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

(10) **DE 693 33 738 T2** 2005.12.01

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 627 923 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 738.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/02034**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 907 272.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 93/016709**
(86) PCT-Anmeldetag: **23.02.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **02.09.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.12.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.01.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.12.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/12**
C12N 15/70, C07K 14/745, C12N 1/21, A61K 38/36

(30) Unionspriorität:
841591 **26.02.1992** **US**

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

(73) Patentinhaber:
The Scripps Research Institute, La Jolla, Calif., US

(74) Vertreter:
Patentanwälte
HANSMANN-KLICKOW-HANSMANN, 22767 Hamburg

(72) Erfinder:
RUGGERI, M., Zaverio, La Jolla, US; WARE, L., Jerry, Encinitas, US

(54) Bezeichnung: **THERAPEUTISCHE DOMÄNEN DES VON WILLEBRAND-FAKTOR**

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

[0001] Die Erfindung betrifft Polypeptide, die für die Behandlung von Gefäßstörungen wie beispielsweise Thrombose vorteilhaft sind. Die Erfindung betrifft ferner die Herstellung von pharmakologisch vorteilhaften Mengen des Polypeptids gemäß der vorliegenden Erfindung durch rekombinante DNA-gerichtete Verfahren.

[0002] Der Begriff "Hämostase" bezieht sich auf jene Vorgänge, die die Verteidigungsmechanismen des Blutes gegen den durch Gefäßverletzungen hervorgerufenen Verlust von zirkulierendem Blut umfassen. Vorgänge, die als physiologische Reaktionen auf eine Gefäßverletzung normal sind, können unter Krankheitsumständen, wie beispielsweise bei einem Patienten, der unter einer atherosklerotischen Gefäßerkrankung oder chronischer kongestiver Herzinsuffizienz leidet, zur Bildung von unerwünschten Thromben (Gerinnseln) führen, mit nachfolgender Gefäßverstopfung. Die Beeinträchtigung des Blutflusses zu Organen kann unter solchen Umständen zu schweren Krankheitszuständen führen, einschließlich einem Myokardinfarkt, einer Hauptursache für die Sterblichkeit in den entwickelten Ländern.

[0003] Die Drosselung oder Beendigung des Blutflusses innerhalb des Kreislaufsystems als Reaktion auf eine Wunde oder als Ergebnis eines Gefäßkrankheitszustandes beinhaltet eine komplexe Serie von Reaktionen, die in zwei Prozesse eingeteilt werden können, die primäre und sekundäre Hämostase. Primäre Hämostase betrifft den Vorgang der Blutplättchenpfropf- oder Weichgerinnselbildung. Die Blutplättchen sind kernlose scheibenförmige Strukturen mit einem Durchmesser von ungefähr 2–5 Mikron; die von megakaryozytären Zellen abgeleitet sind. Eine wirksame primäre Hämostase wird durch Blutplättchenadhäsion erreicht, die Wechselwirkung von Blutplättchen mit der Oberfläche von geschädigtem Gefäßendothel, auf dem darunterliegende Kollagenfasern und/oder andere adhäsive Makromoleküle wie Proteoglykane und Glykosaminoglykane exponiert sind, an die Blutplättchen binden.

[0004] Sekundäre Hämostase beinhaltet die Verstärkung oder Quervernetzung des weichen Blutgerinnsels. Dieser sekundäre Prozeß wird durch im Plasma zirkulierende Proteine (Gerinnungsfaktoren) initiiert, die bei der primären Hämostase aktiviert werden, entweder in Reaktion auf eine Wunde oder einen Gefäßkrankheitszustand. Die Aktivierung dieser Faktoren führt schließlich zur Bildung einer polymeren Matrix des Proteins Fibrinogen (dann Fibrin genannt), welche das weiche Gerinnseln verstärkt.

[0005] Die vorliegende Erfindung betrifft Anti-Blutplättchen-Arzneimittel. Anti-Blutplättchen-Arzneimittel schließen Arzneimittel ein, die die primäre Hämostase durch Veränderung der Blutplättchen oder deren Wechselwirkung mit anderen Bestandteilen des Kreislaufsystems unterdrücken.

[0006] Bestimmte Anti-Blutplättchen-Arzneimittel agieren durch einen oder mehrere Mechanismen. Ein erstes Beispiel beinhaltet die Reduzierung der Verfügbarkeit von ionisiertem Kalzium innerhalb des Blutplättchen-Zytoplasmas, wodurch die Aktivierung des Blutplättchens und die sich daraus ergebende Aggregation beeinträchtigt werden. Für diese Strategie repräsentative Pharmazeutika beinhalten Prostacyclin und auch Persatin® (Dipyridamol), das die Kalzium-Konzentrationen durch Beeinflussung der Konzentration von zyklischem AMP beeinflussen kann. Viele Nebenwirkungen, die mit der Verabreichung dieser Verbindungen verbunden sind, sind dargestellt worden. Eine weitere Klasse von Anti-Blutplättchen-Arzneimitteln wird durch Hemmung der Synthese von Thromboxan A_2 innerhalb des Blutplättchens, wodurch die Blutplättchen-Aktivierungs-Reaktion vermindert wird. Nichtsteroidale antientzündliche Mittel wie beispielsweise Ibuprofen, Phenolbutazon und Napthroxan können eine ähnliche Wirkung durch kompetitive Hemmung eines bestimmten Cyclooxygenaseenzyms hervorrufen, das die Synthese eines Vorläufers von Thromboxan A_2 katalysiert. Eine ähnliche therapeutische Wirkung kann erhalten werden durch die Verabreichung von Aspirin, von dem gezeigt wurde, daß es ein Cyclooxygenaseenzym, das zur Erzeugung von Thromboxan A_2 erforderlich ist, irreversibel acetyliert. Ein dritter Anti-Blutplättchen-Mechanismus hat die Blutplättchenmembran einbezogen, indem er in die Oberflächenrezeptor-Funktion eingreift. Ein solches Arzneimittel ist Dextran, ein großes verzweigtes Polysaccharid, von dem angenommen wird, daß es die Wechselwirkung von Fibrinogen mit Blutplättchen-Rezeptoren, die bei der Aggregation exponiert sind, beeinträchtigt. Dextran ist für Patienten mit einer Vorgeschichte von Nierenproblemen oder mit Herzschäden kontraindiziert. Von dem Therapeutikum Ticlopidin wird angegeben, daß es die Blutplättchenadhäsion und -Aggregation durch Unterdrückung der Bindung des von-Willebrand-Faktors und/oder von Fibrinogen an ihre jeweiligen Rezeptoren auf der Blutplättchenoberfläche hemmt. Es ist jedoch gefunden worden, daß Ticlopidin eine ungenügende Spezifität aufweist, um das Erfordernis der Verabreichung großer Dosen zu eliminieren, die wiederum mit klinischen Nebenwirkungen verbunden sein können.

[0007] Die vorgenannten Pharmazeutika sind dem Körper fremd und können zahlreiche nachteilige klinische

Nebenwirkungen verursachen, da es nicht möglich ist, solche Verbindungen daran zu hindern, an anderen Aspekten der Physiologie oder Biochemie eines Patienten teilzunehmen, insbesondere wenn hohe Dosen erforderlich sind. Es wäre wünschenswert, Pharmazeutika bereitzustellen, die solch eine Spezifität für bestimmte Hämostasereaktionen aufweisen, so daß sie in niedrigen Dosen an den an Patienten verabreicht werden könnten, wobei diese Dosen mit geringerer Wahrscheinlichkeit nachteilige Wirkungen beim Patienten hervorrufen.

[0008] Ein Beispiel für ein Pharmazeutikum, das für ein Therapeutikum repräsentativ ist, das von einem natürlichen Bestandteil des Hämostaseprozesses abgeleitet ist, ist in der EPA-Veröffentlichung Nr. 317278 beschrieben. Diese Veröffentlichung offenbart ein Verfahren zur Hemmung von Thrombose bei einem Patienten durch Verabreichung eines therapeutischen Polypeptids an einen Patienten, das den aminoterminalen Bereich der α-Kette von Blutplättchenmembran-Glykoproteine Ib, oder ein Unterfragment davon, umfaßt.

[0009] Die vorliegende Erfindung ist gerichtet auf die Bereitstellung von antithrombotischen Polypeptiden, die vom von-Willebrand-Faktor abgeleitet sind, einem der Proteine des Hämostase-Mechanismus.

[0010] Entsprechend wird in einem ersten Aspekt der Erfindung ein Polypeptid bereitgestellt, das die Fähigkeit hat, eine Bindung des von-Willebrand-Faktors (vWF) an Blutplättchen zu inhibieren, und das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

(A) einem Polypeptid, bestehend aus der Aminosäuresequenz desjenigen Fragments der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit, dessen Aminoterminus bei Cys^{509} und dessen Carboxyterminus bei Cys^{695} liegt, und bei dem der Cys^{509}-Rest und der Cys^{695}-Rest im natürlich vorkommenden Fragment durch eine intramolekulare Disulfidbindung verbunden sind, wobei das Polypeptid eine modifizierte Form dieses Fragments ist, insofern die Cysteinreste so modifiziert sind, daß sie keine Disulfidbindung bilden können;

(B) einem Polypeptid, bestehend aus: (i) dem modifizierten Fragment von (A); und (ii) der Aminosäuresequenz desjenigen Fragments der reifen vWF-Untereinheit, dessen Aminoterminus bei Arg^{441} und dessen Carboxyterminus bei Tyr^{508} liegt, oder einem Unterfragment davon oder einer Kombination von Unterfragmenten davon; wobei die Sequenzen von (B)(i) und (B)(ii) durch eine kovalente Bindung zwischen dem Aminoterminus des modifizierten Fragments von (B)(i) und dem Carboxyterminus des Fragments von (B)(ii) verbunden sind; und

(C) einem Polypeptid, bestehend aus; (i) dem modifizierten Fragment von (A); und (ii) der Aminosäuresequenz desjenigen Fragments der reifen vWF-Untereinheit, dessen Aminoterminus bei Asp^{696} und dessen Carboxyterminus bei Val^{733} liegt, oder einem Unterfragment davon oder einer Kombination von Unterfragmenten davon; wobei die Sequenzen von (C)(i) und (C)(ii) durch eine kovalente Bindung zwischen dem Carboxyterminus des modifizierten Fragments von (C)(i) und dem Aminosäureterminus des Fragments von (C)(ii) verbunden sind.

[0011] In einem zweiten Aspekt der Erfindung wird ein Polypeptid bereitgestellt, das die Fähigkeit hat, die Bindung des von-Willebrand-Faktors (vWF) an Blutplättchen zu inhibieren und aus einem Fragment der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit besteht, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus: Arg^{441} bis Asp^{709}, Arg^{441} bis Pro^{704}, Arg^{441} bis Glu^{700}, Arg^{441} bis Asp^{696}, Gln^{475} bis Val^{733}, Thr^{492} bis Val^{733} Tyr^{508} bis Val^{733}, Tyr^{508} bis His^{709}, Tyr^{508} bis Pro^{704} und Tyr^{508} bis Glu^{700}, wobei die Cysteinreste Cys^{509} und Cys^{695} dieser Fragmente im natürlich vorkommenden Fragment durch eine intramolekulare Disulfidbindung verbunden sind und das Polypeptid eine modifizierte Form des Fragments ist, insofern das Polypeptid die Disulfidbindung nicht enthält.

[0012] In einem dritten Aspekt der Erfindung wird ein Polypeptid bereitgestellt, das die Fähigkeit hat, die Bindung des von-Willebrand-Faktors (vWF) an Blutplättchen zu inhibieren, und das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

(A) einem Polypeptid, bestehend aus: der Aminosäuresequenz desjenigen Fragments der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit, dessen Aminoterminus bei Cys^{509} und dessen Carboxyterminus bei Cys^{695} liegt, und in dem der Aminosäurerest Cys^{509} und der Aminosäurerest Cys^{695} im natürlich vorkommenden Fragment durch eine intramolekulare Disulfidbindung verbunden sind, wobei das Polypeptid eine modifizierte Form des Fragments ist, insofern das Polypeptid keine Disulfidbindung enthält und die Aminosäurereste von Cystein-Aminosäureresten verschieden sind;

(B) einem Polypeptid, bestehend aus: (i) dem modifizierten Fragment von (A); und (ii) der Aminosäuresequenz desjenigen Fragments der reifen vWF-Untereinheit, dessen Aminoterminus bei Arg^{441} und dessen Carboxyterminus bei Tyr^{508} liegt, oder einem Unterfragment davon oder einer Kombination von Unterfragmenten davon; wobei die Sequenzen von (B)(i) und (B)(ii) durch eine kovalente Bindung zwischen dem Aminoterminus des modifizierten Fragments von (B)(i) und dem Carboxyterminus des Fragments von (B)(ii) verbunden sind;

(C) Polypeptid, bestehend aus: (i) dem modifizierten Fragment von (A); und (ii) der Aminosäuresequenz

desjenigen Fragments der reifen vWF-Untereinheit, dessen Aminoterminus bei Asp^{696} und dessen Carboxyterminus bei Val^{733} liegt, oder einem Unterfragment davon oder einer Kombination von Unterfragmenten davon; wobei die Sequenzen von (C)(i) und (C)(ii) durch eine kovalente Bindung zwischen dem Carboxyterminus des modifizierten Fragments von (C)(i) und dem Aminoterminus des Fragments von (C)(ii) verbunden sind.

[0013] In einem vierten Aspekt der Erfindung wird eine DNA-Sequenz bereitgestellt, die ein Polypeptid gemäß der Erfindung in ihrem ersten, zweiten und dritten Aspekt kodiert.

[0014] In einem fünften Aspekt der Erfindung wird ein Klonierungshilfsmittel bereitgestellt, das eine DNA-Sequenz gemäß der Erfindung in ihrem vierten Aspekt enthält.

[0015] In einem sechsten Aspekt der Erfindung wird ein Expressionsplasmid oder viraler Expressionsvektor, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß der Erfindung in ihrem vierten Aspekt, bereitgestellt.

[0016] In einem siebenten Aspekt der Erfindung, wird eine rekombinante Wirtszelle bereitgestellt, die mit einem Expressionsplasmid oder einem viralen Expressionsvektor gemäß der Erfindung in ihrem sechsten Aspekt transformiert ist.

[0017] In einem achten Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids aus einer kodierenden DNA-Sequenz gemäß der Erfindung in ihrem vierten Aspekt bereitgestellt, das folgende Schritte umfasst:

(A) Bereitstellen der DNA-Sequenz; und

(B) Einbringen der DNA-Sequenz in einen geeigneten Vektor, um ein Konstrukt zu erzeugen, das ein Expressionsplasmid oder einen viralen Expressionsvektor umfaßt, wobei das Konstrukt befähigt ist, die Expression des Polypeptids in einer Wirtszelle zu lenken; und

(C) Transformieren einer Wirtszelle mit dem Expressionsplasmid oder dem viralen Expressionsvektor; und

(D) Kultivieren der transformierten Wirtszelle unter Bedingungen, die eine Expression des Polypeptids innerhalb der Wirtszelle verursachen.

