemäßen Umfang. 2, 3, 4, 5 oder mehr Substitutionen aus dem Vorstehenden werden wie hierin definiert in das Thrombin eingeführt. Die Ergebnisse individueller Aminosäuresubstitutionen sind im Allgemeinen additiv, außer wenn die Reste mit jedem anderen direkt oder indirekt interagieren. Wir erwarten, dass zusätzliche PCAs aus mehrfachen Substitutionen bei Kombinationen der vorstehend beschriebenen wichtigsten Reste (W50, K52, D193, K196, E229, R233, D234) erhalten werden. Sie werden ohne weiteres unter Verwendung der nachstehend beschriebenen gleichen Verfahren zur Identifikation derjenigen mit verbesserten Eigenschaften, insbesondere einer verstärkten Reduktion der prokoagulatorischen Aktivität relativ zur antikoagulatorischen Aktivität gescreent. Sie schließen zum Beispiel E229,R233,D234; E229,R233; E229,D234; R233,D234; E229,K52; R233,K52; D234,K52; E229,R233,K52; E229,D234,K52; R233,D234,K52; E229,R233,D234,K52; W50,D58; W50,K52; W50,E229; W50,R233; W50,D234; W50,E229,R233,D234; W50,E229,R233; W50,E229,D234; W50,R233,D234; W50,E229,K52; W50,R233,K52; W50,D234,K52; W50,E229,R233,K52; W50,E229,D234,K52; W50,R233,D234,K52; W50,E229,R233,D234,K52 ein.

[0071] Beispielhafte Ausführungsformen von mehrfach substituierten NPs fallen in das Folgende (die Substitutionsklasse wird durch die die vorstehende Klassenkennnummer gekennzeichnet, z. B. bedeutet W50.3 W50 substituiert mit jedwedem von V, L, I oder M): W50.1,.2,.3,.5,.6,.7 oder .8,K52.2,.3,.4,.5,.6,.7 oder .8; W50.1,.2,.3,.5,.6,.7 oder .8,E229.1,.3,.4,.5,.6,.7 oder .8; K52.2,.3,.4,.5,.6,.7 oder .8,R233.2,.3,.4,.5,.6,.7 oder .8.

[0072] Spezielle mehrfach substituierte NPs sind W50F, Y oder H,E229D, N oder Q; W50F,Y oder H,R233K oder H; E229D, N oder QR233K oder H; W50A,K52A; W50A,E229A; W50A,R233A; K52A,D193A,K196A; K52A,E229A; K52A,K233A; E229L,R233E; E229L,R233N; E229L,W50K; E229L,K52W; E229A,W50L; E229L,W50M; R233E,W50G; R233E,W50K; R233E,W50K; R233E, W50L; R233E,W50M; R233E,W50R; R233E,W50T; R233E,K52W; W50L,K52A; W50L,K52W; und E229A,R233A.

[0073] Weitere beispielhafte mehrfach substituierte NPs sind aus dem Folgenden ausgewählt: K52G,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52A,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52V,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52L,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52I,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52S,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52T,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52D,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52N,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52E,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52Q,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52M,E229G; A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52F,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52Y,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52P,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52W,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52R,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; K52H,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, C, Q, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50G,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50A,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50V,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50L,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50I,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50S,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50T,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50D,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50N,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50E,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50Q,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50M,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50F,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50Y,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50P,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50K,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50R,E229G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K or H; W50H,E229G, A, V, I, L, S, T,

D, N, Q, C, M, F, Y, P, W, R, K oder H; W50G,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50A,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50V,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50L,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50I,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50S,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50T,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50D,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50N,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50E,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50Q,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50M,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50F,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50Y,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50P,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50K,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50R,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; W50H,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229G,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229A,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229V,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229L,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229I,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229S,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229T,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229D,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229N,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229Q,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229M,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229F,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229Y,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229P,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229K,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229R,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; E229H,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y, P, N, K, E oder H; und E229W,R233G, A, V, I, L, S, T, W, D, Q, C, M, F, Y; P, N, K, E oder H.

[0074] Im erfindungsgemäßen Umfang eingeschlossen sind NPs mit einer oder mehr Aminosäure(n), die unmittelbar benachbart zu einer Thrombin-Aminosäure an jedweder der in Tabelle 1, 1a oder 1b bezeichneten Positionen in der Bezugssequenz insertiert sind. Insertions-NPs weisen im Allgemeinen eine Polypeptidstruktur, umfassend die Sequenz NH_2-PP-A-$(X)_{n1}$-B-PP-COOH auf worin X den/die insertierten Rest(e) (der/die gleich oder verschieden sein kann/können) darstellt, n1 eine ganze Zahl darstellt, entweder A oder B die gekennzeichneten Orte zur Insertion der Reste darstellt und PP den Rest des NP oder eine Bindung am N- oder C-Terminus des NP darstellt. Beispiele schließen K52AA, R233RA, K52KA, K52AK, E229AE, E229EW, E229WE, E229EY, E229YE und E229EA (zu lesen in der N- zur C-terminalen Richtung) ein. Insertionen werden in der Regel innerhalb von ca. 10 Ångstrom von E229 und benachbart zu jedwedem Rest in Tabelle 1b gefunden. Insertionen schließen Thrombin oder Nichtthrombin-Polypeptide im Bereich von 1 bis ca. 1000 oder mehr Reste ein, obwohl diese in der Regel an den N- oder C-terminalen Enden der A- und/oder B-Ketten von NP eingeführt werden. Diese Polypeptide schließen Prothrombinsequenzen oder -fragmente davon (ob von Menschen oder Tieren), Antigensequenzen zur Immunaffinitätsreinigung der NP-Produkte aus der Zellkultur, Signalsequenzen und dergleichen ein, die nachstehend ausführlicher beschrieben werden.

[0075] Auch eingeschlossen im erfindungsgemäßen Umfang sind NPs, worin ein Glycosylierungsort eingeführt oder aus der Bezugssequenz entfernt wird, ob durch Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehr Aminosäurerest(en). Derartige Änderungen führen zur Installation oder Entfernung der Sequenz NXS oder NXT, worin X für jedweden Rest stehen kann. Asparagin kann folglich für jedweden Rest substituiert werden, der 2 Reste N-terminal zum Serin oder Threonin zum Einführen eines Glycosylierungsortes lokalisiert ist.

[0076] Auch eingeschlossen in den erfindungsgemäßen Umfang sind Deletions-NPs, d. h. NPs, worin ein oder mehr Aminosäurerest(e) der Bezugssequenz an der gekennzeichneten Stelle entfernt wurden, wobei flankierende Reste nun durch eine Peptidbindung auf übliche Weise miteinander verbunden werden. Jedweder der in Tabellen 1 oder 1b dargelegten Orte sind zur Deletion geeignet, obwohl die Deletion von P-, C- oder G-Resten im Allgemeinen nicht bevorzugt ist. Außerdem wird die Thrombin-A-Kette in einigen NP-Ausführungsformen optional vollständig deletiert. In den erfindungsgemäßen Ausführungsformen können Deletionen innerhalb von ca. 10 Ångstrom von E229 vorgenommen werden und schließen jedwede der Reste in Tabelle 1b, bevorzugt A200 ein.

[0077] Deletionen oder Insertionen sind in der Regel relativ klein, in der Größenordnung von 1 bis 10 Resten und im Allgemeinen nicht mehr als 2, obwohl Deletionen oder Insertionen recht groß sein können, wenn sie nicht in Anteilen der Bezugssequenz vorliegen, die gegebenenfalls für die prokoagulatorische oder antikoagulatorische Aktivität erforderlich sein können, oder die zusätzliche Sequenz an einem Punkt während des posttranslationalen oder dem Processing nach der Rückgewinnung entfernt werden soll. Die Anzahl der Reste, die teilweise deletiert oder insertiert werden, hängt davon ab, ob sie in sekundären strukturellen Komponenten,

wie zum Beispiel Helices oder Sheets (worauf nur 1 oder bevorzugt 2 Rest(e) insertiert oder deletiert werden) gefunden werden, oder sich in weniger strukturell begrenzten Domänen, wie zum Beispiel Schleifen, befinden, wo eine größere Anzahl von Resten, ohne übermäßige Störung der Thrombin-Struktur, deletiert oder insertiert werden können.

[0078] Auch eingeschlossen in den erfindungsgemäßen Umfang sind NPs, die Kombinationen aus Deletionen, Insertionen und/oder Substitutionen aufweisen. Eine Deletion aus einem einzelnen Rest ist in der Regel von einer Insertion in 1 bis ca. 3 Rest(en) des Deletionsortes begleitet; Deletionen größerer Domänen, die für die prokoagulatorische oder aPC-Aktivität gegebenenfalls nicht notwendig sind, brauchen von keiner Insertion begleitet zu sein.

[0079] Die erfindungsgemäßen NPs können der posttranslationalen kovalenten Modifikation unterliegen, wie z. B. Desamidierung von Asparagin oder Glutamin, oder Oxidation von Cysteinresten, und abwesender oder varianter Glycosylierung an N53 in Abhängigkeit von der zum Exprimieren der Varianten verwendeten Wirtszelle. NPs, die derartige Modifikationen enthalten, sind im erfindungsgemäßen Umfang eingeschlossen. Wenn N53 glycosyliert wird, wird es bevorzugt mit für Säugerzellen charakteristischen Kohlenhydraten glycosyliert, obwohl sie auch fungale (wie zum Beispiel Hefe) Glycosylierungsmuster tragen können. Eine für die Expression des NP aus Fibroblasten-, Nieren-, Lungen-, Haut-, Nerven-, Leber- oder Knochenmarkszellen oder Zelllinien, oder aus jedweder Säugerzelllinie, wie zum Beispiel CHO- oder embryonalen Nierenzellen charakteristische Glycosylierung ist zulässig.

[0080] Ein bedeutender Mechanismus der Thrombin-Clearance in vivo besteht in der Bildung eines Thrombin-AT-III-Komplexes, der größtenteils von Heparin-ähnlichen Molekülen auf der Zelloberfläche abhängig ist. Wir erwarten, dass die Mutation des Heparin-Bindungsortes von Thrombin die Heparinbindung verhindert und dadurch die Plasmahalbwertzeit des Proteins verlängert. Hierdurch wird klinisch die Proteinmenge reduziert, die zum Erreichen einer antithrombotischen Wirkung erforderlich ist. In dieser Ausführungsform ist der Heparin-Bindungsort mutagenisiert, damit das NP nicht mehr fähig ist, im Wesentlichen an Heparin zu binden. Dies wird durch Deletion, Substitution oder Insertion von einem oder mehr Rest(en) mindestens in der bekannten Heparin-Bindungsdomäne (einschließlich R89, R180, R245, K248 und K252) erreicht. Resistente NPs schließen Substitutionen oder Insertionen ein, die in der Einführung eines neuen O- oder N-verknüpften Glycosylierungsortes (NXS/T) in die Bindungsregion (zum Beispiel R180N) resultieren.

[0081] Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass zwei Mutanten, die jeweils dreifache Alanin- Substitutionen beinhalten, resistent gegen eine Heparin-vermittelte Hemmung durch AT-III waren, die im Vergleich zu 18 % für das Wildtyp-Thrombin eine größere als 50%ige Fibrinogengerinnungsaktivität in Gegenwart von Heparin aufwiesen. Einer dieser Mutanten, der eine simultane Substitution von R178, R180 und D183 beinhaltet, wies keine Reduktion der prokoagulatorischen oder antikoagulatorischen Aktivität auf. Optimale Mutanten werden durch Screening auf diejenigen identifiziert, die am resistentesten gegen die Heparin- vermittelte Hemmung, insbesondere in Gegenwart von Antithrombin III sind. Mutationen dieses Typs werden optional kombiniert mit vorstehend beschriebenen Variationen, wie z. B. denjenigen, die eine Reduktion der prokoagulatorischen Aktivität relativ zur antikoagulatorischen Aktivität aufweisen. Solche NPs werden in Kombination mit Heparin verabreicht, um eine potente antikoagulatorische Wirkung zu erreichen, wobei der antikoagulatorische Pfad durch das NP aktiviert und die prokoagulatorische Aktivität des endogenen Thrombins durch Heparin-vermittelte Hemmung durch AT-III gehemmt wird.

HERSTELLUNG UND AUSWAHL VON NPS

[0082] Optimale NPs, die eine ausgewogene Fibrinogengerinnung oder aPC, reduzierte Heparinhemmung, eine modifizierte Fähigkeit zum Spalten der Thrombozyten des Thrombinrezeptors, und andere erwünschte Eigenschaften aufweisen, werden durch das Screening von Kandidaten gegen die relevanten in-vitro-Assays, wie hierin beschrieben, dann gegebenenfalls das Testen an Tieren, gefolgt von der Bestimmung der Wirksamkeit an Thrombose- oder Blutungsmodellen identifiziert. Exogenes aPC kann als eine positive Kontrolle verwendet werden. Die ausgewählten NPs werden dann optional in Tiermodellen, bei denen gezeigt wurde, dass eine Infusion mit aPC wirksam war, wie z. B. an Kaninchen, Meerschweinchen, oder Pavian-Modellen mit septischem Schock oder Modellen mit arterieller Thrombose, direkt getestet. Die antikoagulatorische Potenz solcher NPs kann zusätzlich an kardiopulmonalen Bypass-Modellen getestet werden. Diese Assays sind üblich und im Stand der Technik weithin bekannt. Es würde zur Herstellung und Testen anderer NPs, mit Ausnahme der hierin spezifisch offenbarten, keiner übermäßigen Experimentierung bedürfen.

[0083] Die erfindungsgemäßen NPs werden anhand von aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren

hergestellt. Im Allgemeinen wird Nukleinsäure, die NP kodiert, mittels PCR, in vitro-Synthese, Klonieren oder Kombinationen der drei, einschließlich gegebenenfalls der ortsgerichteten Mutagenese von Thrombin-kodierender Nukleinsäure hergestellt. Sie wird in in vitro-Systemen oder in rekombinanten Wirtszellen exprimiert. Ein Verfahren zur Expression stellt die Ribosomen-basierende Synthese unter Verwendung von dedizierten tRNAs dar (Benner, „TIBTECH" 12:158–163 [1994] und Robertson et al., „J. Am. Chem. Soc." 113:2722–2729 [1991]), im Allgemeinen wird die NP-kodierende Nukleinsäure (im Allgemeinen DNA) jedoch in einen geeigneten Expressionsvektor insertiert, die Wirtszellen werden mit dem rekombinanten Vektor transfiziert, die rekombinanten Wirtszellen werden in einem geeigneten Kulturmedium gezüchtet, und die erwünschte Aminosäuresequenz NP wird aus der rekombinanten Zellkultur anhand chromatographischer oder anderer Reinigungsverfahren zurückgewonnen. Die teilweise Synthese des NP in der rekombinanten Zellkultur oder durch in vitro-Verfahren und dann Ligieren der Polypeptidfragmente durch Peptidligase (reverse proteolytische Synthese) fällt auch in den erfindungsgemäßen Umfang.

[0084] Die Nukleinsäure zur Expression des NP, die in der Regel ein Präprothrombin kodiert, enthaltend die gewünschte Mutation, da dies eine einfache Expression und Processing anhand von Verfahren erlaubt, die bisher mit Thrombin verwendet wurden. Außerdem werden bekannte Verfahren zur rekombinanten Expression von „gla-domänenlosem" Prothrombin zur Herstellung der erfindungsgemäßen NPs ohne weiteres angepasst. Die Expression von Nukleinsäure, die NP-Analoga von jedwedem/r von (a) Präthrombin-2 (α-Thrombin) oder Präthrombin-1, (b) der Sequenz von beiden Ketten von Meizothrombin-des-1 (die entweder als eine einzelne Kette exprimiert werden, die sich von S156 [Degen et al.] bis zum 3'-Ende der Nukleinsäure, kodierend die B-Kette erstreckt, oder coexprimiert als Nukleinsäuren, die das S156-Fragment und die Thrombin-B-Kette getrennt kodieren), (c) Thrombin (das als eine Einzelkette exprimiert wird, kodierend sowohl die A- als auch B-Ketten oder in der gleichen Zelle als Nukleinsäuren, die getrennt die A- und B-Ketten kodieren, coexprimiert wird) oder (d) der Thrombin-B-Kette frei von der A-Kette exprimiert, fällt in den erfindungsgemäßen Umfang. Unter „getrennt kodierend" versteht man, dass die A- und B-Ketten-kodierenden Nukleinsäuren durch mindestens ein Stopcodon getrennt sind und die unterstromige Nukleinsäure (gewöhnlich die B-Kette) gegebenenfalls mit einem Startcodon beginnt. Es ist jedoch zu beachten, dass bakterielle polycistronische Expressionskassetten für die unterstromige Kodierungssequenz kein Startcodon benötigen könnten. Geeignete Vektoren und Wirtszellen zur unabhängigen Expression der beiden Ketten sind in US-Patent 4,923,805 beschrieben. Derartige heterodimere Expressionssysteme sind im Allgemeinen Säuger.

[0085] Polycistronische Expressionssysteme sind für die Einzelzell-Coexpression von Sequenzen nützlich, die die beiden vorstehend beschriebenen Thrombinketten umfassen. Diese Systeme sind als solches bekannt und sind besonders nützlich, wenn es, wie hier, erwünscht ist, die A- und B-Ketten von NP unabhängig in der Zellkultur herzustellen und dadurch die Notwendigkeit des posttranslationalen Processing zu vermeiden. In diesem Fall werden beide Ketten im Allgemeinen unter der Leitung der gleichen Expressionskontrollsequenz exprimiert (welche Ketten und Expressionskontrollsequenzen sich auf dem gleichen oder einem anderen Vektor befinden können). Die Nukleinsäure, die jede Kette kodiert, enthält jedoch gegebenenfalls ihr eigenes Startcodon and jede Nukleinsäure kodiert bevorzugt ihre eigene Signalsequenz.

[0086] Das NP wird optional als Präthrombin eines α-Thrombins oder der A- oder B-Ketten getrennt exprimiert, wobei das NP als ein Präkursor exprimiert wird, das heißt zum maturen NP verarbeitet wird und von der Wirtszelle sezerniert wird. Die Präsequenzen oder Signalsequenzen zur Verwendung hierin schließen die native Präsequenz ein, die in der Regel mit der Quelle des Thrombin-Gens, z. B. der humanen Präsequenz für Präprothrombin, assoziiert sind oder Präsequenzen, die Aminosäuresequenzen aufweisen, die nach Sequenz oder Herkunft des Prothrombinsignals heterolog sind. Geeignete Präsequenzen schließen die von (a) mikrobiellen Proteasen, wie zum Beispiel Subtilisin, (b) Säuger-Proteasen, wie zum Beispiel Trypsin, Chymotrypsin, fibrinolytische Enzyme, einschließlich Urokinase oder tPA, und Blutgerinnungsfaktoren, wie zum Beispiel Faktoren V, X, IX, VII, VIII oder Fibrinogen, (c) Zytokine, wie zum Beispiel γ-Interferon oder ein Interleukin, (d) Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel Wachstumshormon oder TGF-α, (e) Polypeptide oder Proteine mit N-terminalen maturen Sequenzen, die mit humanen Thrombin-A- oder -B-Ketten homolog sind, (f) Immunglobuline, (g) Rezeptoren, (h) andere Präsequenzen von sezernierten oder Zellmembran-gebundenen Proteinen oder (i) zur Richtung der Sekretion von gla-domänenlosem Prothrombin verwendeten bekannten Präsequenzen (Seiten 11, Zeile 30 - Seite 12, Zeile 21 von WO 93/13208) ein. Signalsequenzen leiten sich optional her von der oder sind homolog zur Wirtszelle, oder mindestens dem phylogenetischen Zweig, zu dem die Wirtszelle gehört. So würde man zum Beispiel gewöhnlich eine Präsequenz eines Hefeproteins, wie zum Beispiel einen Paarungsfaktor, in einem Hefeexpressionssystem, oder ein Bakterium, wie zum Beispiel ST-II oder β-Lactamase, in Bakterienzellkultursystemen verwenden. Es wäre wünschenswert, Signale von heterologen Polypeptiden zu wählen, die mature N-terminale Reste aufweisen, bei denen es sich um die gleichen wie die maturen Thrombin-A- oder B-Ketten handelt, and diese Signale mit der N-terminal-homologen Thrombin-Kette

zu verwenden. Es sind eine große Reihe verschiedener geeigneter Signalsequenzen bekannt und können in Verfahren zur Herstellung der hierin beschriebenen NPs verwendet werden.

