



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **302954**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 12 N 9/64, 15/58

Patentstyret

(21) Søknadsnr	892976	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	20.07.89	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	20.07.89	(30) Prioritet	20.07.88, US, 221697
(41) Alm. tilgj.	22.01.90		13.07.89, US, 377221
(45) Meddelt dato	11.05.98		
(83) Mikroorganisme deponert:	ATCC nr 68049, 68050, 68051, 68052, 68053 og i CRL nr.10180		
(73) Patenthaver	Schering AG, D-13342 Berlin, DE		
(72) Oppfinner	Le Thi Duong, Jenkintown, PA, US Paul A. Friedman, Rosemont, PA, US Stephen J. Gardell, North Wales, PA, US John W. Jacobs, Doylestown, PA, US Richard A.F. Dixon, Lansdale, PA, US Bruce L. Daugherty, South Orange, NJ, US George E. Mark, Princeton Junction, NJ, US		
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo		

(54) **Benevnelse** **Fremgangsmåte for fremstilling av et plasminogenaktiverende protein, DNA-sekvens som koder for proteinet, kloningsvektor inneholdende DNA-sekvensen, samt pattedyrceile og bakteriecelle transfektert med kloningsvektoren**

(56) **Anførte publikasjoner** Blood, vol. 43, 3. mars 1974, s. 317-326

(57) **Sammendrag**

Høyaktive glycoprotein-plasminogenaktivatorer med strengt behov for nærvær av fibrin-cofaktor og som lett katalyserer lyse av plasmakoagel. Plasminogenaktivatoren kan produseres av vert-mikroorganismer eller eukaryotiske celler som er om-dannet med ekspresjonsvektorer med en innført DNA-sekvens som koder for glycoproteinet.

Vampyrer eller blodsugende flaggermus er absolutt avhengige av en næring i form av friskt blod som de får ved å gi offeret et sår. Selv om disse sårene bare er i overflaten, fortsetter de å lekke ut blod i flere timer.

5 Bestanddelene i spytt fra vampyr (*Desmodus rotundus*) ble undersøkt, og man fant at disse hadde innvirkning på den hemostatiske mekanisme hos pattedyrblod på tre spesielle områder. Man kunne vise at de inhiberte blodplateaggregering og aktiverte plasminogen (Hawkey, C.M., *Nature*, 211:434 (1966) 10 og Hawkey, C.M., *Br. J. Haematol.*, 13:1014 (1967)). Hver av disse virkninger kunne knyttes til en spesiell proteinfraksjon. Den fraksjon som aktiverte plasminogen, ble betegnet "desmokinase" (Hawkey, C.M., *Nature*). Cartwright, T., *Blood*, beskriver rensing av desmokinase fra *Desmodus*-spyttskret og 15 angir at det er mer effektivt enn urokinase (UK) og streptokinase for lyses av tidligere dannet koagel.

Bruken av vevs-plasminogenaktivator (tissue-type plasminogen activator = tPA) som trombolytisk agens er beheftet med en rekke ulemper, bl.a. alvorlige blødningskomplikasjoner, relativt hyppig reokklusjon, manglende jevn virkning 20 og tendens til inaktivering fra plasminogenaktivatorinhibitorer som plasminogenaktivatorinhibitor av type 1 (PAI-1) (Loskutoff, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, bind 14, nr. 1 (1988)).

25 Man antar at blødningskomplikasjoner ved trombolytisk behandling forårsakes eller økes ved aktivering av sirkulerende plasminogen. Man tror at evnen hos tPA til å binde seg til fibrin er årsak til dens markerte substratpreferanse overfor fibrinbundet plasminogen. Ikke desto 30 mindre har teoretiske studier og resultater av kliniske forsøk vist at de høye innhold av tPA som er nødvendige for hurtig koagel-oppløsning, også fører til aktivering av betydelige mengder sirkulerende plasminogen.

Videre antar man at samvirkereaksjoner mellom tPA 35 og plasmainhibitorer svekker aktiviteten hos tPA under og etter infusjon og derved medvirker potensielt til reokklusjon.

sjon.

En annen ulempe som følger med bruk av tPA som trombolytisk middel, er at den nødvendige dose tPA er stor, mellom 100 og 150 mg, hvilket gjør denne behandlingen svært
5 kostbar.

Man har nå funnet plasminogenaktivatorer i spytt og spyttkjertler fra *Desmodus rotundus* som oppviser større selektivitet overfor fibrinbundet plasminogen og derfor kan redusere graden og hyppigheten av blødnings-diatese ved
10 trombolytisk behandling. Videre blir disse aktivatorer ikke lett inaktivert av plasmainhibitorer som PAI-1 og kan derfor gi mindre hyppig reokklusjon.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av et plasminogenaktiverende protein, DNA-sekvens
15 som koder for proteinet, kloningsvektor inneholdende DNA-sekvensen, samt pattedyrceelle og bakteriecelle transfektert med kloningsvektoren.

Oppfinnelsen omfatter en fremgangsmåte for fremstilling av et renset glycolsylert eller uglycosylert plasminogen-
20 aktiverende protein, en DNA-sekvens som koder et slikt protein, en replikerbar kloningsvektor som omfatter DNA-sekvensen, samt en pattedyrceelle og en bakteriecelle transfektert med kloningsvektoren og i stand til å uttrykke det gitte protein.

25 Plasminogenaktivator-protein isolert fra spytt og spyttkjertler hos vampyr, skiller seg fra både tPA og urokinase med hensyn til forskjellige strukturelle og funksjonelle trekk. Til forskjell fra tPA inneholder plasminogenaktivatorer fremstilt ifølge oppfinnelsen ikke kjede-domene 2
30 (kringle 2 domain) og plasmin-sensitivt reaksjonspunkt. Ekvimolare mengder av disse aktivatorer og tPA er like effektive med hensyn til å katalysere lyses av tidligere dannet plasmakoagel. Virkningen overfor plasminogen stimuleres minst 27.000 ganger i nærvær av fibrin-cofaktor. Tilsvarende
35 verdi for tPA er bare 205 ganger. Man har isolert tre spesielle arter som svarer til tPA i full lengde, finger-minus-tPA og finger-EGF-minus-tPA, ut fra vampyrflaggermus-spytt. Disse har hhv. fått betegnelsene Bat-PA(H), Bat-PA(I) og Bat-PA(L). Senere referanser til "Bat-PA" betegner det ikke-

fraksjonerte preparat som inneholder de tre molekyllformer H, I og L. Den molekylære art med full lengde binder seg fast til fibrin til forskjell fra de andre to. Bat-PA(H), Bat-PA(I) og Bat-PA(L) har M_r -tall på hhv. 49, 42 og 40 kd, som målt i SDS-PAGE i nærvær av dithiothreitol (fig. 1, spor 1). De tilsynelatende M_r -verdier for deglycosylerte former av Bat-PA(H), Bat-PA(I) og Bat-PA(L) (fremstilt ved å fjerne N-bundet carbohydrat-kjeder med endoglycosidase F), som bestemt med SDS-PAGE, er hhv. 44, 40 og 38 kd (fig. 1, søyle 2). Disse proteiner har et kraftig behov for nærvær av fibrin-cofaktor og en bemerkelsesverdig evne til å katalysere lyse av plasmakoagel. Mekanismen som styrer selektiviteten av disse proteiner overfor fibrinbundet plasminogen, er et resultat av forskjellige faktorer som direkte fibrinbinding og kraftig inhibering av NaCl som oppheves i nærvær av fibrin-koagel. Videre er vampyr-plasminogenaktivatorer mindre utsatt enn tPA for inaktivering med inhibitorer som finnes i plasma.

Foreliggende oppfinnelse angår således en fremgangsmåte for fremstilling av et renset glycosylert eller uglycosylert plasminogenaktiverende protein som har minst 90 % homologi med følgende aminosyresekvens:

Ala-Tyr-Gly-Asp-Pro-His-Ala-Thr-Cys-Tyr-Lys-Asp-
Gln-Gly-Val-Thr-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Ser-Thr-Ser-
Glu-Ser-Gly-Ala-Gln-Cys-Ile-Asn-Trp-Asn-Ser-Asn-
Leu-Leu-Thr-Arg-Arg-Thr-Tyr-Asn-Gly-Arg-Arg-Ser-
Asp-Ala-Ile-Thr-Leu-Gly-Leu-Gly-Asn-His-Asn-Tyr-
Cys-Arg-Asn-Pro-Asp-Asn-Asn-Ser-Lys-Pro-Trp-Cys-
Tyr-Val-Ile-Lys-Ala-Ser-Lys-Phe-Ile-Leu-Glu-Phe-
Cys-Ser-Val-Pro-Val-Cys-Ser-Lys-Ala-Thr-Cys-Gly-
Leu-Arg-Lys-Tyr-Lys-Glu-Pro-Gln-Leu-His-Ser-Thr-
Gly-Gly-Leu-Phe-Thr-Asp-Ile-Thr-Ser-His-Pro-Trp-
Gln-Ala-Ala-Ile-Phe-Ala-Gln-Asn-Arg-Arg-Ser-Ser-
Gly-Glu-Arg-Phe-Leu-Cys-Gly-Gly-Ile-Leu-Ile-Ser-
Ser-Cys-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Gln-
Glu-Arg-Tyr-Pro-Pro-Gln-His-Leu-Arg-Val-Val-Leu-
Gly-Arg-Thr-Tyr-Arg-Val-Lys-Pro-Gly-Lys-Glu-Glu-
Gln-Thr-Phe-Glu-Val-Glu-Lys-Cys-Ile-Val-His-Glu-
Glu-Phe-Asp-Asp-Asp-Thr-Tyr-Asn-Asn-Asp-Ile-Ala-

Leu-Leu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Ser-Pro-Gln-Cys-Ala-
 Gln-Glu-Ser-Asp-Ser-Val-Arg-Ala-Ile-Cys-Leu-Pro-
 Glu-Ala-Asn-Leu-Gln-Leu-Pro-Asp-Trp-Thr-Glu-Cys-
 Glu-Leu-Ser-Gly-Tyr-Gly-Lys-His-Lys-Ser-Ser-Ser-
 5 Pro-Phe-Tyr-Ser-Glu-Gln-Leu-Lys-Glu-Gly-His-Val-
 Arg-Leu-Tyr-Pro-Ser-Ser-Arg-Cys-Thr-Ser-Lys-Phe-
 Leu-Phe-Asn-Lys-Thr-Val-Thr-Lys-Asn-Met-Leu-Cys-
 Ala-Gly-Asp-Thr-Arg-Ser-Gly-Glu-Ile-His-Pro-Asn-
 Val-His-Asp-Ala-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-
 10 Leu-Val-Cys-Met-Asn-Asp-Asn-His-Met-Thr-Leu-Leu-
 Gly-Ile-Ile-Ser-Trp-Gly-Val-Gly-Cys-Gly-Glu-Lys-
 Asp-Ile-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Lys-Val-Thr-Asn-Tyr-
 Leu-Gly-Trp-Ile-Arg-Asp-Asn-Met-Arg-Pro

15 og/eller

Met-Val-Asn-Thr-Met-Lys-Thr-Lys-Leu-Leu-Cys-Val-
 Leu-Leu-Leu-Cys-Gly-Ala-Val-Phe-Ser-Leu-Pro-Arg-
 Gln-Glu-Thr-Tyr-Arg-Gln-Leu-Ala-Arg-Gly-Ser-Arg-
 Ala-Tyr-Gly-Val-Ala-Cys-Arg-Asp-Glu-Lys-Thr-Gln-
 20 Met-Ile-Tyr-Gln-Gln-Gln-Glu-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro-
 Glu-Val-Arg-Ser-Lys-Arg-Val-Glu-His-Cys-Arg-Cys-
 Asp-Arg-Gly-Leu-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Pro-Val-
 Lys-Ser-Cys-Ser-Glu-Leu-Arg-Cys-Phe-Asn-Gly-Gly-
 Thr-Cys-Trp-Gln-Ala-Ala-Ser-Phe-Ser-Asp-Phe-Val-
 25 Cys-Gln-Cys-Pro-Lys-Gly-Tyr-Thr-Gly-Lys-Gln-Cys-
 Glu-Val-Asp-Thr-His-Ala-Thr-Cys-Tyr-Lys-Asp-Gln-
 Gly-Val-Thr-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Ser-Thr-Ser-Glu-
 Ser-Gly-Ala-Gln-Cys-Ile-Asn-Trp-Asn-Ser-Asn-Leu-
 Leu-Thr-Arg-Arg-Thr-Tyr-Asn-Gly-Arg-Arg-Ser-Asp-
 30 Ala-Ile-Thr-Leu-Gly-Leu-Gly-Asn-His-Asn-Tyr-Cys-
 Arg-Asn-Pro-Asp-Asn-Asn-Ser-Lys-Pro-Trp-Cys-Tyr-
 Val-Ile-Lys-Ala-Ser-Lys-Phe-Ile-Leu-Glu-Phe-Cys-
 Ser-Val-Pro-Val-Cys-Ser-Lys-Ala-Thr-Cys-Gly-Leu-
 Arg-Lys-Tyr-Lys-Glu-Pro-Gln-Leu-His-Ser-Thr-Gly-
 35 Gly-Leu-Phe-Thr-Asp-Ile-Thr-Ser-His-Pro-Trp-Gln-
 Ala-Ala-Ile-Phe-Ala-Gln-Asn-Arg-Arg-Ser-Ser-Gly-
 Glu-Arg-Phe-Leu-Cys-Gly-Gly-Ile-Leu-Ile-Ser-Ser-
 Cys-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Gln-Glu-
 Arg-Tyr-Pro-Pro-Gln-His-Leu-Arg-Val-Val-Leu-Gly-

Arg-Thr-Tyr-Arg-Val-Lys-Pro-Gly-Lys-Glu-Glu-Gln-
 Thr-Phe-Glu-Val-Glu-Lys-Cys-Ile-Val-His-Glu-Glu-
 Phe-Asp-Asp-Asp-Thr-Tyr-Asn-Asn-Asp-Ile-Ala-Leu-
 Leu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Ser-Pro-Gln-Cys-Ala-Gln-
 5 Glu-Ser-Asp-Ser-Val-Arg-Ala-Ile-Cys-Leu-Pro-Glu-
 Ala-Asn-Leu-Gln-Leu-Pro-Asp-Trp-Thr-Glu-Cys-Glu-
 Leu-Ser-Gly-Tyr-Gly-Lys-His-Lys-Ser-Ser-Ser-Pro-
 Phe-Tyr-Ser-Glu-Gln-Leu-Lys-Glu-Gly-His-Val-Arg-
 Leu-Tyr-Pro-Ser-Ser-Arg-Cys-Thr-Ser-Lys-Phe-Leu-
 10 Phe-Asn-Lys-Thr-Val-Thr-Lys-Asn-Met-Leu-Cys-Ala-
 Gly-Asp-Thr-Arg-Ser-Gly-Glu-Ile-His-Pro-Asn-Val-
 His-Asp-Ala-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-
 Val-Cys-Met-Asn-Asp-Asn-His-Met-Thr-Leu-Leu-Gly-
 Ile-Ile-Ser-Trp-Gly-Val-Gly-Cys-Gly-Glu-Lys-Asp-
 15 Ile-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Lys-Val-Thr-Asn-Tyr-Leu-
 Gly-Trp-Ile-Arg-Asp-Asn-Met-Arg-Pro

og/eller

Ala-Tyr-Gly-Val-Ala-Cys-Arg-Asp-Glu-Lys-Thr-Gln-
 20 Met-Ile-Tyr-Gln-Gln-Gln-Glu-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro-
 Glu-Val-Arg-Ser-Lys-Arg-Val-Glu-His-Cys-Arg-Cys-
 Asp-Arg-Gly-Leu-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Pro-Val-
 Lys-Ser-Cys-Ser-Glu-Leu-Arg-Cys-Phe-Asn-Gly-Gly-
 Thr-Cys-Trp-Gln-Ala-Ala-Ser-Phe-Ser-Asp-Phe-Val-
 25 Cys-Gln-Cys-Pro-Lys-Gly-Tyr-Thr-Gly-Lys-Gln-Cys-
 Glu-Val-Asp-Thr-His-Ala-Thr-Cys-Tyr-Lys-Asp-Gln-
 Gly-Val-Thr-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Ser-Thr-Ser-Glu-
 Ser-Gly-Ala-Gln-Cys-Ile-Asn-Trp-Asn-Ser-Asn-Leu-
 Leu-Thr-Arg-Arg-Thr-Tyr-Asn-Gly-Arg-Arg-Ser-Asp-
 30 Ala-Ile-Thr-Leu-Gly-Leu-Gly-Asn-His-Asn-Tyr-Cys-
 Arg-Asn-Pro-Asp-Asn-Asn-Ser-Lys-Pro-Trp-Cys-Tyr-
 Val-Ile-Lys-Ala-Ser-Lys-Phe-Ile-Leu-Glu-Phe-Cys-
 Ser-Val-Pro-Val-Cys-Ser-Lys-Ala-Thr-Cys-Gly-Leu-
 Arg-Lys-Tyr-Lys-Glu-Pro-Gln-Leu-His-Ser-Thr-Gly-
 35 Gly-Leu-Phe-Thr-Asp-Ile-Thr-Ser-His-Pro-Trp-Gln-
 Ala-Ala-Ile-Phe-Ala-Gln-Asn-Arg-Arg-Ser-Ser-Gly-
 Glu-Arg-Phe-Leu-Cys-Gly-Gly-Ile-Leu-Ile-Ser-Ser-
 Cys-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Gln-Glu-
 Arg-Tyr-Pro-Pro-Gln-His-Leu-Arg-Val-Val-Leu-Gly-