[0018] In einem neunten Aspekt der Erfindung wird ein Antikörper bereitgestellt, der spezifisch ist für ein Polypeptid, das die Bindung des vWF an Blutplättchen inhibieren kann, wobei der Antikörper ein Epitop erkennt, das zwischen den Aminosäureresten Cys^{509} und Cys^{695} der reifen vWF-Untereinheit liegt.

[0019] In einem zehnten Aspekt der Erfindung wird eine therapeutische Zusammensetzung aus einem oder mehreren der Polypeptide nach der Erfindung in ihrem ersten, zweiten oder dritten Aspekt, die befähigt ist, eine Bindung des von-Willebrand-Faktors (vWF) an Blutplättchen zu inhibieren, und einem pharmazeutisch annehmbaren Träger bereitgestellt.

[0020] In einem elften Aspekt der Erfindung wird die Verwendung eines Polypeptids gemäß der Erfindung in ihrem ersten, zweiten oder dritten Aspekt zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verwendung in einem Verfahren zur Hemmung der Aktivierung und/oder Aggregation von Blutplättchen bereitgestellt.

[0021] In einem zwölften Aspekt der Erfindung wird die Verwendung eines Polypeptids gemäß der Erfindung in ihrem ersten, zweiten oder dritten Aspekt zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verwendung in einem Verfahren zur Hemmung der Adhäsion von Blutplättchen an Gefäßoberflächen bereitgestellt.

[0022] In einem dreizehnten Aspekt der Erfindung wird die Verwendung eines Polypeptids gemäß der Erfindung in ihrem ersten, zweiten oder dritten Aspekt zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verwendung in einem Verfahren zur Hemmung oder Behandlung von Thrombose bei einem Patienten bereitgestellt.

[0023] Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung in einem der verschiedenen Aspekte sind wie unten beschrieben oder in den Unteransprüchen definiert.

[0024] **Fig.** 1 ist eine Tabelle, die die früher veröffentlichte Aminosäure- und DNA-Sequenz für die (menschliche) von-Willebrand-Faktor-Untereinheit zwischen dem Rest 431 und dem Rest 750 zeigt.

[0025] Fig. 2 stellt mehrere der erfindungsgemäßen Polypeptide dar.

[0026] **Fig.** 3 zeigt die relative Fähigkeit einer oxidierten und einer reduzierten Form eines vWF-abgeleiteten

Polypeptids, die Bindung von gegen GPIbα gerichteten Antikörpern an Blutplättchen zu hemmen.

[0027] Sofern hier nicht anderweitig angegeben, haben die folgenden Begriffe die angegebene Bedeutung.

[0028] Kodierende Sequenz (Kodierende DNA) – DNA-Sequenzen, die, im geeigneten Leserahmen, für die Aminosäuren eines Proteins kodieren. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung sollte verstanden werden, daß die Synthese oder Verwendung einer kodierenden Sequenz notwendigerweise die Synthese oder Verwendung des entsprechenden komplementären Strangs beinhalten kann, wie durch 5'-CGG·GGA·GGA-3'/3'-GCC·CCT·CCT-5' gezeigt wird, welche das Tripeptid NH_2-arg-gly-gly-CO_2H "kodiert". Eine Diskussion über oder ein Anspruch auf einen Strang gilt als Bezugnahme oder Anspruch auf den anderen Strang und das doppelsträngige Gegenstück davon, soweit gemäß der Praxis in der Fachwelt jeweils anwendbar, geeignet oder erforderlich.

[0029] cDNA – Ein DNA-Molekül oder eine DNA-Sequenz, das/die enzymatisch aus der (den) in einer mRNA-Matrize vorliegen Sequenz(en) hergestellt wurde(n).

[0030] Transkribierter Strang – der DNA-Strang, dessen Nukleotidsequenz durch die RNA-Polymerase zur Herstellung von mRNA 3'→5' gelesen wird. Dieser Strang wird auch als der nichtkodierende Strang bezeichnet.

[0031] Kodierender Strang oder nichttranskribierter Strang – dieser Strang ist das antiparallele Gegenstück des transkribierten Strangs und weist eine Basensequenz auf, die identisch zu der der mRNA ist, die vom transkribierten Strang hergestellt wurde, mit der Ausnahme, das Thymin-Basen anwesend sind (anstelle von Uracil-Basen der mRNA). Er wird als "kodierend" bezeichnet, da wie bei mRNA, und bei Untersuchung 5'→3', die Kodons für die Translation direkt erkannt werden können.

[0032] Biologische Aktivität – eine oder mehrere Funktionen, Wirkungen, Aktivitäten, durchgeführt oder hervorgerufen von einem Molekül in einem biologischen Kontext (d. h. in einem Organismus oder in einem In-vitro-Faksimile). Eine charakteristische biologische Aktivität des monomeren 52/48-kDa-Fragments der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit ist die potentielle Fähigkeit, nur einen Blutplättchen-GPIB-Rezeptor zu binden, wodurch das Molekül befähigt wird, die botrocetininduzierte Bindung von multimerem vWF an Blutplättchen zu hemmen. Andere resultierende oder verwandte Wirkungen der undimerisierten 52/48-kDa-Spezies beinhalten die Hemmung der Blutplättchenaktivierung, -Aggregation oder -Adhäsion an Oberflächen und die Hemmung von Thrombose.

[0033] Reduzierende Bedingungen – bezieht sich auf die Anwesenheit eines "reduzierenden" Mittels in einer Lösung, die den von-Willebrand-Faktor, oder davon abgeleitete Polypeptide, enthält, wobei das Mittel die Spaltung der Disulfidbindungen des vWF verursacht.

[0034] Promotor – DNA-Sequenz stromaufwärts von einem Gen, die dessen Transkription fördert.

[0035] Klonierungsvehikel (Vektor) – Ein Plasmid, eine Phagen-DNA- oder andere DNA-Sequenz, die zur Replikation in einer Wirtszelle befähigt ist, typischerweise charakterisiert durch eine oder eine geringe Anzahl von Endonuklease-Erkennungsstellen, an denen solche DNA-Sequenzen in einer bestimmbaren Weise zur Insertion heterologer DNA ohne begleitenden Verlust einer wesentlichen biologischen Funktion der DNA, zum Beispiel Replikation, Produktion von Hüllproteinen oder Verlust von Expressionskontrollregionen wie beispielsweise Promotoren oder Bindungsstellen, geschnitten werden kann, und die einen selektierbaren Genmarker enthalten kann, der zur Verwendung für die Identifikation von damit transformierten Wirtszellen geeignet ist, zum Beispiel Tetracyclin-Resistenz oder Ampicillin-Resistenz.

[0036] Plasmid – eine nichtchromosomale doppelsträngige DNA-Sequenz, die ein intaktes "Replikon" umfaßt, so daß der Plasmid in einer Wirtszelle repliziert wird. Wenn der Plasmid in eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle eingebracht wird, können die Eigenschaften dieser Zelle als Ergebnis der DNA des Plasmids verändert (oder transformiert) sein. Zum Beispiel transformiert ein Plasmid, der die Gene für Tetracyclin-Resistenz (Tet^R) trägt, eine Zelle, die vorher gegenüber Tetracyclin empfindlich war in eine, die resistent dazu ist. Eine durch einen Plasmid transformiert Zelle wird als "Transformant" bezeichnet.

[0037] Expressionsplasmid – ein Plasmid, in den die klonierte DNA inseriert wurde, wie beispielsweise das von-Willebrand-Faktor-Strukturgen. Die darin inserierte DNA-Sequenz kann auch Sequenzen enthalten, die die Translation von daraus resultierender mRNA kontrollieren und Restriktionsendonukleasestellen enthalten, die den Zusammenbau des Expressionsplasmids erleichtern und die weitere Modifikation desselben erleich-

tern können. Ein Expressionsplasmid ist in der Lage, die Expression des kodierten Polypeptids in einer Wirtszelle zu steuern und enthält üblicherweise einen Transkriptionspromotor stromaufwärts von der DNA-Sequenz des kodierten Strukturgens. Ein Expressionsplasmid kann in die chromosomale DNA des Wirts integriert werden oder auch nicht. Für die Zwecke dieser Erfindung wird ein integrierter Plasmid nichtsdestoweniger als Expressionsplasmid bezeichnet.

[0038] Viraler Expressionsvektor – ein viraler Expressionsvektor ähnelt einem Expressionsplasmid, mit der Ausnahme, daß die DNA in ein Viruspartikel verpackt sein kann, das Zellen durch einen natürlichen biologischen Prozeß transfizieren kann.

[0039] Stromabwärts – Von einem Nukleotid des transkribierten Strangs eines Strukturgens wird gesagt, daß es stromabwärts von einem anderen Abschnitt des Gens liegt, wenn das Nukleotid normalerweise durch eine RNA-Polymerase nach dem früheren Abschnitt des Gens gelesen wird. Das komplementäre Nukleotid des nicht transkribierten Strangs oder das entsprechende Basenpaar innerhalb der doppelsträngige Form der DNA werden ebenfalls als stromabwärts bezeichnet.

[0040] Darüber hinaus, und unter Bezugnahme auf die Richtung der Transkription und der Translation innerhalb des Strukturgens, bedeutet eine stromaufwärts (oder 5') zu dem Gen zugefügte Restriktionsendonukleasen-Sequenz, daß sie vor der Sequenz eingefügt wurde, die das aminoterminale Ende des Proteins kodiert, während eine stromabwärts (oder 3') erzeugte Modifikation an dem Strukturgen bedeutet, daß sie außerhalb des den Carboxy-Terminus kodierenden Bereichs davon liegt.

[0041] Von-Willebrand-Faktor (vWF) – Es ist ersichtlich, daß alle hier vorgenommenen Bezugnahmen auf den von-Willebrand-Faktor den vWF in Menschen betreffen. Der Begriff "von-Willebrand-Faktor" soll in seinem Bereich liegen und alle Begriffe beinhalten, die unmittelbar hiernach definiert sind.

[0042] Darüber hinaus wird der von-Willebrand-Faktor als ein Bestandteil der subendothelialen Matrix, als ein Bestandteil der durch aktivierte Blutplättchen sekretierten α-Granula und als ein zirkulierendes Blutplasmaprotein gefunden. Es ist möglich, daß die dreidimensionale Untereinheitenstruktur oder Multiuntereinheitenstruktur von vWF in diesen verschiedenen Zusammenhängen variiert, möglicherweise verursacht durch, zum Beispiel, Unterschiede in der Glykosylierung. Solche Unterschiede verhindern nicht die Herstellung von therapeutisch nützlichen vWF-abgeleiteten Polypeptiden aus den vWF-DNA-Sequenzen von Endothelzellen oder Megakaryozyten gemäß der Erfindung.

[0043] Darüber hinaus ist es möglich, daß geringfügige biologisch unwichtige Unterschiede zwischen den tatsächlichen manipulierten oder anderweitig gemäß der Erfindung verwendeten DNAs und Polypeptiden und den hier dargestellten strukturellen Sequenzen von Aminosäuren oder Nukleotiden davon vorliegen. Es ist ersichtlich, daß die Erfindung all solche biologisch unwichtigen Variationen umfaßt.

[0044] Prä-pro-vWF – der von-Willebrand-Faktor ist Gegenstand einer umfangreichen posttranslationalen Prozessierung. Der "Prä-pro-vWF" enthält (vom N- zum C-Terminus) ein aus ungefähr 22 Aminosäureresten bestehendes Signalpeptid, ein Propeptid von ungefähr 741 Aminosäuren und dann die ungefähr 2050 Reste des zirkulierenden vWF.

[0045] Pro-vWF – das Signalpeptid ist aus dem Prä-pro-vWF entfernt worden.

[0046] Reifer vWF – der zirkulierende vWF, wie er im Plasma oder an Subendothel gebunden gefunden wird. Er besteht aus einer Population von Polypeptidmonomeren, die üblicherweise zu verschiedenen Spezies von Multimeren davon assoziiert sind, von denen jede Untereinheit 2050 Reste lang ist. Darüber hinaus ist der reife vWF üblicherweise glykosyliert, wenn er in Säugetierzellen exprimiert wurde.

[0047] Signalpeptid(-sequenz) – ein Signalpeptid ist die Sequenz von Aminosäuren in einem neu translatierten Polypeptid, die die Translokation des Polypeptids über die Membran des endoplasmatischen Retikulums und in den sekretorischen Stoffwechselweg der Zelle signalisiert. Ein Signalpeptid tritt typischerweise am Beginn (Aminoterminus) des Proteins auf und ist 20–40 Aminosäuren lang mit einer Strecke von ungefähr 5–15 hydrophoben Aminosäuren in seinem Zentrum. Typischerweise wird die Signalsequenz proteolytisch von dem Protein während oder bald nach dem Vorgang der Translokation in das endoplasmatische Retikulum abgespalten. Jener Bereich eines Gens oder einer cDNA, der für ein Signalpeptid kodiert, kann auch als eine Signalsequenz bezeichnet werden.

[0048] Tabelle 1 zeigt die Standard-Drei-Buchstaben-Bezeichnungen für Aminosäuren, wie sie in der Anmeldung verwendet werden.

TABELLE 1

Alanin	Ala
Cystein	Cys
Asparaginsäure	Asp
Glutaminsäure	Glu
Phenylalanin	Phe
Glycin	Gly
Histidin	His
Isoleucin	Ile
Lysin	Lys
Leucin	Leu
Methionin	Met
Asparagin	Asn
Prolin	Pro
Glutamin	Gln
Arginin	Arg
Serin	Ser
Threonin	Thr
Valin	Val
Tryptophan	Trp
Tyrosin	Tyr

[0049] Ein "Sequenzprotokoll" gemäß 37 CFR §1.821(c) für Nukleotid- und Aminosäuresequenzen, das hier offenbart oder auf das hier Bezug genommen wird, ist angehängt und Teil dieser Anmeldung.

[0050] Die Begriffe "Peptid" und "Polypeptid" werden hier austauschbar verwendet.

[0051] Wie oben ausgeführt, basieren die antithrombotischen Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung auf Fragmenten des natürlich vorkommenden Proteins von-Willebrand-Faktor (im folgenden "vWF"). Zu Hintergrundzwecken werden im folgenden Informationen bereitgestellt, die dieses Protein und seine Rolle bei Hämostase und Thrombose betreffen.

[0052] vWF spielt eine wesentliche Rolle bei der normalen Hämostase während einer Gefäßverletzung und ist ebenfalls von zentraler Bedeutung bei der Pathogenese von akuter thrombotischer Okklusion bei erkrankten Blutgefäßen. Beide Rollen beinhalten die Wechselwirkung von vWF mit Blutplättchen, die dahingehend induziert sind, an die betroffenen Stelle zu binden und dann quervernetzt werden. Es wird angenommen, daß einzelne Blutplättchen zunächst an einer thrombotischen Oberfläche anhaften, wonach sie aktiviert werden, ein Vorgang, der große Stoffwechseländerungen und erhebliche morphologische Änderungen innerhalb des Blutplättchens beinhaltet. Die Aktivierung wird nachgewiesen durch die Freisetzung von Blutplättchen-Speichergranula, die adhäsive Substanzen wie beispielsweise den von-Willebrand-Faktor (ein adhäsives Protein) enthalten, und die Expression von zusätzlichen funktionellen adhäsiven Stellen an der Oberfläche des Blutplättchens. Einmal aktiviert, und als Teil der normalen Hämostase, aggregieren Blutplättchenzellen, ein Prozeß, der eine umfangreiche Quervernetzung der Blutplättchen-Zellen mit weiteren Arten von adhäsiven Proteinen beinhaltet.