[0087] Die Nukleinsäure-Konstrukte, die das sezernierte NP kodieren, kodieren im Allgemeinen die Thrombin-A- oder B-Ketten, die an ihren N-Termini an den normalen C-Terminus der gleichen oder unterschiedlichen Signalsequenzen fusionieren. Sie werden unter der Kontrolle der Expressionskontrollsequenzen zu Expressionsvektoren, wie zum Beispiel Promotoren, Operatoren, Enhancers und Polyadenylierungssequenzen gespleißt, wie aus dem Stand der Technik im Allgemeinen bekannt ist. Die Konstruktion geeigneter Expressionsvektoren für sezernierte oder protoplasmatisch exprimierte erfindungsgemäße NPs ist für den Fachmann eine Routineangelegenheit, und wird unter Verwendung der üblichen Werkzeuge der Molekularbiologie, einschließlich der Nukleinsäuresynthese in vitro, PCR, Adapters, Ligasen, Restriktionsenzyme, Expressions- und Shuttle-Plasmide, Transfektionshilfsmittel und dergleichen erreicht, die alle der Öffentlichkeit (und größtenteils gewerblich) zugänglich sind.

[0088] Geeignete Promotoren oder Enhancers, Terminierungssequenzen und andere Funktionalitäten zur Verwendung bei der Expression von NP in gegebenen rekombinanten Wirtszellen sind ebenso wie geeignete Wirtszellen zur Transfektion mit Nukleinsäure, die das gewünschte NP kodieren, von denen einige vorstehend erwähnt sind, während andere in WO 93/13208 auf Seite 12, Zeile 21 - Seite 19, Zeile 5, und EP 319,312 B1, Seite 16, Zeilen 10–18 und Tabelle II davon beschrieben sind, weithin bekannt. Die Verwendung von Wirtszellen, die zur Glycosylierung der NPs, die in der Regel Säugerzellen, wie zum Beispiel embryonale Nieren-293-Zellen, COS-Zellen, CHO, BHK-21-Zellen und dergleichen fähig sind, könnte optional sein. Außerdem sind Wirtszellen geeignet, die bisher zum Exprimieren proteolytischer Enzyme oder Zymogenen in rekombinanter Zellkultur verwendet wurden, oder von denen bekannt ist, dass sie bereits hohe Spiegel solcher Enzyme oder Zymogene in nicht-rekombinanter Kultur exprimieren. Im letzteren Fall, wenn das endogene Enzym oder Zymogen aus dem NP schwer zu trennen ist, dann sollte das endogene Gen durch homologe Rekombination entfernt oder seine Expression durch Cotransfektion der Wirtszelle mit Nukleinsäure, kodierend eine Antisense-Sequenz, die komplementär zur RNA ist, die das unerwünschte Polypeptid kodiert, supprimiert wird. In diesem Fall werden die Expressionskontrollsequenzen (z. B. Promotor, Enhancers usw.), die vom endogenen hoch exprimierten Gen optimal zur Kontrolle der Expression des NP verwendet werden, benutzt.

[0089] Das Wirt-Vektor-System sollte dergestalt ausgewählt werden, um im Wesentlichen ein homogenes NP zu ergeben, wodurch die Notwendigkeit zur Reinigung einer einzelnen molekularen Spezies aus anderen Isoformen des NP vermieden wird. Wenn die Zelle folglich zur Glycosylierung fähig ist, sollten weitgehend alle NP-Moleküle glycosyliert werden. Außerdem werden Wirtszellen, denen es (im relevanten Zellkompartiment) an proteolytischer Aktivität mangelt, die zur Intrakettenspaltung der Thrombin-A- oder -B-Ketten fähig sind, optimal ausgewählt. Es können Zellen ausgewählt werden, die keine Protease, wie z. B. im Periplasma, enthalten, die nach Thrombin B R62, R123, R73, oder K154 spalten, die alle als Orte des B-Kettenabbaus bekannt sind. So sind zum Beispiel E. coli und andere Mikrobenstämme bekannt, die wenig oder keine extrazelluläre oder periplasmatische proteolytische Aktivität (mit Ausnahme von Signalpeptidasen) enthalten. Solche Zellen würden in Expressionssystemen, in denen die A- und B-Ketten in der gleichen Wirtszelle, die zu den gleichen oder unterschiedlichen Signalsequenzen fusioniert ist, optimal verwendet werden. Die A- und B-Ketten werden in das Periplasma oder extrazelluläre Medium cosezerniert, wo sie an Disulfid gebunden werden. Die Abwesenheit schädlicher Proteasen hilft bei der Gewährleistung, dass das Produkt bezüglich der Kettenlänge durch Wirts-endogene Proteasen, die auf das NP-Produkt wirken, nicht mikroheterogen gemacht wird; eine unabhängige A- und B-Kettensekretion ist aber selbstverständlich nicht abhängig von der Verwendung solcher Zellen. Außerdem oder als Alternative werden die basischen Reste der A- oder B-Ketten, bei denen es sich um Orte der proteolytischen Spaltung handelt, mit Resten mit Ausnahme von K oder R substituiert. So wurde zum Beispiel berichtet, dass K154 einen der Orte darstellt, der bei der Umwandlung von γ-Thrombin gespalten wird (Colman et al., „Hemostasis and Thrombosis", S. 154 (1987)). Aus der vorstehenden Tabelle 1 ist ersichtlich, dass K154, ohne signifikante Änderung der Aktivität, mit A substituiert werden kann. Folglich kann K154 mit einem anderen Rest mit Ausnahme von R substituiert werden, um Widerstand gegen den proteolytischen Abbau (zusätzlich zu anderen Variationen, welche auch immer erwünscht sind) zu verleihen. Dies kann auch die in vivo-Lebenszeit des NP verlängern.

[0090] Die rekombinanten Zellen werden unter üblichen Bedingungen und unter Verwendung üblicher Kulturmedien, die bisher für die zur Frage stehenden Zellen eingesetzt wurden, kultiviert. Diese Bedingungen und Medien sind überall bekannt. Frisch transfizierte Zellen können die NPs nur transient exprimieren, stabile Transformanten werden jedoch ohne weiteres gemäß der üblichen praktischen Ausführung unter Cotransformation mit einem Selektionsgen, wie zum Beispiel DHFR oder Glutaminsynthetase und einer Serienkultur in Anwesenheit eines Selektionsmittels, wie zum Beispiel Methotrexat bzw. Methioninsulfoximin, ohne weiteres

erhalten. Die Ausbeuten von NPs können sich trotz der geringfügigen Unterschiede hinsichtlich des Merkmals der Substituenten oder Insertionen im Wesentlichen unterscheiden. In solchen Fällen ist es wünschenswert, auf ein Expressionssystem zu screenen, das eine Thrombinmenge ergibt, die mindestens ca. 75 % derjenigen beträgt, die mit dem Bezugsthrombin im gleichen Expressionssystem erhalten wird. Es ist gelegentlich nützlich, die Zellen bei niedriger als den üblichen 37 °C, in der Regel von ca. 10 °C bis 30 °C, optimal von ca. 15 °C bis 27 °C zu kultivieren. Dies ist der Fall mit entweder Mikroben- oder Säugerzellen.

[0091] Das NP wird bevorzugt als ein vorschriftsmäßig assembliertes, Disulfid-gebundenes Thrombin-A- und -B-Kettenanalogon oder als das B-Kettenanalogon allein exprimiert. Das NP ist im Allgemeinen wasserlöslich. Es kann in Bakterien in der Form von Einschlusskörperchen („refractile bodies") exprimiert werden, in welchem Fall das unlösliche NP zurückgewonnen und unter Verwendung bekannter Verfahren, wie z. B. Auflösung in Guanidiniumhydrochlorid, gefolgt von gradueller Entfernung des Denaturierungsmittels, rückgefaltet wird. Direkt exprimierte erfindungsgemäße NPs können ein extra N-terminales Methionin oder einen blockierten Methioninrest aufweisen, obwohl Wirtszellen eingesetzt werden können, die derartige überflüssige N-terminale Methioninreste durch Spalten beseitigen.

[0092] Wenn die A- und B-Ketten fusioniert sind, wenn zum Beispiel das NP als das α-Thrombin-Analogon exprimiert wird, dann kann posttranslationales proteolytisches Processing erforderlich sein, um den Zymogen-Präkursor zum proteolytisch aktiven NP zu aktivieren. Derartige Präkursoren stellen Analoga für die natürlich vorkommenden Prothrombine dar oder es können Fusionen von einem oder beiden NP-Ketten mit einem Thrombin-heterologen Polypeptid wie im Falle der Signalsequenzen sein. Die proteolytische Aktivierung und/oder das Processing werden in der Wirtszellkultur selbst erreicht oder können nach der Rückgewinnung des NP-Präkursors (mit oder ohne intervenierender Reinigung des NP-Präkursors) durchgeführt werden. Das posttranslationale proteolytische Processing (entweder in der Wirtszellkultur oder nach der initialen Rückgewinnung des NP-Präkursors) wird zur Entfernung von jeglichen Prothrombin-Sequenzen (oder Prothrombin-heterologen Sequenzen), die mit dem N-Terminus an die A- oder B-Kette der NPs fusioniert sein können, oder das anderswo in einem NP-Präkursor (z. B. zur Erleichterung der Reinigung verwendeten Antigen-Tags) insertiert wird. Die NP-Präkursoren werden durch ein Enzym oder Enzyme hydrolysiert, das/die dazu fähig ist/sind, die korrekten Spaltungen ohne exzessive oder unerwünschte Hydrolyse in den A- oder B-Ketten von NP durchzuführen. Ein allgemein geeignetes Enzym zum Entfernen pro Sequenz und zum Aktivieren des nativen Prothrombins wird im Gift von Echis carinatus (der Sandrasselotter) gefunden. Faktor Xa ist auch zur Aktivierung von NP-Präkursoren nützlich. Eine proteolytische Aktivierung wird von der maturen B-Kette des NP oder den coexprimierten individuellen maturen A- und B-Ketten nicht benötigt.

[0093] Die proteolytische Aktivierung des NP-Präkursors wird durch die Substitution der Thrombin-Aktivierungsdomäne (dem Spaltungsort des Faktors Xa) mit einer anderen Sequenz erleichtert, die von einer anderen Protease oder durch Thrombin selbst erkannt und gespalten wird. Geeignete substituierte Aktivierungsorte zum Gebrauch mit den erfindungsgemäßen NPs sind in WO93/13208, Seite 9, Zeile 21 - Seite 10, Zeile 17 beschrieben. Wie in WO93/13208 angemerkt ist, ist die Substitution des Thrombin-Aktivierungsortes in Prothrombin mit KEX2-Ort der Hefe attraktiv, weil Hefe KEX2 exprimieren und folglich Thrombin-Präkursoren am Aktivierungsort endogen spalten kann. Andere Sequenzen, die für die Thrombin-Aktivierungsdomäne geeignet substituiert sind, sind in Tabelle 1 von EP 319,312 B1 offenbart. Diese werden durch Zellmembran-assoziierte Proteasen im Rahmen des Zekllkultur-Processing von NPs oder ihren Präkursoren gespalten.

[0094] Proteolytische Aktivierung kann an jedem Punkt der Expression oder Reinigung von NP oder seinen Präkursoren erreicht werden, wird aber in der Regel nach der Reinigung von NP-Präkursoren aus den Zellen und/oder dem Überstand der Zellkultur durchgeführt. Es wird erkannt werden, dass NPs, enthaltend einen neuen dibasischen Ort, der sich aus einer Insertion oder Substitution eines R- oder K-Rests in die Thrombinsequenz ergibt, für eine Hydrolyse durch Enzyme anfällig sein kann, die natives Thrombin anderweitig nicht spalten würden, wodurch die Ausbeuten während der Expression oder Aktivierung etwas reduziert werden. In diesem Fall könnte es wünschenswert sein, dass man ein Expressionssystem und/oder ein Aktivierungsenzym auswählt, das eine andere Substratspezifität aufweist, um auf diese Weise die zufällige Spaltung zu reduzieren.

[0095] Die Ausbeuten von NP aus einer rekombinanten Wirtszellkultur variieren, abhängig von einer Anzahl von Faktoren, einschließlich den Kulturbedingungen und der Beschaffenheit von NP. Die gewichtsanteilmäßige Ausbeute von NP aus der Kultur sollte optimal größer als ca. die Hälfte (und bevorzugt größer als 75 %) der des Bezugsthrombins sein.

[0096] Es ist möglich, das NP-enthaltende aktivierte, konzentrierte, konditionierte Medium der rekombinanten

Zellen ohne weitere Reinigung zu diagnostischen Zwecken zu verwenden. Zur therapeutischen Anwendung beabsichtigte NPs sollten jedoch anhand von Verfahren, die bisher für Thrombin oder andere Proteine eingesetzt wurden, z. B. native oder reduzierende/SDS-Elektrophorese, isoelektrische Fokussierung, immobilisierte pH-Gradientenelektrophorese, Salzfällung, Lösungsmittelfraktionierung (z. B. unter Verwendung von Ethanol) und Chromatographie, wie zum Beispiel Gelfiltration, Ionenaustausch (Kationen oder Anionen), Ligandenaffinität (Cibacron-Blau F3GA oder p-Aminobenzamidin), Immunaffinität, Chromatofokussierung, Umkehrphasen- oder hydrophobe Interaktionschromatographie, isoliert oder gereinigt werden. Geeignete Verfahren sind in Colman et al., „Hemostasis and Thrombosis", S. 148 (1987) und hierin angegebenen Referenzen, in WO 93/13208 Seite 19, Zeile 33 - Seite 21, Zeile 25, und anderen üblichen Quellen offenbart. Das aktivierende Enzym kann (gegebenenfalls) immobilisiert werden oder es wird in sich anschließenden Reinigungsschritten entfernt. Das NP wird in der Regel isoliert, damit es > 95 Gew.-% bezogen auf das Protein rein und bevorzugt größer als 99 % rein ist.

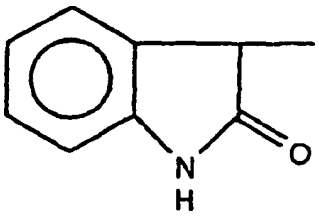
[0097] Die NPs oder ihre Fragmente werden auch in vitro hergestellt, besonders wenn sie relativ klein sind, wie z. B. in der Größenordnung von ca. 30 Resten oder weniger. Größere und intakte NPs werden jedoch auch durch in vitro-Verfahren hergestellt. So werden zum Beispiel kleinere NPs durch Synthese unter Verwendung der Standard-Festphasen-Syntheseverfahren wie von Merrifield „J. Am. Chem. Soc.", 85:2149 (1963) beschrieben, hergestellt. Diese werden dann durch die Verwendung von Peptidligase (reverse Proteolyse) zusammenligiert. In vitro-Proteinsyntheseverfahren werden auch zur Herstellung von NPs ohne die Notwendigkeit für eine rekombinante Zellkultur eingesetzt. Derartige Verfahren sind für Aufbereitungen im kleinen Maßstab nützlich und weisen den Vorteil auf, dass sie den möglichen Effekt auf die Ausbeuten von Wirtszellproteasen reduzieren. Die in vitro-NP-Proteinsynthese weist einen zusätzlichen recht erheblichen Vorteil dahingehend auf, dass sie die ortsspezifische Einführung eines nicht natürlich vorkommenden Aminosäurerests in NP zulässt (Benner, und Robertson et al., vorstehend angegeben). Wenn demgemäß hierin der Begriff „Aminosäurerest" (im Zusammenhang mit der Thrombinmodifikation durch Substitution oder Insertion, besonders durch eine einzelne Aminosäure) verwendet wird, muss man zur Kenntnis nehmen, dass die Aminosäure nicht auf die natürlich vorkommenden Reste, die mit nativen tRNAs assoziiert sind, begrenzt ist. Wie von Robertson et al. angemerkt wurde, wird die Aminoacyl-tRNA effizient unter Verwendung einer Reihe verschiedener nicht natürlich vorkommender Aminosäurereste („nicht natürlich vorkommend" bedeutet, sie werden nicht natürlich in Proteinen gefunden, obwohl die Aminosäure in biologischen Systemen in der Natur zu finden sein könnte) hergestellt wird. Da die tRNA ausgewählt wird, um an einem Codon inkorporiert zu werden, das von keinen der im Allgemeinen an der Proteinsynthese beteiligten tRNAs erkannt wird, wird der ausgewählte nicht natürlich vorkommende Aminosäurerest nur an dem bestimmten Ort in die für das einzigartige Codon gewählte NP-Sequenz inkorporiert. In diesem Fall wird das NP folglich durch eine Nukleinsäure mit einem Nonsense-Codon, wie z. B. UAG, am gewünschten einzigartigen Insertions- oder Substitutionsort kodiert. Die nicht natürlich vorkommenden Aminosäuren, die auf geeignete Weise inkorporiert werden, sind zum Beispiel in Greenstein et al., „Chemistry of the Amino Acids" Vol. 1–3, 1986, beschrieben. Im Allgemeinen verwendet man pharmazeutisch verträgliche L-Aminosäuren, die in der Natur vorkommen, im Allgemeinen aber nicht in Proteine inkorporiert werden. Solche Aminosäuren sind in der Regel strukturell mit einem natürlich vorkommenden Rest verwandt, der an einem gegebenen Ort die gewünschte Wirkung hervorruft und zur weiteren Trennung und Optimierung der gewünschten Eigenschaft des NP verwendet wird.

[0098] Die erfindungsgemäßen NPs schließen auch Thrombine ein, die durch eine Nichtpeptidyl-Komponente substituiert wurden, entweder anfänglich zum Zweck der Herstellung des NP oder als eine sich anschließende Modifikation des NP, das durch Aminosäuresubstitution, -insertion oder -deletion, wie hierin anderswo beschrieben, hergestellt wurde. NPs werden als solches durch kovalente Modifikation von Thrombin oder seiner einzelnen Ketten oder Subfragmente hergestellt. Da wir eine Anzahl von wichtigen Resten bestimmt haben, die an der prokoagulatorischen und antikoagulatorischen Funktion des Thrombins beteiligt sind, fällt die Einführung einer kovalenten Modifikation an solchen Orten, die im Wesentlichen die gleichen Ziele wie der entsprechende ortsgerichtete Mutant mit einem natürlich vorkommenden Rest erreicht, in den erfindungsgemäßen Umfang. So werden zum Beispiel Carboxyl-enthaltende Seitenketten von Resten, wie zum Beispiel E229, durch Reaktion mit Carbodiimiden (R'-N=C=N-R', worin R und R' unterschiedliche Alkylgruppen darstellen) derivatisiert oder werden durch Reaktion mit Ammoniak oder substituierten Aminen amidiert.

[0099] Basische Seitenketten, wie zum Beispiel die von R233 und K52, werden auch derivatisiert. So sind zum Beispiel R233D und E sehr gute PCAs, in denen eine positiv geladene Seitenkette mit einer negativ geladenen Seitenkette substituiert wurde. Ähnliche Ladungsumkehrungen werden durch Substitution eines Thrombin-R233 oder -K52 mit Chloressigsäure erreicht. Lysinreste werden mit Essigsäureanhydrid acetyliert.

[0100] Tryptophan ist eine relativ seltene Aminosäure in Thrombin. Demzufolge ist W50 ein attraktiver Ort für

die posttranslationale kovalente Modifikation, da erwartet wird, dass die Substitution an anderen Orten geringer ist als dies mit häufiger vorkommenden Resten der Fall sein könnte. Die Reaktion von W50 mit einem Oxidans, wie zum Beispiel einem Halogendonator, wie z. B. Brom, ergibt die folgende Seitenkettenstruktur:



[0101] Diese Reaktion sollte in einem wässrigen Lösungsmittel und bei niedrigen Halogenkonzentrationen durchgeführt werden.