Arg-Thr-Tyr-Arg-Val-Lys-Pro-Gly-Lys-Glu-Glu-Gln-
 Thr-Phe-Glu-Val-Glu-Lys-Cys-Ile-Val-His-Glu-Glu-
 Phe-Asp-Asp-Asp-Thr-Tyr-Asn-Asn-Asp-Ile-Ala-Leu-
 Leu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Ser-Pro-Gln-Cys-Ala-Gln-
 5 Glu-Ser-Asp-Ser-Val-Arg-Ala-Ile-Cys-Leu-Pro-Glu-
 Ala-Asn-Leu-Gln-Leu-Pro-Asp-Trp-Thr-Glu-Cys-Glu-
 Leu-Ser-Gly-Tyr-Gly-Lys-His-Lys-Ser-Ser-Ser-Pro-
 Phe-Tyr-Ser-Glu-Gln-Leu-Lys-Glu-Gly-His-Val-Arg-
 10 Leu-Tyr-Pro-Ser-Ser-Arg-Cys-Thr-Ser-Lys-Phe-Leu-
 Phe-Asn-Lys-Thr-Val-Thr-Lys-Asn-Met-Leu-Cys-Ala-
 Gly-Asp-Thr-Arg-Ser-Gly-Glu-Ile-His-Pro-Asn-Val-
 His-Asp-Ala-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-
 Val-Cys-Met-Asn-Asp-Asn-His-Met-Thr-Leu-Leu-Gly-
 Ile-Ile-Ser-Trp-Gly-Val-Gly-Cys-Gly-Glu-Lys-Asp-
 15 Ile-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Lys-Val-Thr-Asn-Tyr-Leu-
 Gly-Trp-Ile-Arg-Asp-Asn-Met-Arg-Pro

og/eller

20 Ala-Tyr-Gly-Ser-Cys-Ser-Glu-Leu-Arg-Cys-Phe-Asn-
 Gly-Gly-Thr-Cys-Trp-Gln-Ala-Ala-Ser-Phe-Ser-Asp-
 Phe-Val-Cys-Gln-Cys-Pro-Lys-Gly-Tyr-Thr-Gly-Lys-
 Gln-Cys-Glu-Val-Asp-Thr-His-Ala-Thr-Cys-Tyr-Lys-
 Asp-Gln-Gly-Val-Thr-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Ser-Thr-
 25 Ser-Glu-Ser-Gly-Ala-Gln-Cys-Ile-Asn-Trp-Asn-Ser-
 Asn-Leu-Leu-Thr-Arg-Arg-Thr-Tyr-Asn-Gly-Arg-Arg-
 Ser-Asp-Ala-Ile-Thr-Leu-Gly-Leu-Gly-Asn-His-Asn-
 Tyr-Cys-Arg-Asn-Pro-Asp-Asn-Asn-Ser-Lys-Pro-Trp-
 Cys-Tyr-Val-Ile-Lys-Ala-Ser-Lys-Phe-Ile-Leu-Glu-
 30 Phe-Cys-Ser-Val-Pro-Val-Cys-Ser-Lys-Ala-Thr-Cys-
 Gly-Leu-Arg-Lys-Tyr-Lys-Glu-Pro-Gln-Leu-His-Ser-
 Thr-Gly-Gly-Leu-Phe-Thr-Asp-Ile-Thr-Ser-His-Pro-
 Trp-Gln-Ala-Ala-Ile-Phe-Ala-Gln-Asn-Arg-Arg-Ser-
 Ser-Gly-Glu-Arg-Phe-Leu-Cys-Gly-Gly-Ile-Leu-Ile-
 35 Ser-Ser-Cys-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Phe-
 Gln-Glu-Arg-Tyr-Pro-Pro-Gln-His-Leu-Arg-Val-Val-
 Leu-Gly-Arg-Thr-Tyr-Arg-Val-Lys-Pro-Gly-Lys-Glu-
 Glu-Gln-Thr-Phe-Glu-Val-Glu-Lys-Cys-Ile-Val-His-
 Glu-Glu-Phe-Asp-Asp-Asp-Thr-Tyr-Asn-Asn-Asp-Ile-
 Ala-Leu-Leu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Ser-Pro-Gln-Cys-

Ala-Gln-Glu-Ser-Asp-Ser-Val-Arg-Ala-Ile-Cys-Leu-
 Pro-Glu-Ala-Asn-Leu-Gln-Leu-Pro-Asp-Trp-Thr-Glu-
 Cys-Glu-Leu-Ser-Gly-Tyr-Gly-Lys-His-Lys-Ser-Ser-
 Ser-Pro-Phe-Tyr-Ser-Glu-Gln-Leu-Lys-Glu-Gly-His-
 5 Val-Arg-Leu-Tyr-Pro-Ser-Ser-Arg-Cys-Thr-Ser-Lys-
 Phe-Leu-Phe-Asn-Lys-Thr-Val-Thr-Lys-Asn-Met-Leu-
 Cys-Ala-Gly-Asp-Thr-Arg-Ser-Gly-Glu-Ile-His-Pro-
 Asn-Val-His-Asp-Ala-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-
 Pro-Leu-Val-Cys-Met-Asn-Asp-Asn-His-Met-Thr-Leu-
 10 Leu-Gly-Ile-Ile-Ser-Trp-Gly-Val-Gly-Cys-Gly-Glu-
 Lys-Asp-Ile-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Lys-Val-Thr-Asn-
 Tyr-Leu-Gly-Trp-Ile-Arg-Asp-Asn-Met-Arg-Pro

hvor proteinet krever en fibrin-cofaktor for aktivering av
 15 plasminogen, og/eller
 et fusjonsprotein, som inneholder en sekvens av aminosyrer
 svarende til aminosyrene 190-441 som vist i fig. 8a, og en
 tungkjedeselekvens fra plasminogenaktivator av vevstypen, hvilket
 protein har større plasminogenaktiverende virkning i nærvær av
 20 plasminogenaktivatorinhibitor av type 1 enn vevsplasminogen-
 aktivator i nærvær av plasminogenaktivatorinhibitor type 1,
 kjennetegnet ved at

- (a) en DNA-sekvens inneholdende DNA som koder for
 proteinet, utvikles,
- 25 (b) DNA-sekvensen klones inn i en ekspresjonsvektor
 for ekspresjon av proteinet i *E. coli*,
- (c) vektoren transfekteres i *E. coli*, og
- (d) proteinet uttrykkes.

Bat-PA(H) inneholder den sekvens av aminosyrer
 30 1-441 som er vist på fig. 8a. Bat-PA(I) inneholder amino-
 syresekvensen 1-3 og 50-441 vist på fig. 8a, og Bat-PA(L)
 inneholder aminosyresekvensen 1-3 og 87-441 som vist på fig.
 8a. Videre er aminosyren i stilling 88 forandret fra
 threonin til prolin i protein "L".

35 Oppfinnelsen omfatter også DNA-sekvenser som koder
 for proteiner fremstilt i henhold til oppfinnelsen, klonings-
 vektorer med innførte DNA-sekvenser ifølge oppfinnelsen, samt
 pattedyrceller og bakterieceller som er transfektert med klon-

ingsvektorene og i stand til å produsere det gitte protein.

Alle de plasminogenaktiverende arter aktiveres av fibrin. Det eneste trekk som har kunnet skille artene, er den eksklusive ende hos Bat-PA(H) til å bindes nært til

5 fibrin, en egenskap som henger sammen med nærværet av

"Finger"-domenet. Den spesifikke virkning hos Bat-PA(I) og Bat-PA(L) overfor fibrinbundet plasminogen synes å være uavhengig av evnen til å bindes nært til fibrin.

10 Den kraftige fibrinavhengighet for virkning av Bat-PA er en karakteristisk egenskap som er ønskelig ved fibrinolytisk terapi. Blødningskomplikasjoner som følger med anvendelse av trombolytiske midler, kan forverres ved aktivering av sirkulerende plasminogen som danner plasmin. Hyppighet og grad av blødningskomplikasjoner kan reduseres ved å bruke
15 en plasminogenaktivator i henhold til oppfinnelsen med virkning lokalisert til området for fibrinkoagel.

Dyreceller av 293-Bat-PA-1 (ATCC nr. CRL 10180), bakterieceller av BPA-CN-pSZ88-104-20 (ATCC nr. 68050), bakterieceller av BPA-CK-pSZ89-111-17 (ATCC nr. 68052),
20 bakterieceller av BPA-FK-p89WO-1 (ATCC nr. 68051), bakterieceller av BPA-FN-p89WO-2C (ATCC nr. 68053) og bakterieceller av BPA-DK-p89WP-20A (ATCC nr. 68049) er innlevert til American Type Culture Collection, Bethesda, MD, USA, i henhold til Budapest-overenskomsten. De er tilgjengelige ved
25 utstedelsen av foreliggende patent. De innleverte deposita er også tilgjengelige i henhold til patentlovene i land hvor tilsvarende patentsøknader eller videreførte søknader er innlevert. Tilgjengeligheten av disse deposita gir imidlertid ingen rettigheter med hensyn til utførelse av oppfinnelsen.
30

Det vises til vedlagte diagrammer og tegninger hvor:

Figur 1 viser SDS-polyacrylamidgelelektroforese av rensset vampyr-plasminogenaktivator. Prøvene er fra vampyr-spyttkjertler (kolonne 1 og 3) og av spytt (kolonne 2 og 4).
35 Hver prøve ble behandlet med endoglycosidase F før SDS-PAGE. Kolonne 1 og 2: "Western blotting and immunostain". Kolonne 3 og 4: Fibrinautografi.

Figur 2 viser % lyse av blodplatefattig plasma-koagel katalysert av tPA og av 40 kd vampyr-plasminogen-aktivatorprotein.

Figur 3 viser % lyse av blodplaterikt plasmakoagel katalysert av tPA og 40 kd plasminogenaktivatorprotein.

Figur 4 viser inaktivering av plasminogenaktivator ved bestanddeler i plasma.

Figur 5 viser molvekt målt ved SDS-PAGE på proteiner 40 kd og 45 kd som identifiseres med sølvfremkalling og fibrinautografi.

Figur 6 viser koagel-lyse katalysert av Bat-PA og tPA.

Figur 7 viser binding av plasminogenaktivator til fibrin.

Figur 8a viser nucleotidsekvensen hos vampyr-plasminogenaktivator cDNA og aminosyresekvenser for plasminogenaktivatorene.

Figur 8b viser skjematisk aminosyresekvensen hos vampyr-plasminogenaktivator sammenlignet med tPA fra mennesker.

Figur 9 viser skjematisk syntese av plasmid p(88)SZ-100-20 som er avledet av kjent plasmid pSP73 og som inneholder Bat-PA(H)-gensekvensen og endelig syntese av plasmid pSZ88-104-20 som er avledet fra kjent plasmid pD5 og som inneholder Bat-PA(H)-gensekvensen.

Figur 10 viser i skjematisk form syntesen av plasmider pSZ89-109, pSZ89-110, p89WO-10 og p89WO-8 som er avledet fra kjent plasmid pSP73 og som inneholder Bat-PA(H)-gensekvensen, samt plasmider pSZ89-111, pSZ89-112 og pSZ89-113 som er avledet fra kjent plasmid pD5 og som inneholder Bat-PA(H)-gensekvensen.

Figur 11 viser i skjematisk form syntese av plasmid p89WO-14, p89WO-5,6, p89WO-9 og p89WO-12 som er avledet fra kjent plasmid pSP73 og som inneholder Bat-PA(I)-gensekvensen, og plasmid p89WO-1, p89WO-2A,B,C, p89WO-3 og p89WO-4 som er avledet fra kjent plasmid pD5 og som inneholder Bat-PA(I)-gensekvensen.

Figur 12 viser i skjematisk form syntese av

plasmid p89WP-20A&B og p89WP-19A&B ut fra kjent plasmid pD5 og p89WP-17 og p89WP-18, respektivt. p89WP-17 ble fremstilt fra p89WO-11, og p89WO-18 ble fremstilt fra p89WO-9.

Oppfinnelsen angår fremstilling av native og rekombinant-avlede, rensede plasminogenaktivatorproteiner og eventuell mikroheterogene eller fragmentære former av disse proteiner med opphav i spytt og spyttkjertler fra vampyrflaggermus *Desmodus rotundus*.

Betegnelsene protein og polypeptid brukes om hverandre og refererer til en lineær polymer av aminosyrer bundet sammen med amidbindinger. Sekvensen av aminosyrer i kjeden er av avgjørende betydning for den biologiske funksjon til proteinet eller polypeptidet. Plasminogenaktivatorer betegner proteiner som katalyserer dannelsen av plasmin, et enzym som hydrolyserer peptider og estere av arginin og lysin og omdanner fibrin til oppløselige produkter.

Native proteiner betegner her proteiner i full lengde dannet av de tilsvarende gener. Rekombinant-avlede proteiner betegner isolering av det aktuelle gen eller cDNA for et ønsket protein og bruk av det rensede gen eller cDNA for oppbygging av en celle som overproduserer det ønskede protein. Fragmentformer betegner deler av proteiner eller polypeptider som har færre aminosyrer enn det native protein, men inneholder den aktive posisjon eller posisjoner hos plasminogenaktivatoren. Mikroheterogene former betegner et enkelt genprodukt, dvs. et protein som er dannet av en enkelt genenhet i DNA som er strukturelt modifisert etter omdanning. Disse strukturforandringer vil imidlertid ikke gi noen vesentlige forandringer av proteinets aktivitet. Modifikasjonene eller forandringene kan foregå enten in vivo eller under isolerings- og renseprosesser. Modifikasjon in vivo kan føre til, men er ikke begrenset til, acetylering ved N-terminus, proteolyse, glycosylering eller fosforylering. Proteolyse kan være exoproteolyse hvor én eller flere ende-plasserte aminosyrer i sekvens blir enzymatisk spaltet under dannelsen av mikroheterogene former som har færre aminosyrer enn det opprinnelige genprodukt. Proteolyse kan også være endoproteolytisk modifikasjon som skyldes innvirkning av endo-

proteaser som spalter peptidet ved spesielle stillinger i aminosyresekvensen. Lignende modifiseringer kan foregå under renseprosesser som kan gi dannelse av mikroheterogene former. Den vanligste modifikasjon under en renseprosess er proteo-
5 lyse.

En annen utførelse av oppfinnelsen er et plasminogenaktiverende protein som har en polypeptidsekvens som er minst 90% homolog med polypeptidsekvensen av aminosyrene 1-441 som vist i fig. 8a, hvilket protein har plasminogen-
10 aktiverende virkning som stimuleres i nærvær av en fibrin-cofaktor og hvilket protein er i stand til å bindes nært til fibrin.

En annen utførelse av oppfinnelsen er et plasminogenaktiverende protein med en polypeptidsekvens som er minst
15 90% homolog med polypeptidsekvensen av aminosyrene 1-3 og 50-441 som vist på fig. 8a, hvilket protein har plasminogenaktiverende virkning som stimuleres i nærvær av en fibrin-cofaktor.

En annen utførelse av oppfinnelsen er et plasminogenaktiverende protein med en polypeptidsekvens som er minst
20 90% homolog med polypeptidsekvensen av aminosyrene 1-3 og 87-441 (hvor aminosyren i posisjon 88 er forandret fra threonin til prolin) som vist på fig. 8a, hvilket protein har plasminogenaktiverende virkning som stimuleres i nærvær av en
25 fibrin-cofaktor.

Oppfinnelsen angår videre isolering og rensing av den genetiske informasjon som svarer til de enkelte proteiner og metoder til ekspresjon av de tilsvarende proteiner.

Figur 1 viser SDS-polyacrylamidgel-elektroforese
30 (SDS-PAGE) for renset plasminogenaktivator fra flaggermus. Prøvene ble forbehandlet med 25 mM dithiothreitol før elektroforese på 11% stablet SDS-polyacrylamidgel. Kolonne 1 viser aktivator (3,6 μ g) renset fra vampyr-spyttkjertler, kolonne 2 viser aktivator (3,6 μ g) behandlet med endogly-
35 cosidase F (Boehringer Mannheim) (0,1 enheter i 24 timer ved

37°C), og kolonne 3, 0,1 enheter av endoglycosidase F. Protein-molvekt-markeringer er som angitt. Vampyr-plasminogenaktivator (100 ng) fra spyttkjertler (kolonne 1) og spytt (kolonne 2) ble analysert med "Western blotting" ved
5 hjelp av anti-vampyr-plasminogenaktivator-antistoffer hos kanin og anti-kanin-IgG hos geit, alkalifosfatase-korresponderende. Fibrinautografi fra aktivator (15 IU) fra kjertler (kolonne 3) og spytt (kolonne 4) ble utført som beskrevet av Laemmli, U.K. Nature, 227, s. 680-685 (1970).

10 For fremlegging av de data som er vist på figur 1, ble frosne, primære og tilliggende submandibulære kjertler (6 g) fra *Desmodus rotundus* satt til 40 ml 10 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,5, og straks homogenisert i en Brinkmann homogenisator. Homogenatet ble sentrifugert ved 27.000 x g
15 i 20 minutter. Supernatantfraksjonen ble klaret ved sentrifugering ved 100.000 x g i 30 minutter, fortynnet til 50 mM NaCl med 20 mM Tris-HCl, pH 7,0, 0,01% Tween® 80 og påsatt en kationvekslerkolonne av fosfocellulose (Whatman P11) innstilt i likevekt med 20 mM Tris-HCl, pH 7,2, 50 mM NaCl og 0,01%
20 Tween® 80. Etter påsetting av prøven ble fosfocellulosekolonnen vasket fullstendig med ovenstående likevektspuffer. Plasminogenaktivator ble eluert fra fosfocellulosekolonnen med 20 mM Tris-HCl, pH 7,2, 0,5 M NaCl og 0,01% Tween® 80 og påsatt en affinitetskolonne som inneholdt Erythrina trypsin-
25 inhibitor (ETI) (American Diagnostica) koblet til CNBr-aktivert Sepharose® 4B (Pharmacia). Affinitetskolonnen ble vasket med 20 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, pH 7,0, 0,1% Tween® 80 og aktivatoren ble derpå eluert med 50 mM Na-acetat, 0,2 M NaCl, pH 4,0, 0,1% Tween® 80. Fraksjoner inneholdende
30 aktivator, ble slått sammen, og det ble tilsatt 1 M Tris-grunnlag som ga en sluttkonsentrasjon av Tris på 25 mM. Den rensede prøven ble lagret ved -70°C. Proteinkonsentrasjonen ble anslått etter fargebindingsprøven til Biorad med kvegserumalbumin som standard.