[0053] Wie oben angegeben, sind diese Vorgänge als physiologische Reaktion auf einer Gefäßverletzung normal. Sie können jedoch unter krankhaften Umständen, wie beispielsweise bei um erkrankten Gefäßen, zur Bildung von unerwünschten Blutplättchen-Thromben mit anschließender Gefäßverstopfung Gefäßokklusion führen.

[0054] Andere Umstände, unter denen es wünschenswert ist, die Ablagerung von Blutplättchen in Blutgefäßen zu verhindern, schließen die Verhinderung und Behandlung von Schlaganfall ein, und um die Okklusion von Arterienverpflanzungen zu verhindern. Die Blutplättchenthrombus-Bildung bei operativen Maßnahmen kann auch Versuche stören, bereits existierende Gefäßobstruktionen zu lindern.

[0055] Die Anheftung von Blutplättchen an geschädigte oder erkrankte Gefäße tritt durch Mechanismen auf, die spezifische Blutplättchen-Membranrezeptoren involvieren, die mit spezialisierten adhäsiven Molekülen wechselwirken. Ein solcher Blutplättchen-Rezeptor ist der Glykoprotein-Ib-IX-Komplex, der aus einer nichtkovalenten Verbindung zweier integraler Membranproteine, Glykoprotein Ib (GPIb) und Glykoprotein IX (GPIX) besteht. Der adhäsive Ligand des GPIb-IX-Komplexes ist das Protein von-Willebrand-Faktor, welches als Bestandteil der subendothelialen Matrix, als ein Bestandteil der durch aktivierte Blutplättchen sekretierten α-Granula und auch als ein zirkulierendes Blutplasmaprotein gefunden wird. Die tatsächliche Bindungsstelle des vWF an den GPIb-IX-Rezeptor ist auf dem aminoterminalen Bereich der α-Kette von Glykoprotein Ib lokalisiert worden. Die Vollängen-α-Kette wird auch als "GPIb(α)" bezeichnet.

[0056] Es wird angenommen, daß die Wechselwirkung des multimeren vWF mit dem Glykoprotein-Ib-IX-Komplex (an GPIb(α)) zur Blutplättchenaktivierung führt und die Rekrutierung weiterer Blutplättchen zu einem nun wachsenden Thrombus erleichtert. Die rasch akkumulierenden Blutplättchen sind auch quervernetzt (aggregiert) durch die Bindung von Fibrinogen an Glykoprotein-IIb-IIIa-Rezeptorstellen der Blutplättchen und möglicherweise auch durch VWF an diesen Stellen und/oder an weiteren Glykoprotein-Ib-IX-Rezeptorstellen. Darüber hinaus kann auch der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor bei der Bildung des anfänglichen Monolayers von Blutplättchen beteiligt sein. Von besonderer Bedeutung bei diesem Vorgang ist der multimere und multivalente Charakter des zirkulierenden vWF, der das Makromolekül in die Lage versetzt, seine Bindungs- und Überbrückungsfunktionen wirksam auszuüben.

[0057] Die Inaktivierung des GPIbα-Rezeptors auf den Blutplättchen eines Patienten, wodurch die Bindungs- und Überbrückungsfähigkeit von vWF gehemmt wird, wäre von großer medizinischer Bedeutung für die Behandlung oder Hemmung von Thrombose. Entsprechend betrifft die vorliegende Erfindung die Entwicklung von Polypeptiden, die bei der Erreichung des Vorstehenden wirksam sind.

[0058] Die Domäne der von-Willebrand-Faktor-Untereinheit, die an den Blutplättchen-Membran-Glykoprotein-Ib-IX-Rezeptor GPIb(α) bindet, ist in einem Fragment von vWF identifiziert worden. Das Fragment kann durch Trypsin-Verdau, gefolgt von Disulfid-Reduktion, erzeugt werden und erstreckt sich von ungefähr dem Rest 449 (Valin) der zirkulierenden Untereinheit bis ungefähr zum Rest 728 (Lysin) davon. Aktuelle Hinweise zeigen, daß dieser Abschnitt auch (zwischen den Resten 509 und 695 davon) Bindungsdomänen für Komponenten des Subendothels enthält, wie beispielsweise Kollagen und Proteoglykane, obwohl andere Bereiche des reifen vWF-Untereinheit als Erkennung dieser Substanzen wichtiger sein können (eine weitere Proteoglykan- oder Heparin-Bindungsstelle ist in den Resten 1–272 der reifen Untereinheit und eine weitere Kollagen-Bindungsstelle innerhalb der Reste 910–1110 davon lokalisiert).

[0059] **Fig.** 1 (SEQ ID NO: 1, siehe auch SEQ ID NO: 15) zeigt die früher beschriebene Aminosäure- und DNA-Sequenz für die (menschliche) reife von-Willebrand-Faktor-Untereinheit zwischen dem Rest 431 und dem Rest 750. Das durch tryptischen Verdau hergestellte 52/48-kDa-Fragment weist einen Aminoterminus am Rest 449 (Valin) auf und erstreckt sich ungefähr bis zum Rest 728 (Lysin). Die Aminosäuren werden durch Standard-Drei-Buchstaben-Bezeichnungen dargestellt. Die DNA-Sequenz wird repräsentiert durch den kodierenden Strang (nicht-transkribierten Strang). In der menschlichen 52/48-Sequenz ist sehr geringer Polymorphismus beschrieben worden, mit einer wesentlichen Ausnahme – Histidin/Asparaginsäure an Position 709, siehe Mancuso, D. J. et al., J. Biol. Chem. 264(33), 19514–19527, Tabelle V (1989). Die für die in dem Beispielabschnitt unten beschriebenen Experimente verwendeten DNA-Sequenzen enthalten ein Asparaginsäure-Kodon für den Rest 709 (Kodon GAC), obwohl die Anordnung von Histidin an der Restposition 709 (die andere bekannte natürlich vorkommende Aminosäure an dieser Position in der menschlichen Sequenz, Kodon CAC) ebenfalls für die Ausübung der Erfindung geeignet ist.

[0060] Mit Bezug auf die therapeutischen antithrombotischen Polypeptide der vorliegenden Erfindung ist die folgende Information hinsichtlich vWF von besonderem Interesse.

[0061] Ein Fragment von reifem Blutplättchen-Glykoprotein-Ib(α)-Aktivität aufweisendem von-Willebrand-Faktors mit einem Molekulargewicht von ungefähr 116.000 (116 kDa) wird durch Verdauung mit Trypsin isoliert. Wenn das 116-kDa-Fragment mit einem reduzierenden Mittel behandelt wird, das in der Lage ist, Disulfidbindungen zu spalten, wird ein Paar von identischen Fragmenten erzeugt. Jedes der identischen Fragmente (die zusammen das 116-kDa-Polypeptid umfassen) weist ein apparentes Molekulargewicht von ungefähr 52.000 (52 kDa) auf.

[0062] (Molekulargewichte von Polypeptiden werden üblicherweise durch Wanderung in Bezug auf Standards in einem denaturierenden Gelelektrophoresesystem gemessen. Die erhaltenen Gewichtswerte sind nur

angenähert.)

[0063] Typischerweise wird das Fragment mit dem Molekulargewicht von 52.000 als ein "52/48"-Fragment bezeichnet, was die Tatsache widerspiegelt, das menschliche Enzymsysteme das Fragment glykosylieren und damit zu seinem Molekulargewicht beitragen. Der Umfang der Glykosylierung variiert von Molekül zu Molekül, wobei zwei Gewichte, 52.000 und 48.000, die häufigsten sind.

[0064] Von dem 52/48-Fragment hat sich gezeigt, daß es an seinem Aminoterminus den Rest 449 (Valin) der reifen Untereinheit und als seinen Carboxyterminus Rest 728 (Lysin) davon aufweist. Ohne das zusätzliche durch die Glykosylierung beigesteuerte Gewicht, wenn beispielsweise ein vergleichbares Fragment von einer rekombinanten Bakterienzellen exprimiert würde, würde das Polypeptid ein Molekulargewicht von ungefähr 38.000 besitzen.

[0065] Von dem 52/48-Fragment wurde gezeigt, daß es die Bindung des von-Willebrand-Faktors an Blutplättchen kompetitiv hemmt. Die Manipulation des 52/48-Fragments oder seines unglykosylierten 38-kDa-Äquivalents hat sich jedoch als schwierig erwiesen. Die erfolgreiche Manipulation des Fragments hat üblicherweise erfordert, daß der Cystein-Rest davon reduziert und permanent alkyliert wird. Ohne diese Behandlung tritt ausnahmslos eine unerwünschte Reaktion des Cystein-Restes davon auf, was zur Bildung von unlöslichen und biologisch inaktiven Polypeptid-Aggregaten führt, die für eine wirksame Verwendung als Therapeutika ungeeignet sind.

[0066] Es ist bekannt, daß das Rest-449-728-Fragment der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit, das die Blutplättchen-Glykoprotein-Ib(α)-Bindungsdomäne enthält, Cysteinreste an den Positionen 459, 462, 464, 471, 474, 509 und 695 aufweist. Es ist ebenfalls bekannt, daß alle Cysteinreste der reifen vWF-Untereinheit an Disulfidbindungen beteiligt sind. (Legaz et al., J. Biol. Chem. 248, 3946–3955 (1973)).

[0067] Marti, T., et al., Biochemistry 26, 8099–8109 (1987) identifizierten endgültig die Reste 471 und 474 der reifen Untereinheit als beteiligt an einer intramolekularen Disulfidbindung. Die Reste 509 und 695 wurden identifiziert als beteiligt an einer Disulfidbindung, obwohl nicht gezeigt wurde, ob diese Paarung intramolekular oder intermolekular (das heißt innerhalb derselben reifen vWF-Untereinheit) war.

[0068] Mohri, H. et al., J. Biol. Chem., 263(34), 17001–17004 (1986) hemmten die ristocetin-induzierte Bindung von ^{125}I-markiertem multimeren vWF an formalinfixierte Blutplättchen mit Peptid-Unterfragmenten des 449–728-Untereinheiten-Fragments Peptid-Unterfragment mit einer Länge von 15 Resten wurden synthetisierte und getestet. Jene Peptide, die eine Untereinheiten-Sequenz repräsentieren, die innerhalb zweier bestimmter Bereiche, Leu^{469} bis Asp^{498} und Glu^{689} bis Val^{713} enthalten sind oder damit überlappen, erwiesen sich als aktiv.

[0069] Mohri schloß, daß die GPIb(α)-Bindungsdomäne von vWF durch Reste gebildet wurde, die in den zwei diskontinuierlichen Sequenzen Cys^{474}-Pro^{488} und Leu^{694}-Pro^{708} enthalten waren, die im nativen vWF durch Disulfidbindungen in ihrer korrekten Konformation gehalten wurden, obwohl diese Autoren nicht in der Lage waren die Cystein-Reste zu identifizieren, die die stabilisierende Bindungen bildeten, und ob die Bindungen intra- oder intermolekular waren.

[0070] Die vorliegende Erfindung stellt aus dem Bereich der Reste 449–728 der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit erhaltene Polypeptide bereit, die zur Behandlung von Gefäßerkrankungen wie beispielsweise Thrombose geeignet sind.

[0071] Solche Moleküle können effizient aus DNA hergestellt werden, die das Fragment der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit, umfassend im wesentlichen die Aminosäuresequenz von ungefähr Rest 441 (Arginin) bis ungefähr Rest 733 (Valin) kodiert, oder die jede Teilmenge der Aminosäuresequenz oder ein mutiertes Polypeptid-Fragment oder eine Teilmenge davon kodiert, die weniger Cystein-Reste enthält als die vergleichbare Wildtyp-Aminosäuresequenz. Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung der Moleküle umfaßt das Kultivieren eines Wirtsorganismus, der transformiert ist mit einem biologisch funktionsfähigen Expressionsplasmid, der eine einen Bereich der von-Willebrand-Faktor-Untereinheit kodierende mutierte DNA-Sequenz enthält, unter Bedingungen, die die Expression des mutierten von-Willebrand-Faktor-Fragments oder einer Teilmenge davon durch den Wirtsorganismus bewirken, und das Gewinnen des Fragmentes davon.

[0072] Ein bevorzugtes Mittel zur Bewirkung der Mutagenese von Cystein-Kodons in einer vWF-DNA zu Kodons, die Aminosäuren kodieren, die nicht in der Lage sind, Disulfidbindungen zu bilden, beruht auf dem orts-

gerichteten Mutageneseverfahren von Kunkel, T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 488–492 (1985). Solche mutierten DNA-Sequenzen können dann entweder von rekombinant-bakteriellen oder rekombinant-eukaryotischen Wirtszellsystemen exprimiert werden.

[0073] Eine erste Ausführungsform der Erfindung ist die Bereitstellung von Zusammensetzungen der von vWF abgeleiteten Polypeptide, die im Vergleich zu früheren Zubereitungen weniger zu Aggregation und Denaturierung neigen, die durch unerwünschte Disulfidbindungen innerhalb der Einschlußkörper von Wirts-Expressionszellen verursacht wird (oder aus Solubilisierungsvorgängen der Einschlußkörper resultiert). Die Entwicklung setzt die Mutagenese ein, um die Zahl von Cystein-Resten zu limitierend, die innerhalb des Polypeptids vorhanden sind.

[0074] Eine Vielzahl von molekularbiologischen Techniken ist verfügbar, die verwendet werden können, um die Cystein-Kodons durch solche von anderen Aminosäuren auszutauschen. Geeignete Techniken beinhalten die Mutagenese unter Verwendung einer Polymerasekettenreaktion, Gapped-Duplex-Mutagenese und die differentielle Hybridisierung eines Oligonukleotids an DNA-Moleküle, die sich in einer einzelnen Nukleotid-Position unterscheiden. Für eine Übersicht von geeigneten Kodon-Veränderungsverfahren siehe Kraik, C. "Use of Oligonucleotides for Site Specific Mutagenesis", Biotechniques Jan/Feb 1985 auf Seite 12.

[0075] Bei der Ausübung dieser Ausführungsform ist es bevorzugt, das ortsgerichtete oder ortsspezifische Mutageneseverfahren von Kunkel, T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488–492 (1985) zu verwenden. Dieses Verfahren nutzt den Vorteil einer Reihe von Schritten aus, die zunächst eine uracilhaltige DNA-Matrize herstellen und anschließend dagegen selektieren. Beispiel 1 der vorliegenden Erfindung erklärt im Detail die Mutagenese-Techniken, die zur Erzeugung von mutierter vWF-cDNA verwendet wurden.

[0076] Andere Veröffentlichungen, die ortsgerichtete Mutageneseverfahren offenbaren, sind: Giese, N. A. et al., Science, 236, 1315 (1987); US-Patent Nr. 4,518,584; und US-Patent Nr. 4,959,314.