[0102] Andere kovalente Modifikationen von NPs oder von Thrombin zum Erhalt der erfindungsgemäßen NPs, werden vom Fachmann erkannt werden. Seitenketten, an denen eine Reaktion unerwünscht ist, werden durch ihre Maskierung mit gegen ein Epitop gerichtete Antikörper geschützt, das den zu schützenden Rest einschließt. Reagenzien zum Erreichen solcher Modifikationen sind überall bekannt und wurden in den diagnostischen und präparativen Bereichen verbreitet verwendet. Siehe T. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, 1983.

[0103] Kovalente Modifikationen sind zum Erreichen der Ziele mit Ausnahme der Herstellung von NPs mit segregierter Substratspezifität auch nützlich. So werden zum Beispiel NPs durch ihre Vernetzung mit einer wasserunlöslichen Matrix unlöslich gemacht. Dies wird durch zur Reaktion bringen des NP und der Matrix mit einem bifunktionellen Mittel, das die kovalente Vernetzung bildet, erreicht. Beispiele geeigneter Mittel stellen 1,1-Bis(diazoacetyl)-2-phenylethan, Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinimidester, zum Beispiel Ester mit 4-Azidosalicylsäure, homobifunktionelle Imidoester, einschließlich Disuccinimidylester, wie zum Beispiel 3,3'-Dithiobis(succinimidylpropionat) und bifunktioneller Maleimide, wie zum Beispiel Bis-N-maleimido-1,8-octan, dar. Derivatisierende Mittel, wie zum Beispiel Methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat ergeben photoaktivierbare Intermediärprodukte, die in Anwesenheit von Licht zum Bilden von Vernetzungen fähig sind. Als Alternative wird NP auf reaktiven wasserunlöslichen Matrices, wie zum Beispiel Cyanogenbromid-aktivierten Kohlenhydraten und den in U.S. 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537 und 4,330,440 beschriebenen reaktiven Substraten immobilisiert.

[0104] NPs sind durch Verknüpfung des NP mit verschiedenen Nichtprotein-Polymeren, wie z. B. Polyethylenglykol, Polypropylenglykol oder Polyoxyalkylenen, in der Art, wie sie zum Beispiel in US 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 oder 4,179,337 angegeben sind, auch kovalent modifiziert.

[0105] Die Halbwertzeit von in vivo zirkulierendem NP wird durch Konjugation des NP an ein Polymer, das eine verlängerte Halbwertzeit verleiht, wie zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG), verlängert. PEG stellt ein nicht immunogenes, lineares, nicht geladenes Polymer mit drei Wassermolekülen pro Ethylenoxid-Einheit dar. (Maxfield, et al., „Polymer" 16:505–509 (1975); Bailey, F. E. et al., in „Nonionic Surfactants", Schick, M. J., Hrsg., S. 794–821 (1967)). Es wurden mehrere therapeutische Enzyme zur Verlängerung ihrer Halbwertzeit in vivo an PEG konjugiert (Abuchowski, A. et al., „J. Biol. Chem." 252:3582–3586 (1977); Abuchowski, A. et al., „Cancer Biochem. Biophys." 7:175–186 (1984). Es wurde berichtet, dass ein IL-2-(Interleukin-2)-PEG-Konjugat die Lebensdauer und Potenz im Kreislauf erhöht (Katre, N.V. et al., „Proc. Natl. Acad. Sci." 84:1487–1491 (1987); Goodson, R. et al., „Bio/Technology" 8:343–346 (1990)). Siehe auch Abuchowski, A. et al., „J. Biol. Chem." 252:3578–3581 (1977). Jedwede der für die PEG-Konjugation in diesen Angaben verwendeten Verfahren ist zur Verwendung mir den erfindungsgemäßen NPs zulässig.

[0106] Wie nachstehend ausführlicher beschrieben wird, sind NPs letzten Endes zum Gebrauch in diagnostischen Applikationen durch ihre Vernetzung an nachweisbare Gruppen, die bisher in diagnostischen Assays eingesetzt wurden, kovalent modifiziert.

VERWENDUNGSZWECKE FÜR DIE ERFINDUNGSGEMÄSSEN NPS

[0107] Die erfindungsgemäßen NPs sind in therapeutischen, diagnostischen und präparativen Verfahren nützlich. Wie vom Durchschnittsfachmann erkannt werden wird, hängt ihre Verwendung von den ihnen innewohnenden Eigenschaften ab. Größtenteils erhalten alle NPs die Immunepitopen des Thrombins bei, so dass sie bei den Immunassays auf Thrombin anstelle des Thrombins nützlich sind, ungeachtet, ob sie in die hierin

verwendete Definition von PCA oder FCP fallen oder nicht und ob sie proteolytische Aktivität besitzen oder nicht. Außerdem besitzen PCAs und FCPs spezialisierte therapeutische Verwendungszwecke.

[0108] Antikoagulatorische NPs, insbesondere PCAs, sind zur Verbesserung oder Verhinderung von unerwünschter Gerinnung nützlich. Sie sind bei der Aktivierung des endogenen Protein C-Pfades wirksam, wobei sie durch endogene Bildung von aPC zur Inaktivierung von FVa und FVIIIa und durch Inaktivierung von PAI-1 der Verstärkung der tPA-vermittelten Fibrinolyse als ein potentes Antikoagulans dienen. Die klinischen Indikationen für solche NPs und insbesondere PCAs schließen thrombotische Erkrankungen oder Zustände, wie zum Beispiel septischen Schock, unterstützende Therapie bei der koronaren Thrombolyse und Angioplastie, pulmonalen Embolismus, transitorische ischämische Attacken und Schlaganfälle, instabile Angina pectoris, MI, tiefe Venenthrombose und eine Reihe verschiedener arterieller und venöser Thrombosen ein. In einem Verfahren zur Behandlung des septischen Schocks wird das antikoagulatorische NP an Patienten mit fortgeschrittener Sepsis (gramnegativ, grampositiv oder fungal), die z. B. Symptome wie hohes Fieber, Hypotension, disseminierte intravasale Koagulation, Niereninsuffizienz und/oder ARDS aufweisen, verabreicht. Antikoagulatorische NPs, insbesondere PCAs, sind für jedwede der hierin zuvor für aPC vorgeschlagenen Anwendungszwecke nützlich. In dieser Beziehung siehe EP 191 606 B1, Seite 13, Zeile 52, Seite 15, Zeile 32. Für therapeutische Applikationen, werden antikoagulatorische NPs und besonders PCAs folglich an einen Säuger, bevorzugt einen Menschen, in einer pharmazeutisch verträglichen Dosierungsform und in einer therapeutisch wirksamen Dosierung verabreicht. Das antikoagulatorische NP wird intravenös als ein Bolus oder durch Dauerinfusion über eine Zeitdauer, oder durch intramuskuläre, subkutane, intraartikuläre, intrasynoviale, intrathekale, topische, oder über Inhalationsrouten verabreicht. Die antikoagulatorischen NPs werden auch über einen Katheter zur Ausübung einer primär lokalen Antikoagulation geeignet verabreicht.

[0109] Antikoagulatorische NPs sind auch nützlich bei der Diagnose von Gerinnungserkrankungen. Ein erheblicher Anteil von bei Patienten ermittelten Hyperkoagulationszuständen kann keinem bestimmten Molekülddefekt zugeschrieben werden. Viele Patienten, die zu Thrombose-Episoden neigen, können an einem angeborenen Fehler in einer Komponente des Protein C-Aktivierungspfades leiden, es ist aber derzeit schwierig, solche Patienten zu diagnostizieren. PCA sind besonders nützlich bei der Diagnosestellung eines defektiven Pfades des aktivierten Proteins C und der Komponente des Pfades, die defizient ist. In dieser Ausführungsform benötigt der Patient keine sofortige antikoagulatorische Therapie, es könnte aber bekannt sein, dass er einer exzessiven Thrombose von unbekannter Genese ausgesetzt gewesen sein könnte. Antikoagulatorisches NP, wie zum Beispiel PCA, wird an den Patienten verabreicht und der antikoagulatorische Zustand des Patientenblutes wird bestimmt, nachdem der PCA Zeit zu wirken hatte. Die PCA-Dosis ist im Wesentlichen die gleiche wie die PCA-Menge, die bei normalen Patienten bei der Induktion einer nachweisbaren Antikoagulation wirksam ist. Der Antikoagulationszustand des Patienten wird zu den im Wesentlichen gleichen Zeitpunkten wie die gemessen, bei denen eine nachweisbare Antikoagulation bei normalen Patienten induziert wird. Jeder Blutgerinnungsassay ist geeignet, wie z. B. aPTT und dergleichen. Wenn der PCA bei der nachweisbaren Antikoagulation des Patientenblutes nicht erfolgreich ist, leidet der Patient möglicherweise an einem Defekt im Thrombomodulin-Protein C-Antikoagulationspfad. In einer weiteren Ausführungsform, führt die Verabreichung von löslichem TM zusammen mit PCA und Bestimmung, ob das eine oder andere Protein den Defekt behebt, zu Informationen über die Lokalisierung der Defizienz, d. h. wenn TM und das NP Antikoagulation induzieren, aber Protein C und das NP nicht, kann man daraus folgern, dass das TM des Patienten für den Defekt verantwortlich ist.

[0110] Prokoagulatorische NPs sind therapeutisch nützlich als Prokoagulanzien für jedweden Zweck. Sie werden zum Beispiel in Verbände, Bandagen und dergleichen imprägniert oder anderweitig in Dosierungsformen eingeschlossen, die zur topischen Verabreichung bestimmt sind. FCP sind auch als Thrombose-Akzelerator bei der thrombotischen Behandlung von großen soliden Tumoren wirksam. Die FCP werden anstelle des C4b-Bindungsproteins oder von Anti-aPC-Antikörpern, wie in US-Patent 5,147,638 beschrieben, optimal in Kombination mit einem Zytokin, wie zum Beispiel TNF-α oder TNF-β, gamma-Interferon, IL-1, IL-2 und/oder GM-CSF angewendet. Die FCP-Dosis wird zur Induktion der Gerinnung in Tumoren, aber nicht zur Herbeiführung von klinisch signifikanter Gerinnung anderswo, titriert. Vorformen von NPs, die von der endogenen Aktivierung abhängig sind, können auch in diesem Verfahren eingesetzt werden.

[0111] Die Dosierungsformen der erfindungsgemäßen NPs stellen die herkömmlich mit anderen Proteintherapeutika verwendeten dar. Die NPs sind steril, sind für sterilen Zugang in der Regel in Behältnissen enthalten (Durchstichflaschen, zum Beispiel verschlossen mit elastomeren Stopfen) und umfassen pharmazeutisch verträgliche Träger, die nicht toxisch sind, einschließlich Salzen und Solvaten. Zu Beispielen solcher Träger gehören Ionenaustauscher, Aluminiumoxid, Aluminiumstearat, Lecithin, Serumproteine, wie zum Beispiel humanes Serumalbumin, Puffer, wie zum Beispiel Phosphate, Glycin, Arginin, Lysin, Sorbinsäure, Kaliumsorbat,

partielle Glyceridgemische aus gesättigten pflanzlichen Fettsäuren, Wasser, Alkalimetallsalze oder Elektrolyte, wie zum Beispiel Protaminsulfat, Disodiumhydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphate, Natriumchlorid, Zinksalze, kolloidales Siliciumdioxid, Magnesiumtrisilikat, Polyvinylpyrrolidon, auf Zellulose basierende Substanzen und Polyethylenglykol. Träger für topische oder Gelformen der NPs schließen Polysaccharide, wie zum Beispiel Natriumcarboxymethylcellulose oder Methylcellulose, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylate, Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockpolymere, Polyethylenglykol und Holzwachsalkohole ein. Übliche Depotformen können verwendet werden und schließen zum Beispiel Mikrokapseln, Nanokapseln, Liposomen, Pflaster, Inhalationsformen, Nasensprays und Sublingualtabletten ein. Das NP wird in der Regel in solche Vehikel in einer ca. 1–150 mikromolaren (1–200 mg/ml) Konzentration formuliert. Der Einschluss eines Antioxidans, wie zum Beispiel Ascorbat, ist erwünscht, insbesondere wenn und wie dies allgemein der Fall sein wird, das NP eine Disulfid-Bindung, welche die A- und B-Ketten miteinander verbindet oder eine Disulfid-Bindung, die in der B-Kette zu finden ist, einschließt. Der pH der Formulierung sollte zur Minimierung der Desamidierung und Autolyse ausgewählt werden und liegt im Allgemeinen bei ca. 5 bis B. Die Formulierungen werden bevorzugt lyophilisiert, können aber als wässrige Lösungen hergestellt und gelagert werden.

[0112] Die geeignete Dosierung von antikoagulatorischem NP zur Verhinderung oder Behandlung von Thrombose hängt (gegebenenfalls) von der Menge der restlichen prokoagulatorischen Aktivität, dem Sitz und der Beschaffenheit der zu behandelnden Thrombose oder der erwarteten Thrombose, dem Schweregrad und dem Verlauf der Gerinnungsstörung, ob das antikoagulatorische NP zur Prophylaxe oder Therapie verabreicht wird, der Beschaffenheit und dem Verlauf der vorherigen Behandlung, der Halbwertzeit des NPs im Kreislauf, der Anwendung anderer Therapeutika oder Antikoagulanzien, dem Ort der NP-Verabreichung (lokale Dosen sind niedriger als systemische Dosen), dem Ansprechen des Patienten auf NP, ob das NP der Aktivierung durch endogene Prothrombin-Aktivierungspfade bedarf (d. h. ob das Thrombin NP als das entsprechende Prothrombin oder als nicht aktiviertes Fragment davon zugeführt wird) und anderen Erwägungen vom Ermessen des behandelnden Arztes ab. Da der PCA ein aktives Enzym darstellt, ist die für eine antithrombotische Wirkung erforderliche Menge, im Bereich von 5–10 nM (Endkonzentration im Plasma), recht klein, und unsere Studien mit Kaninchen zeigen faktisch, dass der K52A-PCA eine therapeutische Antikoagulation bei Plasmaspiegeln im Bereich von ca. 3–9 nM, mit ähnlichen Ergebnissen für den E229A-PCA herbeiführt. Dies lässt einen recht vorteilhaften Vergleich mit anderen antikoagulatorischen Makromolekülen, wie zum Beispiel Hirudin (100–800 nM) oder GS-522, einem Thrombin-bindenden DNA-Aptamer (2000–4000 nM; PCT US 92/01367) zu. Unsere vorläufigen Studien mit Affen deuten darauf hin, dass die PCA-Dosis in Primaten im Bereich von ca. 0,05 U/kg/min bis 20 U/kg/min liegen, primär abhängig von der Menge von restlicher Fibrinogenspaltungsaktivität (die zu Gunsten niedrigerer Dosen zur Verhinderung des Fibrinogenverbrauchs und der Thrombozytenaktivierung spricht) und der Potenz der aPC-Aktivität (PCA, der einen erheblichen Anteil der Wildtyp-aPC-Aktivität beibehält, wird im niedrigeren Dosisbereich eingesetzt). 1 U entspricht der amidolytischen Aktivität der S-2238-Menge in 1 NIH-Einheit (Gerinnnungsaktivität) des Wildtyp-Thrombins (siehe Beispiel 4).

[0113] Es wird nicht erwartet, dass die erfindungsgemäßen NPs immunogen sind, da in bevorzugten Ausführungsformen nur wenige kritische Reste modifiziert werden (weniger als ca. 5), oder mittels Glycosylierung maskiert sind. Dies ist insbesondere der Fall mit einzelnen Substitutionen (z.B. E229D), die höchst konservativ sind. Die Halbwertzeit bestimmter NPs kann sehr kurz sein, wobei erforderlich ist, dass sie als eine Dauerinfusion verwendet werden (die Plasma-Halbwertzeit des Wildtyp-Thrombins in vivo ist – wahrscheinlich im Bereich von Sekunden – extrem kurz). Dies kann jedoch unter Umständen klinisch vorteilhaft sein, da dies die Notwendigkeit eines Thrombin-Hemmers überflüssig machen würde, sollte sich bei dem Patienten eine Blutungsepisode entwickeln. PCAs weisen bei subhumanen Primaten und anderen Tieren für von ca. 90 bis 180 Minuten nach der Verabreichung in angemessenen Dosen eine antikoagulatorische Wirkung auf, so dass die Verabreichung von PCAs mittels einer Einzelinjektion oder einer kurzen Infusion (z. B. 10 Minuten) möglich ist. Die Verabreichung mittels Dauerinfusion fällt jedoch auch in den erfindungsgemäßen Umfang.

[0114] Prokoagulatorische oder antikoagulatorische NPs werden auf geeignete Weise als einmalige Behandlung oder über eine Reihe von Behandlungen an den Patienten verabreicht. Für wiederholte Verabreichungen über mehrere Tage hinweg oder länger, wird die Behandlung in Abhängigkeit von der Erkrankung fortgesetzt, bis die gewünschte antikoagulatorische oder prokoagulatorische Wirkung erreicht ist.

[0115] Gemäß einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform wird die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen als Prokoagulanzien oder Antikoagulanzien durch Verabreichung der Verbindungen seriell oder simultan mit einem anderen Mittel oder medizinischen Verfahren, das für die relevanten Zwecke wirksam ist, verbessert. Der PCA ist in Verbindung mit bekannten Antikoagulanzien, wie zum Beispiel Heparin, Hemmern des Faktors X, Thrombozytenaggregationshemmern und dergleichen nützlich. Er ist auch nützlich in Verbindung mit thrombolytischen Therapien unter Verwendung von zum Beispiel tPA, Urokinase oder Strep-

tokinase oder mit der Ballonangioplastie oder anderen Verfahren, welche die Lyse von Gerinnseln, die Behandlung atherosklerotischer Plaques oder die Manipulation des oder Kontakt mit dem Gefäßendothel(s) beinhalten.

[0116] Die erfindungsgemäßen NPs sind bei der Identifikation von Substanzen nützlich, die an Targetorten am Thrombin (Thrombin-bindende Partner oder „TBP") binden. Von besonderem Interesse sind Substanzen, die an der PC-aktivierenden Domäne von Thrombin, aber nicht der prokoagulatorischen Domäne oder umgekehrt binden. In bevorzugten Ausführungsformen sind sie fähig, an Thrombin zu binden und die prokoagulatorische Aktivität von Thrombin ohne vergleichsweise Hemmung seiner PC-aktvierenden Funktion weitgehend zu hemmen. Dies bedeutet nicht, dass der TBP die PC-aktivierende Funktion des Thrombins vollkommen ungehemmt lassen muss. In diesem Fall ist es lediglich notwendig, dass der Hemmungsgrad der PC-Aktivierung weniger als der der prokoagulatorischen Funktion sein muss. Der TBP hemmt in der Regel die proteolytische Target-Aktivität des Thrombins dergestalt, dass das Verhältnis der PC-Aktivierung zu prokoagulatorischer Aktivität weniger als ca. 0,5 oder mehr als ca. 2,0 beträgt. TBPs stellen im Allgemeinen Polymere dar, die in zwei Klassen fallen: Polypeptide und Oligonukleotide, aber weitgehend unbegrenzt sind und jedwede Substanz einschließen können, einschließlich Molekülen mit einem Molekulargewicht von weniger als ca. 1500. TBPs werden in diagnostischen Verfahren eingesetzt, um Thrombin indirekt zu markieren oder um Thrombin von anderen in den Testproben vorliegenden Substanzen zu trennen. Die Fähigkeit von TBPs an Thrombin zu binden, ist auch in Verfahren zur Rückgewinnung von Thrombin aus kontaminierten Gemischen, wie zum Beispiel Zellkulturüberständen aus rekombinanten Thrombin-exprimierenden Zellen (einschließlich NPs mit der Thrombin-Aminosäuresequenz hierin) nützlich. NPs können in der Regel anstelle von Thrombin-Standards in Immunassays auf Thrombin verwendet werden, wenn sie mindestens ein Thrombin-Epitop besitzen, das von dem in dem zur Frage stehenden Thrombin-Immunassay verwendeten Antikörper erkannt wird, während die TBPs anstelle von Antikörpern auf Thrombin verwendet werden. Die NPs sind gegebenenfalls auch in funktionellen Assays auf bestimmte individuelle Eigenschaften des Thrombins, wie zum Beispiel seine prokoagulatorische Aktivität nützlich, vorausgesetzt dass das NP seine prokoagulatorische Aktivität beibehält.