35 Figur 6 viser koagel-lyse katalysert med vampyr-

- plasminogenaktivator og tPA. Plasmakoagel ble dannet ved å sette 0,2 IU humant trombin (Sigma) og 7,5 mM CaCl_2 til 195 μl humant plasma som inneholdt [^{125}I] fibrinogen (100.000 cpm/koagel). Sluttvolumet for hver prøve var 200 μl .
- 5 Koagelet ble dannet i nærvær av og heftet til små trepinner, aldret i 30 minutter ved 37°C , avpresset overskudd av væske og overført til 250 μl plasma tilsatt 25 U/ml "Hirudin" (Sigma). 25 μl 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,01% Tween[®] 80 inneholdende plasminogenaktivator, ble satt til oppløsningen som badet
- 10 koagelprøvene, prøvene ble inkubert ved 37°C og tatt og ut teller med hensyn på oppløselige nedbrytningsprodukter av fibrin. Vampyr-plasminogenaktivator rensset fra spyttkjertler og to-kjedet tPA ble brukt til denne undersøkelsen. ▼, 3 nM Bat-PA; ■, 3 nM t-PA; ●, 10 nM Bat-PA; ▲, 10 nM t-PA.
- 15 Vampyr-plasminogenaktivator og t-PA viste seg like effektive når det gjaldt evne til å katalysere frigivelsen av radioaktivt merket fibrin-nedbrytningsprodukter fra tidligere dannet plasmakoagel.

- Figur 7 viser binding av plasminogenaktivatorer
- 20 til fibrin. Kolonne 1, Bat-PA, 1,8 pmol; kolonne 2 og 3, 10 volum% av hhv. pellet og supernatantfraksjoner, fra den plasminogenaktivatorholdige fibrinprøve; kolonne 4, enkelt-kjedet tPA, 1,8 pmol; kolonne 5 og 6, 10 volum% av pellet og supernatantfraksjoner, respektivt, fra den tPA-holdige
- 25 fibrinprøve; kolonne 7, urokinase, 0,5 pmol; kolonne 8 og 9, 10 volum% pellet og supernatantfraksjoner, respektivt, fra de urokinaseholdige fibrinprøver. De tre plasminogenaktivatorarter (kolonne 1) er ujevnt fordelt mellom supernatantfraksjoner og pelletfraksjoner. Mesteparten av Bat-PA(H) fordeler
- 30 seg i fibrinpelletene (kolonne 2), mens Bat-PA(I) og Bat-PA(L) ikke har noen tydelig affinitet til fibrin og for det meste finnes i supernatanten (kolonne 3). Prøver av tPA (kolonne 4) og urokinase (kolonne 7) ble også undersøkt med hensyn til bindingsevne til fibrin. Som ventet, binder tPA seg kraftig
- 35 til fibrin og fordeler seg i pelletfraksjonen (kolonne 5),

mens urokinase utelukkende finnes i supernatantfraksjonen (kolonne 9).

Det ble dannet fibrinkoagel ved å tilsette 0,2 IU trombin til 200 μ l 10 mM NaH_2PO_4 , 140 mM NaCl, pH 7,4, 0,01% Tween[®] 80 inneholdende humant fibrinogen (1 mg/ml), EDTA (5 mM) og vampyr-plasminogenaktivator (18 pmol) eller enkeltkjedet tPA (18 pmol) eller urokinase (5,5 pmol). Enkeltkjedet tPA ble rensset ut fra en blanding av enkeltkjedet og dobbeltkjedet tPA ved kromatografering i en kolonne av monoklonale antistoffer som fortrinnsvis binder enkeltkjedet tPA (PAM-1, American Diagnostica). Fibrinkoagel ble aldret i 1 time ved 37°C og sentrifugert ved 100.000 g i 10 minutter. Pelletfraksjoner ble vasket med 400 μ l Na_2HPO_4 , NaCl, Tween[®] 80 puffer, suspendert på nytt i 150 μ l 0,5% SDS og inkubert ved 37°C i 1,5 time under stadig røring. Pellet- og supernatantfraksjoner som inneholder vampyr-plasminogenaktivator, ble behandlet med "Endo F". Prøvene gjennomgikk SDS-PAGE og ble FA-analysert.

20 Forsøksmetoder med plasminogenaktivator

Fibrinplatemetode: Det ble dannet fibrinplater ved å oppløse fibrinogen fra kveg eller mennesker (2 mg/ml) og humant Glu-plasminogen (6 μ g/ml) i 1% agaroseoppløsning (som holdes ved 55°C). Humant trombin (1,5 enheter) ble tilsatt før oppløsningen ble støpt ut til kalibrerte immunodiffusjonsplater. Det ble slått ut brønner i en herdet fibrinplate, og det ble påsatt kolonnefraksjoner. Det ble observert oppløste områder, områder av lyse, hvor aktivitet fant sted. Lyse-arealet (mm^2) pr. inkuberingstid ved 37°C kan korreleres til aktivitetsenheter for enzymer.

Fibrinautografi: Prøver gjennomgikk SDS-PAGE under ikke-reducerende forhold, og acrylamidgel ble omhyggelig vasket i Triton[®] X-100 (2,5%) og plassert på en plasminogenholdig fibrin-agarosegel. Plasminogenaktivatorene renaturerer på grunn av Triton-behandlingen og diffunderer ut i agarosegelen

hvor de aktiverer plasminogen til plasmin. Det dannede plasmin vil nedbryte fibrinet som gir en sone av fibrinolyse som lett kan skilles ut mot bakgrunnen av ikke nedbrutt fibrin.

5

Koplet amidolytisk prøve: Aktivering av plasminogen til plasmin ble undersøkt i nærvær av "Desafib" og produksjon av plasmin ble fulgt med kolorimetrisk plasminsubstrat, "Spectrozyme" PL. Vampyr-plasminogenaktivatorene ble inkubert med humant Glu-plasminogen (20 $\mu\text{g/ml}$), "Spectrozyme" PL (0,4 mM) og "Desafib" (80 $\mu\text{g/ml}$). Blandingen ble inkubert ved 37°C i 60 minutter. Reaksjonen ble avsluttet ved tilsetning av 50 μl 10% SDS. Absorpsjon av spaltet substrat ble fulgt ved 405 nm. 1 aktivitetseenhet for vampyr-plasminogen-aktivator svarer til den mengden enzym som katalyserer omdannelsen av 1 μmol "Spectrozyme" PL i 1 minutt ved 37°C.

10

Titring av aktiv stilling: Vampyr-plasminogenaktivatorer ble titrert etter to forskjellige metoder for å bestemme funksjonell molaritet. Første metode er basert på prinsippet med tilbaketitrering av en kalibrert trypsinstandard med en kalibrert standardoppløsning av klormethylketon-inhibitor for både trypsin og plasminogenaktivator. En oppløsning av trypsin (500 nM) ble titrert direkte med 4-methyl-umbelliferyl-p-guanidinbenzoat (MUGB). Klormethylketonet (Dansyl-glutamyl-glycyl-arginin-klormethyl-keton, DNS-EGRCK) ble titrert mot MUGB-kalibrert trypsin. Reaksjonen mellom en slik kalibrert trypsinoppløsning og en kalibrert klormethylketonoppløsning gjør det mulig å måle reduksjon av inhibering av trypsinstandarden når CK-standard blir preinkubert med aktivator. Nærvær av vampyr-plasminogenaktivator resulterer i økt aktivitet i forhold til trypsin-CK-kontrollprøven, proporsjonalt med mengden plasminogenaktivator.

20

25

30

Den andre metoden består i observasjon av "burst kinetics" som følger tilsetning av MUGBE til plasminogen-aktivator når reaksjonen er utført ved lav temperatur (5°C).

35

SDS-polyacrylamidgel-elektroforese: Det ble brukt en modifisert utgave av Laemmli-systemet (Nature, 227, s. 680-685 (1970)). Stablegel og skillegel (0,75 mm) inneholdt 4% og 10% polyacrylamid, respektivt. Gelkolonnene ble påsatt 75
5 volt i 20 timer. Protein ble påvist ved sølvfarging.

Proteinkarakterisering og aktivitet:

Plasminogenaktivatorer fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse viser ingen aktivitet med plasminogenfrie
10 fibrinplater. Inkubering av aktivatorer med plasminogen i nærvær av fibrin I ("Desafib") resulterer i dannelse av plasmin bedømt ved "western blotting and immunostaining" med anti-plasmin(ogen)-antistoffer. De viser aktivitet overfor menneske-plasminogen bundet til menneske-fibrin og overfor
15 kveg-plasminogen bundet til kveg-fibrin.

Ved gelfiltreringskromatografi på Sepharose[®] G-200 ble aktiviteten av plasminogenaktivator i utgangsspytt eluert som en bred topp med omtrentlig molvekt lik 130K. Denne molvekt er sannsynligvis molvekten for aggregert plasminogen-
20 aktivator. Den syntes å være omkring 32K på FPLC-sepharosekolonne i nærvær av 0,01% Tween[®] 20.

Under rensetrinnene hadde plasminogenaktivator ingen reaksjon overfor lysin-sepharose, hvilket tidligere er vist å være et effektivt trinn til rensing av proteiner som
25 binder seg til fibrin via sekvensdomènet "kringle domain". Således er bindingsmekanismen for aktivatorene til fibrin forskjellig fra tPA.

Behandling av aktivatorene med endoglycosidase H og F resulterer i aktive proteiner med lavere molvekt som
30 tyder på at aktivatorene er glycoproteiner. Reaksjoner mellom disse proteiner og agarose fra hvetespire og concanavalin A gir ytterligere støtte for denne konklusjon.

Evnen hos Bat-PA(H) til aktivering av Glu-plasminogen ble målt ved en koplingsprøve som fulgte omsetningen av
35 plasmin-spesifikt amidolytisk substrat (tabell II). Denne spesifikke aktivitet (IU/nmol) for Bat-PA(H) overfor Glu-plasminogen var omtrent 260 ganger mindre enn tPA i fravær av fibrin-mimetisk forbindelse. Imidlertid var den spesifikke aktivitet for Bat-PA(H) overfor Glu-plasminogen i nærvær av

"Desafib" ca. 85% av aktiviteten til tPA. Således stimulerte "Desafib" tPA- og Bat-PA(H)-aktiviteten hhv. 205 og 45.000 ganger. Den spesifikke virkning av Bat-PA, preparatet som inneholdt alle tre molekylformer, var som for Bat-PA(H) i fravær av "Desafib", men omtrent 30% lavere enn Bat-PA(H) i nærvær av denne fibrin-cofaktor (tabell II). Man antar at aktivitetene til Bat-PA(I) og Bat-PA(L) ikke stimuleres i samme grad som for Bat-PA(H) av 80 μ g/ml "Desafib".

TABELL II

Aktivering av plasminogen med Bat-PA(H), Bat-PA og tPA

<u>Plasminogen- aktivator</u>	<u>"Desafib"-konsentrasjon</u>		<u>Ganger stimulering</u>
	<u>0 μg/ml</u>	<u>80 μg/ml</u>	
Bat-PA(H)	1,05 $\pm$ 0,04	47.700 $\pm$ 4500	45.000 (220)
Bat-PA	1,24 $\pm$ 0,08	33.500 $\pm$ 970	27.000 (130)
tPA	270 $\pm$ 20	55.400 $\pm$ 1500	205 (1)

Disse tallene gjengir spesifikk virkning (IU/nmol) ved bruk av koplet amidolyseprøve som beskrevet tidligere. To-kjedet tPA ble brukt til disse prøver; den katalytiske virkning av en-kjedet tPA er ikke angitt da resultatene forstyrres av den uunngåelige dannelsen av to-kjedet tPA under prøven. "Desafib" ble inkludert i prøven som angitt. Tallene under relativ stimulering betegner forholdene mellom de spesifikke aktiviteter. Tallene i parentes betegner stimulering av plasminogenaktivatoraktivitet fra "Desafib" i forhold til aktivitet fra tPA.

Egenskaper fra tPA og Bat-PA(H) med hensyn til katalysering av lyses av plasminogenholdig fibrinkoagel ble også sammenlignet. Det kreves noe høyere konsentrasjoner av Bat-PA(H) for å oppnå en koagel-lysegrad som er like stor som med konsentrasjoner av tPA mellom 0,25 og 10 nM. Konsentrasjoner av tPA og Bat-PA(H) (avledet fra kurver over dose-respons) som gir en valgt hastighet av koagel-lyse, er gjengitt i tabell III. Den spesifikke aktivitet for Bat-PA(H) i

forhold til tPA lå mellom 59 og 72% og ble sammenlignet med plasminogenaktivert konsentrasjon. Den økede spesifikke aktivitet for Bat-PA(H) i forhold til tPA ved høyere konsentrasjoner kan skyldes forskjeller mellom disse plasminogen-aktivatorer med hensyn til deres virkemåter overfor fibrin og/eller plasminogen.

TABELL III

Fibrinkoagel-lyse fremkalt av tPA og Bat-PA(H)

	Hastighet	tPA (nM)	Bat-PA(H) (nM)	Relativ virkning (%)
	0,850	9,33 ± 1,11	12,9 ± 1,05	72,3
	0,825	7,52 ± 0,88	10,53 ± 0,83	71,4
	0,800	6,05 ± 0,69	8,60 ± 0,66	70,4
15	0,775	4,88 ± 0,54	7,02 ± 0,52	69,5
	0,725	3,16 ± 0,34	4,68 ± 0,32	67,5
	0,675	2,05 ± 0,21	3,12 ± 0,20	65,7
	0,625	1,33 ± 0,13	2,08 ± 0,12	63,9
	0,575	0,86 ± 0,08	1,39 ± 0,07	61,9
20	0,525	0,56 ± 0,05	0,92 ± 0,05	60,9
	0,475	0,36 ± 0,03	0,61 ± 0,03	59,0
	0,425	0,24 ± 0,02	0,41 ± 0,02	58,5

Eksperimenter med koagel-lyse ved hjelp av turbidimeterforsøk ble gjennomført som firfoldige prøver med følgende konsentrasjoner av 2-kjedet tPA eller Bat-PA(H): 0,25, 0,50, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 og 10,0 nM. Man noterte hastighet for koagel-lyse som den maksimale hastighet for synkende turbiditet (-MOD/min) ved analyse av hver koagel-lyse-profil med databehandling (Softmax kinetic software). Det ble satt opp fire og seks uavhengige lineære kurver over dose-respons (hastighet mot log [plasminogenaktivator]) for hhv. tPA og Bat-PA(H). Tabellen gjengir de konsentrasjoner av plasminogenaktivator som fører til de angitte hastigheter for koagel-lyse. Disse tall ble utregnet ut fra ligninger som beskriver de best tilpassede kurver ut fra analyse av alle dose-responskurver for tPA og Bat-PA(H). Tallene for relativ virkning er forholdet mellom tPA- og Bat-PA(H)-konsentrasjoner som gir den oppførte hastighet for koagel-lyse.

Vampyr-plasminogenaktivatorer fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse er mindre utsatt enn tPA for inaktivering fra den hurtigvirkende plasminogenaktivator-inhibitor av type 1 (PAI-1).

5 Man antar at konsentrasjonen av PAI-1 i området for okkluderte blodkar kan være mye høyere enn konsentrasjoner som bedømmes ut fra plasmaprøver. Latent PAI-1 i plasma og blod- plater som inneholder PAI-1 som kan frigjøres av trombin, adenosin-difosfat og andre blodplateaktive stoffer, medvirker
10 til relativt høye lokale konsentrasjoner i okkluderte områder. PAI-1 virker som antiaktivator som spesifikt blokkerer aktivitet hos tPA.

Figur 4 viser at tPA blir lettere inaktivert av plasminogenaktivator-inhibitorer enn plasminogenaktivatorer
15 av spyttsekret fra vampyr. tPA og vampyr-plasminogen-aktivatorer ble begge inkubert i blodplasma og deres respektive aktiviteter målt som funksjon av tiden.

NaCl-inhibering av plasminogenaktivering fra både tPA og 40 kd protein ble ikke funnet ved måling av fibrin-
20 koagel-lyse. I disse tilfeller ble det laget koagel av rensede bestanddeler som omfattet fibrinogen (både radio-aktivt merket og ikke-merket), plasminogen, α -2-antiplasmin, faktor XIIIa og puffer med eller uten 0,1 M NaCl.

25 Molekylær kloning av plasminogenaktivator fra vampyr-
flaggermus, cDNA

Rekombinant DNA-teknikk defineres her som en teknikk som gjør det mulig å sammenføye segmenter av gen-
informasjon, DNA, fra forskjellige celler, vanligvis fra for-
30 skjellige organismer, ende mot ende utenfor organismene som DNA ble utvunnet fra, og innføre dette hybrid-DNA i en celle som muliggjør produksjon av det protein som det opprinnelige DNA koder for. Geninformasjon, DNA eller mRNA, isoleres og innarbeides i en egnet kloningsvektor og overføres til en
35 egnet vertcelle.