[0077] Es ist bei der Ausübung dieser Ausführungsform ebenfalls bevorzugt, den Austausch einer oder mehrerer der Cystein-Kodons der Wildtyp-DNA-Sequenz-Kodons gegen eine oder mehrere der folgenden Aminosäuren hervorzurufen: Alanin, Threonin, Serin, Glycin und Asparagin. Der Austausch mit Alanin- und Glycin-Kodons ist am meisten bevorzugt. Die Auswahl eines Ersatzes für jedes der jeweiligen Kodons ist im allgemeinen unabhängig von der Auswahl eines geeigneten Ersatzes an irgendeiner anderen Position.

[0078] Im folgenden sind repräsentative Beispiele der Art von Kodon-Substitutionen, die vorgenommen werden können, unter Verwendung des Cystein-Rests 459 als Beispiel aufgeführt:

(A) das Kodon für Cystein 459 könnte ersetzt werden durch ein Kodon für Glycin; oder

(B) das Kodon für Cystein 459 könnte ersetzt werden durch zwei oder mehr Kodons, wie beispielsweise eines durch Serin und eines durch Glycin, wobei das solch ein Ersatz zu einer neuen Aminosäuresequenz führt: -His^{458}-$Ser^{459(a)}$-$Gly^{459(b)}$-Gln^{460}-; oder

(C) das Kodon für Cystein 459 könnte aus der cDNR entfernt werden, wobei solch eine Entfernung zu einer gekürzten Aminosäuresequenz führen würde, die repräsentiert wird durch: -His^{458}-Gln^{460}-; oder

(D) ein oder mehrere Kodons für Reste, die dem Cystein-Rest 459 benachbart sind, könnten zusammen mit dem Kodon 459 entfernt werden, wie beispielsweise repräsentiert durch: -Glu^{457}-Gln^{460}-.

[0079] Es wird davon ausgegangen, das Kodons für andere als die Aminosäuren Alanin, Threonin, Serin, Glycin oder Asparagin ebenfalls zur Ausübung der Erfindung geeignet sind, abhängig von der jeweiligen primären, sekundären, tertiären oder quartären Umgebung des Ziel-Cystein-Restes.

[0080] Es wird für die Ausübung dieser Ausführungsform als wünschenswert erachtet, für jeden einzelnen Cystein-Rest des tryptischen 449–728-vWF-Untereinheitenfragments eine Aminosäure als Ersatz bereitzustellen, die an der Cystein-Position des Wildtyp-Aminosäuresequenz-Unterabschnitts, innerhalb dessen die Cystein-Position lokalisiert ist, mit minimaler Störung der Sekundärstruktur (wie beispielsweise α-Helix oder β-Faltblatt) untergebracht werden kann. Bei der Ausübung der vorliegenden Erfindung werden Alanin, Threonin, Serin, Glycin und Asparagin im allgemeinen zufriedenstellend sein, weil sie, wie Cystein, neutral geladen sind und Seitenketten aufweisen, die klein oder vergleichsweise klein in der Größe sind.

[0081] Es ist ein beträchtlicher Forschungsaufwand getrieben worden, um vorherzusagen, innerhalb welcher Arten von Strukturdomänen von Proteinen (α-Helix, β-Faltblatt oder "Random coil") man am wahrscheinlichsten bestimmte Aminosäure-Spezies findet. Serin ist eine bevorzugte Aminosäure zur Verwendung in der Praxis dieser Erfindung, weil sie der Größe und Polarität von Cystein am nächsten kommt und von ihr angenommen

wird, daß sie die α-helikalen und β-Faltblatt-Domänen nicht unterbricht.

[0082] Die Bezugnahme zum Beispiel auf Chou, P. Y. et al., Biochemistry 13(2), 211–222 (1974) und Chou, P. Y. et al., "Prediction of Protein Conformation", Biochemistry, 13(2), 222–244 (1974) stellt weitere Informationen bereit, die für die Auswahl von Ersatz-Aminosäuren nützlich sind. Chou, P. Y. et al. sagten die Sekundärstruktur von bestimmten Polypeptidsequenzabschnitten auf Basis von Regeln für die Feststellung voraus, welche Arten von Aminosäuren darin wahrscheinlich im Zentrum beispielsweise eines alpha-helikalen Bereichs zu finden sind, welche Reste davon wahrscheinlich die Ausbreitung eines helikalen Bereichs beenden und dadurch Grenz-Reste oder Helixbrecher werden. Nach Chou, P. Y. et al., oben, auf 223, sind Cystein und die Gruppe aus Threonin, Serin und Asparagin indifferent gegenüber α-helikalen Strukturen, anstatt Brecher oder Bildner solcher Bereiche zu sein. Daher lassen Threonin, Serin und Asparagin eine α-helikale Region, in der ein potentielles Ziel-Cystein lokalisiert sein kann, wahrscheinlich ungestört. Gleichermaßen wurde von Glycin, Alanin und Serin gefunden, daß sie mehr oder weniger indifferent gegenüber der Bildung von β-Regionen sind. Es sei angemerkt, daß Serin-, Threonin- und Asparagin-Reste mögliche neue Stellen für die Glykosylierung bilden, was sie zu potentiell ungeeigneten Ersatz-Resten an bestimmten Positionen in sekretorischen Proteinen, die einer Glykosylierung unterzogen werden, macht.

[0083] Allgemein besteht die primäre Überlegung, die in Zusammenhang mit der Auswahl geeigneter Aminosäure-Ersetzungen berücksichtigt werden sollte, darin, ob die in Betracht gezogenen Substitution eine nachteilige Wirkung auf die Tertiärstruktur des Fragments haben wird. Daher können andere Aminosäuren als annehmbarer Ersatz für bestimmte Cystein-Reste geeignet sein, solange die neuen Reste keine unerwünschten Änderungen in die Tertiärstruktur des 449–728-Fragments einführen. Die Reaktionsfähigkeit mit einem NMC-4-Antikörper wird als ein Test empfohlen, ob ein mutiertes Polypeptid die gewünschten therapeutischen Eigenschaften aufweist.

[0084] Besonders bevorzugte mutierte Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung sind auf Grundlage einer monomeren Form der Domäne aus den Resten 449–728 des reifen Untereinheitenfragments als Muster gebildet, als Gegensatz zu einem Dimer davon, daß eine Brückenfunktion zwischen zwei Blutplättchen bereitstellen könnte. Normalerweise sollten in einem vWF-DNA-Fragment jene Kodons für bestimmte Cysteine, die normalerweise an der intermolekularen Disulfidbindung beteiligt sind, ersetzt werden. Cystein-Kodons, die Reste kodieren, die intramolekulare Disulfidbindungen bilden, sollten unmutiert gelassen werden, wenn von der intramolekularen Bindung gezeigt wurde, daß sie wichtige Struktureigenschaften auf das Untereinheiten-Fragment überträgt, und wenn Bedingungen gefunden werden können, die die korrekte Bildung der intramolekularen Bindung ermöglichen.

[0085] Insbesondere wird die Herstellung eines mutierten Polypeptid-Fragments offenbart, das dem Fragment der reifen von-Willebrand-Untereinheit entspricht, die einen Aminoterminus an Rest 441 (Arginin) und einen Carboxyterminus an Rest 733 (Valin) aufweist, das sich davon jedoch dadurch unterscheidet, daß jeder der Cystein-Reste davon durch einen Glycin-Rest ersetzt wurde.

[0086] Die Erfindung lehrt ebenfalls, daß die Beibehaltung einer bestimmten Disulfidbindung innerhalb von Polypeptiden, die der 449–728-vWF-Untereinheitenregion entsprechen, besonders wichtig für die Ausgestaltung von davon abgeleiteten therapeutischen Molekülen ist. Hierzu wird ein mutiertes vWF-Fragment beschrieben, das durch p5E-Plasmide exprimiert wird, wie in Beispiel 4 beschrieben, und das eine intramolekulare Disulfidbindung enthält.

[0087] Wichtige Faktoren, die bei der Gestaltung von bevorzugten mutierten Polypeptiden gemäß der Erfindung beteiligt sind, werden im folgenden beschrieben.

[0088] Potentielle Bindungsstellen für Kollagene und heparinartige Glykosaminoglykane existieren in dem tryptischen 449–728-Fragment in der Schleifenregion zwischen den Cysteinresten 509 und 695. Für den Fall, daß die Bindung an diesen Stellen die antithrombotische therapeutische Eignung des Moleküls beeinträchtigt, beispielsweise, indem auch eine Brückenbildung zu Kollagen bereitgestellt wird, kann das Polypeptid (z. B. durch chemische Synthese oder Proteolyse) umgestaltet werden, um die gesamte Schleifenregion oder einen Teil davon zu entfernen.

[0089] Von-Willebrand-Faktor-Polypeptiden, die aus bakteriellen Expressionssystemen erhalten wurden, fehlt im wesentlichen die Glykosylierung, die vWF normalerweise als Ergebnis des posttranslationalen Prozessings beispielsweise im Golgi-Apparat oder in Weibel-Palade-Körpern erfährt. Die vorliegende Erfindung schließt in ihren Bereich Moleküle ein, die durch E. coli BL21(DE3) oder andere geeignete prokaryotische

Wirtszellen hergestellt sind und die enzymatisch oder chemisch glykosyliert sind, um den durch Säugetierzellen exprimierten Molekülen stärker zu ähneln.

[0090] Alternativ können die kodierenden DNA-Sequenzen zu Expressionsplasmiden oder viralen Expressionsvektoren transferiert werden, die in der Lage sind, eine Expression in Säugetier-Wirtszellen hervorzurufen, um eine normale Glykosylierung bereitzustellen.

[0091] Es ist festgestellt worden, daß sowohl Blutplättchen als auch Von-Willebrand-Faktor-Moleküle eine große Anzahl negativer Ladungen enthalten, wie beispielsweise jene, die durch Sialinsäure bereitgestellt werden. Solche Ladungen können eine gewünschte gegenseitige Abstoßung der Moleküle unter-Nichtverletzungsbedingungen erleichtern. Die Zugabe von einem oder mehr positiv geladenen Resten von Lysin und/oder von Arginin, die sich vom Amino- und/oder vom Carboxy-Terminus des tryptischen 52/48-Fragments oder rekombinanten Äquivalenten davon erstrecken, können die elektrische Abstoßung in Bezug auf den GPIb-IX-Rezeptor überwinden und damit die Verwendung des Fragments als antithrombotisches Therapeutikum erleichtern.

[0092] Darüber hinaus liegt es hinsichtlich der nach dem Muster des 449–728-vWF-Untereinheitenfragments hergestellten Polypeptide im Bereich der Erfindung, bestimmte Cystein-Reste durch ortsgerichtete Mutagenese zu entfernen und anschließend jeden verbliebenen Cystein-Rest durch dessen chemische Inaktivierung, zum Beispiel durch S-Carboxymethylierung, zu inaktivieren.

[0093] Wie oben beschrieben, kann die erfolgreiche Manipulation der erfindungsgemäßen Polypeptide erfordern, daß ein oder mehrere Cystein-Reste davon verändert werden, so daß sie nicht miteinander unter Bildung unerwünschter intramolekularer oder intermolekularer Disulfidbindungen reagieren können. Insbesondere tritt ohne diese Behandlung bei vielen der erfindungsgemäßen Polypeptide typischerweise eine unerwünschte Reaktion von Cystein-Resten davon auf, was zur Bildung von unlöslichen oder biologisch inaktiven Polypeptid-Aggregaten führt, die für eine wirksame Verwendung als Therapeutika ungeeignet sind. Entsprechend werden viele der erfindungsgemäßen Polypeptide am besten beschrieben als cysteinveränderte Polypeptide, was bedeutet, daß ein oder mehrere Cystein-Reste davon in gewisser Weise verändert wurden, um die unerwünschten Reaktionen zu minimieren. Die Erfindung sieht in ihrer Anwendung vor, solche Veränderungen der Cystein-Reste durch irgendeines von verschiedenen Verfahren zu bewirken, die in der Fachwelt hierfür als wirksam bekannt sind. Obwohl eine bevorzugte Form der Cystein-Veränderung die Mutagenese des Cystein-Kodons zu Kodons für andere Aminosäuren umfaßt (siehe Beispiele 1 und 4), sind auch alternative Verfahren erhältlich. Eine solche Technik beinhaltet die Behandlung von Cystein-Resten mit einem Reduktionsmittel wie beispielsweise β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol, "DTT", gefolgt von permanenter Dealkylierung (zum Beispiel mit Iodacetamid). Viele andere kovalente Markierungen können an die Ziel-Cysteinreste angeheftet werden, um diese zu inaktivieren, wobei die einzigen Anforderungen darin bestehen, daß die Markierung unter pH-Bedingungen erfolgen kann, die das Ziel-Polypeptid nicht irreversibel denaturieren, wobei die Anheftung von einer Art ist, die unter den Bedingungen, denen das Fragment im Laufe der weiteren Verarbeitung oder Lagerung oder Verwendung ausgesetzt ist, eine chemische Reaktion des veränderten Cysteins mit anderen Cystein-Resten nicht ermöglicht.

[0094] Ein unlösliches mutiertes Polypeptid kann löslich gemacht werden, indem eine Subdomäne eines wasserlöslichen Polymers, zum Beispiel eines Polyacrylamids, kovalent daran gebunden wird.

[0095] Im Licht des Vorstehenden, das allgemein auf alle erfindungsgemäßen Polypeptide anwendbar ist, folgt im weiteren eine Beschreibung von Mitteln, durch welche mutierte Polypeptide gemäß der ersten Ausführungsform der Erfindung hergestellt werden können.

[0096] Um dies zu erreichen, wurde ein cDNA-Klon verwendet, der das Von-Willebrand-Faktor-Gen (für das Prä-Pro-Peptid) kodiert. Die cDNA wurde einer enzymatischen Amplifikation mittels einer Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotiden unterzogen, die den angegebenen Bereich flankierten. Das erste den kodierenden DNA-Strang repräsentierende Oligonukleotid enthielt eine EcoRI-Stelle 5' zum Kodon für den Rest 441 (Arginin) und erstreckte sich zum Kodon für Rest 446 (Glycin). Das zweite Oligonukleotid, entsprechend dem nicht-kodierenden DNA-Strang, kodierte die Aminosäuren 725 bis 733 und kodierte 3' zum Kodon 733 eine HindIII-Restriktionssequenz. Die erhaltene doppelsträngige von-Willebrand-Faktor-cDNA, die der Aminosäuresequenz von Rest 441 bis Rest 733 (der reifen Untereinheit) entspricht, wurde dann unter Verwendung von EcoRI- und HindIII-Restriktionsenzymen in die doppelsträngige replikative Form des Bakteriophagen M13mp18 inseriert, der eine multiple Klonierungsstelle mit kompatiblen EcoRI- und HindIII-Sequenzen besitzt. Nach dem Verfahren von Kunkel, T. A, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488–492 (1985) wurde die orts-

gerichtete Mutagenese unter Verwendung von hybridisierenden Oligonukleotiden durchgeführt, die für die Ersetzung aller Cystein-Kodons (Reste-Positionen 459, 462, 464, 471, 474, 509 und 695) mit einzelnen Cystein-Kodons (siehe Beispiel 1) oder zum Beispiel von 5 der Cystein-Kodons, Reste-Positionen 459, 462, 464, 471 und 474, mit einzelnen Cystein-Kodons (siehe Beispiel 4) geeignet waren. Mutierte doppelsträngige vWF-cDNA-Fragmente, die durch das Verfahren erhalten wurden, wurden vom M13mp18-Phagen durch Behandlung mit EcoRI- und HindIII-Restriktionsendonukleasen entfernt, wonach die Enden der vWF-cDNA-Fragmente mit BamHI-Linkern modifiziert wurden.