[0117] Polypeptid-TBPs sind in der Regel Peptide oder Proteine, die zur spezifischen Bindung von FCP, aber im Wesentlichen nicht zur Bindung an PCA und umgekehrt fähig sind. Sie sind folglich hochspezifische Hemmer entweder des prokoagulatorischen oder der aPC-Funktion des Thrombins.

[0118] Peptid-TBPs werden durch die Verwendung von in vitro gerichteten evolutionären Verfahren, wie zum Beispiel denen, die fadenförmige Phagen zur Darstellung von Kandidatensequenzen (anderweitig als Phagendisplay bekannt) und ähnliche Verfahren einsetzen, die als solches bekannt sind, die sich auf die systematische Generierung und das Screening von Peptiden auf Aktivität verlassen. Bei diesen handelt es sich in der Regel um ziemlich kleine Moleküle, die in der Größenordnung von ca. 5 bis 20 Reste enthalten. Die erfindungsgemäßen FCP- und PCA-Polypeptide sind beim Screening auf solche Peptid-TBPs auf die gleiche allgemeine Weise wie beim Screening auf Oligonukleotid-TBPs nützlich.

[0119] Antikörper-TBPs sind Immunglobuline, gewöhnlich monoklonale Antikörper, die zur spezifischen Hemmung der prokoagulatorischen oder aPC-Funktion des Thrombins fähig sind. Antikörper werden gegen eine Proteinzusammensetzung, umfassend ein Bezugssequenzthrombin gebildet. Zum Erhalt eines antikoagulatorischen Antikörpers wird der Antikörper-Pool an einen PCA adsorbiert, wobei Antikörper, die nicht weitgehend binden (die aber eine Gerinnungshemmung nachweisen) zurückgewonnen werden. Diese Antikörper werden notwendigerweise an die Fibrinogenspaltungsepitopen gerichtet. Eine analoge Strategie wird zur Herstellung eines prokoagulatorischen Antikörpers verwendet.

[0120] Unter dem Begriff „monoklonaler Antikörper", wie hierin verwendet, versteht man einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern, d. h. den individuellen Antikörpern, die die Population umfassen, die hinsichtlich der Spezifität und Affinität weitgehend identisch sind, erhalten wird. Monoklonale Antikörper schließen hybride und rekombinante Antikörper (z. B. „humanisierte" Antikörper) ungeachtet der Herkunftsspezies oder der Klassen- oder Unterklassenbezeichnung von Immunglobulin, ebenso wie Antikörperfragmente (z. B. Fab, $F(ab')_2$ und Fv) ein. „Monoklonale" Antikörper werden folglich durch jedwedes bestimmte Verfahren hergestellt, das eine im Wesentlichen homogene Population ergibt. Monoklonale Antikörper können zum Beispiel unter Verwendung der von Kohler & Milstein, „Nature" 256:495 (1975), Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, S. 59–103 (1986), Kozbor, „J. Immunol." 133:3001 (1984), oder Brodeur, et. al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, S. 51–63 (1987) beschriebenen Verfahren hergestellt werden, oder sie können durch rekombinante DNA-Verfahren hergestellt werden. Cabilly, et al., US-Patent Nr. 4,816,567.

[0121] In einer erfindungsgemäßen bevorzugten Ausführungsform weist der monoklonale Antikörper eine Affinität zum Bezugssequenzthrombin von mindestens ca. 10^9 Mole/Liter auf, wie zum Beispiel mittels die Scratchard-Analyse von Munson und Pollard, „Anal. Biochem.", 107:220 (1980), bestimmt wurde. Die monoklonalen Antikörper hemmen in der Regel auch die prokoagulatorische oder antikoagulatorische Aktivität des Thrombins um mindestens 50 %, bevorzugt mehr als 80 % und am bevorzugtesten mehr als 90 %, wie zum Beispiel durch den hierin offenbarten PC-Aktivierungsassay oder die Thrombinzeit-Bestimmungen bestimmt wurde.

[0122] Die monoklonalen Antikörper kodierende DNA wird unter Verwendung üblicher Verfahren (z. B. unter Verwendung von Oligonukleotidsonden, die spezifisch zur Bindung an Gene fähig sind, die die Schwer- und Leichtketten muriner Antikörper klonieren) ohne weiteres isoliert und sequenziert. Hybridomzellen dienen als eine bevorzugte Quelle von solcher DNA. Nach der Isolation kann die DNA in Expressionsvektoren platziert werden, die dann in Wirtszellen, wie zum Beispiel Simian-COS-Zellen, Ovarzellen vom Chinesischen Hamster (CHO-Zellen) oder Myelomzellen, die nicht anderweitig Immunglobulin-Protein produzieren, transfiziert werden, um die Synthese monoklonaler Antikörper in den rekombinanten Wirtszellen zu erhalten.

[0123] Die DNA kann optional modifiziert werden, um das Merkmal des durch ihre Expression produzierten Immunglobulins zu erhalten. So werden zum Beispiel die humanisierten Formen muriner Antikörper durch Substitution einer die Komplementarität bestimmenden Region (CDR) der variablen Domäne des murinen Antikörpers für die entsprechende Region eines humanen Antikörpers produziert. In einigen Ausführungsformen, werden auch ausgewählte Aminosäurereste der Framework-Region (FR) des murinen Antikörpers für die entsprechenden Aminosäurereste im humanen Antikörper substituiert. Humanisierte Formen der murinen Antikörper können auch durch Substitution der Kodierungssequenz für konstante humane Schwer- und Leichtkettendomänen anstelle der homologen murinen Sequenzen produziert werden. Morrison, et al., „PNAS" 81:6851 (1984).

[0124] Evolutionäre Selektionsverfahren für Oligonukleotide, die an Target-Proteine binden, sind überall bekannt (WO 92/14843; Ellington et al., „Nature" 355:850 (1992); Bock et al., „Nature" 355:564 (1992); Ellington et al., „Nature" 346:818 (1990); Tuerk et al., „Science" 249:505 (1990). Diese Oligonukleotide, die allgemein als Aptamere bekannt sind, enthalten im Allgemeinen die üblichen A-, T-, G-, C- oder U-Basen oder Derivative davon und umfassen Sequenzen, die an einen prädeterminierten Ort an ein Target-Protein binden. In diesem Fall werden das FCP und der PCA in negativen (keine Bindung vorhanden) und positiven (Bindung vorhanden) Selektionsprotokollen verwendet, um TBPs, wie zum Beispiel Aptamere, zu ergeben, die für die Hemmung von entweder Gerinnung oder aPC-Aktivität spezifisch sind. Ein Selektionsverfahren für TBPs, die die prokoagulatorische Funktion von Thrombin hemmen (aber nicht weitgehend in seine antikoagulatorische Aktivität eingreifen), umfasst (a) Herstellen eines Pools von Kandidaten (Oligonukleotiden, Peptiden, Extrakten, Proteinen usw.), (b) Kontaktieren der Kandidaten mit Thrombin mit prokoagulatorischer Aktivität (in der Regel Bezugssequenzthrombin) (c) Isolieren aus dem Thrombin die Kandidaten, die zur Bindung an Thrombin fähig sind, (d) Kontaktieren der Kandidaten aus Schritt c) mit einem NP, in dem die prokoagulatorische Funktion des Thrombins im Wesentlichen aus dem NP, d. h. einem PCA, mutiert wurde und (e) Rückgewinnung der Kandidaten, die nicht an PCA binden. Dies gewährleistet, dass jedweder so ausgewählte Kandidat zur Bindung an den/die Aminosäureort(e) fähig ist, die bei Ankunft am PCA-Polypeptid, d. h. die bei der prokoagulatorischen Funktion des Thrombins ausschlaggebenden Reste, variiert wurden. Als Alternative wird ein Kandidat oder ein an potenziellem antikoagulatorischem TBP angereicherter Pool ausgewählt aus (a) Herstellen eines Pools aus Kandidaten-Bindungspartnern (wie vorstehend), (b) Kontaktieren der Kandidaten mit Thrombin mit prokoagulatorischer Aktivität (in der Regel Bezugssequenzthrombin), (c) Isolieren aus dem Thrombin der Kandidaten, die zur Bindung an Thrombin fähig sind, (d) Kontaktieren der Kandidaten aus Schritt c) mit einem Thrombin-NP, worin die PC-aktivierende Funktion im Wesentlichen aus dem NP, d. h. einem FCP, mutiert wurde und (e) Rückgewinnung der Kandidaten, die an FCP binden. Der sich ergebende Kandidaten- Pool wurde folglich spezifisch mit Kandidaten angereichert oder es wurde ein Kandidat ausgewählt, der nicht an Thrombin an den mutierten Resten im PC-Aktivierungsort bindet. Dieser Kandidaten-Pool wird dann auf antikoagulatorische Aktivität, z. B. durch weitere Auswahl auf TBPs, die nicht an PCA binden, ausgewählt. Letztlich wird der Pool dadurch angereichert oder auf Kandidaten-TBPs ausgewählt, die den PC-Aktivierungsort nicht binden, die aber an die prokoagulatorischen Reste des Thrombins binden. Schritte c) und d) werden optional wieder in eine der beiden Alternativen zurückverwandelt.

[0125] TBPs, die die Protein C-aktivierende Funktion von Thrombin hemmen, werden anhand eines Verfahrens ausgewählt, das der Anreicherung von TBPs analog ist, wobei sie die Fähigkeit zum Hemmen der prokoagulatorischen Funktion, wie vorstehend beschrieben, aufweisen, z. B. werden TBPs ausgewählt, die an Thrombin, aber nicht an FCP binden.

[0126] Die Bindungsschritte werden in den meisten Fällen unter Verwendung von immobilisiertem NP, in der Regel NP erreicht, das durch seine Glycosylsubstituenten oder seinen N- oder C-Terminus an einen unlöslichen Träger gemäß bekannten Verfahren (z. B. Concanavalin A-Agarose-Immobilisierung, gefolgt von Elution mit α-Methylmannosid; Bock et al., op. cit.) absorbiert wurde.

[0127] Wenn es sich bei den Kandidaten um replizierbare Komponenten, z. B. einen fadenförmigen Displayphagen oder Oligonukleotide handelt, kann man optional einen oder mehr Amplifikationsschritt(e) des ausgewählten oder isolierten Kandidaten-Pools zwischen Schritten c) und d) dazwischen schalten. Die Kandidaten werden im Allgemeinen zwischen diesen Schritten nicht amplifiziert. Es ist außerdem wünschenswert, die Schritte a)–e) zu wiederholen und in den meisten Fällen, zwischen Schritten e) und a) einen Amplifikationsschritt dazwischen zu schalten. Eine Amplifikation (wird im Allgemeinen im Fall von Oligonukleotid-Kandidaten durch PCR erreicht) ist bei der Anreicherung der Pools nützlich, die zum Nachweis der Funktion, auf die ausgewählt wurde, fähig sind.

[0128] FCP und PCA sind insbesondere nützlich als Intermediärprodukte bei der Herstellung von TBPs.

[0129] Für diagnostische Applikationen sind die erfindungsgemäßen TBPs oder die NPs optional mit einer nachweisbaren Komponente markiert. Die nachweisbare Komponente kann jedweden Substituenten darstellen, der zur Produktion, entweder direkt oder indirekt, eines nachweisbaren Signals fähig ist. Die nachweisbare Komponente kann beispielsweise ein Radioisotop, wie zum Beispiel ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S oder ^{125}I, eine Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-Verbindung, wie zum Beispiel Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin oder Luciferin; ein radioaktiv markiertes Isotop, wie zum Beispiel ^{125}I, ^{32}P, ^{14}C oder ^{3}H oder ein Enzym, wie zum Beispiel alkalische Phosphatase, β-Galactosidase oder Meerettich-Peroxidase darstellen.

[0130] Jedwedes aus dem Stand der Technik per se bekannte Verfahren kann zur Konjugation des TBP oder NP an die nachweisbare Komponente verwendet werden. Siehe die vorstehend beschriebenen Verfahren und Hunter, et al., „Nature" 144:945 (1962); David, et al., „Biochemistry" 13:1014 (1974); Pain, et al., „J. Immunol. Meth." 40:219 (1981); und Nygren, J. „Histochem. and Cytochem." 30:407 (1982). Oligonucleotid-TBPs werden auf übliche Weise, wie hierin vorstehend in diagnostischen Sonden aus dem Stand der Technik eingesetzt, markiert.

[0131] Die markierten NPs werden beim Nachweis von zum Beispiel Proteinen, die an Thrombin, z. B. Antikörper binden, eingesetzt. Außerdem werden die nicht markierten NPs mit Antianalyt-Antikörpern (entweder kovalent oder durch Immunadsorption) oder mit Analyt-bindenden Rezeptoren verknüpft und werden aufgrund ihrer Fähigkeit, markierte Peptide, die ohne weiteres durch Fluoreszenz- oder kolorimetrische Verfahren nachgewiesen werden, selbst als Markierungen verwendet. Typische Rezeptoren, die mit den nicht markierten NPs verknüpft sind, schließen Makromoleküle an den Zelloberflächen, z. B. LFA-1, VLA-4, mac-1, I-CAM1, I-CAM2, I-CAM3 oder V-CAM1 ein. Typische Antikörper, die mit den nicht markierten NPs verknüpft sind, schließen gegen Proteine gerichtete Antikörper, die an der Blutgerinnungskaskade beteiligt sind, ebenso wie Endothelzell-Antigene, Tumor-Antigene oder andere Zelloberflächen-Makromoleküle ein. Geeignete Verfahren zum Konjugieren von Proteinen oder zum Markieren von Proteinen sind weithin bekannt und werden zweckmäßigerweise für die Konjugation oder Markierung von NPs angewendet. So wird zum Beispiel die B-Kette von NP an ihrem N-Terminus mit dem C-Terminus einer Immunglobulin-Schwerkette oder mit dem C-Terminus der extrazellulären Domäne eines Zelloberflächen-Rezeptors fusioniert.

[0132] Die erfindungsgemäßen TBPs oder NPs werden optional in bekannten Immunassay-Verfahren, wie zum Beispiel kompetitiven Bindungsassays, direkten und indirekten Sandwich-Assays und Immunpräzipitationsassays eingesetzt. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, S.147–158 (1987).

[0133] Kompetitive Bindungsassays verlassen sich auf die Fähigkeit eines markierten Standards (bei dem es sich um Thrombin oder einen immunologisch reaktiven Anteil davon, wie zum Beispiel ein markiertes erfindungsgemäßes NP handeln kann), um mit dem Thrombin in der Testprobe um die Bindung mit einer begrenzten TBP-Menge zu konkurrieren. Die Thrombinmenge in der Testprobe ist umgekehrt proportional zu der Menge des Standards, die an den TBP gebunden wird. Zur Erleichterung der Bestimmung der Standardmenge, die gebunden wird, wird der TBP im Allgemeinen vor oder nach dem Wettbewerb unlöslich gemacht, damit der Standard und der Analyt, die an den TBP gebunden sind, zweckmäßigerweise vom Standard und Analyt, die ungebunden bleiben, getrennt werden.

[0134] Sandwich-Assays beinhalten die Verwendung von zwei TBPs, wobei jeder zur Bindung an einen unterschiedlichen Target-Anteil, oder ein Epitop, von Thrombin fähig ist. In einem Sandwich-Assay, ist der Analyt

der Testprobe durch einen ersten TBP gebunden, der auf einem festen Träger immobilisiert ist und danach einen zweiten TBP an den Analyten bindet, wobei folglich ein unlöslicher dreiteiliger Komplex gebildet wird. David & Greene, US-Patent Nr. 4,376,110. Der zweite Antikörper kann selbst mit einer nachweisbaren Komponente markiert sein (direkte Sandwich-Assays) oder kann unter Verwendung eines Anti-TBP-Antikörpers, der mit einer nachweisbaren Komponente markiert ist, gemessen werden (indirekter Sandwich-Assay). Ein Typ eines Sandwich-Assays stellt der ELISA-Assay dar, in welchem Fall die nachweisbare Komponente ein Enzym darstellt.

[0135] Die erfindungsgemäßen TBPs und NPs sind auch für das in vivo-Imaging nützlich, worin ein mit einer nachweisbaren Komponente markierter/s TBP oder NP an einen Wirt, bevorzugt in den Blutstrom, verabreicht wird und die Anwesenheit und der Ort des markierten TBP oder NP im Wirt bestimmt wird.

[0136] Das folgende beispielhafte Material wird lediglich mittels der Erläuterung vorgelegt und ist in keiner Weise zur Einschränkung der Erfindung beabsichtigt. Alle hierin angeführten Patent- und Literaturhinweise sind ausdrücklich unter Bezugnahme eingeschlossen.

BEISPIEL 1

1.1 KONSTRUKTION VON EXPRESSIONSVEKTOREN ZUR HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEM HUMANEM PROTHROMBIN

[0137] Die gesamten 1869 Basenpaare der Sequenz, die das humane Prothrombin plus 12 Basenpaare von der 5' nicht translatierten Sequenz und 97 Basen von der 3' nicht translatierten Sequenz kodiert, wurden auf einem SmaI- bis XbaI-Fragment aus einem cDNA-Klon von humanem Prothrombin, BS(KS)-hFII (bezogen von Ross T. A. MacGillivray, Dept. of Biochemistry, Univ. of British Columbia, Vancouver, Kanada) isoliert. Dieses Fragment wurde in den eukaryotischen Expressionsvektor, pRc/CMV (Invitrogen Corp, San Diego, CA) kloniert. pRc/CMV wurde mit Hind III aufgeschlossen und die 3' „recessed" Enden wurden durch Ausfüllen mit dem Klenow-Fragment von DNA-Polymerase I von E. coli stumpf gemacht. Der Vektor wurde mit XbaI weiter aufgeschlossen und mit dem SmaI- an das XbaI-Fragment ligiert, enthaltend die Prothrombin-Kodierungssequenz. Das resultierende Konstrukt, pRc/CMV-hPT, enthält die Prothrombin-Kodierungsequenz, die von Sequenzen flankiert ist, die für eine hochgradige Transkription in Säugerzellen erforderlich sind: der Promotor aus dem unmittelbar frühen Gen des humanen Zytomegalievirus und die Transkriptionsterminierungssequenzen und Polyadenylierungssignale aus dem bovinen Wachstumshormon-Gen. Dieser Klon enthält auch das β-Laktamase-Gen, das Ampicillin-Resistenz verleiht und den ColE1-Replikationsstartpunkt zur Propagierung und Erhaltung in E. coli. Auch anwesend ist der Replikationsstartpunkt des fadenförmigen Bakteriophagen, f1, zur Herstellung einer einsträngigen DNA in E. coli, das mit dem defektiven Helferphagen, M13KO7, infiziert ist (Vieira und Messing, 1987). Dieser Vektor kann zur Expression von humanem Prothrombin in transient transfizierten Säugerzellen verwendet werden, die Anwesenheit des Neomycin-Phosphotransferase-Gens bedeutet jedoch, dass permanent transfizierte Zelllinien für eine Expression in großem Maßstab durch Resistenz gegen das Antibiotikum, G418, ausgewählt werden können.