Kloningsvektor defineres her som en DNA-sekvens som tillater innføring av et spesifikt eksperimentelt fremmed-DNA hvor den kombinerte DNA innføres i en vertcelle som kan eksistere stabilt og fremkalle det protein som dikteres av

nevnte eksperimentelle DNA. Fremmed-DNA kombinert med vektor-DNA danner et rekombinant DNA-molekyl som er avledet fra rekombinantteknologi. Kloningsvektorer kan omfatte plasmider, bakteriofager, virus og kosmider. Det skal forstås at enhver kloningsvektor kan brukes til kloning av de nye protein-DNA-sekvenser av *Desmodus*. Ekspresjonsvektorer defineres her som DNA-sekvenser som er nødvendige for transkripsjonen av klonede genkopier og overføring eller oversettelse av deres mRNA hos en egnet vert. Slike vektorer kan brukes til ekspresjon av enten prokaryotiske eller eukaryotiske gener hos en rekke forskjellige celler som bakterier, gjær, insekt- og pattedyrceller. Proteinene kan også få ekspresjon i en rekke virussystemer. En riktig konstruert ekspresjonsvektor skal inneholde: en replikasjonskilde for autonom replikasjon hos vertceller, selektive markører, et begrenset antall egnede enzyms seter for restriksjon, et kopieringstall og sterke promotorer. En promotor defineres som en DNA-sekvens som dirigerer RNA-polymerase mot binding til DNA og igangsetting av RNA-syntese. En kraftig promotor forårsaker at mRNA dannes i høy takt. Ekspresjonsvektorer kan omfatte, men er ikke begrenset til, kloningsvektorer, modifiserte kloningsvektorer, spesielt konstruerte plasmider eller virus.

Proteiner fremstilt i henhold til oppfinnelsen kan eksistere som de komplette proteiner i form av definerte gener i nativt protein hos *Desmodus*, eller som hybrider av komplette proteiner eller slike, eller som hybrider av komplette proteiner eller slike fragmenter og subenheter forutsatt at proteinene har egenskaper som plasminogenaktivator avledet av *Desmodus rotundus*-spytt, med et sterkt behov for nærvær av fibrin. Komplette proteiner i foreliggende betydning er polypeptider i full lengde modifisert etter transkripsjon og produsert fra egnede *Desmodus*-gener. Komplette proteiner kan lages ved rensing ut fra spytt fra *Desmodus rotundus* eller ved ekspresjon i en egnet ekspresjonsvektor av det tilsvarende genprodukt som er rekombinant-avledet. Med proteinfragmenter eller mindre enheter mener man en hvilken som helst del av proteinet som inneholder færre aminosyrer enn det komplette protein og opp-

rettholder evnen til å aktivere plasminogen under samme forhold til naturlig protein. Hybride proteiner omfatter, men er ikke begrenset til, fusjonsproteiner eller proteiner som er dannet ved ekspresjon av multiple gener inne i ekspresjonsvektoren. Fusjonsproteiner er proteiner hvor et begrenset antall aminosyrer som ekspresjonsvektoren koder for, bringes til ekspresjon og denne ekspresjon resulterer i binding til det spesifikke plasminogenaktivator-polypeptid. Proteiner som dannes av multiple gener, kan omfatte det spesifikke aktivator-polypeptid bundet til et annet polypeptid eller peptider med peptidbindinger som øker plasminogenaktiveringen.

Man fikk spyttkjertler fra 10 nettopp drepte vampyrflaggermus og brukte disse til isolering av poly-A⁺-RNA. Dette RNA ble brukt til bygging av et cDNA-bibliotek med enkelt-retning og λ gt 22, inneholdende mer enn 2×10^6 rekombinante bakteriofager. Et annet RNA-preparat som ble brukt til analyse ved "Northern blotting", ble isolert fra kjertler som ble hurtigfrosset på tørris. Kvaliteten for dette RNA kunne sammenlignes med kvaliteten isolert fra friskt vev.

Total RNA ble isolert fra primære og tilliggende submandibulære kjertler hos vampyrflaggermus (*Desmodus rotundus*) ved lavtemperaturmetoden med guanidin-thiocyanat (Han, J. et al., Biochem. 26, 1617-1625 (1987)). Poly(A)⁺ RNA ble isolert ved kromatografering på oligo(dT)-cellulose. Dobbelstreng-cDNA ble fremstilt ved en modifikasjon av metoden til Gubler og Hoffman (Gene 25, 263-269 (1983)) som tidligere beskrevet (Dixon, R.A.F. et al., Nature 321, 75-79 (1986)). cDNA ble størrelsesfraksjonert ved elektroforese på agarosegel til samlefraksjoner på 1-2 kb og 2-7 kb lengder som ble bundet til EcoRI-setet på lambda-ZAP-armer (Stratagene). Disse biblioteker ble forsterket på *E. coli*-arten LE392 og siktet ved platehybridisering som beskrevet i (Maniatis, T., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Par av delvis overlappende, komplementære oligonucleotider som svarer til

peptidene N-1, N-3, V-2 og T-1, ble utaldret, merket med Klenow-fragment og fire [³²P]alfa-dNTP og brukt til oppheising med nitrocellulosefilter fra bibliotekene. Hybridisering og vasking foregikk som beskrevet (Maniatis et al., ibid).

- 5 Positive kloner ble plakkrenset og cDNA-innføringer reddet ved coinfeksjon med en hjelpe-fag i henhold til leverandørens instruksjoner. Sekvensdannelse med enkelt- og dobbeltstreng-DNA ble utført ved dideoxynucleotidmetoden. Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., bind 74, s. 5463-5467 (1977).

- 10 Figur 8a viser nucleotidsekvensen for plasminogen-aktivator(ene) cDNA og aminosyresekvensen for aktivator(ene). Nucleotidsekvensen strekker seg fra 5'-enden på den lengste klon og gjennom den åpne leserammen. Ytterligere 800 nt med 3'-sekvens som ikke er oversatt og ender i en poly(A)-hale,
15 er ikke vist. Nucleotidsekvensen er nummerert til venstre i hver linje med den foreslåtte startkode som den første base. Den anslåtte aminosyresekvens er vist i enkeltbokstavkode og nummerert til høyre på hver linje. Aminosyresekvensen som er bestemt for Bat-PA(H), Bat-PA(I) og Bat-PA(L), er under-
20 streket og har fått betegnelsene N-1, N-2 og N-3, respektivt. Bat-PA(H) svarer til et peptid i full lengde hvor signal-peptidet er spaltet i en stilling som er analog til setet

- for signalspalting i tPA. Bat-PA(I) begynner med de samme tre aminosyrer som Bat-PA(H) fulgt av sekvenser som
25 begynner med N-2 svarende til EGF-domènet. Således svarer Bat-PA(I) til en finger-minus-form for Bat-PA(H). Den unike aminosyresekvens for Bat-PA(L) begynner med de samme tre aminosyrer fulgt av den porsjon av polypeptidet som begynner ved N-3, bortsett fra at den andre aminosyren i N-3 er for-
30 andret fra threonin til prolin, etter EGF-domènet, og gir opphav til en finger-minus- og EGF-minus-form for proteinet. Aminosyresekvensene for to proteolytiske fragmenter av staphylococcus V8 (V-1, V-2) og et tryptisk fragment (T-1) er også understreket. Prikket understreking angir aminosyre-
35 rester som ikke kunne bestemmes eller som ikke stemte overens med aminosyrer som kunne forutsies fra cDNA. Posisjonen for

det aktive sete Ser som ble radioaktivt merket med [^3H] DIFP, er angitt med (*). De forutsagte glycosylerings seter med N-binding er angitt ved aminosyrer i klammer.

Det ble syntetisert oligonucleotidprimere basert på tre fag-kloner som inneholdt BatPA-cDNA. Kloner av BatPA-cDNA ble forsterket ved hjelp av polymerase-kjedereaksjon (polymerase chain reaction = PCR) (se U.S. patent 4.800.159, kolonne 2, linje 36-68, kolonne 3-4 og kolonne 5, linje 1-20, som hermed tas med som referanse). cDNA-strengene ble oppvarmet inntil de separerte, hvorpå primere som binder seg til hver streng, ble tilsatt. Disse primere instruerte DNA-polymerase som har en replikatfunksjon, om å kopiere en spesiell del av strengen. Prosessen ble fortsatt med en rekke oppvarmings- og avkjølingskretsløp, oppvarming for å separere strengene og avkjøling når kopier ble laget. Dette kretsløp ble gjentatt for å danne flere og flere kopier av de spesielle strenger. Ved forstørring fikk man kodedomønet som de endeplasserte avgrensningsstillinger er heftet til.

Det ble fremstilt ekspresjonsvektorer for de tre plasminogenaktivatorformene (Bat-PA(H), Bat-PA(I) og Bat-PA(L)), som beskrevet i det følgende, og derpå transfisert inn i celler ifølge en metode med ustabil transfeksjon (som brukes til kvalitativ bedømmelse av om det er oppnådd ekspresjon) eller en stabil transfeksjonsmetode (fortrinnsvis brukt til å etablere levedyktige kloner).

Ved metoden med ustabil transfeksjon ble $2,5 \times 10^6$ celler/100 mm skiver lagt ut i 10 ml medium 24 timer før transfeksjon. To til fire timer før transfeksjon ble mediet byttet. Det ble dannet en felling av DNA/ CaPO_4 ved å fremstille et filtersterilisert, rekombinant BatPA-pD5-plasmid-DNA i en konsentrasjon på 5 $\mu\text{g}/250 \mu\text{l}$ ddH $_2\text{O}$ for hver 100 mm skive. Dette ble blandet med 500 μl 0,5 M CaCl_2 og ddH $_2\text{O}$ til et sluttvolum på 1 ml. En ml 2 x HBS tilsettes dråpevis under lett røring. Preparatet henses ved romtemperatur i 10-30 minutter, og fellingen legges jevnt ut på platen med en forsiktig hvirvelbevegelse. Etter dette trinnet skiller

fremgangsmåten seg noe avhengig av hvilke celler som skal transfiseres. CV1-celler inkuberes fire timer ved 37°C og 10% CO₂, mens celler av COS7 og 293 inkuberes i fire timer ved 37°C og 6% CO₂. Fire timer etter transfeksjon fjernes mediet for celler 293. Fire timer etter transfeksjon gjennomgår celler av CV1 og COS7 glycerolsjokk i 2 minutter (15% glycerol i mediet) og skylles to ganger med PBS. Derpå tilsettes friskt medium. Cellene inkuberes ved 37°C, og man tar ut prøver 24, 48 og 72 timer etter transfeksjon.

Ved metoden med stabil transfeksjon følges metoden med ustabil transfeksjon med følgende modifikasjoner. Det ble lagt ut 5×10^5 celler pr. 100 mm skiver istedenfor $2,5 \times 10^6$ pr. 100 mm skiver. 0,5 µg Neo-ekspresjonsplasmid tilsettes DNA/CaPO₄-fellingen for G418-seleksjon. Cellene holdes i seleksjon i 48 timer, og mediet veksles med mellomrom i 2-3 dager til det er utviklet kolonier resistente mot G418.

Mellomliggende og ekspresjonsvektorer ble laget på følgende måte for de forskjellige plasminogenaktivatorformer.

I. Bat-PA(H)

1. Naturlig 5'-NTL:

cDNA fra Bat-PA(H) ble avledet fra cDNA-biblioteket ved PCR-forsterkning av cDNA med oligodeoxynucleotidparene 141 & 142 og 27 & 19 som er gjengitt nedenfor, som primere:

Bgl II

141 5' > ATA TAT AGA TCT AGG GAC ACC GCA CAA ATG
 5 GTG > 3'

Spe I Bgl II

142 5' > ATA TAT GAG CTC AGA TCT CAG GGA GTT GCG
 TAT TCT TGG > 3'

Hind III

Spe I

10 27 5' > ATA TAA GCT T AC TAG TAG GGA CAC CGC
 ACA AAT GGT G > 3'

met

XbaI

Sac I

19 5 > TAT ATC TAG A GA GCT CCA GGG AGT TGC GTG
 15 TTC TTG G > 3'

Det ble gjennomført PCR i 100 μ l reaksjonsvolum som inneholdt 10 mM Tris-Cl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M i hver dNTP, 100 pmol av hver PCR-primer, 10-100 ng av cDNA eller DNA fra biblioteket og 2,5 enheter Taq-polymerase. Reaksjonen ble programmert til 30 kretsløp i DNA-termosykluser. Hvert temperaturkretsløp omfattet to minutters denaturering ved 94°C, to minutters aldring (annealing) ved 60°C, og to minutters polymerisering ved 72°C. Forstørret cDNA ble gelrenset og avgrenset med BglII og bundet (ligert) inn i setet pSP73 BglII. Etter verifikasjon av sekvensen ble Bat-PA(H) med åpne avlesningsrammer subklonet inn i den eukaryotiske ekspresjonsvektor pD5 som inneholdt sen-promotor av adenovirus major under dannelse av pSZ88-104-20 (se figur 9). Celler av 293 ble transfisert med pSZ88-104-20 og dannet 293-Bat-PA-1 pattedyrceller (ATCC nr.). Celler av E. coli ble transfisert med pSZ88-104-20 og dannet bakterieceller av BPA-CN-pSZ88-104-20 (ATCC nr.).

2. 5'-Kozak NTL:

cDNA fra Bat-PA(H) ble forstørret ved PCR som be-

skrevet ovenfor, med oligodeoxynucleotidparene 18 & 19 som primere:

```

5          Hind III  Spe I          Nco I
18      5' > ATA TAA GCT TAC TAG TCC ACC ATG GTG
                                     met
      AAT ACA ATG AAG AC > 3'

```

10

Forsterket cDNA ble renset på gel og spaltet med XbaI og Hind III fulgt av ligering inn i mellomproduktvektoren pSP73 mellom setene XbaI og Hind III, under dannelse av pSZ89-109, pSZ89-110, p89WO-10 og p89WO-8. Bat-PA(H) med
15 åpen leseramme ble i tillegg subklonet inn Sac I/Spe I-setet på pD5-mcs-vektoren som inneholder et multikloningssete istedenfor det opprinnelige BamHI-kloningssete under dannelse av pSZ89-111-17, pSZ89-112 og pSZ89-113 (se fig. 10). Celler av E. coli ble transfisert med pSZ89-111-17 og dannet bak-
20 teriecelle-BPA-CK-pSZ89-111-17 (ATCC nr.).

II. Bat-PA(I)

Bat-PA(I) med åpen leseramme ble avledet fra cDNA-biblioteket etter samme PCR-metode som er beskrevet tidligere
25 og gjenkjent ved den mindre størrelsen i forhold til den fullstendige isoformen. Bat-PA(I) inneholdende naturlig NTL, ble avledet fra oligodeoxynucleotidparet 27 & 19, mens Bat-PA(I) inneholdende Kozak NTL, ble avledet fra oligodeoxynucleotidparet 18 & 19. Forsterket Bat-PA(I) med åpen lese-
30 ramme ble spaltet med Hind III og XbaI for innkloning i pSP73 under dannelse av p89WO-14, p89WO-5,6, p89WO-9 og p89FWO-12, eller spaltet med Spe I og Sac I for kloning inn i pD5-mcs-vektor, under dannelse av p89WO-1, p89WO-2,A,B,C, p89WO-3 og p89WO-4 (se fig. 11). Celler av E. coli ble transfisert med
35 p89WO-1, og man fikk BPA-FK-p89WO-1-bakterieceller (ATCC

nr.). Celler av *E. coli* ble transfisert med p89-WO-2C under dannelsen av bakteriecelle-BPA-FN-p89WO-2C (ATCC nr.).

III. Bat-PA(L)

5 Bat-PA(L) med åpen leseramme ble avledet fra cDNA-biblioteket ved samme metode med PCR-forstørking av DNA fra biblioteket med oligodeoxynucleotidparene 18 & 11.4 som primere.

10 11.4 5 > CCT TTC TCC TGA TGA CCT TC > 3'

Forsterket DNA ble renset på gel og kappet med NcoI, og de minste av de tre NcoI-fragmenter som koder for 5'-stillingen i Bat-PA(L), ble igjen renset på gel og bundet
15 til NcoI-spaltet p89WO-11 (en Bat-PA(H) med åpen avlesningsramme i pSP73) under dannelsen av hhv. p89WP-17 og p89WP-18. Disse Bat-PA(L) med åpen avlesningsramme ble deretter frigjort fra mellomproduktvektorene ved spaltning med Sac I og Spe I og subklonet inn i pD5-mcs-vektorer under dannelsen av p89W-20A&B
20 og p89WP-19A&B (se fig. 12). Celler av *E. coli* ble trans-
fisert med p89WP-20A under dannelsen av BPA-DK-p89WP-20A-bakterieceller (ATCC nr.).

Prøver på fibrinagarplate av mediet som ble tatt ut 48 timer etter transfeksjon med COS-7, viste 50 ng/ml BatPA.

25 Klon pSZ88-104-20 ble funnet å være den beste eks-
pressor. Denne klon ble opprettet i celler 293 og ga eks-
presjon av mer enn 0,5 mikrogram pr. milliliter pr. dag av BatPA-aktivitet/medstrøm-enkeltskikt. Kronisk nærvær av butyrat og optimalisering av mediet økte ekspresjonsnivået til
30 over 10 mikrogram pr. milliliter pr. dag. Andre egnede ekspresjonsvektorer er pSZ89-111-17 (et derivat av pSZ88-104-20 med Kozak-5'-NTL istedenfor naturlig 5'-NTL),
EBV/EBNA/D5BatPA-C og CMVIE-AK1-BatPA-C, samt HIV LTR/BatPA-C.

35 Sammenligning med plasminogenaktivator fra menneskevev

Nedenfor følger en sammenligning mellom den primære aminosyresekvens for plasminogenaktivator fra menneskevev og Bat-PA(H) fremstilt i henhold til oppfinnelsen.