[0097] Die zwei Arten von mutierter vWF-cDNA, die entweder 5 oder 7 Mutationen von Cys zu Gly enthielten, wurden dann getrennt in den Expressionsvektor pET-3A kloniert (siehe Rosenberg, A. H., et al., Gene 56, 125–136 (1987)) für die Expression vom E.-coli-Stamm BL21(DE3), Novagen Co., Madison, WI. pET-3A-Vehikel, die cDNA für das vWF-Untereinheitenfragment mit 7 Cystein-zu-Glycin-Mutationen enthielt, wird als "p7E" bezeichnet, und als "p5E", wenn das enthaltene vWF-cDNA-Fragment die 5 oben angegebenen Cystein-zu-Glycin-Mutationen enthielt. Mutierte von-Willebrand-Faktor-Polypeptide, die durch Bakterienkulturen hergestellt wurden, die den Expressionsplasmid p5E enthielten, wurden mit jenen verglichen, die von Kulturen exprimiert wurden, die p7E-Plasmide enthielten. Das p5E-Molekül ist in der Lage, eine Disulfidbindung zwischen den Cystein-Resten 509 und 695 zu bilden, wohingegen das p7E-Molekül dies nicht kann.

[0098] Die mutierten Polypeptide wurden durch die bakteriellen Wirtszellen nicht ausgeschieden, sondern in schlecht löslichen Aggregaten ("Einschlußkörper") akkumuliert, aus denen die Polypeptide erfolgreich mit Hilfe der Verfahren aus Beispiel 1 (p7E) und Beispiel 4 (p5E) löslich gemacht wurden. Von p7E- und p5E-Plasmiden exprimierte Polypeptide wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunblotting charakterisiert (Beispiele 2 und 5). Unter reduzierenden Bedingungen exprimieren beide Plasmide Polypeptid-Spezies, die ein durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gemessenes apparentes Molekulargewicht von ungefähr 38.000 aufweisen, wie es von dem unglykosylierten Molekulargewicht der erwarteten Aminosäuresequenzen vorhergesagt würde.

[0099] Das Verhalten von p5E- und p7E-Extrakten wurde mittels immunologischer Verfahren untersucht (siehe Beispiel 5). Die vWF-spezifischen murinen monoklonalen Antikörper RG-46 und NMC-4 wurden als Sonden verwendet. Von RG-46 ist gezeigt worden, daß es eine lineare Sequenz von Aminosäuren als sein Epitop erkennt, die die Reste 694 bis 708 innerhalb der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit umfaßt. Die Bindung dieses Antikörpers an seine Determinante ist im wesentlichen konformationsunabhängig. Mohri, H. et al., J. Biol. Chem. 263(34), 17901–17904 (1988).

[0100] NMC-4 weist als sein Epitop jedoch die Domäne der von-Willebrand-Faktor-Untereinheit auf, die die Glykoprotein-Ib-Bindungsaktivität enthält. Die Kartierung des Epitops hat gezeigt, daß es innerhalb zweier diskontinuierlicher Domänen (umfassend ungefähr die Reste 474 bis 488 und auch ungefähr die Reste 694 bis 708 der reifen vWF-Untereinheit) enthalten ist, die in disulfidabhängige Verbindung gebracht sind, Mohri, H., et al., oben, obwohl es nicht festgestellt werden konnte, ob die Disulfidbindung, die diese tertiäre Konformation in dem nativen vWF-Molekül vermittelt, intramolekular oder intermolekular war. Ders. auf 17903.

[0101] Entsprechend wurden 7,5 µg Probe (Protein) zunächst auf 10% SDS-Polyacrylamid-Gelen laufengelassen, so daß das antigene Verhalten von bestimmten Banden (unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen) mit Ergebnissen verglichen werden konnte, die durch Coomassie-Blue-Färbung erhalten wurden. Anschließend wurde ein Immunblotting ("Western-Blotting") nach einem Standardverfahren, Burnette, A. Anal. Biochem., 112, 195–203 (1981), durchgeführt, um die p5E- und p7E-Extrakte zu vergleichen.

[0102] Es wurde festgestellt, daß unter nichtreduzierenden Bedingungen das Einzelketten-p5E-Polypeptid-Fragment (das die Sequenz von Rest 441 bis Rest 733 repräsentiert) im Vergleich zu der vergleichbaren cysteinfreien Spezies, die von p7E isoliert wurde, einen ungefähr 120fachen Anstieg in der Bindungsaffinität für NMC-4 zeigt. Nach Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen (unter Verwendung von 100 mM DTT) zeigt die Einzelketten-p5E-Spezies eine bemerkenswert verminderte Affinität für NMC-4, die dann sehr ähnlich war zu derjenigen der cysteinfreien p7E-Spezies unter sowohl reduzierten als auch nichtreduzierten Bedingungen. NMC-4 erkannte auch weder unter reduzierenden noch unter nichtreduzierenden Bedingungen disulfid-verbundene Dimere von dem p5E-Extrakt als Epitop.

[0103] Die Nitrozellulosefilter, die zur Herstellung von Autoradiographien auf Basis von NMC-4 verwendet wurden, wurden durch Subtraktion der anfänglichen NMC-4-Expositionsantwort, die durch eine Kombination von niedrigem Antikörpertiter und kurzer Expositionszeit niedrig gehalten wurde, mit RG-46 neu untersucht. Die Bindung von RG-46 an das 36.000-kDa-p7E-Polypeptid auf den Filtern war die gleiche, ob reduzierende

oder nichtreduzierende Bedingungen gewählt wurden, was übereinstimmt mit der Ersetzung von allen Cysteinen in dem exprimierten Polypeptid durch Glycin.

[0104] Ein vWF-Antigen (das mit RG-46 reagiert) von hohem Molekulargewicht war in dem p5E-vWF-Polypeptid-Extrakt unter nichtreduzierenden Bedingungen vorhanden. Diese p5E-vWF-Aggregate (die intermolekulare Disulfidbindungen widerspiegeln) wanderten unter reduzierenden Bedingungen zur selben Position wie das p7E-Polypeptid, was auf die Zerstörung ihrer Disulfid-Kontakte hinweist. Die großen intermolekularen p5E-Disulfid-Aggregate, die von RG-46 unter nichtreduzierenden Bedingungen leicht erkannt wurden, wurden durch NMC-4 weder unter reduzierenden noch unter nichtreduzierenden Bedingungen erkannt. Es wurde somit gezeigt, daß die Disulfid-Bindung zwischen den Resten 509 und 695 in nativen multimeren vWF-Untereinheiten einen intramolekularen Kontakt bildet.

[0105] Von der Disulfidbindung zwischen den Resten 471 und 474 der reifen vWF-Untereinheit wurde früher gezeigt, daß es sich um einen intramolekularen Kontakt handelt, so daß die obengenannte Ausführungsform in der Lage ist, darauf hinzuweisen, daß (eine) intramolekulare Disulfidbindung(en) in der aus mehreren Untereinheiten bestehenden reifen vWF unter Verwendung von einem oder mehreren der Cysteinreste 459, 462 oder 464 gebildet würde(n).

[0106] Eine große Vielzahl von Expressionsplasmiden oder viralen Expressionsvektoren sind für die Expression des 441–733-Fragments oder ähnlicher vWF-Fragmente geeignet. Repräsentative Beispiele schließen pBR322 und Derivate davon wie beispielsweise pET-1 bis pET-7 ein. Geeignete Wirtszellen schließen die Bakteriengattungen Escherichia und Bacillus ein. Von Bedeutung bei der Auswahl eines Expressionssystems ist die empfohlene Anwesenheit eines effizienten Transkriptionspromotors direkt benachbart zu dem klonierten vWF-Insert. Mutierte vWF-cDNA-Fragmente können auch in eukaryotische Wirtszellen kloniert werden.

[0107] Von dieser Entdeckung wird angenommen, daß sie besonders nützlich bei der Entwicklung von therapeutischen vWF-Polypeptiden ist, die nach dem Muster des tryptischen 52/48-Fragments (zur Verwendung als Antithrombotika) oder stattdessen nach dem Muster des 116-kDa-Homodimers davon (zur Verwendung als Antihämorrhagika) hergestellt wurden.

[0108] Viele der Faktoren, die oben in Bezug auf die Entwicklung und Expression von therapeutischen Fragmenten von vWF bei rekombinanten Bakterienzellen beschrieben wurden, sind auf die Entwicklung und Expression von vWF-Fragmenten bei eukaryotischen Wirtszellen anwendbar. Solch eine Anwendbarkeit ist für den Fachmann leicht ersichtlich.

[0109] Die zweite Ausführungsform schließt in ihren Bereich die Erkennung von einigen der Rollen ein, die von Cystein-Resten, die in dem Fragment der reifen vWF-Untereinheit mit der Primärsequenz der Reste 449–728 vorhanden sind, erfüllt werden. In diesem Zusammenhang bestätigt diese Ausführungsform, daß die Cystein-509–695-Disulfidbindung eine intramolekulare Bindung ist und stellt wirksame die 509–695-Bindung beinhaltende Therapeutika zwecks Behandlung von Thrombose oder zwecks Behandlung der von-Willebrand-Krankheit bereit.

[0110] Sowohl die antithrombotischen Polypeptide als auch die antihämorrhagischen Polypeptide dieser zweiten Ausführungsform der Erfindung beruhen auf der Aminosäuresequenz-Domäne, die ungefähr die Reste 449 bis 728 der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit umfassen und die, wenn sie voll glykosyliert ist, dem 52/48-kDa-vWF-Untereinheitenfragment in Bezug auf das Gewicht äquivalent wäre. In der Praxis ist es schwierig, therapeutisch nützliche Mengen solcher Polypeptide aus Blutplasma zu erhalten. Die Schwierigkeiten umfassen die wirksame Trennung von 116-kDa- und 52/48-kDa-Fragmenten von anderen Bestandteilen von tryptischen Verdaus und die wirksame Sterilisation von aus Blut erhaltenen Bestandteilen von menschlichen Viren wie beispielsweise Hepatitis und AIDS. Darüber hinaus haben in der Literatur beschriebene Verfahren zur Erzeugung des 52/48-kDa-Monomers aus dem 116-kDa-Dimer die vollständige Disulfid-Reduktion mit dem daraus resultierenden Verlust der Tertiärstruktur eingesetzt. Bestimmte wichtige Manipulationen des 52/48-Fragments, wie beispielsweise die Ersetzung von selektiven Cystein-Resten zur Verbesserung der Produkt-Eignung und -Stabilität, können in einem praktischen Sinne nur durch rekombinante DNA-Technologie erreicht werden.

[0111] Die Herstellung von zu dem tryptischen 52/48-Fragment analogen therapeutischen vWF-Polypeptiden durch rekombinante DNA-gerichtete Mittel ist auf bestimmte Beschränkungen gestoßen. Es ist wünschenswert, daß das Polypeptid von den Wirtszellen nicht nur hergestellt wird, sondern daß es auch korrekt gefaltet wird für eine maximale therapeutische Eignung. Es wird angenommen, daß der grundlegende Faktor, der bis

heute die Expression der therapeutisch am meisten aktiven Formen des 52/48-Fragments verhindert hat, die inkorrekte Faltung des Moleküls ist, verursacht durch die Verbindung von Cystein-Resten unter Bildung inkorrekter Disulfid-Kontakte. Darüber hinaus scheinen solche Polypeptide hydrophobe Eigenschaften oder Löslichkeitsprobleme zu zeigen, auf die man nicht gestoßen wäre, wenn sie in die Gesamtheit der natürlichen vWF-Untereinheit eingeschlossen wären oder korrekt glykosyliert wären.

[0112] Von kritischer Bedeutung für die Synthese von vWF-abgeleiteten therapeutischen Polypeptiden ist daher die Auswahl von Bedingungen, die die Bildung von ungeeigneten Disulfid-Kontakten minimieren. Die vorherige Expression solcher Peptide von rekombinanter DNA in Wirts-Bakterienzellen weist bestimmte Nachteile auf. Hinsichtlich der ersten Ausführungsform sind neu produzierte vWF-Polypeptide nicht in der Lage, aus den Wirtszellen zu entkommen, was dazu führt, daß sie in unlöslichen Aggregaten (Einschlußkörpern) angesammelt werden, wo die wirksame Konzentration von Cystein-Resten extrem hoch war. Unter diesen Umständen wird die Bildung von Disulfid-Bindungen, die für das vWF-Molekül, wie es natürlicherweise im Plasma vorkommt, nicht charakteristisch sind, befördert und werden entweder innerhalb der Einschlußkörper oder bei den Versuchen, die Polypeptide daraus zu solubilisieren, gebildet.

[0113] Diese Erfindung beschreibt eine Lösung für diese Schwierigkeiten, indem sie die vWF-abgeleiteten Polypeptide dazu bringt, in Säugetierzellen unter Verwendung einer DNA-Sequenz exprimiert zu werden, die das Polypeptid kodiert und die ebenfalls für ein Signalpeptid kodiert, dessen Anwesenheit das vWF-Polypeptid dazu bringt, aus den Wirtszellen ausgeschieden zu werden. Die Bildung unkorrekter Disulfidbindungen wird durch Limitierung der Akkumulation von hohen lokalen Konzentrationen des Polypeptids, wie in Einschlußkörpern, minimiert.

[0114] Darüber hinaus sind Enzyme, die in den eukaryotischen Wirtszellen vorhanden sind, anders als bei Bakterien, in der Lage, die vWF-abgeleiteten Polypeptide zu glykosylieren (Kohlenhydratketten daran anzufügen), was zu therapeutischen Molekülen führt, die vWF-Molekülen mehr ähneln, die aus menschlichem Plasma erhalten wurden.

[0115] Das ohne Mutation irgend eines der Cystein-Kodons hierfür erzeugte rekombinante 116-kDa-Polypeptid repräsentiert ein Dimer des Untereinheitenfragments bestehend aus den Resten 441–730 und weist eine Glykosylierungsmenge auf, die der in vergleichbaren Bereichen des aus Plasma erhaltenen vWF äquivalent ist.

[0116] Es folgt hiernach die Beschreibung der Arten von therapeutischen vWF-abgeleiteten Polypeptiden, die nach den wirksamen rekombinanten Verfahren der zweiten Ausführungsform erzeugt wurden oder erzeugt werden können.