1.2 MUTAGENESE-STRATEGIE ZUR IDENTIFIKATION FUNKTIONELLER RESTE AUF DER OBERFLÄCHE VON THROMBIN

[0138] Unsere Mutagenese-Strategie wurde zum systematischen Scanning der Oberfläche von humanem α-Thrombin zur Identifikation von Resten ausgelegt, die für die Fibrinogengerinnung, Thrombomodulin-abhängige Protein C-Aktivierung und Gerinnungshemmung durch Heparin/Antithrombin III und das Thrombin-Aptamer wichtig sind. Die Strategie wurde zur Maximierung der Chancen zur Identifikation funktioneller Reste konzipiert, während die Gelegenheiten für die nicht spezifische Unterbrechung der Protein-Konformation minimiert wurde. Die geladenen und polaren (R, K, D, E, H, S, T, Q, N, Y, W) Aminosäuren waren von besonderem Interesse für die Mutation, da diese Reste zur Teilnahme an Wasserstoffbindungen und elektrostatischen Interaktionen fähig sind, die wahrscheinlich für die Bindung geladener Liganden wichtig sind. Zweitens wurden nur die geladenen und polaren Reste, die dem Lösungsmittel auf der Oberfläche von α-Thrombin stark ausgesetzt waren, auf Mutation ausgewählt. Die für das Lösungsmittel zugänglichen Oberflächenreste wurden targetiert, da diese Reste für Interaktionen mit Liganden zur Verfügung stehen und gegenüber einer Sequenzvariation toleranter sind (Bowie et al., 1990). Die fraktionelle Zugänglichkeit (Rose et al., 1985) zu einer Lösungsmittelsonde mit einem Radius von 1,4 Å wurde für jeden Rest im Thrombin in der Kristallstruktur (2,3 Å) von humanem α-Thrombin, das mit dem Hemmer Hirudin komplexiert ist, bestimmt (Rydel et al., 1990) und die 70 geladenen und polaren Reste mit einer fraktionellen Zugänglichkeit von > 35 % wurden zur Mutation ausgewählt. Nur ein einzelner Rest, R36a, wurde von dieser Liste ausgeschlossen. R36a befindet sich an der Verbindungs-

stelle zwischen den A- und B-Ketten von α-Thrombin und ist für das Processing von Prothrombin zu maturem, zweikettigem α-Thrombin erforderlich. Es wurden der Liste jedoch mehrere Reste zugefügt, einschließlich fünf Resten (R20, K65, H66, R68, K77), die sich im vermutlichen Fibrinogenbindungsexoort befinden und zwei Resten (R98, W249), die sich im putativen Heparin-bindenden Ort befinden. Folglich wurden durch die Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese insgesamt 76 Reste mit Alanin ersetzt. Alanin wurde für alle Substitutionen verwendet, weil Alanin sowohl mit sekundären α- wie auch β-Strukturen kompatibel ist (Klapper, 1977), das sowohl in abgeschirmten als auch exponierten Orten in Proteinen toleriert wird (Klapper, 1977; Rose et al., 1985) und die Nichtpolarität und die kleine Größe seiner Seitenketten gewährleistet, dass die Substitution mit Alanin mit geringerer Wahrscheinlichkeit die Protein-Konformation unterbricht. Mehrfache Substitutionen wurden simultan vorgenommen, wenn zwei oder drei targetierte Reste im Cluster zusammengebündelt wurden. Wenn solche mehrfachen Mutanten einen funktionellen Phänotyp aufwiesen, dann wurden die individuellen Reste anschließend individuell substituiert. Die vollständige Liste mit Alanin-Ersatz-Mutanten ist in Tabelle 1 eingeschlossen. Das Nummerierungssystem für Reste im humanen α-Thrombin ist das zuvor verwendete (Wu et al., 1991), wobei die Reste in der B-Kette konsekutiv nummeriert (1–259) sind. Die Reste in der A-Kette sind auch konsekutiv (1a–36a) nummeriert, weisen aber einen Suffix mit dem Kleinbuchstaben ‚a' auf, um die Identität mit der A-Kette anzuzeigen.

1.3 KONSTRUKTION VON ALANIN-SUBSTITUTIONEN IN HUMANEM PROTHROMBIN DURCH DIE OLIGONUKLEOTID-GERICHTETE MUTAGENESE

[0139] Alanin-Substitutionen wurden in das humane Prothrombin-Gen durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese an einer einsträngigen DNA-Matrize eingeführt (Zoller und Smith, 1982). Eine Uracil-enthaltende einsträngige DNA-Matrize wurde in einem dut-ung-Stamm von of E. coli generiert (CJ236) (Kunkel et al., 1987), die die Auswahl gegen den nichtmutanten Matrizen-Strang in ung+-Stämmen von E. coli nach der Verlängerung und Ligation des mutagenen Oligonukleotid-Primers erlaubte. Synthetische Oligonukleotid-Primer, die Alanin-Substitutionen kodieren, die von Regionen aus 12 Nukleotiden flankiert sind, die komplementär zum Prothrombin-Kodierungsstrang sind, wurden auf einem Festphasen-Synthesizer von der Applied Biosystems Inc. unter Verwendung der Phosphoamidit-Chemie synthetisiert. Phosphorylierte Primer wurden mit der pRc/CMV-hPT-Matrize hybridisiert, durch T7-DNA-Polymerase verlängert und an den neu synthetisierten Strang durch T4-DNA-Ligase ligiert. Die Heteroduplex-DNA wurde zur Transformation des dut^+ung^+-Stammes von E. coli, XL1-Blue, verwendet, um gegen den Uracil-enthaltenden Elternstamm auszuwählen. Einsträngige DNA aus individuellen Transformanten wurden unter Verwendung der Didesoxy-Kettentermination und Sequenase 2.0 (United States Biochemical) sequenziert, um die Identität von jeder Mutation zu bestätigen. 500-ml-Kulturen von jedem pRc/CMV-hPT-Mutanten in XL1-Blue wurden zur Herstellung von Plasmid-DNA zur Transfektion kultivierter COS-7-Zellen verwendet. Circa 1 mg „closed circular" Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des QIAGEN Maxi Plasmidpräparationskits isoliert. DNA, die andere hierin beschriebene NPs kodiert, wird auf die gleiche Weise unter Verwendung einer angemessenen Matrize hergestellt.

BEISPIEL 2

2.1 EXPRESSION UND AKTIVIERUNG VON REKOMBINANTEN PROTHROMBINEN FÜR TRANSIENTE EXPRESSIONS-ASSAYS

[0140] Rekombinante Prothrombin-Konstrukte (10–20 µg), enthaltend die nicht modifizierte Prothrombin-cDNA (für Wildtyp-Thrombin), Thrombin mutiert an S205A (für eine negative Kontrolle) und die verschiedenen Mutanten wurden in 10^6 COS-7-Zellen, die in einer 35-mm-Well gezüchtet wurden, durch das DEAE-Dextran-Transfektionsverfahren getrennt eingeführt (Adams und Rose, 1985). Zwei Tage nach der Transfektion wurde die Zellmonolayer zweimal mit PBS gewaschen und 1 ml serumfreies DME-Medium wurde zurück an die Monolayer zugefügt und 24 h bei 37 °C (gelegentlich war es vorteilhaft, bei Temperaturen unter ca. 30 °C, insbesondere 27 °C zu kultivieren, wenn eine Expression nicht nachgewiesen wird oder bei 37 °C, d. h. Mt 11, 12, 13, 34, 35, 14.5 und 37c schlecht ist) inkubiert. Das konditionierte Medium wurde dann geerntet, zur Entfernung von jeglichen Zelltrümmern zentrifugiert und durch Ultrazentrifugation mit Centricon-30 um das 20fache konzentriert. 50 µl dieses konzentrierten Mediums wurden mit 1,5 µg Gift von Echis carinatus 45 min bei 37 °C aktiviert. 25 µl konzentriertes konditioniertes Medium wurde vor und nach der Aktivierung mit Gift mittels Western-Blotting unter Verwendung gegen humanes Thrombin gerichtete polyklonale oder monoklonale Antikörper analysiert. Der Expressionsspiegel des Thrombins variiert von 0,12 bis 2,0 µg Thrombin pro 10^6 Zellen, wie anhand der Western-Analyse wie auch dem amidolytischen Assay bestimmt wurde.

2.1A QUANTIFIZIERUNG VON REKOMBINANTEN PROTHROMBINEN IN KONDITIONIERTEM ZELLKULTURMEDIUM MITTELS SLOT-BLOT

[0141] Die Thrombinprotein-Konzentration wurde mittels des quantitativen Western-Blottings unter Verwendung eines Minofold II Vakuum-Slot-Blot-Apparates von Schleicher und Schüll bestimmt. Prothrombin in 20fach konzentriertem konditioniertem Medium und gereinigten Prothrombin-Standards (American Diagnostica) wurde, wie vorstehend beschrieben, aktiviert. Die Proben und Standards wurden mit PBS verdünnt und auf die gleiche Konzentration des konditionierten Mediums von scheintransfizierten Zellen angepasst. 100 µl Aliquote (zweifach), enthaltend ca. 50 ng aktiviertes Prothrombin und Aliquote (zweifach) aus gereinigten, aktivierten Prothrombin-Standards (1–200 ng) wurden durch ein Nitrocellulose-Filter (0,45 µm) im Slot-Blot-Apparat aspiriert. Jeder Slot wurde zweimal mit 200 µl Aliquoten von PBS gewaschen. Das Filter wurde zweimal mit PBS gewaschen und mit 5 % Magermilch (Carnation) in PBS blockiert. Der Blot wurde mit 11 µg/ml polyklonalen Immunglobulinen vom Kaninchen gegen humanes Prothrombin (Dako) in 5 % Magermilch in PBS inkubiert. Der Blot wurde mit PBS, enthaltend 0,05 % Tween-20 gewaschen und mit 1 µCi/ml mit ^{35}S-markierten gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichtete $F(ab')_2$ vom Esel (Amersham) inkubiert. Der Blot wurde mit PBS, enthaltend 0,05 % Tween-20 gewaschen und die Radioaktivität wurde an jeder Position durch Scanning unter Verwendung eines Ambis 4000 radioanalytischen Imaging-Detektors bestimmt. Die Thrombin-Konzentration in jeder Probe wurde anhand der Standardkurve, die über dem Bereich von 1–200 ng Prothrombin linear war, bestimmt.

2.2 AMIDOLYTISCHER ASSAY

[0142] Die Hydrolyse durch Thrombin des chromogenen Substrats S-2238 wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Wu et al., 1991). Es wurde eine Standardkurve mit Plasmathrombin erstellt, auf der 1 µg Thrombin eine Hydrolyserate von 1220,5 mOD/min in 300 µl von 100 µM S-2238 ergibt. 20 µl eines mit Gift aktivierten und um ein Drittel verdünnten, konditionierten Mediums wurden zur Messung der Hydrolyserate von 300 µl von 100 µM S-2238 verwendet.

2.3 FIBRINOGENGERINNUNG

[0143] Bei der Fibrinogengerinnung wurde die Menge des mit Gift aktivierten konditionierten Mediums verwendet, das im amidolytischen Assay von Beispiel 2.2 335 mOD/min (entspricht 0,2 µg Plasmathrombin) ergibt. Das Reaktionsgemisch enthielt 20 µl konditioniertes Medium und 180 µl Selektionspuffer, enthaltend 20 mM Tris-Acetat, pH 7,5, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl humanem Fibrinogen bei 2 mg/ml frisch verdünntem Selektionspuffer aus einer Stammlösung von 10 mg/ml, in calciumfreiem PBS angesetzt, initiiert. Die Zeit in Sekunden von der Zugabe von Fibrinogen zur Gerinnselbildung wurde mit einem Fibrometer gemessen. Zur Umwandlung der Gerinnungszeiten in mg/ml Äquivalent des Plasmathrombins wurde eine Standardgerinnungskurve für Plasmathrombin verwendet. Die Ergebnisse sind als Wildtyp-Aktivität in ausgedrückt.

2.4 PROTEIN C-AKTIVIERUNG

[0144] Aus TMnc-Zellen-exprimierendem rekombinantem humanem Thrombomodulin bei einer Konzentration von 504 ± 34 fmol/10^6 Zellen (Tsiang et al., 1992) wurden, wie zuvor beschrieben, Zelllysate hergestellt (Tsiang et al., 1990). Circa 8 × 10^6 Zellen wurden in 800 µl lysiert, was eine Thrombomodulin-Konzentration von ca. 5 nM im Lysat ergab. Die Kontrolllysate wurden aus der nicht transfizierten CV-1-Elternzelllinie, die kein TM exprimiert, ähnlich hergestellt. Gewerblich erhältliches humanes Plasmaprotein C enthält für jedes pmol Protein C ca. 0,005–0,02 pmol kontaminierendes Prothrombin. Um diesem Problem zu begegnen wurden 444 pmol Protein C zuerst mit 10 µg Gift von Echis carinatus 30 min bei 37°C zur Umwandlung des kontaminierenden Prothrombins in Thrombin umgewandelt, das dann durch Titration mit dem Thrombinhemmer PPACK (D-Phe-Pro-Arg-Chlormethyl-Keton) inaktiviert wurde, behandelt. Dieses Gift-verarbeitete und PPACK-titrierte Protein C wurde dann im Protein C-Aktivierungsassay verwendet (Tsiang et al., 1990). Das Assay-Gemisch enthielt eine Menge des Gift-aktivierten konditionierten Mediums, das der amidolytischen Aktivität einer Standardmenge von S-2238 (8,5 mOD/min), 20 µl TMnc-Zelllysat und 887 nM Protein C in einem Gesamtvolumen von 50 µl entspricht. Dieses Gemisch wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und durch Zugabe von Antithrombin III und Heparin gestoppt. Für die Thrombomodulin-unabhängige Protein C-Aktivierung wurde das TMnc-Lysat ausgelassen und 2 mM $CaCl_2$ wurden mit 5 mM Na_2-EDTA im Assay-Gemisch ersetzt. Das gebildete aktivierte Protein C wurde mittels Hydrolyse des chromogenen Substrats S-2366 bestimmt. Die Roh-Scores von Tabelle 1a spiegeln die Bereinigung auf die gleiche Weise wie in Beispiel 2.3 wider. Die Protein C-Aktivierungsaktivität wurde als Wildtyp-Aktivität in % ausgedrückt.

2.5 HEPARIN-ABHÄNGIGE ANTITHROMBIN III-HEMMUNG DER GERINNUNG

[0145] In jedem Assay wurde eine Menge des Gift-aktivierten Mediums verwendet, das einer Rate der S-2238-Hydrolyse von 370 mOD/min entspricht. Das Volumen der Probe wurde mit scheintransfiziertem, 20fach konzentriertem Medium auf 15 µl eingestellt, mit 135 µl Selektionspuffer gemischt und auf 37 °C vorgewärmt. Die Gerinnungszeit wurde sofort nach der gleichzeitigen Zugabe von 50 µl von 2 mg/ml Fibrinogen und 50 µl von 650 nM AT-III mit oder ohne 0,1 U/ml Heparin zum Probengemisch gemessen. Die Empfindlichkeit der AT-III-Hemmung der Gerinnung von Heparin wurde in restlicher Gerinnungsaktivität in % bei Anwesenheit von Heparin im Vergleich zur Kontrolle ohne Heparin ausgedrückt.

BEISPIEL 3

3.1 BESTÄNDIGE EXPRESSION VON REKOMBINANTEN THROMBINEN

[0146] Linearisierte rekombinante Prothrombin-Konstrukte aus Beispiel 1 (10 µg) wurden unter Verwendung des Transfektionsverfahren mit Calciumphosphat in BHK-21-Zellen eingeführt (Graham und Van der Eb, 1973; Parker und Stark, 1979). Die Klone wurden in Kulturmedium, enthaltend das Antibiotikum, G418, ausgewählt, und die Expressionsspiegel wurden anhand der amidolytischen Aktivität und mittels des Western-Blottings bestimmt.

3.2 HERSTELLUNG VON KONDITIONIERTEM MEDIUM FÜR DIE PROTEINREINIGUNG

[0147] Jeder gewünschte BHK-21-Klon, exprimierend rekombinantes Prothrombin, wurde in Rollerflaschen (850 cm^2) geimpft und in komplettem DMEM, enthaltend 10 % FCS (5×10^6 Zellen pro 200 ml pro Rollerflasche) gezüchtet. Zwei Tage später, nachdem die Zellen konfluierten, wurden Microcarrier-Perlen, Cytodex 2 (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ) zum Beschichten der Zellmonolayer zugefügt. Drei Tage später, nachdem die Perlen mit auf ihnen wachsenden Zellen bedeckt waren, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und serumfreies DMEM, enthaltend 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferrin, 5 µg/ml Fetuin und 10 µg/ml Vitamin K, wurde den Zellen zur Prothrombin-Sekretion wieder zugefügt. Konditioniertes Medium wurde 3 Tage später einmal und ein weiteres Mal 6 Tage später geerntet.

[0148] In einem alternativen Verfahren wurde anstelle der Verwendung von Mikrocanier-Perlen zum Expandieren der Wachstumsoberfläche jeder gewünschte BHK-21-Klon in Rollerflaschen mit expandierter Oberfläche (1700 cm^2) in das gleiche Kulturmedium, wie vorstehend beschrieben, (5×10^6 Zellen pro 200 ml pro Rollerflasche) geimpft. Vier Tage später, nachdem die Zellen Konfluenz erreichten, wurden die Zellen mit PBS (anstelle von 3-mal) zweimal gewaschen und das gleiche serumfreie Medium (150 ml) wurde den Zellen zur Prothrombin-Expression wieder zugefügt. Das konditionierte Medium wurde 3-mal, einmal 4 Tage (150 ml) später, ein zweites Mal 8 Tage später (150 ml) und ein drittes Mal 11 Tage später (100 ml) geerntet. Das konditionierte Medium wurde durch Whatman N° 1-Filterpapier unter Verwendung eines Buchner-Trichters zur Entfernung der Zelltrümmer und, im ersten Verfahren, der losgelösten Perlen filtriert.

3.3 MEDIUMKONZENTRATION UND DIALYSE

[0149] Konditioniertes serumfreies Medium, enthaltend Prothrombin, wurde mit einem Tangentialfluss-Filtrationssystem (Pellicon^R, Millipore, Bedlford, MA) konzentriert. Die Cellulosemembran mit geringer Proteinbindung des Tangentialfluss-Filters (Typ PLCC, 5 ft^2, MWCO. 10 000) wurde nach Anweisung des Herstellers vorkonditioniert. Während der Konzentrierung wurde auf der Zuleitungsseite ein Druck von 20–25 psi, und auf der Retentatseite ein Druck von 3–4 psi verwendet. Die Permeat-Flussrate betrug 150–200 ml/min. Wenn das Medium (Retentat) auf ca. 500–600 ml konzentriert wurde, wurde es 7- bis 8-mal gegen 1000–1200 ml Dialysepuffer (0,1 M Kaliumphosphat; pH 7,5) durch das gleiche Filter dialysiert. Es sei kurz erwähnt, dass dem Mediumkonzentrat der Dialysepuffer unter vorsichtigem Mischen durch Zirkulieren der Mischung im Filtrationssystem für ca. 2–3 min (Permeation Aus) zugefügt wurde. Das Gemisch wurde dann auf 500–600 ml konzentriert. Nach 7- bis 8-maliger Wiederholung der vorstehenden Dialyse, wurden mehr als 99,9 % des Mediums durch den Dialysepuffer ersetzt.

3.4 PROTHROMBIN-REINIGUNG

[0150] Das Enddialysat (600–800 ml) wurde dann durch ein steriles entsorgbares Filter (0,45 µm) (Nalgene, Rochester, NY) filtriert und auf eine (2,6 × 7 cm) DEAE-Sepharose-Schnellfluss-Ionenaustausch-Säule (Pharmacia, Piscataway, NJ) geladen. Der Prothrombin-Peak wurde bei zwischen 0,35 und 0,45 M Kaliumphosphat

unter Verwendung eines Gradienten von 0,1–0,7 M eluiert. Aliquote von Fraktionen, enthaltend Prothrombin, wurden sowohl durch den amidolytischen Assay nach der Aktivierung des löslichen Gifts von Echis carinatus (Sigma, St. Louis, MO) als auch SDS-PAGE bestimmt. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und gegen 0,02 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 8,0 bei 4 °C über Nacht dialysiert. Nach der Dialyse wurden die gepoolten Prothrombin-Fraktionen durch eine PM30-Membran unter Verwendung einer gerührten Zelle (Amicon, Beverly, MA) auf 10–15 ml konzentriert.