		1								10			
	human-t-PA	G	A	R	S	Y	Q	V	I	C	R	D	E
	Bat-PA(H)	G	S	R	A	Y	G	V	A	C	R	D	E
5		-3									7		
									20				
		K	T	Q	M	I	Y	Q	Q	H	Q	S	W
		K	T	Q	M	I	Y	Q	Q	Q	E	S	W
									17				
10							30						
		L	R	P	V	L	R	S	N	R	V	E	Y
		L	R	P	E	V	R	S	K	R	V	E	H
							27						
					40								
15		C	W	C	N	S	G	R	A	Q	C	H	S
		C	R	C	D	R	G	L	A	Q	C	H	T
					37								
			50										60
		V	P	V	K	S	C	S	E	P	R	C	F
20		V	P	V	K	S	C	S	E	L	R	C	F
			47										57
										70			
		N	G	G	T	C	Q	N	A	L	Y	F	S
		N	G	G	T	R	W	N	A	A	S	F	S
25											67		
									80				
		D	F	V	C	N	C	P	E	G	F	A	G
		D	F	V	C	N	C	P	K	G	Y	T	G
									77				
30							90						
		K	C	C	E	I	D	T	R	A	T	C	Y
		K	Q	C	E	V	D	T	H	A	T	C	Y
							87						

5 human-t-PA E D Q G I S Y R G T W S
 Bat-PA(H) K D Q G V T Y R G T W S
 100
 110 T A E S G A E C T N W N
 T S E S G A Q C I N W N
 97
 107
 130
 127
 140
 137
 150
 147
 160
 157
 170
 167
 176
 180
 190
 30 human-t-PA S D C Y F G N G S A Y R
 35

200

human-t-PA G T H S L T E S G A S C

5

210

L P W N S M I L I G K V

10

220

Y T A Q N P S A Q A L G

15

230

240

L G K H N Y C R N P D G

20

250

D A K P W C H V L K N R

260

R L T W E Y C D V P S C

25

270

human-t-PA S T C G L R Q Y S Q P Q

Bat-PA(H) T C G L R K Y K E P Q

30

177

180

280

F R I K G G L F A D I A

L H S T G G L F T D I T

190

35

35

					390								
	human-t-PA	S	R	C	A	Q	E	S	S	V	V	R	T
5	Bat-PA(H)	P	Q	C	A	Q	E	S	D	S	V	R	A
					300								
			400										
		V	C	L	P	P	A	D	L	Q	L	P	D
		I	C	L	P	E	A	N	L	Q	L	P	D
10				310									
		410									420		
		W	T	E	C	E	L	S	G	Y	G	K	H
		W	T	E	C	E	L	S	G	Y	G	K	H
		320									330		
15									430				
		E	A	L	S	P	F	Y	S	E	R	L	K
		K	S	S	S	P	F	Y	S	E	Q	L	K
									340				
									440				
20		E	A	H	V	R	L	Y	P	S	S	R	C
		E	G	H	V	R	L	Y	P	S	S	R	C
									350				
				450									
		T	S	Q	H	L	L	N	R	T	V	T	D
25		T	S	K	F	L	F	N	K	T	V	T	K
				360									
			460										
		N	M	L	C	A	G	D	T	R	S	G	G
		N	M	L	C	A	G	D	T	R	S	G	E
30				370									
		470									480		
		P	Q	A	N	L	H	D	A	C	Q	G	D
		I	H	P	N	V	H	D	A	C	Q	G	D
		380									390		

										490			
	human-t-PA	S	G	G	P	L	V	C	L	N	D	G	R
5	Bat-PA(H)	S	G	G	P	L	V	C	M	N	D	N	H
										400			
								500					
		M	T	L	V	G	I	I	S	W	G	L	G
		M	T	L	L	G	I	I	S	W	G	V	G
10								410					
					510								
		C	G	Q	K	D	V	P	G	V	Y	T	K
		C	G	E	K	D	I	P	G	V	Y	T	K
					420								
15			520										
		V	T	N	Y	L	D	W	I	R	D	N	M
		V	T	N	Y	L	G	W	I	R	D	N	M
					430								
		530											
20		R	P										
		R	P										
		440											

25 Fibronectin-fingerdomènet hos human-tPA (sekvens 9-46) har 78% homologi med sekvens 6-43 i Bat-PA(H). Domènet hos human-tPA for epidermisk vekstfaktor (sekvens 46-95) har 75% homologi med sekvens 43-92 i Bat-PA(H). Det første "kringle"-domène hos human-tPA (sekvens 95-177) har 67% homologi med Bat-PA(H)-sekvensen 92-174.

30 Det andre "kringle"-domène hos menneske-tPA (sekvens 178-265) har ingen motpart hos Bat-PA(H). Bat-PA(H)-aminosyrene 175 og 176 er lysin og alanin. Aminosyrene 190-441 hos Bat-PA(H), den "lette kjede", har 74% homologi med lettkjede-sekvensen 280-531 hos human-tPA.

35 Figur 8b er en skjematisk gjengivelse av aminosyre-

sekvensen hos Bat-PA(H) og sammenligning med human-tPA (Pennica et al., Nature, bind 301, 214-221 (1983)). De enkelte aminosyrer i Bat-PA er angitt med enkeltbokstavkode. Fylte ringer viser aminosyreidentitet mellom Bat-PA(H) og human-tPA.
5 Åpne ringer betegner forskjelligartede rester. Det foreslåtte disulfidmønster er i analogi med t-PA. De postulerte glycosyleringsstillinger med N-binding er angitt ved en påhektet klammer.

I tillegg til de naturlige derivater Bat-PA(I) og
10 Bat-PA(L) av denne plasminogenaktivator er andre derivater innenfor oppfinnelsen plasminogenaktivatorer som utelukker enten fingerdomène-regionen (aminosyrer -(3)-43) eller den epiderme vekstfaktor-region (aminosyrer 43-84). Et annet derivat er Bat-PA(H) med muterte carbohydratholdige aminosyre-
15 rester. Alle disse har ønskede plasminogenaktiverende egenskaper, deriblant lengre halvliv.

Innen oppfinnelsens ramme ligger også fusjonsproteiner av Bat-PA med lett kjede (sekvens 190-441) og human-tPA med tung kjede (sekvens 1-278) og derivater av disse med
20 plasminogenaktiverende egenskaper. Da de proteolytiske domèner hos Bat-PA ikke blir vesentlig inaktivert av plasminogenaktivator-inhibitor type 1, antar søkerne at fusjonsproteiner vil ha forbedrede farmakologiske egenskaper i forhold til plasminogenaktivator fra mennekevev.

25 Som tidligere nevnt, blir aktiviteten av vampyr-plasminogenaktivatorer dramatisk stimulert i nærvær av en fibrin-cofaktor. Den synes å være minst 90 ganger mer selektiv enn tPA overfor fibrinbundet plasminogen. Det andre "kringle"-domène hos tPA inneholder en lysinbindende stilling
30 som man antar spiller en avgjørende rolle for fibrinindusert stimulering av aktiviteten. Derimot avslører aminosyresekvensen av aktivatoren fremstilt ifølge oppfinnelsen at dennes markerte fibrinselektivitet ikke skyldes nærværet av en region som ligner det andre "kringle"-domènet hos tPA. Den manglende
35 evne hos vampyr-plasminogenaktivatorer til å binde Lys-sepharose viser dessuten at nærvær av lysinbindende stilling ikke er årsak til plasminogenets fibrinspesifikke aktivitet.

"Kringel"-domènet hos aktivatoren fremstilt ifølge oppfinnelsen fører til fibrin-indusert stimulering av

aktivitet til tross for forskjellene i forhold til den andre "kringle"-region hos tPA.

Aktivatorene skiller seg også strukturelt fra tPA ved fravær av plasminsensitivt aktivt sete i vampyrenzymet.

5 Bat-PA-proteiner som beskrevet ovenfor, har vært definert ved hjelp av determinert DNA-gensekvensundersøkelse og deduktiv aminosyresekvensundersøkelse. Man vil forstå at det kan finnes naturlige alleliske variasjoner. Disse variasjoner kan bestå i én eller flere aminosyreforskjeller i 10 totalsekvensen eller ved manglende aminosyrer, ved substitusjoner, innføringer, omdanninger eller addisjoner av én eller flere aminosyrer i sekvensen. Dessuten vil stillingen for og graden av glycosylering avhenge av vertcellemiljøets natur.

15 Det eksisterer muligheter for, ved bruk av rekombinant-DNA-teknikk, fremstilling av forskjellige derivater av vampyr-plasminogenaktivator, på forskjellig måte modifisert ved resulterende enkle eller multiple aminosyresubstitusjoner, -utelatelser, -addisjoner eller -erstatninger, f.eks. ved seterettet mutagenese av den underliggende DNA. Alle slike 20 alleliske variasjoner og modifikasjoner som gir derivater av vampyr-plasminogenaktivator, faller innenfor oppfinnelsens ramme så lenge den essensielle og karakteristiske plasminogenaktivatoraktivitet holder seg kvalitativt uforandret. Vampyr-plasminogenaktivator fremstilles (1) med methionin som første 25 aminosyre (til stede på grunn av ATG-startsignalkoden forrest på det strukturelle gen) eller (2) når methioninet er intra- eller ekstracellulært spaltet, med den normale første aminosyre eller (3) sammen med enten dens signalpolypeptid eller et konjugert protein forskjellig fra det vanlige 30 signalpolypeptid, hvilket signalpolypeptid eller konjugat er spesifikt spaltbart i intra- eller ekstracellulært miljø (se britisk patentsøknad, publikasjonsnr. 2.007.676A), eller (4) ved direkte ekspresjon i moden form uten nødvendig avspaltning av overflødige polypeptider. Sistnevnte er særlig viktig når 35 en gitt vert eventuelt ikke, eller ikke i tilstrekkelig grad, fjerner et signalpeptid hvor ekspresjonsbæreren er konstruert til å gi ekspresjon for plasminogenaktivatoren sammen med signalpeptidet. I alle tilfeller blir vampyr-plasminogen-

aktivator produsert på denne måten i dens forskjellige former, utvunnet og renset opp til et nivå som er egnet for behandling av forskjellige vaskulære sykdommer eller tilstander.

5

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et renset glycolsy-
lert eller uglycosylert plasminogenaktiverende protein som har
10 minst 90 % homologi med følgende aminosyresekvens:

15

20

25

30

35

Ala-Tyr-Gly-Asp-Pro-His-Ala-Thr-Cys-Tyr-Lys-Asp-
Gln-Gly-Val-Thr-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Ser-Thr-Ser-
Glu-Ser-Gly-Ala-Gln-Cys-Ile-Asn-Trp-Asn-Ser-Asn-
Leu-Leu-Thr-Arg-Arg-Thr-Tyr-Asn-Gly-Arg-Arg-Ser-
Asp-Ala-Ile-Thr-Leu-Gly-Leu-Gly-Asn-His-Asn-Tyr-
Cys-Arg-Asn-Pro-Asp-Asn-Asn-Ser-Lys-Pro-Trp-Cys-
Tyr-Val-Ile-Lys-Ala-Ser-Lys-Phe-Ile-Leu-Glu-Phe-
Cys-Ser-Val-Pro-Val-Cys-Ser-Lys-Ala-Thr-Cys-Gly-
Leu-Arg-Lys-Tyr-Lys-Glu-Pro-Gln-Leu-His-Ser-Thr-
Gly-Gly-Leu-Phe-Thr-Asp-Ile-Thr-Ser-His-Pro-Trp-
Gln-Ala-Ala-Ile-Phe-Ala-Gln-Asn-Arg-Arg-Ser-Ser-
Gly-Glu-Arg-Phe-Leu-Cys-Gly-Gly-Ile-Leu-Ile-Ser-
Ser-Cys-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Gln-
Glu-Arg-Tyr-Pro-Pro-Gln-His-Leu-Arg-Val-Val-Leu-
Gly-Arg-Thr-Tyr-Arg-Val-Lys-Pro-Gly-Lys-Glu-Glu-
Gln-Thr-Phe-Glu-Val-Glu-Lys-Cys-Ile-Val-His-Glu-
Glu-Phe-Asp-Asp-Asp-Thr-Tyr-Asn-Asn-Asp-Ile-Ala-
Leu-Leu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Ser-Pro-Gln-Cys-Ala-
Gln-Glu-Ser-Asp-Ser-Val-Arg-Ala-Ile-Cys-Leu-Pro-
Glu-Ala-Asn-Leu-Gln-Leu-Pro-Asp-Trp-Thr-Glu-Cys-
Glu-Leu-Ser-Gly-Tyr-Gly-Lys-His-Lys-Ser-Ser-Ser-
Pro-Phe-Tyr-Ser-Glu-Gln-Leu-Lys-Glu-Gly-His-Val-
Arg-Leu-Tyr-Pro-Ser-Ser-Arg-Cys-Thr-Ser-Lys-Phe-
Leu-Phe-Asn-Lys-Thr-Val-Thr-Lys-Asn-Met-Leu-Cys-
Ala-Gly-Asp-Thr-Arg-Ser-Gly-Glu-Ile-His-Pro-Asn-
Val-His-Asp-Ala-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-
Leu-Val-Cys-Met-Asn-Asp-Asn-His-Met-Thr-Leu-Leu-
Gly-Ile-Ile-Ser-Trp-Gly-Val-Gly-Cys-Gly-Glu-Lys-

Asp-Ile-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Lys-Val-Thr-Asn-Tyr-
Leu-Gly-Trp-Ile-Arg-Asp-Asn-Met-Arg-Pro

og/eller

5

Met-Val-Asn-Thr-Met-Lys-Thr-Lys-Leu-Leu-Cys-Val-
Leu-Leu-Leu-Cys-Gly-Ala-Val-Phe-Ser-Leu-Pro-Arg-
Gln-Glu-Thr-Tyr-Arg-Gln-Leu-Ala-Arg-Gly-Ser-Arg-
Ala-Tyr-Gly-Val-Ala-Cys-Arg-Asp-Glu-Lys-Thr-Gln-
Met-Ile-Tyr-Gln-Gln-Gln-Glu-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro-

10

Glu-Val-Arg-Ser-Lys-Arg-Val-Glu-His-Cys-Arg-Cys-
Asp-Arg-Gly-Leu-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Pro-Val-
Lys-Ser-Cys-Ser-Glu-Leu-Arg-Cys-Phe-Asn-Gly-Gly-
Thr-Cys-Trp-Gln-Ala-Ala-Ser-Phe-Ser-Asp-Phe-Val-
Cys-Gln-Cys-Pro-Lys-Gly-Tyr-Thr-Gly-Lys-Gln-Cys-

15

Glu-Val-Asp-Thr-His-Ala-Thr-Cys-Tyr-Lys-Asp-Gln-
Gly-Val-Thr-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Ser-Thr-Ser-Glu-
Ser-Gly-Ala-Gln-Cys-Ile-Asn-Trp-Asn-Ser-Asn-Leu-
Leu-Thr-Arg-Arg-Thr-Tyr-Asn-Gly-Arg-Arg-Ser-Asp-
Ala-Ile-Thr-Leu-Gly-Leu-Gly-Asn-His-Asn-Tyr-Cys-
Arg-Asn-Pro-Asp-Asn-Asn-Ser-Lys-Pro-Trp-Cys-Tyr-
Val-Ile-Lys-Ala-Ser-Lys-Phe-Ile-Leu-Glu-Phe-Cys-

20

Ser-Val-Pro-Val-Cys-Ser-Lys-Ala-Thr-Cys-Gly-Leu-
Arg-Lys-Tyr-Lys-Glu-Pro-Gln-Leu-His-Ser-Thr-Gly-
Gly-Leu-Phe-Thr-Asp-Ile-Thr-Ser-His-Pro-Trp-Gln-

25

Ala-Ala-Ile-Phe-Ala-Gln-Asn-Arg-Arg-Ser-Ser-Gly-
Glu-Arg-Phe-Leu-Cys-Gly-Gly-Ile-Leu-Ile-Ser-Ser-
Cys-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Gln-Glu-
Arg-Tyr-Pro-Pro-Gln-His-Leu-Arg-Val-Val-Leu-Gly-
Arg-Thr-Tyr-Arg-Val-Lys-Pro-Gly-Lys-Glu-Glu-Gln-
Thr-Phe-Glu-Val-Glu-Lys-Cys-Ile-Val-His-Glu-Glu-
Phe-Asp-Asp-Asp-Thr-Tyr-Asn-Asn-Asp-Ile-Ala-Leu-

30

Leu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Ser-Pro-Gln-Cys-Ala-Gln-
Glu-Ser-Asp-Ser-Val-Arg-Ala-Ile-Cys-Leu-Pro-Glu-
Ala-Asn-Leu-Gln-Leu-Pro-Asp-Trp-Thr-Glu-Cys-Glu-
Leu-Ser-Gly-Tyr-Gly-Lys-His-Lys-Ser-Ser-Ser-Pro-
Phe-Tyr-Ser-Glu-Gln-Leu-Lys-Glu-Gly-His-Val-Arg-
Leu-Tyr-Pro-Ser-Ser-Arg-Cys-Thr-Ser-Lys-Phe-Leu-
Phe-Asn-Lys-Thr-Val-Thr-Lys-Asn-Met-Leu-Cys-Ala-
Gly-Asp-Thr-Arg-Ser-Gly-Glu-Ile-His-Pro-Asn-Val-