[0117] Allgemein gesagt, beschreibt die Erfindung jedes Fragment der reifen von-Willebrand-Untereinheit, die jene Sequenz von Aminosäuren zwischen ungefähr dem Rest 449 und ungefähr dem Rest 728, oder ein Unterfragment davon, umfaßt, aus dem zumindest eines der Cystein-Reste 459, 462 und 464 entfernt ist. Diese Entfernung vermindert die Neigung des Fragments, unerwünschte intermolekulare Disulfidbindungen (und daraus resultierende Dimere) zu bilden, mit dem Ergebnis, das die therapeutischen Verwendbarkeit als Antithrombotika verbessert ist.

[0118] Ein weiterer Aspekt umfaßt eine glykosylierte Form der oben definierten Polypeptide.

[0119] Ebenfalls beschrieben ist ein glykosyliertes Polypeptid, das aus dem obengenannten Bereich von vWF abgeleitet ist, bei dem Cystein-Reste an den Positionen 509 und 695 erhalten sind, und bei dem jedes der Cystein-Reste 459, 462 und 464 entfernt oder durch Reste von anderen Aminosäuren ersetzt ist.

[0120] Weiter bevorzugt bei der Ausübung der Ausführungsform ist ein glykosyliertes Polypeptid, erhalten aus dem obengenannten Bereich von vWF, bei dem die Cystein-Reste an den Positionen 509 und 695 erhalten sind und bei dem irgend eines der Cystein-Reste 459, 462 und 464 entfernt oder durch einen einzelnen Rest einer anderen Aminosäure ersetzt ist.

[0121] Wichtige Faktoren bei der Entwicklung oder der weiteren Modifikation der bevorzugten mutierten Polypeptide (Antithrombotika) gemäß der Erfindung sind im folgenden beschrieben.

[0122] Potentielle Bindungsstellen für Kollagene und Glykosaminoglykane (oder Proteoglykane) befinden sich in dem tryptischen 449–728-Fragment in dem Schleifenbereich zwischen den Cystein-Resten 509 und

695. Für den Fall, daß die Bindung durch solche Makromoleküle an diesen Stellen die antithrombotische therapeutische Eignung irgend einer der rekombinanten Polypeptide gemäß der Erfindung beeinträchtigt, indem zum Beispiel auch eine Brückenbildung zu Kollagen ermöglicht wird, kann das Polypeptid neu gestaltet werden (z. B. durch Proteolyse, kovalente Markierung oder Mutagenese), um den Schleifenabschnitt oder eine Subdomäne davon zu entfernen oder zu verändern.

[0123] Es folgt eine Diskussion von Mitteln, durch welche Polypeptide gemäß der zweiten Ausführungsform hergestellt werden können, und durch welche solche Polypeptide insbesondere wirksam in korrekt gefalteter Form und mit bevorzugt nur jenen Disulfidbindungen, deren Anwesenheit mit der therapeutischen Eignung vereinbar ist, aus Wirtszellen ausgeschieden werden können.

[0124] Essentielle, für die Ausübung der Ausführungsform erforderliche Elemente sind: (A) eine DNA-Sequenz, die die Domäne mit den Resten 449–728 der reifen vWF-Untereinheit kodiert oder eine Subdomäne davon kodiert; (B) ein Expressionsplasmid oder viraler Expressionsvektor, der in der Lage ist, in einer eukaryotischen Zelle die Expression der obengenannten Domäne mit den Resten 449–728, oder eine Subdomäne davon, zu steuern; und (C) eine eukaryotische Wirtszelle, in der die Expression bewirkt werden kann.

[0125] Die Expression der DNA-Sequenz des von-Willebrand-Faktor-Untereinheitenfragments wird erleichtert durch Platzierung einer eukaryotischen Konsensus-Translationsinitiationssequenz und eines Methionin-Initiationskodons stromaufwärts (5') zu der die Reste 449–728 kodierenden DNA. Die vWF-DNA-Sequenz kann eine cDNA-Sequenz sein oder eine genomische Sequenz, wie sie, zum Beispiel, durch enzymatische Amplifikation aus einem genomischen Klon in einer Polymerasekettenreaktion hergestellt werden kann. Die Expression der die Reste 449–728 kodierenden Sequenz wird ferner erleichtert durch Platzierung eines Translationsterminationskodons wie beispielsweise TGA stromabwärts davon. Das so exprimierte vWF-Polypeptid verbleibt üblicherweise aufgrund der fehlenden Anheftung eines Signalpeptids an das entstehende vWF-Polypeptid in den Wirtszellen. In solch einer Situation sind die Aufreinigung von darin exprimierten Proteinen und die Extraktion von pharmakologisch geeigneten Mengen davon schwieriger zu bewerkstelligen, als wenn die Polypeptide in das Kulturmedium der Wirtszellen ausgeschieden würden. Solche Expressionssysteme sind nichtsdestotrotz für diagnostische Testzwecke wie beispielsweise zur Feststellung der korrekten Funktion von Blutplättchen-GPIb-IX-Rezeptor-Komplexen bei einem Patienten von Nutzen.

[0126] Bei der Erfindung, bei der das Polypeptid aus der Wirtszelle ausgeschieden wird, wird eine vWF-kodierende DNA-Sequenz zur Insertion in eine geeignete Wirtszellen beschrieben, bei der stromaufwärts von der die Reste 449–728 kodierenden Sequenz auch eine DNA-Sequenz inseriert ist, die das vWF-Signalpeptid kodiert (siehe Beispiel 7). Andere vWF-kodierende DNA-Sequenzen, die verschiedenen Bereichen der reifen vWF-Untereinheit entsprechen oder dem Propeptid oder Kombinationen irgend einer dieser Bereiche entsprechen, können in gleicher Weise exprimiert werden, indem sie in ähnlicher Weise stromabwärts von einer vWF-Signalpeptid-Sequenz in einer geeigneten kodierenden DNA platziert werden. Bei Anfügung an das aminoterminale Ende des Rest-449–728-Fragments der vWF-Untereinheit führt das Signalpeptid zur Erkennung des Fragments durch Zellstrukturen als ein Polypeptid der Art, das für die anschließende Ausscheidung aus der Zelle, mit begleitender Abspaltung des Signalpeptids von dem 449–728-Fragment, weiterzubehandeln ist.

[0127] Bezüglich der Konstruktion eines eukaryotischen Expressionssystems und der Expression der tryptischen 52/48-kDa-Domäne der reifen Untereinheit vWF (des Rest-449–728-Fragments) darin wurde gefunden (siehe Beispiel 7), daß es zweckmäßig ist, ein etwas größeres Fragment, repräsentiert durch die Reste 441 (Arginin) bis 730 (Asparagin), zu manipulieren. Andere ähnliche Fragmente, die kleine Bereiche von zusätzlichen Aminosäuren (neben der Rest-449–728-Sequenz) enthalten, wobei die zusätzlichem Aminosäuren die Funktion des Fragments nicht wesentlich beeinflussen, können ebenfalls exprimiert werden.

[0128] Gleichermaßen können funktionsfähige Fragmente, aus denen im Vergleich zu dem 449–728-Fragment mehrere Reste neben den Amino- und Carboxytermini entfernt wurden, exprimiert werden, solange die GPIb(α)-Bindungssequenzen nicht beeinträchtigt sind.

[0129] Mit Bezug auf die Konstruktion einer geeigneten DNA-Sequenz für die Kodierung und Expression des Rest-441–730-Fragments wurde es auch als wirksam gefunden, zu verursachen, daß zwischen der den Carboxy-Terminus des Signalpeptids kodierenden DNA und dem Kodon für Rest 441 Kodons für die ersten drei Aminosäuren des vWF-Propeptids (Alanin-Glutaminsäure-Glycin) inseriert werden, wobei die Kodons in dem menschlichen vWF-Gen natürlicherweise direkt stromabwärts (3') zur Signalsequenz gefunden werden. Wie unten weiter ausgeführt wird (siehe Beispiel 17), erleichtert das Vorhandensein solch einer Propeptid-Sequenz (ein Abstandhalter) die Erkennung einer korrekten Spaltstelle durch Signalpeptidase, wodurch ein therapeuti-

sches vWF-Polypeptid von korrekter Größe erzeugt wird und die Ausscheidung des therapeutischen Produkts aus der Wirtszelle erleichtert wird. Wie weiter unten ausgeführt wird, sollte diese Abstandhalter-Sequenz einen halbpolaren oder polaren Charakter aufweisen.

[0130] Gemäß der Erfindung wird eine Abstandhalter-Sequenz beschrieben, umfassend zwischen einem und bis zu zehn der ersten Reste des aminoterminalen Abschnitts des vWF-Propeptids. Es liegt im Bereich der Erfindung, längere propeptidkodierende Sequenzen zu verwenden, mit dem Verständnis, daß die gewünschte Tertiärstruktur der Rest-441–730-Sequenz nicht nachteilig beeinflußt wird.

[0131] Eine große Vielzahl von Expressionsplasmiden oder viraler Expressionsvektoren sind geeignet für die Expression des reifen vWF-Untereinheitenfragments mit den Resten 441–730 oder ähnlicher vWF-Fragmente. Ein wichtiger Faktor bei der Auswahl eines Expressionssystems ist die Bereitstellung eines hocheffizienten Transkriptionspromotors in dem Plasmid oder Vektor, der zu dem klonierten vWF-Insert direkt benachbart ist.

[0132] Ein anderer wichtiger Faktor bei der Auswahl eines Expressionsplasmids oder viralen Expressionsvektors ist die Bereitstellung eines Antibiotikaresistenz-Genmarkers in dem Plasmid oder Vektor, so daß, zum Beispiel, die kontinuierliche Selektion auf stabil transformierte eukaryotische Wirtszellen eingesetzt werden kann.

[0133] Beispiele von Plasmiden, die für die Ausübung der Erfindung geeignet sind, schließen pCDM8, pCDM8^{neo}, pcDNA1, pcDNA1^{neo}, pMAM^{neo} und Rc/CMV ein. Bevorzugte Plasmide schließen pCDM8^{neo}, pcDNA1^{neo}, pMAM$^{neo\ und}$ RC/CMV ein.

[0134] Beispiele für virale Expressionsvektorsysteme, die für die Ausübung der Erfindung geeignet sind, schließen solche auf Basis von Retroviren und solche auf Basis von Baculovirus Autographa californica Nuclear-Polyhedrose-Virus ein.

[0135] Repräsentative Wirtszellen, umfassend permanente Zellinien, die zur Verwendung bei der Ausübung der Erfindung geeignet sind, schließen Ovarzellen chinesischer Hamster CHO-K1, ATCC-CCL 61; COS-1-Zellen, SV-40-transformierte Nierenzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze, ATCC-CRL 1650; murine Hirnanhangdrüsenzellen ATT-20; pankreatische β-Zellen der Ratte; kultivierte Insektenzellen, Spodoptera frugiperda; oder Hefe (Sarcomyces) ein.

[0136] Beispiel 7 enthält eine detaillierte Erklärung von bevorzugten Verfahren, die verwendet werden, um die 441–730-Sequenz zu exprimieren und auszuscheiden. In diesem Beispiel wird das Fragment als ein Homodimer ausgeschieden, das zusammengehalten wird durch eine oder mehrere Disulfidbindungen, an denen die Cystein-Reste 459, 462 und 464 beteiligt sind. Die Expression von monomeren Fragmenten, die als Antithrombotika geeignet sind, erfordert die Kontrolle der Disulfidbindungsfähigkeiten der Monomere, was am meisten bevorzugt durch Mutagenese-Verfahren wie bei der obengenannten ersten Ausführungsform der Erfindung beschrieben erreicht wird.

[0137] Das spezielle Protokoll, das zur Erzeugung des mutierten Rest-441–730-vWF-Fragments mit den Cystein-zu-Glycin-Substitutionen an jedem der Reste mit den Positionen 459, 462 und 464 verwendet wurde, ist in Beispiel 8 beschrieben. Der hier verwendete Expressionsplasmid wird als pAD4/Δ3C bezeichnet.

[0138] Das spezielle Protokoll, adaptiert von dem aus Beispiel 8, und das verwendet wurde, um die drei mutierten Rest-441–730-Fragmente zu erzeugen, die jeweils eine andere einzelne Cys-Gly-Mutation (an den Positionen 459, 462 oder 464) enthalten, ist in Beispiel 10 beschrieben. Die entsprechenden hier verwendeten Expressionsplasmide wurden als pAD4/G^{459}, pAD4/G^{462} und pAD/G^{464} (zusammen "die pAD4/Δ1C-Plasmide") bezeichnet. Ähnliche Verfahren können verwendet werden, um mutierte Rest-441–730-Fragmente mit Cys-Gly-Mutationen an zwei der drei vorgenannten Positionen herzustellen.

[0139] Beispiel 7 unten offenbart die Verwendung von stabil transformierten CHO-K1-Zellen, um das unmutierte Rest-441–730-vWF-Untereinheitenfragment zu exprimieren. Wie in Beispiel 10 unten beschrieben, wurde das unmutierte Fragment auch in unstabilen COS-1-Transformanten exprimiert.

[0140] SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von ausgeschiedenen und immunpräzipitierten Proteinen, die aus CHO-K1-Zellen erhalten wurden, zeigt, daß unter nichtreduzierenden Bedingungen das dominierende vWF-abgeleitete Polypeptid, nachgewiesen durch Färbung mit Coomassie Blue, ein apparentes Molekulargewicht von etwa 116.000 aufweist (Beispiel 7). Dieses Ergebnis wurde bestätigt durch Charakterisierung der von pAD4/WT-transformierten COS-1-Zellen ausgeschiedenen Polypeptide (Beispiel 11) unter Verwendung von

Autoradiographien von ^{35}S-markierten Proteinen. Unter disulfidreduzierenden Bedingungen (wie beispielsweise in Gegenwart von 100 mM Dithiothreitol) wurde das 116-kDa-Fragment nicht länger nachgewiesen, und das vWF-abgeleitete Material erscheint als das erwartete 52/48-kDa-Monomer.

[0141] Das apparente Molekulargewicht des rekombinanten 116-kDa-Polypeptids stimmt überein mit dem Vorliegen des Polypeptids als ein Homodimer des 441–730-Fragments. Dieses Homodimer weist ebenfalls einen Grad von Glykosylierung auf, der dem entspricht, der in dem 116-kDa-Polypeptid beobachtet wurde, das durch tryptischen Verdau des reifen (zirkulierenden) Plasma-vWF isoliert wurde. Es wurde daher gezeigt, daß die Expression des 441–730-Fragments in der Säugetierzellkultur gemäß dieser Erfindung die Bildung des disulfidabhängigen 116-kDa-Dimeres davon fördert, die Strukturen nachahmend, die in Plasma beobachtet werden. Daß das so gebildete 116-kDa-Fragment ein korrekt gefaltetes Polypeptid repräsentiert, wurde durch seine Reaktion (unter nichtreduzierenden Bedingungen) mit konformationsunabhängigem NMC-4-Antikörper nachgewiesen. Dieser Antikörper erkennt eine korrekt zusammengebaute GPIb(α)-Bindungsstelle. Die Reaktionsfähigkeit mit NMC-4 verschwindet unter reduzierenden Bedingungen.