3.5 REINIGUNG VON NPS

[0151] Prothrombin-NP im Konzentrat wurde durch das Gift von Echis carinatus, das an Amberlite CG50 (ICN Biomedicals, Irvine, CA) voradsorbiert wurde und optional an Affi-Gel-10-Perlen (Bio Rad, Richmond, CA) immobilisiert wurde, zu NP verarbeitet. Die Gift-Aktivierung des Prothrombin-NPs wurde 50 min bei 37 °C durch vorsichtige Rotation durchgeführt. Die Gift-Perlen wurden durch Zentrifugation, gefolgt von der Filtration durch ein Filter (0,45 µm) entfernt. Das Filtrat wurde sofort auf eine (2,6 × 7 cm) Amberlite CG50 (200–400 Mesh) Kationenaustausch-Säule geladen. Das NP wurde bei 0,4 M unter Verwendung eines Gradienten von 0,1–1,0 M NaCl als ein Einzelpeak eluiert. Die NP-Fraktionen wurden basierend auf der amidolytischen Aktivität und SDS-PAGE (gefärbtes Gel und Western-Blot) gepoolt. Gepoolte NP-Fraktionen wurden dann unter Verwendung einer gerührten Zelle mit einer PM30-Membran auf 8–10 ml konzentriert und gegen 0,1 M NaCl, 0,02 M HEPES, pH 8,0, dialysiert. Das gereinigte NP wurde mit Bezug auf die amidolytische Aktivität bei der Plasmagerinnungszeit, der Protein C-Aktivierung und Thrombozytenaggregation gekennzeichnet. Seine Reinheit und spezifische Aktivität wurden auch bestimmt. Schließlich wurde die NP-Aufbereitung in Aliquoten zu 0,5 ml in sterilen Polypropylenröhrchen bei –80 °C gelagert.

3.6 ANTIKOAGULATION IN VIVO UNTER VERWENDUNG VON NP

[0152] Die getesteten Formulierungen sind nachstehend angegeben:

Formulierung	Artikel	Beschreibung
A	Kontrolle	Sterile, isotonische Kochsalzlösung, USP.
B	Test	Eine sterile, isotonische wässrige Lösung des humanen Wildtyp-Thrombins (Hematologic Technologies - humanes Thrombin aus humanem Plasma, Prothrombinase aktiviert), enthaltend ca. 0,25 mg/ml Thrombin.
C	Kontrolle	Rekombinantes Bezugssequenz-Prothrombin aktiviert mit Gift von *Echis carinatus* auf die gleicheWeise wie das Test-NP (Fig. 2A).
D	Test	Eine sterile, isotonische wässrige Lösung aus rekombinantem NP-K52A, enthaltend ca. 0,25 mg/ml NP (Fig. 2B)
E	Kontrolle	Eine sterile, isotonische Lösung aus Thromboplastin aus dem Kaninchen-Gehirn (enthaltend Gewebsfaktor).

[0153] Die Formulierungen wurden jeweils durch intravenöse Verabreichung an weiße Neuseeland-Kaninchen über eine Verweilkanüle, die in einer Zentralvene lag, bei einer Infusionsrate von ca. 13 ml/Stunde (14,3 U/kg/min für den Wildtyp und 11,7 U/kg/min für K52A) verabreicht. Aufgrund der potenziellen thrombotischen Natur der Testformulierungen wurde angenommen, dass die Infusion in eine periphere Vene (z. B. die marginale Ohrvene) eine lokale Thrombose und Ischämie hervorrufen könnte, die auf eine hohe lokale Konzentration des Testartikels zurückzuführen ist. Durch Zugang zum Zentralkreislauf (z. B. der Vena cava superior (SVC) über die Vena jugularis) würde diese Komplikation aufgrund der hohen intravasalen Flussraten und der schnellen Verteilung einer innfundierten Verbindung minimiert. Dieser Ansatz wurde zuvor unter Verwendung von humanem Thrombin bei Pavianen verwendet (J. Clin. Invest., 92:2003–12, 1993).

[0154] Die Infusion von Formulierung E erfolgte über eine marginale Ohrvene, da gezeigt wurde, dass diese Verabreichungsroute sicher und wirksam ist.

[0155] Die Ergebnisse sind in **Fig.** 2A, 2B und 3 ersichtlich. Jede Figur stellt die Ergebnisse mit einem Kaninchen dar. **Fig.** 2A zeigt, dass Wildtyp-Thrombin zu erheblichem Fibrinogenverbrauch und exzessiver Antikoagulation führt. Im Gegensatz dazu ist aus **Fig.** 2B ersichtlich, dass K52A-PCA zu einer antikoagulatorischen Aktivität im Normalbereich (der schattierte Bereich in den Figuren) in der Lage ist, da es eine klinisch nützliche Wirkungsdauer besitzt, und da es zu keinem Fibrinogenverbrauch führt. **Fig.** 3 veranschaulicht die Eliminati-

onshalbwertzeit und Reversibilität.

3.7 PROTEIN C-AKTIVIERUNG DURCH PCAS BEI AN- ODER ABWESENHEIT VON TM

[0156] Der Protein C-Aktivierungsassay wird in Beispiel 2.4 beschrieben. Im Gegensatz zu Beispiel 2.4 ist die Vorbehandlung der Protein C-Stammlösung mit Gift und PPACK nicht notwendig, weil kein Gift in gereinigtem rekombinantem Thrombin zur Aktivierung des kontaminierenden Prothrombins in der Protein C-Stammlösung vorhanden ist. Thrombin, Thrombomodulin und Protein C wurden bei den in **Fig.** 6 angegebenen Konzentrationen verwendet. Die Reaktion wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und unter Verwendung des chromogenen Substrats S-2366 auf aPC-Aktivität untersucht. Dieses Experiment weist darauf hin, dass die PCAs K52A und E229A Thrombomodulin-abhängig bleiben.

BEISPIEL 4

NACHWEIS VON REVERSIBLER ANTIKOAGULATION IN CYNOMOLGUS-AFFEN UNTER VERWENDUNG VON PROTEIN C-AKTIVATOR 2 (PCA 2) (E229A) UND K52A-PCA

[0157] Der wie in Beispiel 3.4 und 3.5 beschrieben hergestellte PCA 2 wurde in steriler isotonischer wässriger Lösung in einem Gesamtvolumen von 10 ml hergestellt. Die PCA 2-Lösung wurde für eine Dauer von 10 min bei einer Rate von 60 ml/h in einem Gesamtvolumen von 10 ml kontinuierlich in eine periphere Vene von adulten männlichen Cynomolgus-Affen infundiert. Die Infusionsrate wurde durch die Verwendung einer Infusionspumpe kontrolliert. Es wurden zwei Konzentrationen verabreicht: (1) 1,5 µg/kg/min (2 U/kg/min) und (2) 4,5 µg/kg/min (6 U/kg/min). (1 U ist im vorstehenden Text definiert).

[0158] Blutproben wurden durch Punktion einer peripheren Vene an den folgenden Zeitpunkten gesammelt: sofort vor Infusionsbeginn (t = 0) und in Intervallen nach Infusionsbeginn (t = 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 min). Bei den Proben handelte es sich um ein in Citrat gesammeltes Volumen von ca. 2 ml. Das Plasma wurde innerhalb von 10 Minuten aus dem Vollblut gewonnen. Die Antikoagulation wurde durch Messung des aPTT in einem Fibrometer überwacht. Die Fibrinogenspiegel wurden aus den Gerinnungsassays unter Verwendung von Fibrinogen-defizientem Plasma bestimmt.

[0159] **Fig.** 4 erläutert die Ergebnisse der Infusion an individuelle Affen mit den beiden PCA 2-Dosen. Beide Dosen führten zu einer Verlängerung der Gerinnungszeit über den antizipierten therapeutischen Bereich (schattierter Bereich) hinausgehend ohne Fibrinogenverbrauch, was darauf hindeutet, dass dem PCA 2 eine nachweisbare prokoagulatorische Aktivität in vivo fehlte. Die Wirkung war reversibel, wobei die aPTT ca. 170 Minuten nach dem Anhalten der Infusion auf normale Werte zurückkehrte. Die Reversibilität der Wirkung deutete darauf hin, dass die Koagulationsfaktoren während der Infusion nicht verbraucht wurden, wobei es sich um einen anderen Hinweis handelte, dass PCA 2 keine nachweisbare prokoagulatorische Aktivität in vivo besaß. Die Analyse der Kinetik von der Umkehrung deutet auf eine Halbwertzeit für die Clearance von ca. 50 Minuten hin. Man nimmt an, dass dieser Persistenzgrad von klinischem Nutzen ist.

[0160] In einer getrennten Studie wurden 2 U/kg/min K52A-PCA hergestellt und über 10 Minuten, wie vorstehend beschrieben, infundiert und mit einem E229A-PCA von 2 U/kg/min im vorstehenden Beispiel verglichen. Die Ergebnisse sind in **Fig.** 5 ersichtlich. Obwohl die Fibrinogenspiegel mit K52A-PCA bei 2 U/kg/min nicht verändert wurden, resultierte der unter im Wesentlichen den gleichen Bedingungen, aber bei einer Überdosis von 12 U/kg/min infundierte K52A-PCA in einer aPTT, die um das 10fache größer als die Kontrolle ist, und in einem Abfall des Fibrinogens auf <10% resultierte. 12 U/kg/min stellten für Affen trotz der Tatsache eine Überdosis dar, dass er von Kaninchen bei dieser Dosis gut vertragen wurde (vorstehend). Folglich liegen die Dosen bei Affen im Allgemeinen niedriger als bei Kaninchen.

[0161] Der Thrombozytenverbrauch und die Blutungszeiten wurden bestimmt und die Ergebnisse sind in Tabelle 2 ersichtlich.

TABELLE 2

	E229A(2 U/kg/min)			E229A(6 U/kg/min)			K52A (2 U/kg/min)	
Zeit (nach der Infusion) (min)	0	60	150	0	60	180	0	120
Thrombozyten	345		352	400		341	458	471
Blutungszeit (min)	2	2		2	2			

[0162] Aus diesen Daten geht hervor, dass im Gegensatz zu den mit gpIIb/IIIa-Hemmern oder Thrombinhemmern gesehenen Ergebnisse die Thrombozytenfunktion erhalten wurde und die Blutungszeiten unverändert waren.

BEISPIEL 5

5.1 EXPRESSION UND VERWENDUNG VON NP MIT B-KETTEN ALLEIN

[0163] In Anbetracht unserer Beobachtungen, dass Substitutionen in der A-Kette des Thrombins eine vernachlässigbare Wirkung auf die S-2238-Hydrolyse, FC oder den PA aufwiesen, ist die Verwendung der PCA-B-Kette als ein Antikoagulans allein oder der FCP-B-Kette als ein Prokoagulans allein nützlich. Die FCP- oder PCA-B-Kette wird aus den beiden Elternketten durch Reduktion der verknüpfenden Disulfid-Bindung und Rückfaltung erhalten (Hageman et a.l, Arch. Biochem. Biophys. 171:327–336 [1975]). Die B-Kette wird jedoch bevorzugt durch Expression von Nukleinsäure, welche die NP-B-Kette allein kodiert, erhalten. Ein Expressionsvektor für den B-Ketten-PCA oder -FCP leitet sich von Vektoren her, die für die Expression von Prothrombin, Präthrombin 1, Präthrombin 2 (einkettiges α-Thrombin) durch Deletion der intervenierenden Sequenz zwischen dem Codon, kodierend den Carboxyl-Terminus des Signalpeptids und dem Amino-terminalen Rest der Thrombin-B-Kette (11) konstruiert wurden. Deletionen werden durch die Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide erreicht, die die Deletion als Primer an einer einsträngigen DNA-Matrize, wie für die Konstruktion der ala-Substitutions-NPs beschrieben, kodieren. Das Codon für C44 wird zum Kodieren von A oder S optional mutagenisiert.

5.2 EXPRESSION VON PRÄTHROMBIN-1 UND PRÄTHROMBIN-2 ALS GST-FUSIONSPROTEINE IN E. COLI

[0164] Präthrombin-1 (Amino-terminaler Rest S156, Degen et al., Restenummern) und Präthrombin-2 (Amino-terminaler Rest T272, Degen et al., Restenummern) wurden als lösliche Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) im zytoplasmatischen Kompartiment von E. coli exprimiert. Der verwendete Expressionsvektor war pGEX-5X-1 (Pharmacia LKB Biotechnology), der die pBR322-Startreplikation zur Propagation in E. coli, das β-Laktamase-Gen, kodierend für Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin zur Aufrechterhaltung der Anwesenheit des Plasmids und das lac 19-Gen, dass das lac-Repressor-Protein zur Dämpfung der basalen Expression des Fusionsproteins kodiert. Die Expression wird durch den tac-Promoter vermittelt, der durch IPTG, proximal zum Ribosomen-Bindungsort und dem Translations-Startcodon des GST-Gens vermittelt wird. Der Sequenz, kodierend die 221 Aminosäuren von GST folgt eine Sequenz (IEGR), kodierend einen proteolytischen Spaltungsort für Faktor Xa oder Gift von Echis carinatus, das zur Spaltung der GST-Komponente aus dem Fusionsprotein verwendet werden kann, und eine Polylinker-Sequenz enthaltend einzigartige Restriktionseenzymorte für die Insertion von an die GST-Kodierungssequenzen zu fusionierende Kodierungssequenzen.

[0165] Für Präthrombin-1 wurden PCR-Primer zur Amplifikation der Nukleotidsequenz, kodierend Präthrombin-1 aus 5156 (Degen et al., Restenummern) an den Carboxyl-Terminus der Thrombin-B-Kette, konzipiert. Das 5'-Ende der Präthrombin-1-Kodierungssequenz wurde durch die Addition einer Sequenz, kodierend sechs konsekutive Histidinreste, die als ein Affinitäts-Tag zur Reinigung von Fusionsproteinen auf Ni^{2+}-Chelatbildungsmatrices und die Addition einer Sequenz, kodierend einen EcoRI-Restriktionsendonukleaseort modifiziert. Der 3'-Primer wurde zum Insertieren einer Sequenz, kodierend einen XhoI-Restriktionsendonukleaseort auf der 3'-Seite des Stopcodons modifiziert. Für Präthrombin-2 wurde der gleiche 3'-PCR-Primer verwendet, der 5'-PCR-Primer wurde jedoch zum Fusionieren der Präthrombin-2-Sequenz, die am Rest T272 beginnt (Degen et al., Restenummern), an die sechs Histidin-Affinitäts-Tags und den EcoRI-Restriktionsort ausgelegt. PCR-Primer wurden zum Amplifizieren der modifizierten Sequenzen verwendet, die Präthrombin-1 und Präthrombin-2 unter Verwendung des Prothrombin-cDNA-Klons, BS(KS)-hFII als eine Matrize kodieren. Die am-

plifizierten Fragmente wurden im Rahmen mit der GST-Kodierungssequenz in den EcoRI- und XhoI-Orten in pGEX-5X-1 kodiert. Die sich ergebenden Konstrukte wurden zur Transformation des E. coli-Stammes JM 105 (ATCC 47016) verwendet.

[0166] Die Kulturen von JM 105 in der stationären Phase, die GST-Präthrombin-1 und GST-Präthrombin-2 enthielten, wurden über Nacht bei 37 °C in 25 ml Luria-Bertani-Medium (LB), enthaltend 200 µg/ml Ampicillin unter Schütteln bei 250 U/min gezüchtet. 200 ml Medium wurden mit 4 ml der Kultur in der stationären Phase beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bei 250 U/min, bis die Zellen die exponentielle Wachstumsphase (OD bei 600 nm = 0,6–1,2) erreichten, inkubiert. Die Inkubationstemperatur wurde auf 17 °C abgesenkt und nach 1 Stunde wurde IPTG bei einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt und die Inkubation wurde 24 Stunden fortgesetzt. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation bei 5OOOg geerntet und mit 50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,5, gewaschen. Die Zellen wurden in 20 ml 50 nM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,5, suspendiert, durch Beschallung für 3–4 Minuten (50 %-Arbeitszyklus) aufgeschlossen, Triton X-100 wurde einer Endkonzentration von 1 % zugefügt und der Extrakt wurde 60 Minuten bei 4 °C bei 80 U/min gemischt. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation bei 10 000g entfernt. GST-Präthrombin-1 und GST-Prährombin-2 wurden in der löslichen Fraktion bei einer Ausbeute von ca. 5 mg/Liter der Kultur, wie durch das Western-Blotting unter Verwendung eines gegen humanes α-Thrombin gerichteten monoklonalen Antikörpers (EST-1) exprimiert. GST-Präthrombin-1- und GST-Präthrombin-2-Fusionsproteine wurden durch Inkubation mit 30 µg/ml Gift von Echis carinatus in 50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,5, 30 Minuten bei 37 °C oder länger zu maturem α-Thrombin verarbeitet. Das Processing der Fusionsproteine zu Fragmenten der gleichen Größe wie die A- und B-Ketten von humanem α-Thrombin wurde durch das Western-Blotting, gefolgt von SDS-PAGE unter Reduktionsbedingungen sichtbar gemacht. Nach dem Processing wurde die amidolytische Aktivität gegenüber dem Thrombinspezifischen chromogenen Peptidyl-Substrat (S-2238) durch Inkubation von 200 ng der verarbeiteten GST-Präthrombin-1- oder GST-Präthrombin-2-Fusionsproteine mit 100 µM S-2238 in 50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,5, 10 Minuten bei 37 °C beurteilt. Die amidolytische Aktivität wurde nur in Proben nach dem Processing mit dem Gift von Echis carinatus nachgewiesen.

[0167] GST-Präthrombin-1- und GST-Präthrombin-2-Fusionsproteine wurden mittels Affinitätschromatographie auf Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia) gereinigt. Bakterienextrakte wurden auf eine 1-ml-Säule aus Glutathion-Sepharose 4B aufgebracht, die Säule wurde verschlossen und 40 Minuten gemischt. Die Säule wurde entleert und mit 50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,5, plus 1 % Triton X-100 gewaschen, dann mit 50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,5 gewaschen, und mit 1-ml-Aliquoten von 50 mM Tris-Cl, pH 8,0, enthaltend 10 mM Glutathion, eluiert. GST-Präthrombin-1- und GST-Präthrombin-2-Fusionsproteine, die mittels 10 mM Glutathion eluiert wurden, waren – wie anhand von SDS-PAGE, gefärbt mit Coomassie-Blue, beurteilt wurde – ca. 50 % rein.

[0168] Die erfindungsgemäßen NPs werden auf die gleiche Weise wie das Präthrombin-1 oder Präthrombin-2 in diesem Beispiel hergestellt und werden, wie hierin beschrieben, zu maturem, aktiviertem NP verarbeitet, außer dass die Konstrukte zur Einführung der gewünschten Sequenzänderung in den Expressionsvektor vor der Expression in JM 105 mutagenisiert werden.

BEISPIEL 6

THROMBOZYTENAGGREGATION DURCH PCA 2- (E229A) UND WILDTYP-THROMBIN

[0169] Obwohl nachgewiesen wurde, dass PCA 2 bei der Fibrinogengerinnung defektiv ist, besteht eine andere wichtige prokoagulatorische Funktion des Thrombins in der Stimulation der Thrombozytenaggregation aufgrund der Spaltung eines Transmembranrezeptors auf der Thrombozytenoberfläche. Zum Nachweis, dass PCA 2 auch bei dieser prokoagulatorischen Funktion des Thrombins defektiv ist, wurden Studien zur Thrombozytenaggregation durchgeführt, die verschiedene Konzentrationen von PCA 2- und Wildtyp-Thrombins vergleichen.