35

His-Asp-Ala-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-
 Val-Cys-Met-Asn-Asp-Asn-His-Met-Thr-Leu-Leu-Gly-
 Ile-Ile-Ser-Trp-Gly-Val-Gly-Cys-Gly-Glu-Lys-Asp-
 Ile-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Lys-Val-Thr-Asn-Tyr-Leu-
 5 Gly-Trp-Ile-Arg-Asp-Asn-Met-Arg-Pro

og/eller

Ala-Tyr-Gly-Val-Ala-Cys-Arg-Asp-Glu-Lys-Thr-Gln-
 Met-Ile-Tyr-Gln-Gln-Gln-Glu-Ser-Trp-Leu-Arg-Pro-
 10 Glu-Val-Arg-Ser-Lys-Arg-Val-Glu-His-Cys-Arg-Cys-
 Asp-Arg-Gly-Leu-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Pro-Val-
 Lys-Ser-Cys-Ser-Glu-Leu-Arg-Cys-Phe-Asn-Gly-Gly-
 Thr-Cys-Trp-Gln-Ala-Ala-Ser-Phe-Ser-Asp-Phe-Val-
 Cys-Gln-Cys-Pro-Lys-Gly-Tyr-Thr-Gly-Lys-Gln-Cys-
 15 Glu-Val-Asp-Thr-His-Ala-Thr-Cys-Tyr-Lys-Asp-Gln-
 Gly-Val-Thr-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Ser-Thr-Ser-Glu-
 Ser-Gly-Ala-Gln-Cys-Ile-Asn-Trp-Asn-Ser-Asn-Leu-
 Leu-Thr-Arg-Arg-Thr-Tyr-Asn-Gly-Arg-Arg-Ser-Asp-
 Ala-Ile-Thr-Leu-Gly-Leu-Gly-Asn-His-Asn-Tyr-Cys-
 20 Arg-Asn-Pro-Asp-Asn-Asn-Ser-Lys-Pro-Trp-Cys-Tyr-
 Val-Ile-Lys-Ala-Ser-Lys-Phe-Ile-Leu-Glu-Phe-Cys-
 Ser-Val-Pro-Val-Cys-Ser-Lys-Ala-Thr-Cys-Gly-Leu-
 Arg-Lys-Tyr-Lys-Glu-Pro-Gln-Leu-His-Ser-Thr-Gly-
 Gly-Leu-Phe-Thr-Asp-Ile-Thr-Ser-His-Pro-Trp-Gln-
 25 Ala-Ala-Ile-Phe-Ala-Gln-Asn-Arg-Arg-Ser-Ser-Gly-
 Glu-Arg-Phe-Leu-Cys-Gly-Gly-Ile-Leu-Ile-Ser-Ser-
 Cys-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Gln-Glu-
 Arg-Tyr-Pro-Pro-Gln-His-Leu-Arg-Val-Val-Leu-Gly-
 Arg-Thr-Tyr-Arg-Val-Lys-Pro-Gly-Lys-Glu-Glu-Gln-
 30 Thr-Phe-Glu-Val-Glu-Lys-Cys-Ile-Val-His-Glu-Glu-
 Phe-Asp-Asp-Asp-Thr-Tyr-Asn-Asn-Asp-Ile-Ala-Leu-
 Leu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Ser-Pro-Gln-Cys-Ala-Gln-
 Glu-Ser-Asp-Ser-Val-Arg-Ala-Ile-Cys-Leu-Pro-Glu-
 Ala-Asn-Leu-Gln-Leu-Pro-Asp-Trp-Thr-Glu-Cys-Glu-
 35 Leu-Ser-Gly-Tyr-Gly-Lys-His-Lys-Ser-Ser-Ser-Pro-
 Phe-Tyr-Ser-Glu-Gln-Leu-Lys-Glu-Gly-His-Val-Arg-
 Leu-Tyr-Pro-Ser-Ser-Arg-Cys-Thr-Ser-Lys-Phe-Leu-
 Phe-Asn-Lys-Thr-Val-Thr-Lys-Asn-Met-Leu-Cys-Ala-
 Gly-Asp-Thr-Arg-Ser-Gly-Glu-Ile-His-Pro-Asn-Val-

His-Asp-Ala-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-
 Val-Cys-Met-Asn-Asp-Asn-His-Met-Thr-Leu-Leu-Gly-
 Ile-Ile-Ser-Trp-Gly-Val-Gly-Cys-Gly-Glu-Lys-Asp-
 Ile-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Lys-Val-Thr-Asn-Tyr-Leu-
 Gly-Trp-Ile-Arg-Asp-Asn-Met-Arg-Pro

5

og/eller

Ala-Tyr-Gly-Ser-Cys-Ser-Glu-Leu-Arg-Cys-Phe-Asn-
 Gly-Gly-Thr-Cys-Trp-Gln-Ala-Ala-Ser-Phe-Ser-Asp-
 Phe-Val-Cys-Gln-Cys-Pro-Lys-Gly-Tyr-Thr-Gly-Lys-
 Gln-Cys-Glu-Val-Asp-Thr-His-Ala-Thr-Cys-Tyr-Lys-
 Asp-Gln-Gly-Val-Thr-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Ser-Thr-
 Ser-Glu-Ser-Gly-Ala-Gln-Cys-Ile-Asn-Trp-Asn-Ser-
 Asn-Leu-Leu-Thr-Arg-Arg-Thr-Tyr-Asn-Gly-Arg-Arg-
 Ser-Asp-Ala-Ile-Thr-Leu-Gly-Leu-Gly-Asn-His-Asn-
 Tyr-Cys-Arg-Asn-Pro-Asp-Asn-Asn-Ser-Lys-Pro-Trp-
 Cys-Tyr-Val-Ile-Lys-Ala-Ser-Lys-Phe-Ile-Leu-Glu-
 Phe-Cys-Ser-Val-Pro-Val-Cys-Ser-Lys-Ala-Thr-Cys-
 Gly-Leu-Arg-Lys-Tyr-Lys-Glu-Pro-Gln-Leu-His-Ser-
 Thr-Gly-Gly-Leu-Phe-Thr-Asp-Ile-Thr-Ser-His-Pro-
 Trp-Gln-Ala-Ala-Ile-Phe-Ala-Gln-Asn-Arg-Arg-Ser-
 Ser-Gly-Glu-Arg-Phe-Leu-Cys-Gly-Gly-Ile-Leu-Ile-
 Ser-Ser-Cys-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Phe-
 Gln-Glu-Arg-Tyr-Pro-Pro-Gln-His-Leu-Arg-Val-Val-
 Leu-Gly-Arg-Thr-Tyr-Arg-Val-Lys-Pro-Gly-Lys-Glu-
 Glu-Gln-Thr-Phe-Glu-Val-Glu-Lys-Cys-Ile-Val-His-
 Glu-Glu-Phe-Asp-Asp-Asp-Thr-Tyr-Asn-Asn-Asp-Ile-
 Ala-Leu-Leu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Ser-Pro-Gln-Cys-
 Ala-Gln-Glu-Ser-Asp-Ser-Val-Arg-Ala-Ile-Cys-Leu-
 Pro-Glu-Ala-Asn-Leu-Gln-Leu-Pro-Asp-Trp-Thr-Glu-
 Cys-Glu-Leu-Ser-Gly-Tyr-Gly-Lys-His-Lys-Ser-Ser-
 Ser-Pro-Phe-Tyr-Ser-Glu-Gln-Leu-Lys-Glu-Gly-His-
 Val-Arg-Leu-Tyr-Pro-Ser-Ser-Arg-Cys-Thr-Ser-Lys-
 Phe-Leu-Phe-Asn-Lys-Thr-Val-Thr-Lys-Asn-Met-Leu-
 Cys-Ala-Gly-Asp-Thr-Arg-Ser-Gly-Glu-Ile-His-Pro-
 Asn-Val-His-Asp-Ala-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-
 Pro-Leu-Val-Cys-Met-Asn-Asp-Asn-His-Met-Thr-Leu-
 Leu-Gly-Ile-Ile-Ser-Trp-Gly-Val-Gly-Cys-Gly-Glu-
 Lys-Asp-Ile-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Lys-Val-Thr-Asn-
 Tyr-Leu-Gly-Trp-Ile-Arg-Asp-Asn-Met-Arg-Pro

10

15

20

25

30

35

hvor proteinet krever en fibrin-cofaktor for aktivering av plasminogen, og/eller

et fusjonsprotein, som inneholder en sekvens av aminosyrer svarende til aminosyrene 190-441 som vist i fig. 8a, og en

5 tungkjedesequens fra plasminogenaktivator av vevstypen, hvilket protein har større plasminogenaktiverende virkning i nærvær av plasminogenaktivatorinhibitor av type 1 enn vevsplasminogen-aktivator i nærvær av plasminogenaktivatorinhibitor type 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

- 10 (a) en DNA-sekvens inneholdende DNA som koder for proteinet, utvikles,
(b) DNA-sekvensen klones inn i en ekspresjonsvektor for ekspresjon av proteinet i *E. coli*,
(c) vektoren transfekteres i *E. coli*, og
15 (d) proteinet uttrykkes.

2. DNA-sekvens,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t den koder for et protein fremstilt ifølge krav 1.

20

3. Replikerbar kloningsvektor,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter en innført DNA-sekvens ifølge krav 2, og er i stand til å uttrykke det gitte gen.

25

4. Pattedyrcelle,

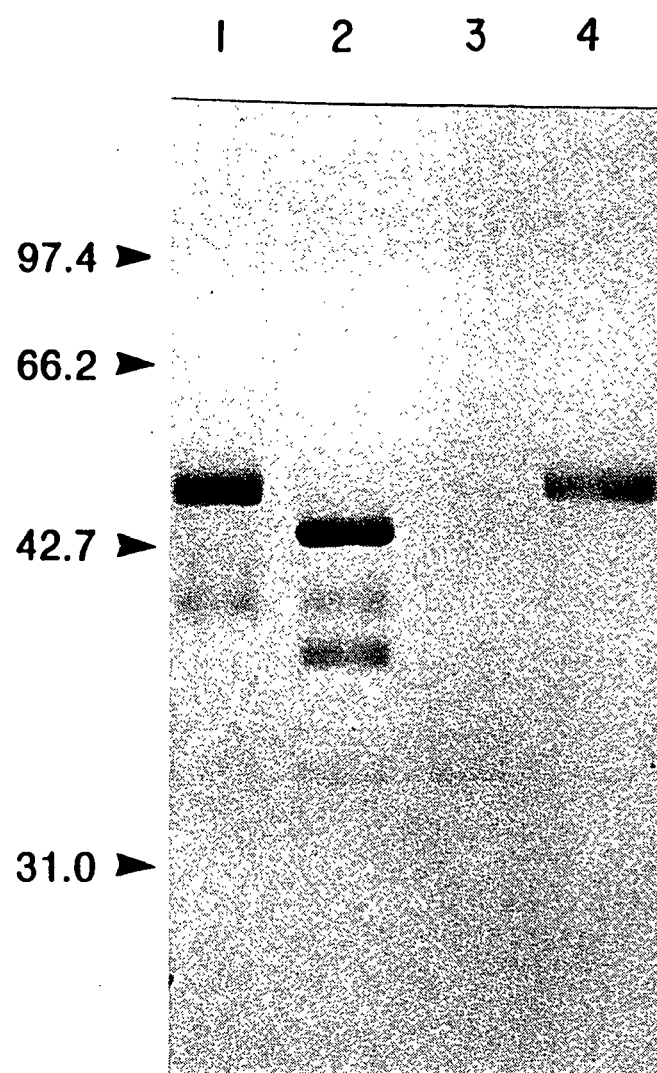
k a r a k t e r i s e r t v e d a t den er transfektert med en kloningsvektor ifølge krav 3, og er i stand til å produsere det gitte protein.

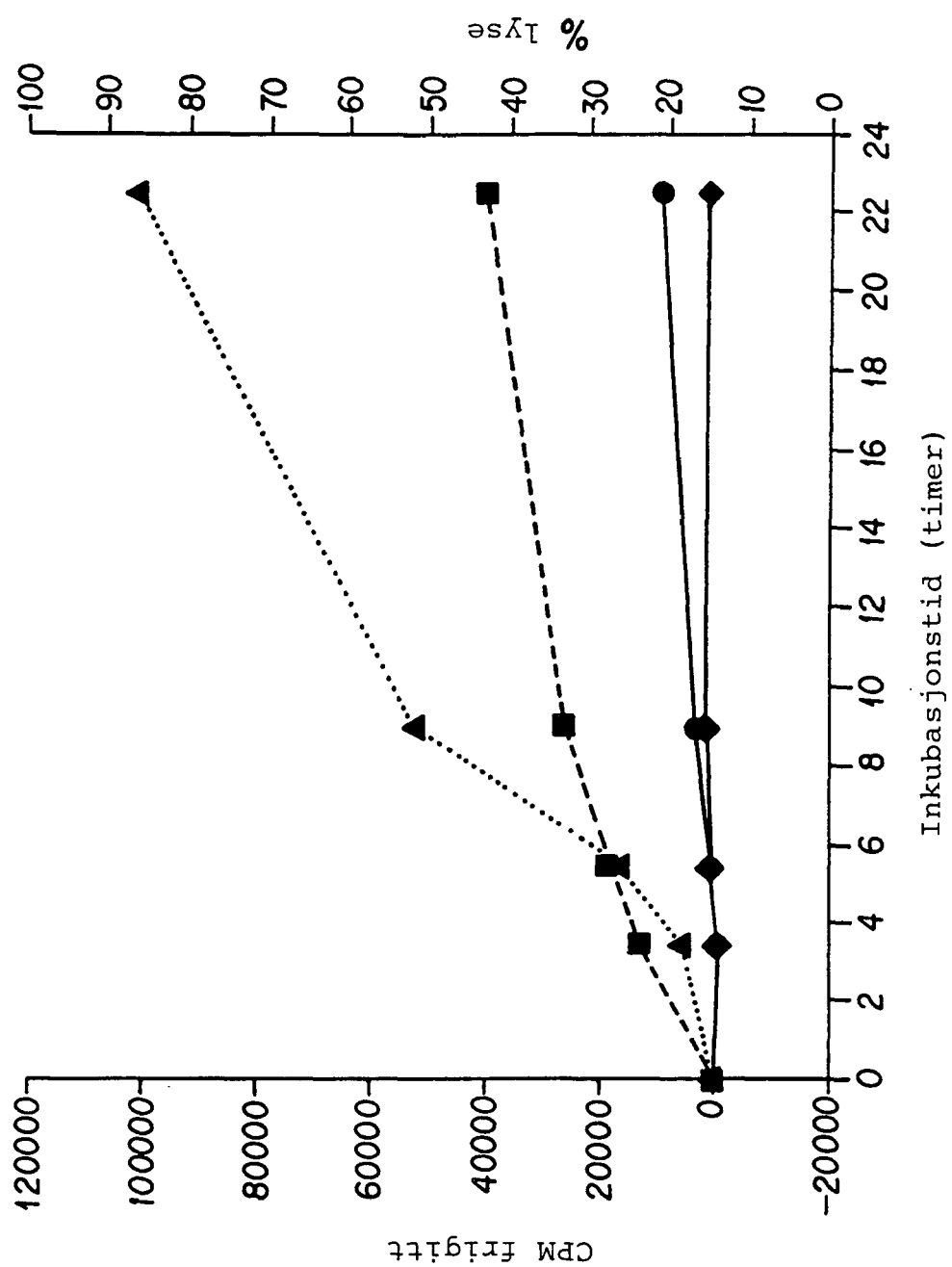
30

5. Bakteriecele,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t den er transfektert med en kloningsvektor ifølge krav 3, og er i stand til å produsere det gitte protein.