[0142] Da (unter Verwendung bakteriell exprimierter vWF-Fragmente) gezeigt wurde, daß die Cystein-Reste 471 und 474 und auch die Reste 509 und 695 an intramolekularen Bindungen beteiligt sind, müssen die intermolekularen Bindungen, die das 116-kDa-Homodimer stabilisieren, aus einem oder mehreren der Reste 459, 462 und 464 gebildet sein. Es sei ferner darauf hingewiesen, daß, da die Reste 459, 462 und 464 in jedem Monomer in solcher Nähe zueinander liegen, daß es eine Variation dahingehend geben kann, welcher jeweilige Rest oder welche Reste an der/den intermolekularen Disulfidbindung/-bindungen, die den Kontakt zwischen den Polypeptiden im jeweiligen reifen vWF-Dimer oder -Multimer oder rekombinanten 116-kDa-Fragment bilden, beteiligt sind. Therapeutisch wirksame Populationen von dimeren Molekülen können erzeugt werden gemäß der Ausübung der Erfindung unter Verwendung jeder der möglichen Kombinationen von intermolekularen Disulfidbindungen.

[0143] Es wird darauf hingewiesen, daß es auch möglich ist, daß eine gewisse strukturelle Faltung oder Disulfidbindungsbildung, die mit der Erzeugung von therapeutisch wirksamen Konformationen des erfindungsgemäßen rekombinanten 116-kDa-Dimers oder Disulfidaustauschen darin verbunden ist, auftritt, nachdem die Polypeptide aus der Wirtszelle ausgeschieden wurden.

[0144] Da innerhalb des 441–730-vWF-Fragments auch potentielle Bindungsstellen für Kollagene, Proteoglykane und Glykosaminoglykane enthalten sind, ist das 116-kDa-Polypeptid in der Lage, eine Überbrückungsfunktion zwischen einem Blutplättchen und dem Subendothel zu übernehmen. Dies macht es möglich, es in einem Verfahren zur Induktion der Blutplättchen-Adhäsion an Oberflächen wie beispielsweise Gefäß-Subendothel zu verwenden. Es wird auch ein Verfahren zur Induktion der Blutplättchenaktivierung und/oder -Aggregation beschrieben, welches das Inkontaktbringen von Blutplättchen mit einer wirksamen Menge des rekombinanten 116-kDa-Polypeptids umfaßt. Solch ein Verfahren ist bei der Behandlung der von Willebrand-Krankheit von Nutzen.

[0145] Es sei darauf hingewiesen, daß solange mindestens eine der einen oder mehreren potentiellen intermolekularen Disulfidbindungen, die das Homodimer stabilisieren, intakt gelassen wird, und die Aminosäuresequenzen, die die zwei GPIB(α)-Bindungsstellen umfassen, erhalten werden, daß, sofern erforderlich, andere Bereiche von einem oder mehreren der zwei monomeren Fragmente davon entfernt werden könnten, um die therapeutischen Eigenschaften des Dimers zu modifizieren.

[0146] Ein wichtiges Merkmal der zweiten Ausführungsform der Erfindung ist die Bereitstellung von glykosylierten monomeren 52/48-kDa-Fragmenten der vWF-Untereinheit, die wesentliche Elemente der normalen Tertiärstruktur aufweisen. Solche Fragmente zeigen eine verminderte Tendenz, Dimere zu bilden, die zur Verwendung als antithrombotische Therapeutika ungeeignet zu sein pflegen.

[0147] Gemäß den oben beschriebenen Verfahren für die ortsgerichtete Mutagenese wurden Rest-441–730-vWF-Fragmenten produziert, bei denen ein oder mehrere der Cystein-Reste 459, 462 und 464 durch Glycin-Reste ersetzt waren. Die Beispiele 8, 9 und 10 unten erklären die Mutagenese und die Zellkulturbedingungen, die erforderlich waren, um COS-1-Zelltransformanten zu erzeugen, die diese mutierten vWF-Polypeptide exprimieren. Die Beispiele 11 bis 13 gemäß der Erfindung beschreiben die Eigenschaften der so erhaltenen Moleküle im Vergleich zu dem rekombinanten 116-kDa-Polypeptid, das von pAD4/WT-transformierten COS-1-Zellen hergestellt wurde.

[0148] Die vWF-abgeleiteten Polypeptide, die durch pAD4/Δ3C-transformierte COS-1-Zellen (enthaltend die

vWF-441-730-DNA-Sequenz, aber mit jedem der Cystein-Kodons 459, 462 und 464 darin ersetzt durch einzelne Glycin-Kodons) exprimiert wurden, wurden verglichen mit den Polypeptiden, die von pAD4/WT-transformierten COS-1-Zellen ausgeschieden wurden. Um den Vergleich vorzunehmen, wurde mit ^{35}S-Methionin versetztes Kulturmedium aus jeder Kultur einer Immunpräzipitation unter Verwendung gleicher Mengen von NMC-4- und RG-46-Anti-vWF-Antikörpern unterzogen (Beispiel 11), um die sekretierten vWF-abgeleiteten Proteine zu sammeln. Die immunpräzipitierten vWF-Polypeptide wurden dann durch Autoradiographie der ^{35}S-Markierung auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. In Kulturextrakten von pAD4/Δ3C-transformierten Zellen unter nichtreduzierenden Bedingungen konnte kein 116-kDa-Polypeptid detektiert werden. Stattdessen wurde sowohl unter reduzierenden als auch unter nichtreduzierenden Bedingungen eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 52 kDa beobachtet. Im Gegensatz dazu produzieren die pAD4/WT-transformierten COS-1-Zellen unter nichtreduzierenden Bedingungen wie erwartet ein Polypeptid mit dem apparenten Molekulargewicht von 116 kDa.

[0149] Das Immunpräzipitationsverfahren wurde auch unter alleiniger Verwendung konformationsabhängigen NMC-4-Antikörpers wiederholt (Beispiel 12). Der wichtigste aus dem Kulturmedium von pAD4/WT-transformierten Zellen isolierte vWF-abgeleitete Bestandteil wies unter nichtreduzierenden Bedingungen erneut ein apparentes Molekulargewicht von 116 kDa und von 52 kDa unter reduzierenden Bedingungen auf. Eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 52 kDa wurde unter nichtreduzierenden Bedingungen auf Gelen von pAD4/Δ3C-abgeleitetem Polypeptidmaterial festgestellt. Wie in Beispiel 12 beschrieben, ist die Reaktivität mit einem NMC-4-Antikörper ein wichtiger Hinweis, daß das in pAD4/Δ3C-transformierten Zellen detektierte 52-kDa-Fragment die Tertiärstruktur der natürlichen Rest-441–730-Domäne aufweist.

[0150] Das Immunpräzipitationsverfahren wurde auch eingesetzt, um NMC-4-reaktive-vWF-Polypeptide festzustellen, die von pAD4/Δ1C-transformierten COS-1-Zellen produziert wurden, die unter Bedingungen kultiviert wurden, die jenen für pAD4/WT- und -Δ3C-Transformanten in Gegenwart von ^{35}S-Methionin ähnelten. Immunpräzipitierte Proteine wurden unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen laufengelassen und mit vWF-Polypeptiden verglichen, die durch pAD4/WT- und pAD4/Δ3C-Transformanten hergestellt wurden (Beispiel 13).

[0151] Es wurde ermittelt, daß die Substitution jedes der Cystein-Reste 459, 462 und 464 durch Glycin vorwiegend zu einem Polypeptid führt, das unter nichtreduzierenden oder reduzierenden Bedingungen ein apparentes Molekulargewicht von 52 kDa aufweist, wobei die Bildung der 116-kDa-Spezies verhindert wurde.

[0152] Das apparente Molekulargewicht von 52 kDa für rekombinante Polypeptide, die von COS-1-Zellen abgeleitet erhalten wurden, die entweder mit pAD4/Δ3C- oder pAD4/Δ1C-Plasmiden transformiert wurden, stimmt damit überein, daß diese Polypeptide Monomere des 441–730-Fragments sind, während sie ebenfalls einen Glykosylierungsgrad aufweisen, der äquivalent ist zu demjenigen, der bei dem 52-kDa-Polypeptid beobachtet wird, wie es bei tryptischem Verdau und Reduktion des reifen (zirkulierenden) Plasma-vWF isoliert wurde.

[0153] Anders als die dimeren Polypeptide mit apparentem Molekulargewicht von 116 kDa sind die monomeren 52-kDa-Polypeptide, die von pAD4/Δ1C- und pAD4/Δ3C-Plasmiden hergestellt wurden, wahrscheinlich nicht in der Lage, die Überbrückungsfunktion auszuüben, die mit dem Dimer verbunden ist. Entsprechend kann die Blutplättchen-Aktivierung und/oder -Aggregation verhindert werden durch Inkontaktbringen von Blutplättchen mit einer wirksamen Menge eines rekombinanten 52/48-kDa-Polypeptids, wobei das Polypeptid im Vergleich zu nicht mutierten (Wildtyp-) rekombinanten 52/48-kDa-Polypeptiden eine zumindest wesentlich verminderte Tendenz zeigt, zu dimerisieren.

[0154] Die Anheftung von Blutplättchen an Oberflächen kann auch verhindert werden durch Inkontaktbringen von Blutplättchen mit einer wirksamen Menge eines mutierten rekombinanten 52/48-kDa-Polypeptids, das im Vergleich zu nicht mutierten rekombinanten 52/48-kDa-Polypeptiden mindestens eine wesentlich verminderte Tendenz zeigt, zu dimerisieren.

[0155] In 441–730-vWF-Fragmenten sind zusätzlich zu den GPIbα-Bindungsstellen potentielle Bindungsstellen für Kollagen (ungefähr die Reste 542–622) und Glykosaminoglykane und Proteoglykane (ebenfalls innerhalb der Rest-509–695-Disulfid-Schleife) enthalten. Es ist aufgrund sterischer Erwägungen möglich, daß ein einzelnes die Reste 441–730 umfassendes Fragment nicht wirksam als ein brückenbildendes, potentiell thrombotisches, Molekül fungieren könnte. Es wird jedoch darauf hingewiesen, daß, solange die GPIb(α)-Bindungsdomäne des 52/48-kDa-Monomers (bestehend aus ungefähr den Primärsequenzbereichen 474–488 und 694–708 und einer tertiären Domäne davon, die teilweise durch die 509–695-Disulfidbindung beigetragen wird)

erhalten bleibt, andere Bereiche (wie beispielsweise ein Teil der Heparin- und Kollagen-Bindungsschleife) des monomeren 52/48-kDa-Fragments, falls erforderlich, beispielsweise durch Proteolyse oder durch Mutagenese entfernt oder verändert werden könnten, um die antithrombotischen therapeutischen Eigenschaften davon zu modifizieren oder zu erhalten.

[0156] Es ist auch möglich, daß eine gewisse strukturelle Faltung oder Disulfidbindungsbildung, die mit der Erzeugung von therapeutisch wirksamen Konformationen von rekombinanten 52/48-kDa-Monomeren oder dem Disulfidaustausch darin verbunden ist, auftritt, nachdem die Polypeptide aus einer Wirtszelle ausgeschieden wurden.

[0157] Diese Erfindung definiert eine Reihe von Polypeptiden, die Aminosäuresequenzen (Domänen) der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit entsprechen. Die Polypeptide sind in der Lage, die Bindung von Blutplättchen-Glykoprotein Ibα an den von-Willebrand-Faktor zu hemmen und weisen dementsprechend eine Eignung als Antithrombotika auf.

[0158] Fugimura, Y. et al., J. Biol. Chem., 261, 381–385 (1986) definierten ein reduziertes und alkyliertes Fragment der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit, beginnend am Aminosäurerest Val^{449}, das die Domäne des mit Glykoprotein Ibα wechselwirkenden Proteins enthielt. Die weitere Charakterisierung der Domäne, Fugimura, Y. et al., J. Biol. Chem., 262, 1734–1739 (1987), ergab, daß sie ihren Carboxy-Terminus am Rest Lys^{728} aufweist. Mohri, H. et al., J. Biol. Chem. 263, 17901–17904 (1988) stellten fest, daß eine GPIbα-Bindungsdomäne von vWF durch zwei in dem Fragment enthaltene diskontinuierliche Sequenzen, Cys^{474}-Pro^{488} und Leu^{694}-Pro^{708}, gebildet wurde, die im nativen vWF durch Disulfidbindung in korrekter Konformation gehalten wird, obwohl die Autoren nicht in der Lage waren, die Cystein-Reste, die die stabilisierenden Bindungen bildeten, zu identifizieren und festzustellen, ob diese Bindungen intramolekular oder intermolekular waren. Es ist anschließend festgestellt worden, daß eine intramolekulare Disulfidbindung (Cystein 509–695) für die Regulierung der Funktion der zwei diskontinuierlichen Positionen von Bedeutung ist. Es sind weitere Bereiche (Domänen) innerhalb des tryptischen 449–728-Fragments von vWF identifiziert worden, die dessen Wechselwirkung mit Blutplättchen-Glykoprotein Ibα beeinflussen und dadurch für die Entwicklung von antithrombotischen Polypeptiden nützlich sind. Insbesondere ist festgestellt worden, daß die Modifikation der intramolekularen Disulfid-Schleife (zwischen Cys^{509} und Cys^{695}) die Affinität von vWF für Glykoprotein Ibα reguliert. Ware, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2946–2950 (1991), haben bei einem Patienten, der an Typ IIb der von-Willebrand-Krankheit litt, eine Punktmutation identifiziert, die die Affinität des von-Willebrand-Faktors zu Blutplättchenmembran-Glykoprotein Ibα erhöhte. Die identifizierte Mutation, Trp^{550} zu Cys^{550}, tritt innerhalb der Schleifenregion von Cys^{509} bis Cys^{695} von vWF auf. Cooney, K. A. et al., Blood, 76 (Beiheft 1), Abstract 1661, Seite 418a, 15. November 1990, identifizieren weitere phänotypische Typ-IIb-Mutationen, Arg^{543} zu Trp^{543} und Val^{553} zu Met^{553} von der Schleife. Weitere zusätzliche Mutationen bei Patienten mit von-Willebrand-Krankheit vom Typ-II- oder Typ-IIb-artigen Symptomen schließen die Schleifenmutationen Arg^{511} zu Trp^{511} und Gly^{561} zu Asp^{561} ein.

[0159] Hierin beschrieben (Beispiel 14–17) sind Experimente, um die Identität von Domänen eines 449–728-Fragments des von-Willebrand-Faktor-Polypeptids mit antithrombotischem Nutzen zu definieren. Beispiel 15 der Erfindung beschreibt Verfahren der ortsgerichteten oder "Loopout"-Mutagenese, wobei DNA-Sequenzen, die zum Beispiel ein Rest-441–733-Fragment der von-Willebrand-Faktor-Untereinheit kodieren, verwendet wurden, um DNA-Subsequenzen herzustellen, die antithrombotische Domänen des von-Willebrand-Faktor-Fragments kodieren.