[0170] Studien zur Thrombozytenaggregation, die Wildtyp- und PCA-2-Thrombin vergleichen, wurden mit citriertem humanem Thrombozyten-reichen Plasma (PRP) unter Verwendung eines Chrono-Log-Dualkanal-Aggregometers (Modell 560-VS, Chrono-Log Corp, Havertown PA) durchgeführt. Frisches humanes Vollblut (4,5 ml) wurde in sterilen Vacutainer-Röhrchen (Becton Dickenson, Rutherford, NJ), die 0,5 ml 129 mM Natriumcitrat enthalten, gesammelt. PRP wurde durch Zentrifugation vom citrierten Blut getrennt. Das Aggregometer wurde gemäß den Anleitungen des Herstellers eingestellt. Rekombinantes humanes α-Thrombin wurde vorgewärmtem (2 min bei 37 °C) PRP bei Endkonzentrationen im Bereich von 0,12 nM–0,49 nM für den Wildtyp und 0,74 nM–71,89 nM für PCA 2 zugefügt. Die durch die Thrombin-Zugabe zu PRP stimulierte Thrombozytenag-

gregation wurde durch Zunahme der Lichtdurchlässigkeit, die bis zu 5 Minuten an einem Bandschreiber aufgezeichnet wurde, überwacht. Der Grad der Thrombozytenaggregation wurde durch Messen der Fläche unter der Kurve 1,5 min nach der Zugabe von Thrombin quantifiziert. Der Grad der Thrombozytenaggregation (cm^2) wurde gegen die Thrombin-Konzentration aufgetragen (**Fig.** 7).

[0171] Die EC50 (die Konzentration, die für 50 % der maximalen Stimulation erforderlich ist) zur Stimulation der Thrombozytenaggregation durch Wildtyp-Thrombin und PCA 2 wurde anhand der Kurve bestimmt. Der PCA 2 (EC50 = 30,8 nM) ist bei der Stimulation der Thrombozytenaggregation 8-mal weniger wirksam als das Wildtyp-Thrombin (EC50 = 3,9 nM) und ist folglich hinsichtlich der prokoagulatorischen Aktivität ebenso wie bei der Gerinnung von Fibrinogen defektiv.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, G. A. et al., Mol. Cell. Biol. 5, 1442–1448, 1985.
Bowie J. U. et al., Science. 247, 1306–1310, 1990.
Dreyfus, M., et al., N. Eng. J. Med. 325, 1565–1568, 1991.
Graham, F.L., und Vand der Eb, A., J. Virology. 52, 456–467, 1973.
Gruber, A., et al., Circulation. 82, 578–585, 1991.
Gruber, A., et al., Circulation. 84, 2454–2462, 1991a.
Hirsh, J., N. Eng. J. Med. 324, 1865–1875, 1991.
Hirsh, J., N. Eng. J. Med. 324, 1565–1574, 1991a.
Klapper, M. H., Biochem. Biophys. Res. Comm. 78, 1018–1024, 1977.
Kunkel T. A. et al., Meth. Enzymol. 154, 367–382, 1987.
LaVallie, E. R., et al., Biotechnology, 11, 187–193, 1993.
Maggi, A., et al., Haemostasis. 17, 329–335, 1987.
Parker, B.A. und Stark, G.R., J. Virol. 31, 360–369, 1979.
Pescador, R., et al., Thrombosis Res. 53, 197–201, 1989.
Rose G. D. et al., Science. 229, 834–838, 1985.
Rydel T. J. et al., Science. 249, 277–280, 1990.
Smith, D. B. et al., Gene, 67, 31–40, 1988.
Stader, J. A. et al., Meth. Enzymol. 185, 166–187, 1990.
Studier, F. W. et al., Meth. Enzymol. 185, 60–89, 1990.
Tabor, S. und Richardson, C.C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 4767–4771, 1987.
Taylor et al., J. Clin. Invest. 79, 918–925, 1987.
Tsiang, M., et al., Biochemistry 29, 10602–10612, 1990.
Tsiang, M., Lentz, S. R., und Sadler, J. E. J. Biol. Chem. 267, 6164–6170, 1992.
Vieira, J. and Messing, J., Meth. Enzymol. 153, 3–11, 1987.
Wells, J. A. Biochemistry, 29, 8509–8S17, 1990.
Wu, Q., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6775–6779, 1991.
Zoller, M. J. and Smith, M., Nucleic Acids Res. 10, 6487–6493, 1982.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: GILEAD SCIENCES, INC.

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: NEUE POLYPEPTIDE UND KOAGULATIONSTHERAPIE

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) NAME: GILEAD SCIENCES, INC.

(B) STRASSE: 353 LAKESIDE DRIVE

(C) STADT: FOSTER CITY

(D) STAAT: CALIFORNIA

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL: 94404

(v) MASCHINENLESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Diskette

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: Patent In Release Nr. 1.0, Version Nr. 1.25

(vi) VORLIEGENDE PATENTANMELDUNG:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: PCT/US94/13104

(B) ANMELDETAG: 14. NOV. 1994

(C) KLASSIFIKATION:

(vii) FRÜHERE PATENTANMELDUNG

(A) ANMELDUNGSNUMMER: US 08/338,368

(B) ANMELDETAG: 14. NOV. 1994

(viii) ANGABEN ZUM PATENTANWALT:

(A) NAME: HENSLEY, MAX D.

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 27,043

(C) REFERENZNUMMER: 190.2F

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:

(A) TELEFON: 415-574-3000

(B) TELEFAX: 415-578-9264

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 885 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einsträngig

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..885

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

```
ACC TTT GGC TCG GGA GAG GCA GAC TGT GGG CTG CGA CCT CTG TTC GAG        48
Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu
  1               5                  10                  15

AAG AAG TCG CTG GAG GAC AAA ACC GAA AGA GAG CTC CTG GAA TCC TAC        96
Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr
            20                  25                  30

ATC GAC GGG CGC ATT GTG GAG GGC TCG GAT GCA GAG ATC GGC ATG TCA       144
Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser
        35                  40                  45


CCT TGG CAG GTG ATG CTT TTC CGG AAG AGT CCC CAG GAG CTG CTG TGT       192
Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys
    50                  55                  60

GGG GCC AGC CTC ATC AGT GAC CGC TGG GTC CTC ACC GCC GCC CAC TGC       240
Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys
65                  70                  75                  80

CTC CTG TAC CCG CCC TGG GAC AAG AAC TTC ACC GAG AAT GAC CTT CTG       288
Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu
                85                  90                  95

GTG CGC ATT GGC AAG CAC TCC CGC ACC AGG TAC GAG CGA AAC ATT GAA       336
Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu
            100                 105                 110

AAG ATA TCC ATG TTG GAA AAG ATC TAC ATC CAC CCC AGG TAC AAC TGG       384
Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp
        115                 120                 125

CGG GAG AAC CTG GAC CGG GAC ATT GCC CTG ATG AAG CTG AAG AAG CCT       432
Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro
    130                 135                 140

GTT GCC TTC AGT GAC TAC ATT CAC CCT GTG TGT CTG CCC GAC AGG GAG       480
Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu
145                 150                 155                 160
```

```
ACG GCA GCC AGC TTG CTC CAG GCT GGA TAC AAG GGG CGG GTG ACA GGC          528
Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly
                165                 170                 175

TGG GGC AAC CTG AAG GAG ACG TGG ACA GCC AAC GTT GGT AAG GGG CAG          576
Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln
            180                 185                 190

CCC AGT GTC CTG CAG GTG GTG AAC CTG CCC ATT GTG GAG CGG CCG GTC          624
Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val
        195                 200                 205

TGC AAG GAC TCC ACC CGG ATC CGC ATC ACT GAC AAC ATG TTC TGT GCT          672
Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala
    210                 215                 220

GGT TAC AAG CCT GAT GAA GGG AAA CGA GGG GAT GCC TGT GAA GGT GAC          720
Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp
225                 230                 235                 240

AGT GGG GGA CCC TTT GTC ATG AAG AGC CCC TTT AAC AAC CGC TGG TAT          768
Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr
                245                 250                 255

CAA ATG GGC ATC GTC TCA TGG GGT GAA GGC TGT GAC CGG GAT GGG AAA          816
Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys
            260                 265                 270

TAT GGC TTC TAC ACA CAT GTG TTC CGC CTG AAG AAG TGG ATA CAG AAG          864
Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys
        275                 280                 285

GTC ATT GAT CAG TTT GGA GAG                                             885
Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
    290                 295
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 295 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

```
Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu
 1               5                  10                  15

Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr
            20                  25                  30

Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser
        35                  40                  45

Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys
    50                  55                  60

Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys
65                  70                  75                  80

Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu
                85                  90                  95

Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu
            100                 105                 110

Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp
        115                 120                 125

Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro
    130                 135                 140

Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu
145                 150                 155                 160

Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly
                165                 170                 175

Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln
            180                 185                 190

Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val
        195                 200                 205

Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala
    210                 215                 220

Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp
225                 230                 235                 240

Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr
                245                 250                 255

Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys
            260                 265                 270

Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys
        275                 280                 285

Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
    290                 295
```

Patentansprüche

1. Proteolytisch aktives neues Polypeptid (NP), das mindestens eine ca. 80%ige Aminosäuresequenz-Homologie mit Bezugssequenzthrombin aufweist und ein Verhältnis von Protein C-aktivierender Aktivität zu Fibrinogengerinnungsaktivität aufweist, das größer als das ca. Zweifache von dem der Bezugssequenzthrombin ist, worin mindestens ein Aminosäurerest für mindestens einen der folgenden Thrombin-Aminosäurereste substituiert wurde, oder mindestens einer der folgenden Thrombin-Aminosäurereste deletiert wurde, oder ein Aminosäurerest unmittelbar benachbart zu mindestens einem der folgenden Thrombin-Aminosäurereste insertiert wurde: W50, D51, R93, E94, R98, D122, R123, E124, S128, Q131, E169, K174, D175, S176, T177, D183, D193, K196, A200, N216, W227, E229, D232, R233, D234, G235, K236, Y237, F239 oder W249, jedoch vorausgesetzt, dass das NP nicht Thrombin K174E oder Thrombin des P48P49W50 darstellt.

2. NP nach Anspruch 1, worin das NP aus einem Thrombin ausgewählt ist, worin einer oder mehr von Resten W50, S176, T177, D193, K196, W227, E229, D232, R233, D234, K236, Y237 oder F239 substituiert, de-

letiert wurden oder ein anderer Rest benachbart dazu insertiert wurde.

3. NP nach Anspruch 2, worin W50 deletiert ist oder ein anderer aus der folgenden Gruppe ausgewählter Rest dafür substituiert oder unmittelbar benachbart dazu insertiert wurde: G, A, V, I, L, S, T, D, N, E, Q, C, K, M, F, Y, P, R und H.

4. NP nach Anspruch 2, worin K196 deletiert ist oder ein anderer aus der folgenden Gruppe ausgewählter Rest dafür substituiert oder unmittelbar benachbart dazu insertiert wurde: G, A, V, I, L, S, T, D, N, E, Q, C, M, F, Y, P, W, R und H.

5. NP nach Anspruch 2, worin D193 oder D234 deletiert ist oder ein anderer aus der folgenden Gruppe ausgewählter Rest dafür substituiert oder unmittelbar benachbart dazu insertiert wurde: G, A, V, I, L, S, T, N, E, Q, C, K, M, F, Y, P, W, R und H.

6. NP nach Anspruch 2, worin Reste W50 und K52, E229 und W50, R233 und W50, R233 und K52 oder R233 und E229 substituiert oder deletiert sind.

7. NP nach Anspruch 2, worin E229 deletiert ist oder ein anderer aus der folgenden Gruppe ausgewählter Rest dafür substituiert oder unmittelbar benachbart dazu insertiert wurde: G, A, V, I, L, S, T, D, N, Q, C, K, M, F, Y, P, W, R und H.

8. NP nach Anspruch 2, worin die Substitution, Deletion oder Insertion nur in der A- oder B-Kette vorgenommen wird.

9. NP nach Anspruch 2, worin R233 deletiert ist oder ein anderer aus der folgenden Gruppe ausgewählter Rest dafür substituiert oder unmittelbar benachbart dazu insertiert wurde: G, A, V, I, L, S, T, D, N, E, Q, C, K, M, F, Y, P, W und H.

10. NP nach Anspruch 2, worin Reste D193, K196 und K52 substituiert oder deletiert sind.

11. NP nach Anspruch 2, worin der Rest substituiert ist und die Substitution mit Alanin erfolgt.

12. NP nach Anspruch 2, worin 2 oder 3 der Reste substituiert sind.

13. NP nach Anspruch 2, das eine von der A-Kette freie B-Kette umfasst.

14. NP nach Anspruch 2, das eine A- und B-Kette umfasst.

15. NP nach Anspruch 1, das größer als ca. das Zweifache der restlichen proteolytischen Aktivität von Bezugsthrombin besitzt, wenn es durch Hydrolyse von S-2238 in Gegenwart von Heparin-abhängiger AT-III-Inhibition gemessen wird.

16. NP nach Anspruch 2, worin ein Rest des Heparin-Bindungsorts substituiert ist.

17. NP nach Anspruch 16, worin der Rest R89, R180, R245, K248 oder K252 darstellt.

18. NP nach Anspruch 2, das K52A, R233A NP, E229D NP, E229F NP, E229S NP, E229W NP, E229Y NP, R233N NP, R233D NP, R233F NP, W50C NP, W50E NP oder W50K NP darstellt.

19. NP nach Anspruch 1, worin das Thrombin am Rest W227 substituiert wurde, W227 deletiert wurde oder ein anderer Rest unmittelbar benachbart zu W227 insertiert wurde.

20. NP nach Anspruch 2, worin der Rest E229 oder R233 darstellt.

21. NP nach Anspruch 1, worin sich der Rest innerhalb von 10 Ångstrom des Ca von E229 oder R233 befindet.

22. NP nach Anspruch 2, worin Arginin für E229 substituiert wurde.

23. Nukleinsäure, codierend das NP nach Anspruch 1.

24. Replizierbarer Vektor, umfassend die Nukleinsäure nach Anspruch 23.

25. Rekombinante Zelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 24.

26. Verfahren, umfassend das Kultivieren der Zelle nach Anspruch 25 und Rückgewinnung des NP aus der Zellkultur.

27. Verfahren nach Anspruch 26, worin das NP in der Zellkultur als ein lösliches Polypeptid exprimiert wird.

28. Verfahren nach Anspruch 26, worin das NP in der Zellkultur als die B-Kette allein exprimiert wird.

29. Verfahren nach Anspruch 26, worin die Nukleinsäure A- und B-Sequenzen codiert, von denen jeweils jede unabhängig an Nukleinsäure, codierend eine Signalsequenz, ligiert ist und die Nukleinsäure in der gleichen Wirtszelle coexprimiert wird.

30. Pharmazeutische Zusammensetzung, die ein proteolytisch aktives NP nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

31. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung thrombotischer Erkrankungen oder Zustände, umfassend eine therapeutisch wirksame Menge eines proteolytisch aktiven NP nach einem der Ansprüche 1 bis 22.

32. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 31, worin das NP eine größere als das ca. Zweifache der restlichen proteolytischen Aktivität des Bezugsthrombins besitzt, wenn es durch Hydrolyse von S-2238 in Gegenwart von Heparin-abhängiger AT-III-Inhibition gemessen wird.

33. Proteolytisch aktives NP nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Anwendung bei der Therapie.

34. Proteolytisch aktives NP nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Anwendung bei der Behandlung thrombotischer Erkrankungen oder Zustände.

35. Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung thrombotischer Erkrankungen oder Zustände eines proteolytisch aktiven NP nach einem der Ansprüche 1 bis 22.

36. Verwendung nach Anspruch 35, worin das NP eine größere als das ca. Zweifache der restlichen proteolytischen Aktivität des Bezugsthrombins besitzt, wenn es durch Hydrolyse von S-2238 in Gegenwart von Heparin-abhängiger AT-III-Inhibition gemessen wird.

37. Verwendung nach Anspruch 35, worin die thrombotische Erkrankung oder der Zustand eine Herzbypassoperation, eine koronare Thrombolyse und Angioplastie, eine Lungenembolie, transitorische ischämische Attacken, einen Schlaganfall, eine instabile Angina pectoris oder eine tiefe Venenthrombose darstellt.

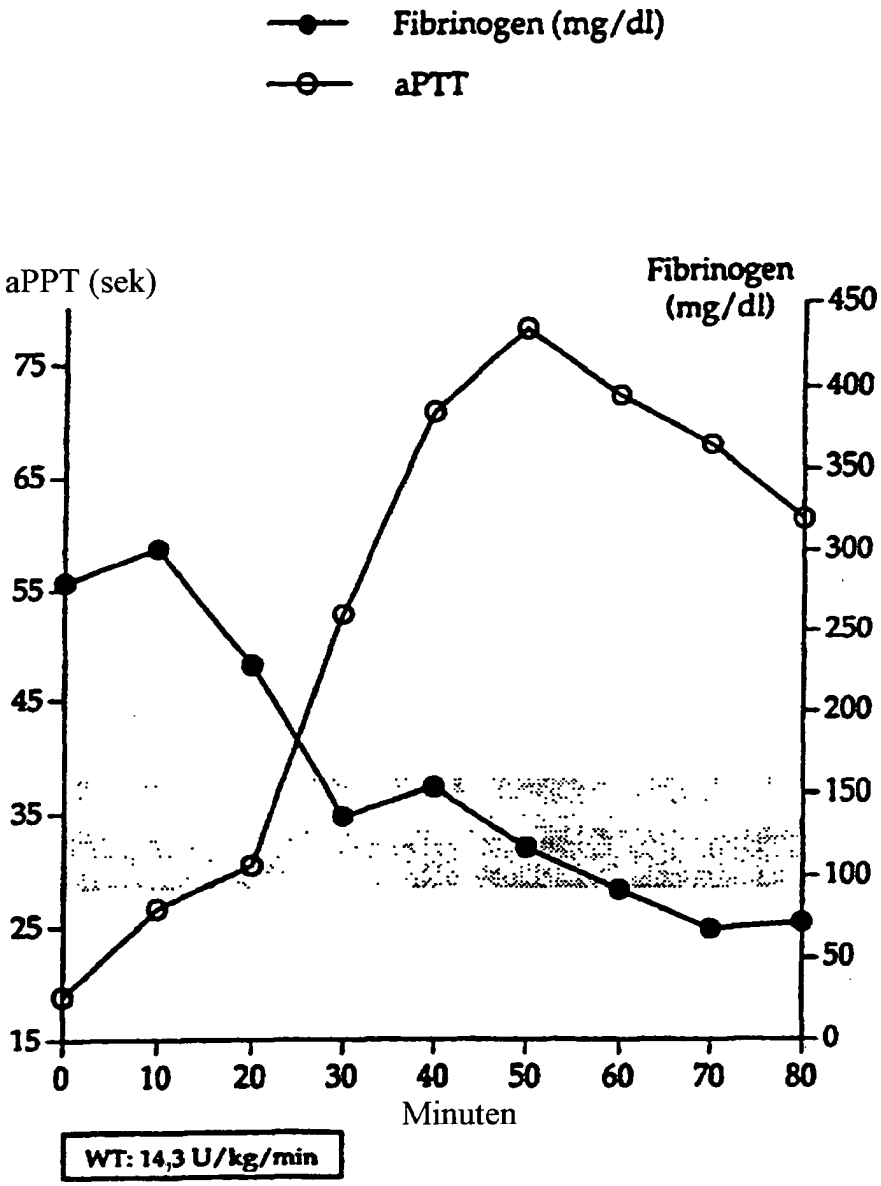
38. Verwendung nach Anspruch 35, worin dem NP eine nachweisbare Fibrinogengerinnungsaktivität fehlt.

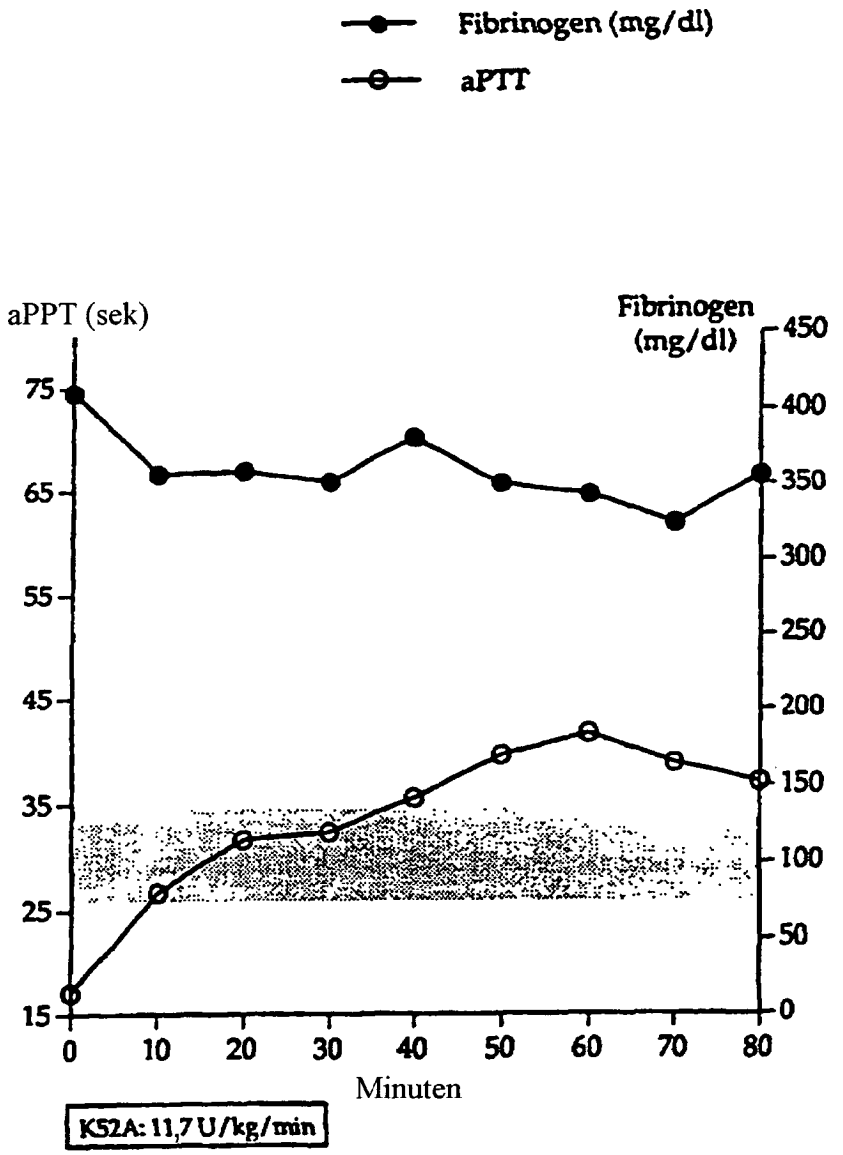
39. Verwendung nach Anspruch 35, worin das NP mindestens ca. 5% der Protein C-aktivierenden Aktivität des Wildtyp-Thrombins beibehält.

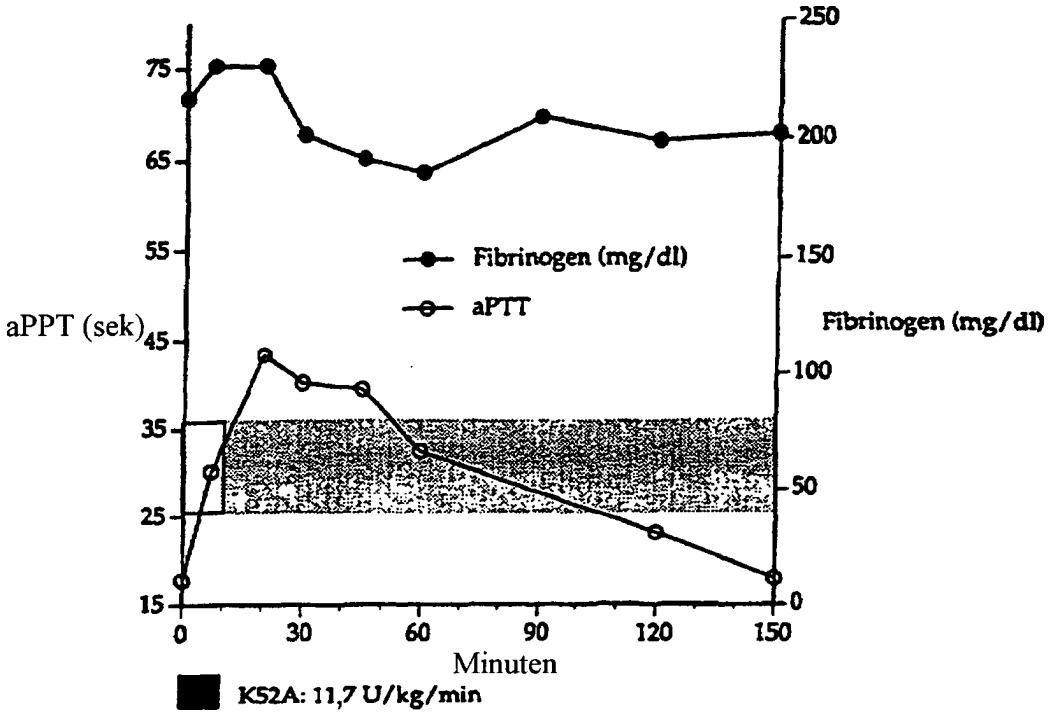
40. Verwendung nach Anspruch 35, worin das NP K52A, R233A NP, E229D NP, E229F NP, E229S NP, E229W NP, E229Y NP, R233D NP, R233N NP, R233F NP, W50C NP, W50E NP oder W50K NP darstellt.

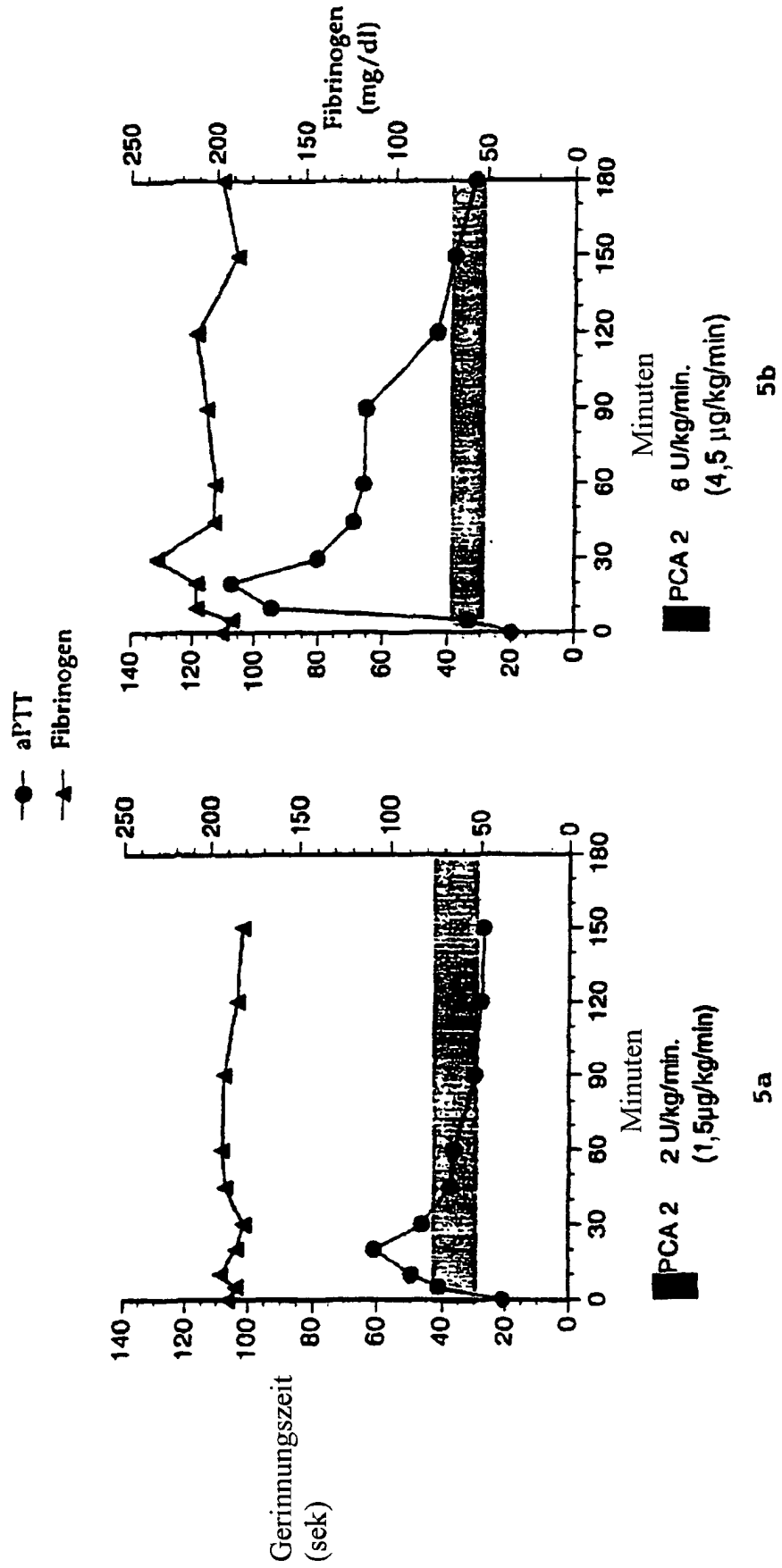
Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

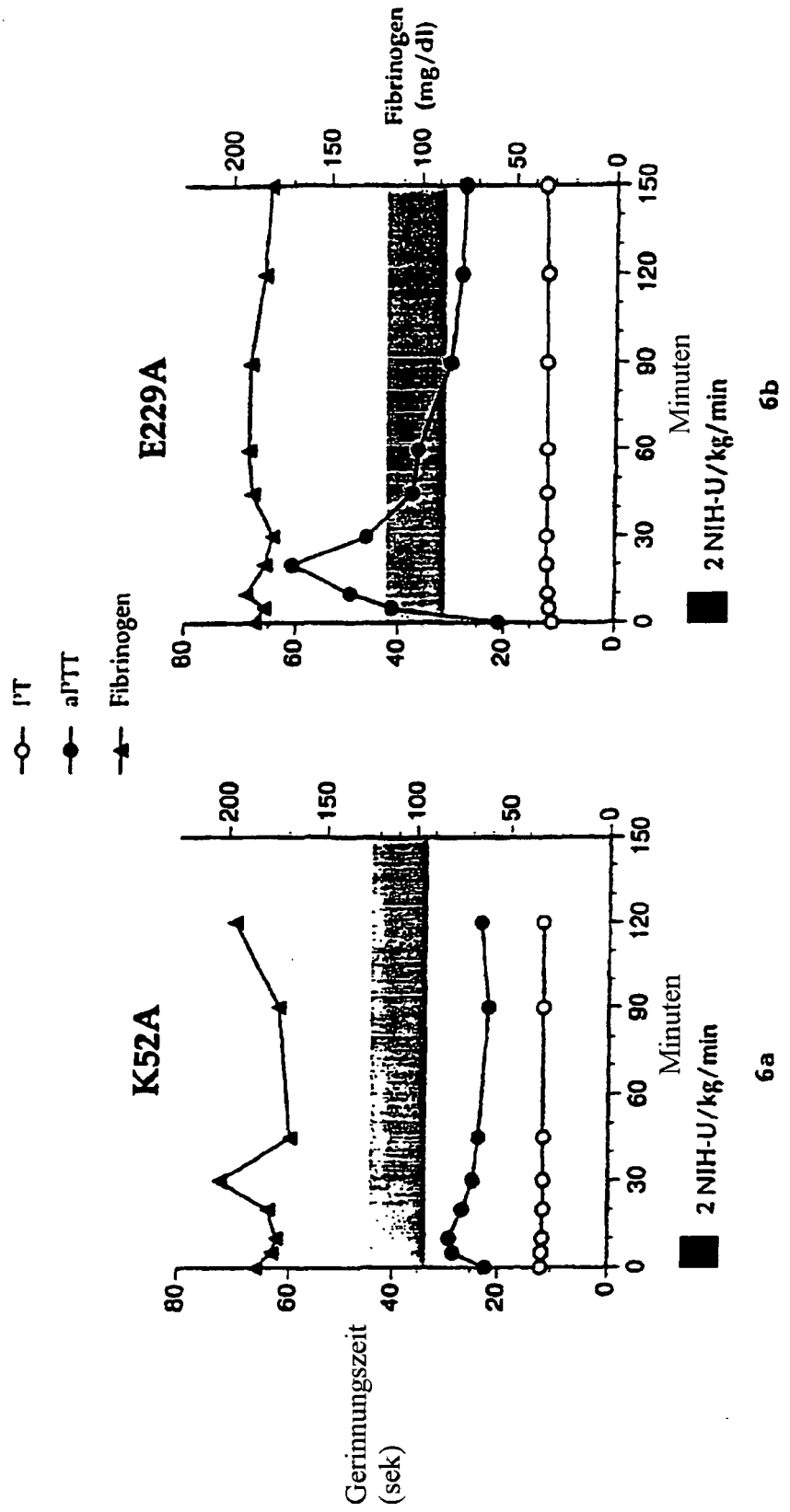
Anhängende Zeichnungen

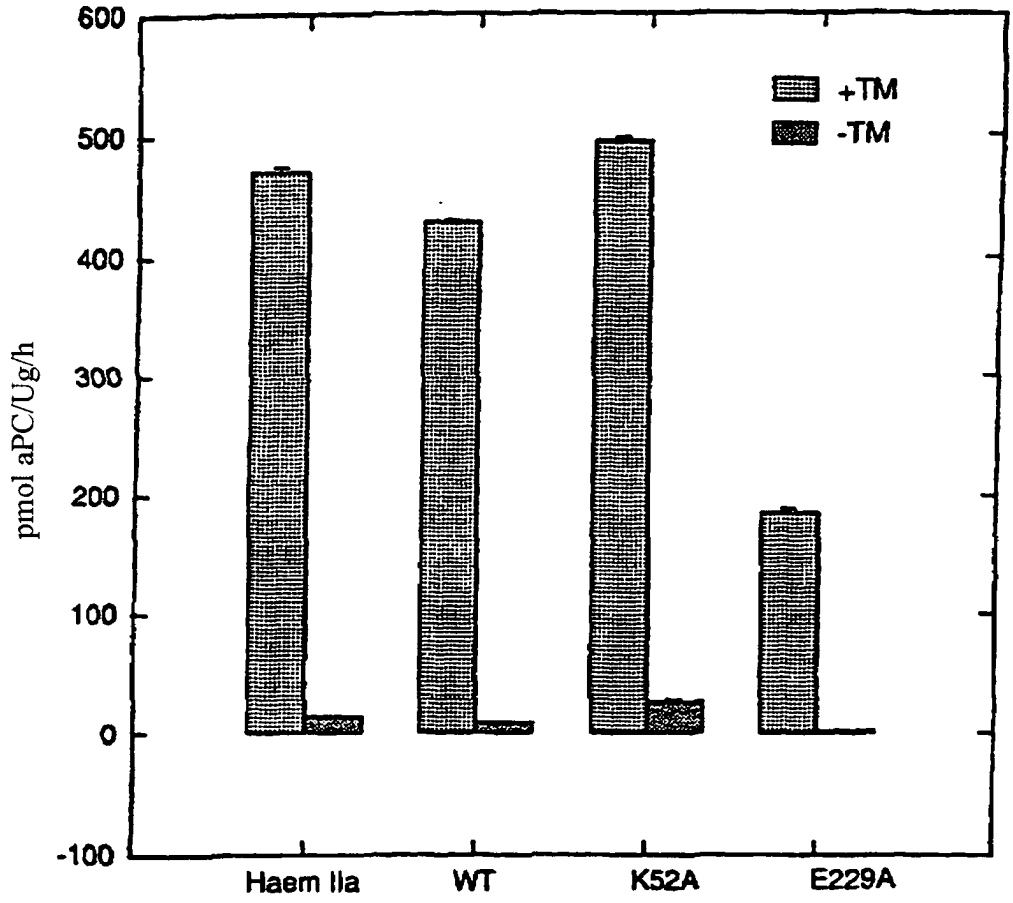

Fibrinogen (mg/dl)
aPTT
aPPT (sek)
Fibrinogen (mg/dl)
75
65
55
45
35
25
15
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Minuten
WT: 14,3 U/kg/min


Fibrinogen (mg/dl)
aPTT
aPPT (sek)
Fibrinogen (mg/dl)
75
65
55
45
35
25
15
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Minuten
K52A: 11,7 U/kg/min

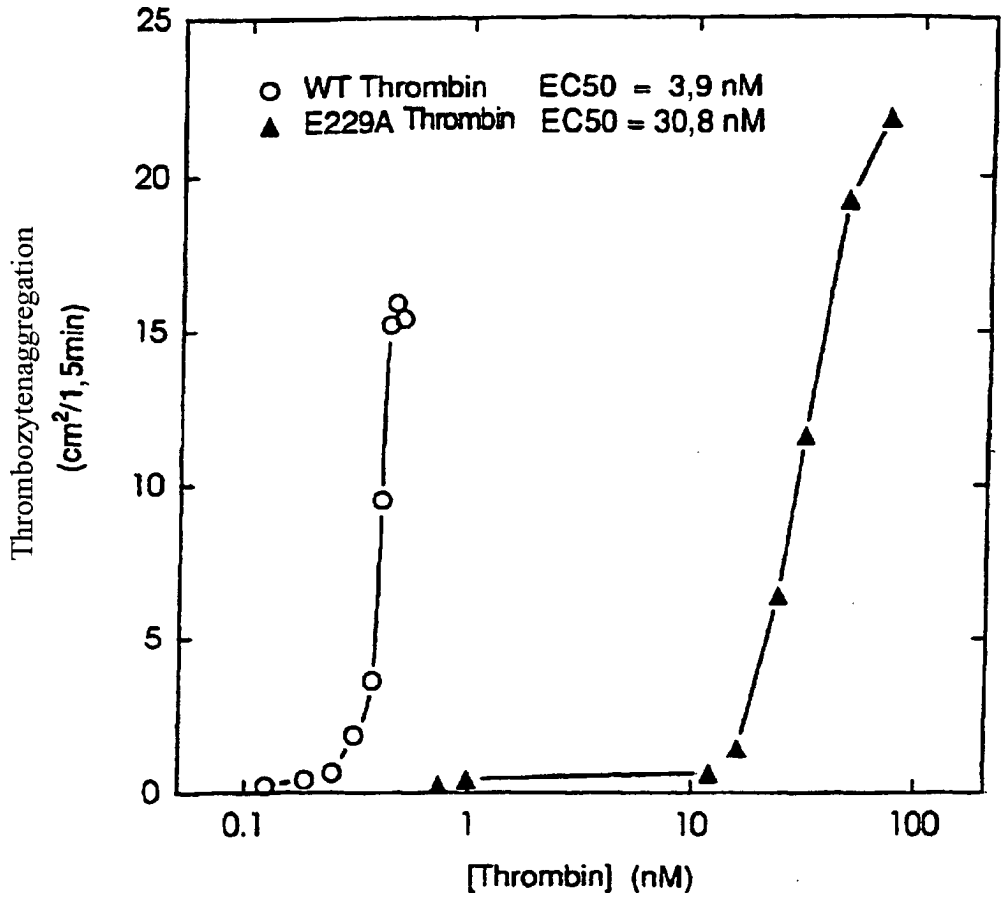

aPPT (sek)
75
65
55
45
35
25
15
250
200
150
100
50
0
Fibrinogen (mg/dl)
aPTT
Fibrinogen (mg/dl)
0
30
60
90
120
150
Minuten
K52A: 11,7 U/kg/min


aPTT
Fibrinogen
Gerinnungszeit (sek)
Minuten
PCA 2 2 U/kg/min. (1,5µg/kg/min)
5a
Fibrinogen (mg/dl)
Minuten
PCA 2 8 U/kg/min. (4,5 µg/kg/min)
5b


PT
aPTT
Fibrinogen
K52A
E229A
Gerinnungszeit (sek)
Fibrinogen (mg/dl)
Minuten
2 NIH-U/kg/min
6a
6b



[TM] = 0,5 nM, [PC] = 887 nM, [IIa]=10nM


25
20
15
10
5
0
WT Thrombin EC50 = 3,9 nM
E229A Thrombin EC50 = 30,8 nM
Thrombozytenaggregation
(cm²/1,5min)
0.1
1
10
100
[Thrombin] (nM)