35

**FIG. 1**



—◆— Kontrollprøve ▲ iPA 1.2 nM
—●— iPA 0.4 nM --■-- iPA 40 nM

FIG. 2

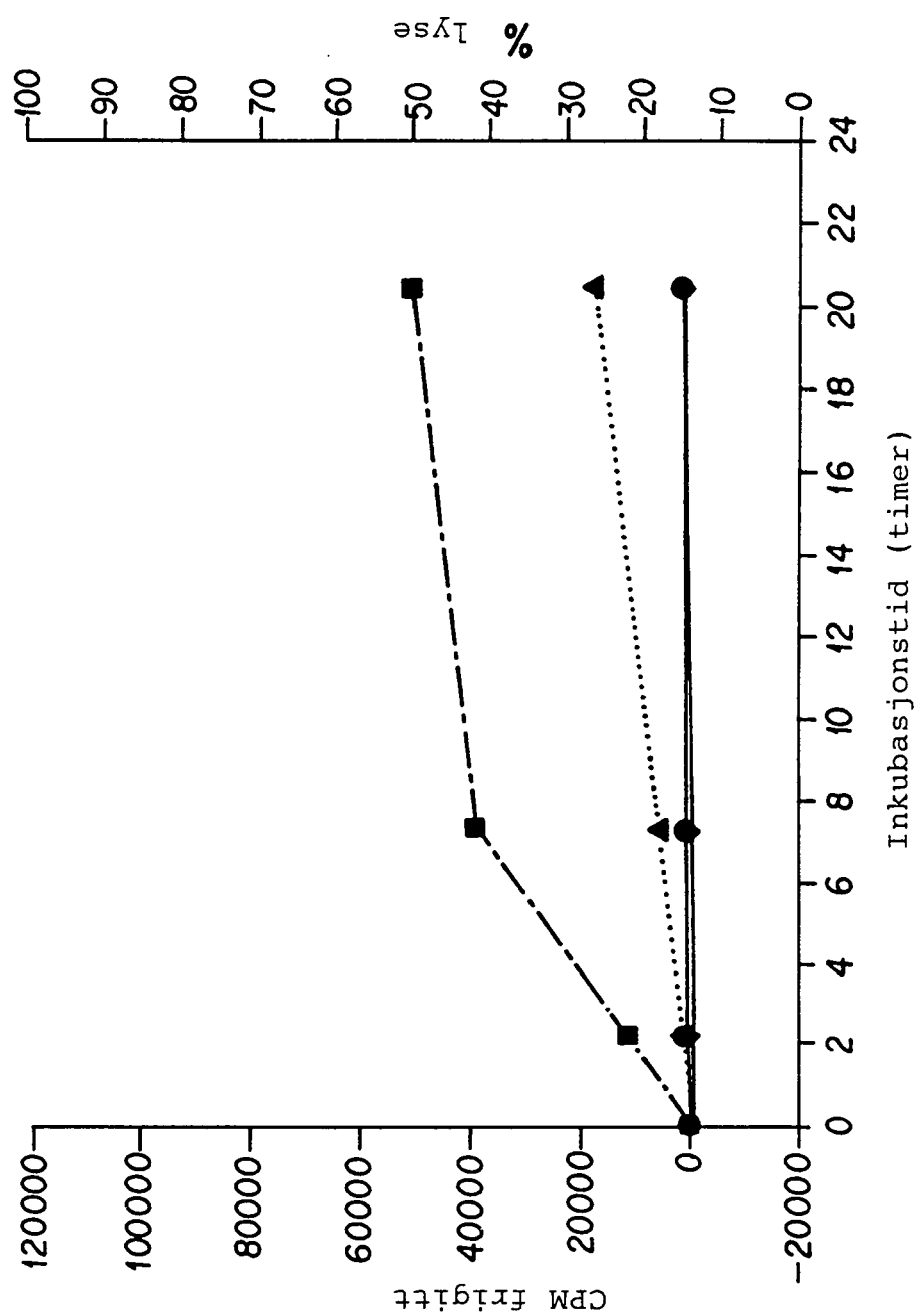


FIG. 3

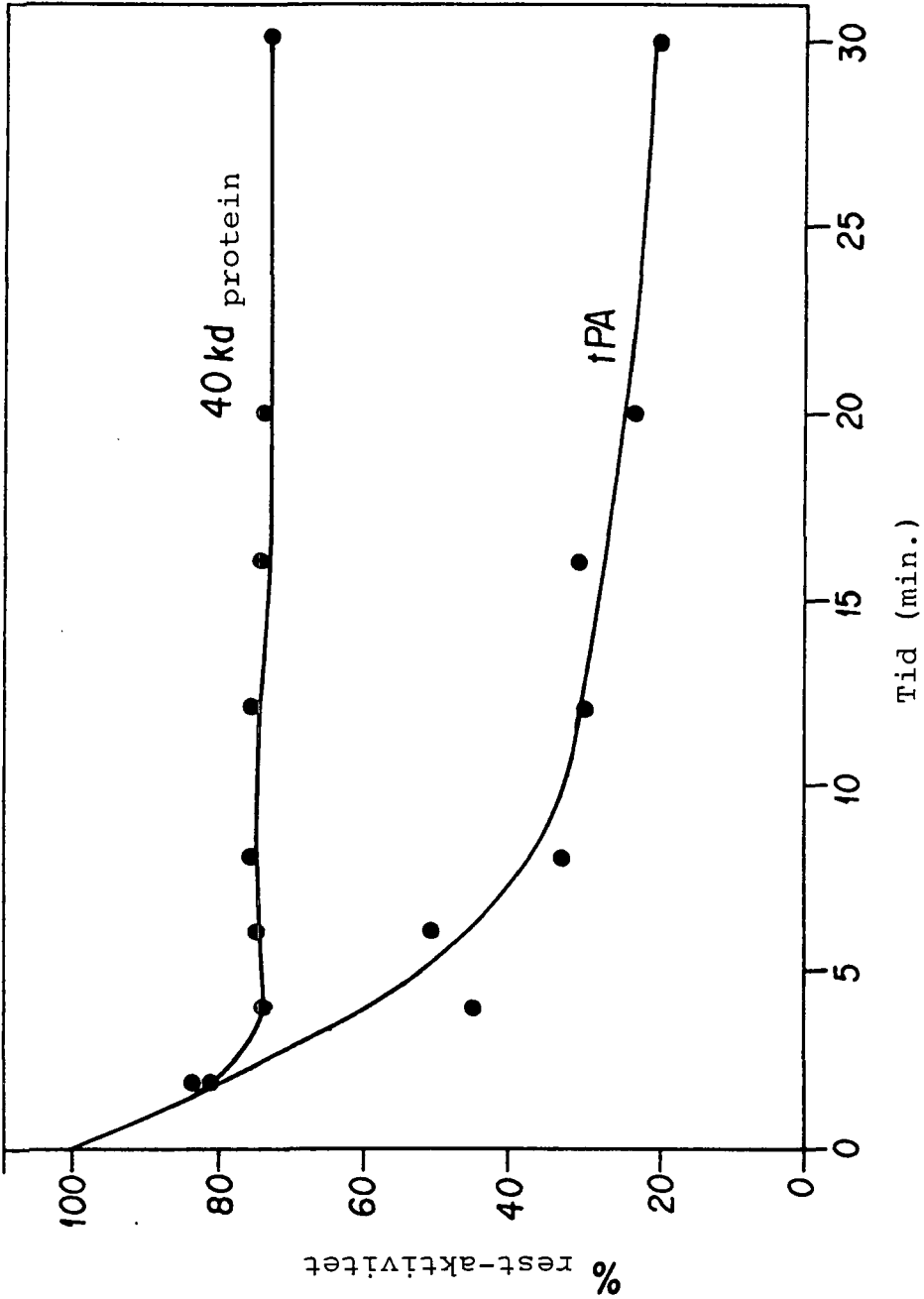


FIG. 4

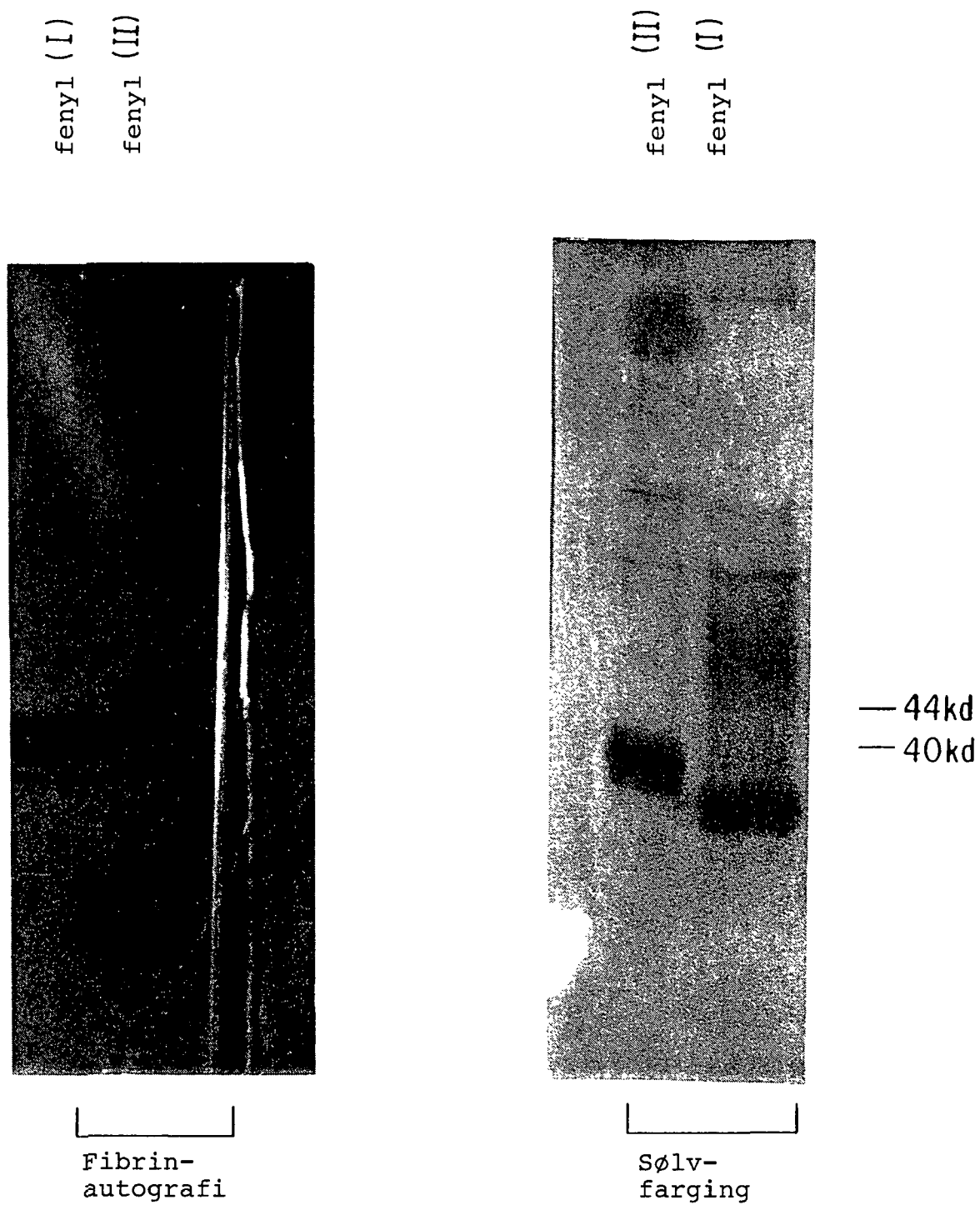


FIG. 5

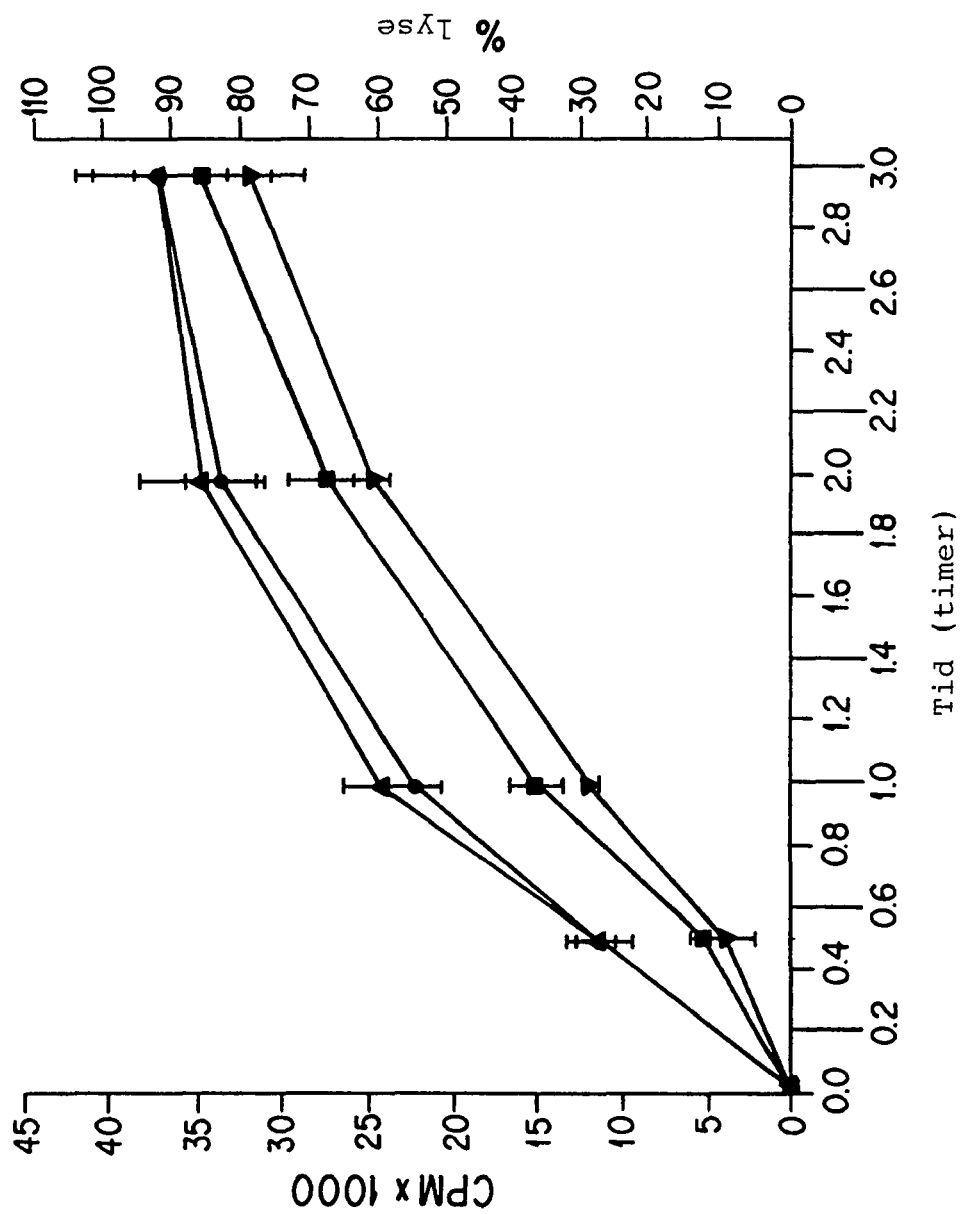


FIG. 6

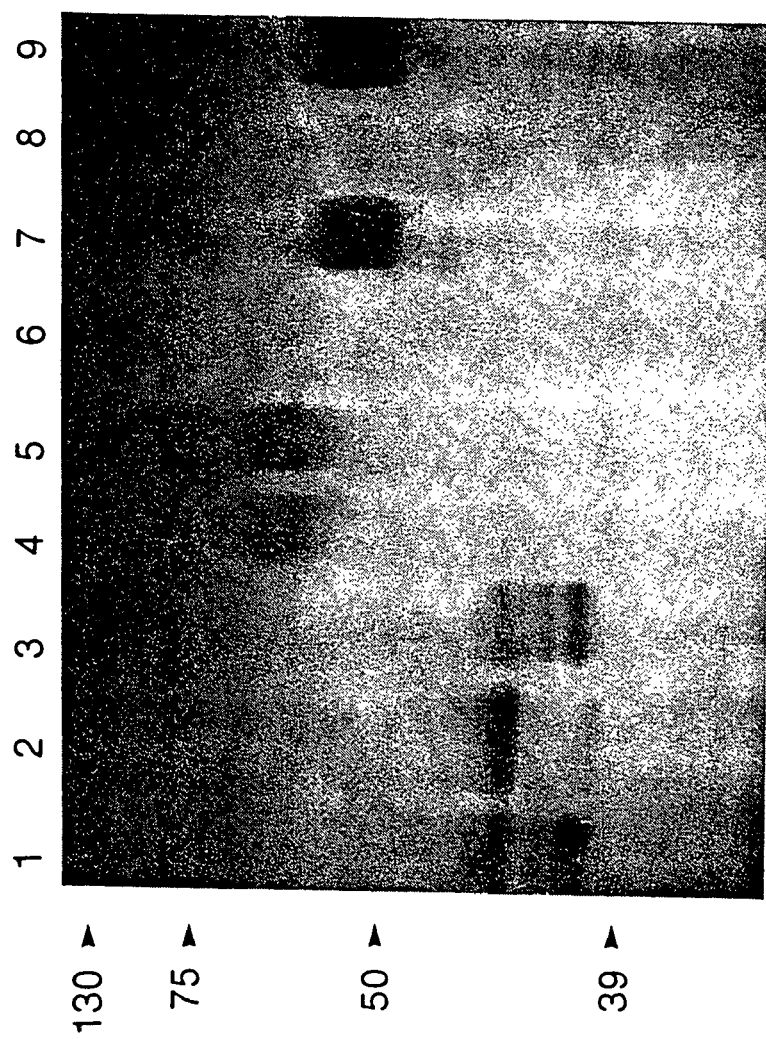


FIG. 7

* Plasminogen-aktivator "L" har prolin i stilling 88 i stedet for treonin

```

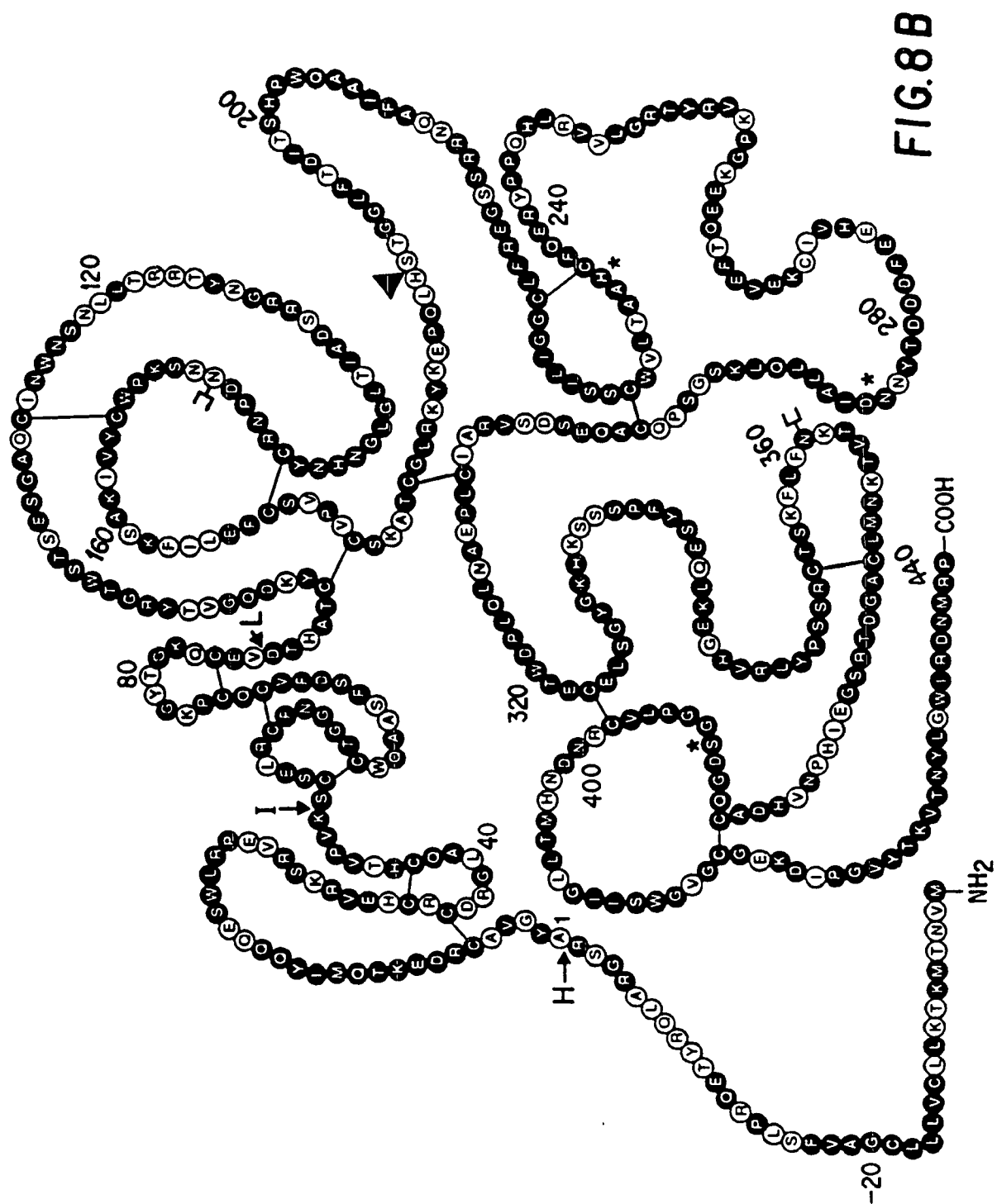
-90  ACCCAATTGCGCAAGAGCTGAGCTGACGGGAATCCTCTCCAGGAGAGAAGGAAGGAGTGGCGAGTTAAGGGACACCGCAGAA
1    ATGGTGAATACAATGAAGACAAAGCTGTTGTGTACTGCTGTTGTGGAGCAGTCTTCTGTTGCCAGGCAGGAACCTACAGGCAA
(-36) M V N T M K T K L L C V L L L C G A V F S L P R Q E T Y R Q (-07)
91   TTGGCAAGGGGATCCAGAGCATATGGTGTGGCCTGCAGAGACGAAAAACCCAGATGATATACCAGCAACAAGAGTCGTGGCTGCGCCCC
L A R G S R A Y G V A C R D E K T Q M I Y Q Q Q Q E S W L R P 24
181  GAGTCAGAAGCAAGCGGTAGAACACTGCCGGTCCGATAGAGGATTGGCCCAGTGTACACCCGTGCCCTGTCAAAAAGTTGCAGTGAAC TG
E V R S K R V E H C R C D R G L A Q C H T V P V K S C S E L 54
271  AGGTGCTTCAATGGGGGACATGCTGCCAGGCTGCATCTTCTCAGACTTTGTCTGTCTCAGTGCCTAAAGGATATACGGGGAACACAGTGT
R C F N G G T C W Q A A S F S D F V C Q C P K G Y T G K Q C 84
361  GAAGTAGATACCCATGCCACCTGCTACAAGGACCAGGGTGTCCCTACAGGGGCACATGGAGCACATCGGAAAGTGGGGCTCAGTGTATC
E V D (T)*H A T C Y K D Q G V T Y R G T W S T S E S G A Q C I 114
451  AACTGGAACAGCAACCTTCTGACCCGGAGGACCTACAATGGCGGAGTCCAGATGCCATCACACTGGGCCTTGGGAATCACAAATTACTGC
N W N S N L L T R R T Y N G R R S D A I T L G L G N H N Y C 144
541  AGAAACCCAGATAACAACCTTGGTGCTATGTATCATCAAGGCAAGCAAGTTTCATCTTGGAGTTCTGTAGCGTGCCTGTCTGCTCC
R N P D [N] N S K P W C Y V I K A S K F I L E F C S V P V C S 174
631  AAGGCCACCTGTGGCCTGAGAAAGTACAAGGAGCCACAGCTTTCACAGTACAGGAGGACTCTTCACAGACATCACCTCTCATCCATGGCAG
K A T C G L R K Y K E P Q L H S T G G L F T D I T S H P W Q 204

```

FIG.8A

721 GCTGCCATCTTTGCCAGAACAGAAGGTTCATCAGGAGAAAGGTTCTTGTGTGGGGGATATTGATCAGTTCCTGCTGGTCTGACTGCT 234
 A A I F A Q N R R S S G E R F L C G G I L I S S C W V L T A
 811 GCCCACTGCTTCCAGGAGAGGTATCTCCCCAGCATCTTAGGGTGGTTTGGGCAGAACATACCGGGTGAACCTGGAAAGGAAGACGACG 264
 A H C F Q E R Y P P Q H L R V V L G R T Y R V K P G K E E Q
 901 ACATTGAAGTCGAAAAATGCCATCGTCCATGAGGAATTTGATGACGACACTTACAACAATGACATTGCCACTGCTGCAGCTGAAATCGGGC 294
 T F E V E K C I V H E E F D D T Y N N D I A L L Q L K S G
 991 TCGCCACAGTGTGCCCAAGAGAGTGTCCCGGCCATCTGTCTCCCGGAAGCCAACCTGCAGCTGCCCGACTGGGACAGAAATGTGAG 324
 S P Q C A Q E S D S V R A I C L P E ^{V-2} A N L Q L P D W T E C E
 1081 CTGTCTGGCTACGGCAAGCATAAGTCATCTTCTCTCTTCTATCTGAGCAGCTCA^{V-2}AGGAAGGGCATGTCAGGCTGTACCCCTCCAGCCGC 354
 L S G Y G K H K S S S P F Y S E Q L K E G H V R L Y P S S R
 1171 TGCACATCCCAAGTTTCTGTTTAAACAAAACCGTCACAAAGAACATGCTGTGTGCTGGAGACACGCGGAGCGGAGAGATCCCAAAATGTG 384
 C T S K F L F N K T V T K N M L C A G D T R ^{I-1} S G E I H P N V
 1261 CACGATGCCCTGCCAGGTGACTCAGGAGGCCCTTGTGTGTAGGAATGACAACCAACATGACTTTGCTTGGCATCATCAGTTGGGGTGT 414
 H D A C Q G D S G G P L V C R N D N H M T L L G I I S W G V
 1351 GGCTGTGGGAGAAAGACATTCAGGTGTATACACCAAGGTTACTAATTACCTAGGCTGGATTCCGAGACAACATCGCCCAATAACCAAGA 441
 G C G E K D I P G V Y T K V T N Y L G W I R D N M R P
 1441 ACAGCAACTCCCTGGCAGCCCTTCCTCCACCCCAAGAAACACAAGGCAGAATGCTTCTCTGACACCAGTTTCTTCAACAGCCT

FIG. 8A (cont)



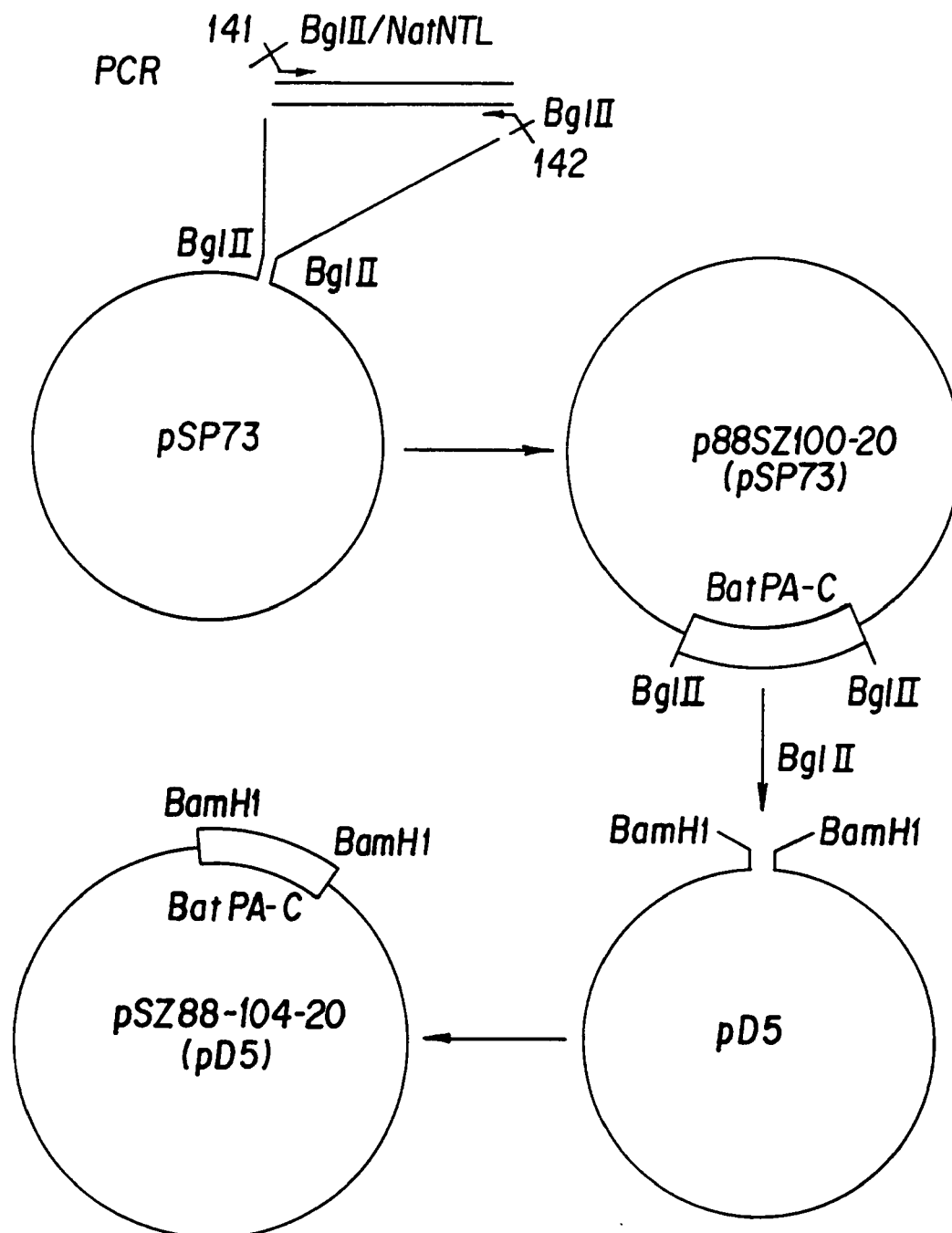


FIG. 9

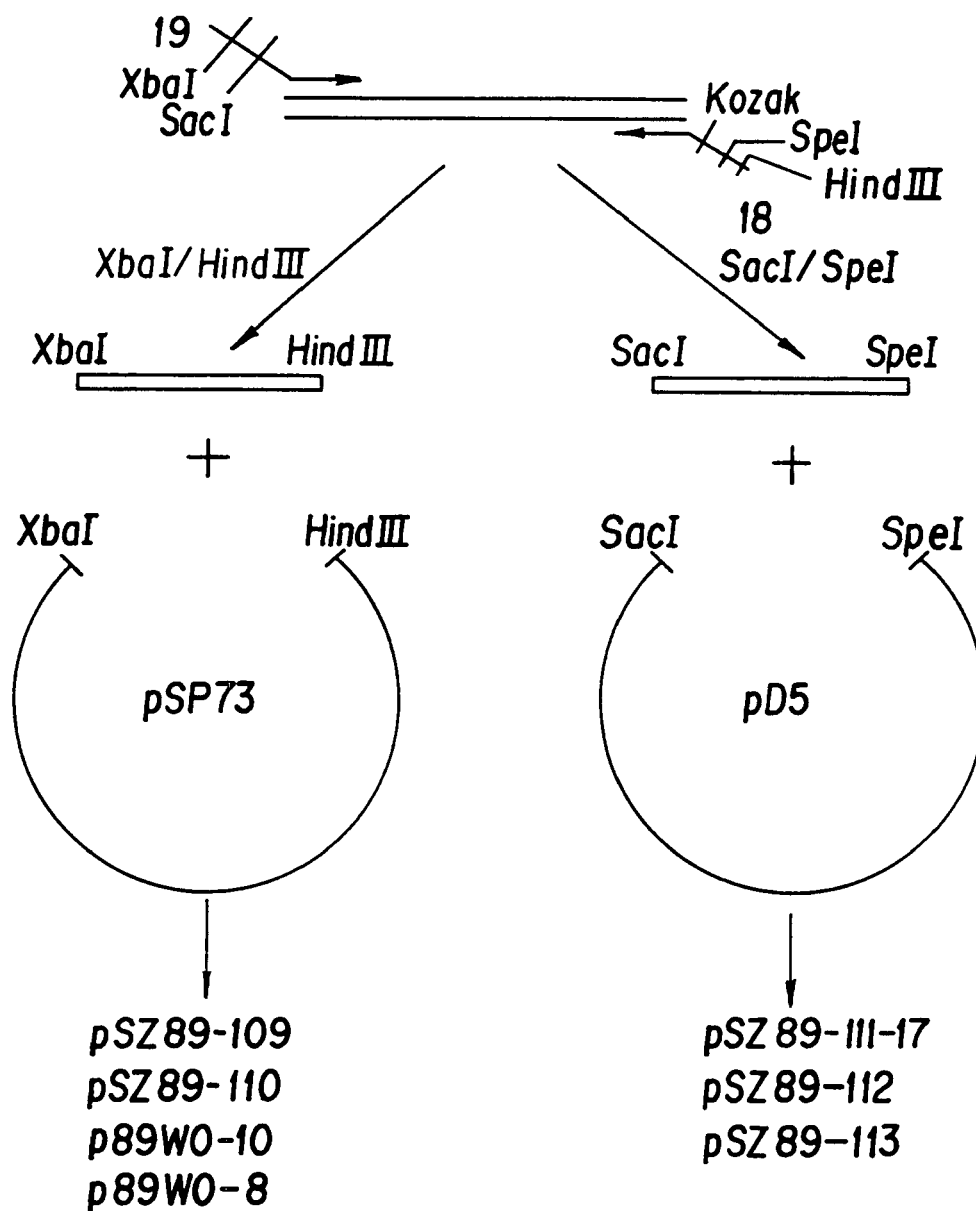


FIG.10

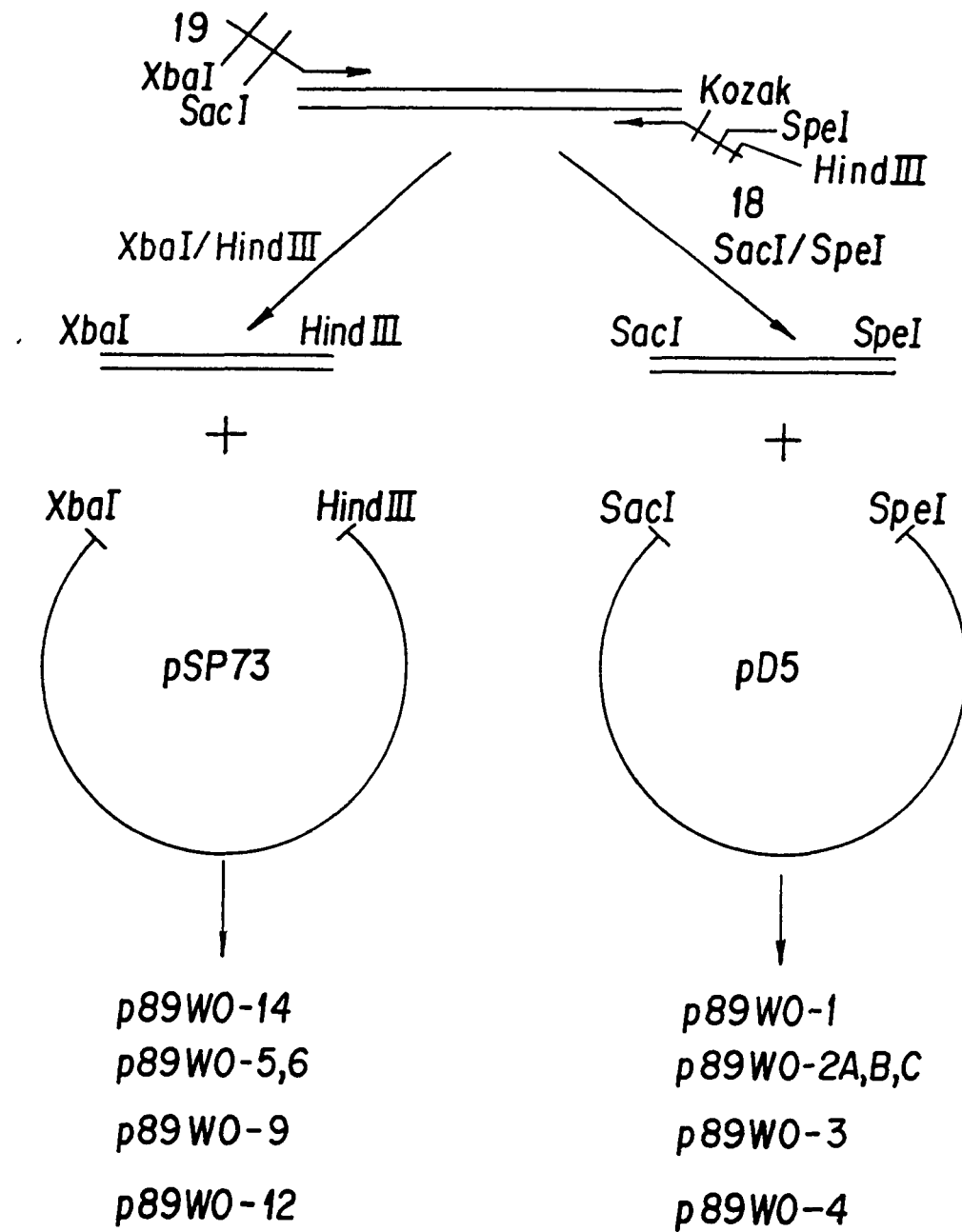


FIG. 11