[0160] Unter den Polypeptiden, die gemäß dieser Verfahren hergestellt wurden, waren folgende: (A) Polypeptide, die aus der Sequenz mit den Resten 441–733 bestehen, denen jedoch entweder die Subsequenz mit den inneren Resten 474–488 oder den Resten 694–708 fehlte; (B) weitere Polypeptid-Domänen des vorgenannten Fragments, umfassend N-terminale Deletionen, zum Beispiel Gly^{475}-Val^{733}, Thr^{492}-Val^{733} und Tyr^{508}-Val^{733}; (C) Polypeptide, die C-terminale Deletionen umfassen, d. h., einen Aminoterminus an Arg^{441}, jedoch Carboxytermini zum Beispiel an den Resten Asp^{709}, Pro^{704}, Glu^{700} und Asp^{696} aufweisen; und (D) eine letzte Klasse von Polypeptiden, die Domänen umfaßt, bei denen sowohl N-terminale als auch C-terminale Deletionen aufgetreten sind.

[0161] Die antithrombotischen Polypeptide dieser Ausführungsform der Erfindung sind in **Fig. 2** dargestellt. Die erfindungsgemäßen Polypeptide umfassen eine oder drei Domänen und haben eine Sequenz von Aminosäuren gemeinsam, die der Domäne der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit entspricht, die einen Aminoterminus an Cys^{509} und einem Carboxyterminus an Cys^{695} aufweist. Polypeptiden, die diese Domäne enthalten, fehlt eine intramolekulare 509–695-Disulfidbindung.

[0162] Typischerweise erfordert die Aufrechterhaltung der reduzierten Form die Reduktion und anschließende chemische Alkylierung der Cysteine oder deren Substitution durch andere Aminosäuren auf Grundlage einer Modifikation einer kodierende DNA.

[0163] Zusätzliche erfindungsgemäße Polypeptide umfassen die vorgenannte Cys^{509}-Cys^{695}-Domäne und umfassen ebenfalls eine, an den Aminoterminus der Domäne angeheftete, zusätzliche "zweite" Domäne, die eine Sequenz von Aminosäuren umfaßt, die dem Fragment der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit entspricht, das einen Aminoterminus an Arg^{441} und einen Carboxyterminus an Tyr^{508} aufweist, oder ein Unterfragment oder eine Kombination von Unterfragmenten davon.

[0164] Weitere erfindungsgemäße Polypeptide umfassen die vorgenannte Cys^{509}-Cys^{695}-Domäne und umfassen ebenfalls, eine an den Carboxyterminus der Cys^{509}-Cys^{695}-Domäne angeheftete dritte oder "andere Domäne" einer Aminosäuresequenz entsprechend der des Fragments der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit, dessen Aminoterminus an Asp^{695} liegt und dessen Carboxyterminus an Val^{733} liegt, oder ein Unterfragment oder eine Kombination von Unterfragmenten davon.

[0165] Ein weiterer Typ von erfindungsgemäßem Polypeptid umfaßt eine Domäne, die von der Sequenz der Aminosäuren von Cys^{509}-Cys^{695} beigesteuert wird, und Polypeptide, die von den beiden vorgenannten zweiten und dritten Domänen beigesteuert werden.

[0166] Die erfindungsgemäßen Polypeptide wurden daher in In-vitro-Tests auf potentielle antithrombotische Aktivität getestet. Eine Diskussion der Eigenschaften der erfindungsgemäßen Polypeptide ist in den Beispielen 14 bis 17 wiedergegeben.

[0167] Antikörper, insbesondere konformationsabhängige Antikörper, sind mächtige Werkzeuge für die Analyse der Struktur und Funktion von Makromolekülen. Durch Blockierung makromolekularer Wechselwirkungen können Antikörper auch einen wichtigen therapeutischen Nutzen haben.

[0168] Entsprechend beinhaltet die vorliegende Erfindung in ihrem Bereich einen Antikörper, der spezifisch ist für ein Polypeptid, das in der Lage ist, die Bindung von vWF an Blutplättchen zu hemmen, wobei der Antikörper ein Epitop erkennt, das zwischen den Aminosäureresten Cys^{509} und Cys^{695} der reifen vWF-Untereinheit lokalisiert ist, und wobei der Antikörper durch ein Verfahren hergestellt ist, das die Immunisierung von Tieren mit einem oder mehreren durch die Erfindung definierten Polypeptiden beinhaltet.

[0169] Ein oder mehrere der erfindungsgemäßen Polypeptide können für therapeutische, diagnostische oder andere Zwecke in pharmazeutischen Zusammensetzungen formuliert sein. Zu ihrer Herstellung zwecks intravenöser Verabreichung werden die Zusammensetzungen in Wasser gelöst, das üblicherweise auch ein oder mehrere physiologisch kompatible Substanzen wie Natriumchlorid enthält. Es wird eine Lösung erhalten, die einen pH, eine Ionenstärke und ein osmotisches Potential aufweist, das mit therapeutischen Verwendungen vereinbar ist (wobei der Bereich der möglichen Konzentrationen gelöster Stoffe in der Fachwelt gut bekannt ist oder leicht bestimmbar), wobei das Wasser und die physiologisch annehmbaren kompatible Substanzen einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfassen.

[0170] Hinsichtlich der therapeutischen Verwendung der erfindungsgemäßen Polypeptide hängt die zur Verhinderung oder Hemmung von Thrombose zu verabreichende Menge von der Affinität des Polypeptids für GPIbα in vivo und/oder für andere Makromoleküle, die an der Hämostase und Thrombose im Körper beteiligt sind, von der Lebensdauer des Polypeptids im Körper und von der Schwere, mit der der Patient von Thrombose betroffen ist, ab. Die Menge kann für jeden Patienten leicht bestimmt werden.

[0171] Es liegt auch innerhalb der Ausübung der Erfindung, eine therapeutische Zusammensetzung bereitzustellen, die ein oder mehrere der erfindungsgemäßen Polypeptide und auch zusätzliche therapeutische Substanzen enthält. Solche zusätzlichen Substanzen schließen Heparin und andere Antikoagulanzien, Aspirin oder andere Anti-Blutplättchen-Arzneimittel oder Gewebeplasminogenaktivator oder andere präfibrinolytische Arzneimittel ein.

Beispiele

[0172] Die folgenden Beispiele sind repräsentativ für die Ausübung der Erfindung.

Beispiel 1 – Expression eines mutierten cysteinfreien Fragments der reifen von Willebrand-Faktor-Untereinheit mit einem Aminoterminus an Rest 441 (Arginin) und einem Carboxyterminus an Rest 733 (Valin)

Herstellung eines cDNA-Klons von Prä-pro-von-Willebrand-Faktor-mRNA

[0173] Ein das vollständige von-Willebrand-Faktor-Gen (für das Prä-Propeptid) kodierender cDNA-Klon wurde von Dr. Dennis Lynch, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, bereitgestellt, und wurde wie in Lynch, D. C. et al., Cell, 41, 49–56 (1985) beschrieben angesetzt. Es ist als möglich angesehen worden, daß die Größe der vWF-mRNA diejenige von menschlicher rRNA vom Typ 28S übersteigen würde. Entsprechend wurde die Gesamt-RNA aus Endothelzellen (die Hauptquelle für Plasma-vWF) in Saccharosegradienten sedimentiert, wobei RNA größer 28S für die Konstruktion einer cDNA-Bibliothek ausgewählt wurde.

[0174] Diese angereicherte Fraktion wurde weiter unter Verwendung zweier separater Zyklen von Poly(U)-Sephadex®-Chromatographie aufgereinigt, um die RNA-Spezies (mRNA) mit 3'-polyadenylierten Enden zu selektieren. Lynch et al., oben, schätzten das Vorherrschen von vWF-mRNA in dieser Fraktion zu etwa 1 in. 500, wobei diese Fraktion zur Erzeugung einer cDNA-Bibliothek von ungefähr 60.000 unabhängigen Rekombinanten verwendet wurde.

[0175] Um die cDNA-Bibliothek zu erzeugen, wurden Standardtechniken verwendet. Die mRNA-Population wurde unter Verwendung eines Oligo(dT)-Primers vorbereitet und dann mit einer reversen Transkriptase transkribiert. Die RNA-Stränge wurden dann durch alkalische Hydrolyse entfernt, wodurch antikodierende cDNA-Stränge (äquivalent zu transkribierten Strängen) zurückblieben, die dann durch Haarnadelschleifenbildung für die Synthese des zweiten Strangs unter Verwendung von DNA-Polymerase I vorbereitet wurden. Die Haarnadelschleife wurde mit S1-Nuklease entfernt und rauhe enden wurden mit DNA-Polymerase I repariert.

[0176] Anschließend wurde GC-Tailing, Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, 2. Aufl., Bd. 1, S. 5.56 (1987) eingesetzt, um die cDNA mit dem Plasmid-Vektor pBR322 zusammenzubringen (Annealing). Mit terminaler Transferase wurden dann Oligo(dC)-Schwänze an die cDNA-Fragmente angefügt und an mit Oligo(dG)-Schwänzen versehenem pBR322 angelagert. Die Plasmide wurden zur Vermehrung in den ampicillinsensitiven E.-coli-Stamm HB101 transformiert. Geeignete Klone wurden identifiziert nach Screening mit ^{32}P-markierter cDNA, die als Reverse-Transkriptase-Produkt von immungereinigten vWF-Polysomen hergestellt wurde. Positive Klone wurden in pSP64 subkloniert (Promega Co., Madison, WI).

Primergesteuerte Amplifikation von cDNA

[0177] Eine das Vollängen-Präpro-vWF-Gen von pSP64 repräsentierende cDNA wurde einer enzymatischen Amplifikation in einer Polymerasekettenreaktion unterworfen. Basierend auf der bekannten Nukleotidsequenz des Präpro-vWF-Gens, Bonthron, D. et al., Nucl. Acids Res., 14 (17), 7125–7127 (1986); Mancuso, D. et al., J. of Biological Chemistry, Bd. 264(33), 19514–19527 (1989) wurden Oligonukleotide (bezeichnet als (1), SEQ ID NO: 2 und (2) SEQ ID NO: 3) hergestellt, die den interessierenden Bereich flankieren. Alle hier verwendeten Oligonukleotide wurden durch das Phosphoramidit-Verfahren, Sinha et al., Tetrahedron Letters, 24, 5843 (1983) unter Verwendung eines automatisierten Systems Modell 380B, Applied Biosystems, Foster City, CA, synthetisiert.

Oligonukleotid (1) (SEQ ID NO: 2)

5'ACGAATTC CGG CGT TTT GCC TCA GGA3'

EcoRI Arg_{441} Gly_{446}

Oligonukleotid (2) (SEQ ID NO: 3)

3'GG GAC CCC GGG TTC TCC TTG AGG TAC CAT TCGAAG5'

5'cc ctg ggg ccc aag agg aac tcc atg gta agcttc3'

Leu_{725} Met_{732} Val_{733} HindIII

[0178] Die Oligonukleotide überlappen die Enden der kodierenden Region für dieses Fragment der reifen vWF-Untereinheit, die durch Verdau mit Trypsin hergestellt werden kann und die mit Rest 449 (Valin) beginnt und mit Rest 728 (Lysin) endet. Oligonukleotid (1) entspricht dem kodierenden DNA-Strang (analog zur mRNA)

für die Aminosäurepositionen 441 bis 446 und fügt 5' zu dem Kodon für Aminosäure 441 eine EcoRI-Restriktionsschnittstelle hinzu.

[0179] Oligonukleotid (2) entspricht dem nichtkodierenden Strang (transkribierten Strang) der reifen vWF-DNA für die Aminosäurepositionen 725–733 und fügt 3' zu dem Kodon für Aminosäure 733 eine HindIII-Restriktionsschnittstelle hinzu. Der zu (2) komplementäre kodierende Strang ist in Kleinbuchstaben wiedergegeben.

[0180] Unter Verwendung der obigen Oligonukleotide mit der Vollängen-cDNA als Matrize wurde dann in einer Polymerasekettenreaktion nach dem Verfahren von Saiki, R. K. et al., Science 239, 487–491 (1988) ein cDNA-Fragment synthetisiert, das den Resten Nr. 441–733 des reifen vWF entspricht und EcoRI- und HindIII-Linker enthält.

[0181] Das Verfahren verwendet einen Abschnitt doppelsträngiger vWF-cDNA, von dem ein Unterabschnitt zu amplifizieren ist, und zwei einzelsträngige Oligonukleotid-Primer (in diesem Fall die Oligonukleotide (1), (2)), die die Enden des Unterabschnitts flankieren. Die Primer-Oligonukleotide (in Gegenwart einer DNA-Polymerase und Desoxyribonukleotid-Triphosphaten) wurden in sehr viel höherer Konzentration als die zu identifizierende DNA zugegeben.

[0182] Insbesondere wurden PCR-Reaktionen mit einem Thermocycler (Perkin Elmer Co., Norwalk, CT/Cetus Corporation, Berkeley, CA) unter Verwendung von Taq-Polymerase (Thermus aquaticus) durchgeführt. Die Reaktionen wurden durchgeführt in Volumen von 100 µl enthaltend 1,0 µg Präpro-vWF-cDNA, 1,0 µg von jedem synthetischen Oligonukleotid-Primer und Puffer bestehend aus 50 mM KCl, 10 mM Tris·HCl (pH 8,3), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,1% Gelatine (BioRad Co., Richmond, CA) und 200 mM jedes dNTPs. Die PCR-Bedingungen waren 35 Zyklen von 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 52°C und 1 Minute bei 72°C. Die amplifizierten Fragmente wurden dann gereinigt und mittels Elektrophorese durch ein 2%-Agarose-Gel isoliert, Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 164–170, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY (1982).

[0183] Die große Mehrheit der Polynukleotide, die sich nach mehreren Runden Denaturierung, Oligonukleotid-Anlagerung und Synthese anhäufen, repräsentieren den gewünschten doppelsträngigen cDNA-Unterabschnitt, der für die weitere Amplifikation durch Klonierung geeignet ist.

[0184] Für einige Experimente wurde eine dem reifen an der Aminosäuresequenzposition 441 beginnenden und an Position 733 endenden vWF-Fragment entsprechende cDNA direkt aus Blutplättchen-mRNA nach dem Verfahren von Newman, P. J. et al., J. Clin. Invest., 82, 739–743 (1988) hergestellt und amplifiziert. Die Primer-Nukleotide Nr. 440 und 733 wurden wie vorher mit der resultierenden EcoRI und HindIII-Linker enthaltenden cDNA verwendet.

Insertion von cDNA in M13mp18-Klonierungsvehikel

[0185] Die erhaltene doppelsträngige von-Willebrand-Faktor-cDNA entsprechend den Aminosäuresequenzen von Rest 441 bis 733 wurde dann unter Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII in die doppelsträngige replikative Form des Bakteriophagen M13mp18, der eine multiple Klonierungsstelle mit kompatiblen EcoRI- und HindIII-Sequenzen enthält, inseriert.

[0186] Filamentöse Phagen der M13-Serie infizieren männliche (F-Faktor enthaltende) E.-coli-Stämme. Die infektiöse Form des Virus wird repräsentiert durch einzelsträngige DNA, den ($^+$)-Strang, der durch die meisten Wirtsenzyme in eine doppelsträngige zirkuläre Form konvertiert wird, die auch den Minus($^-$)-Strang enthält, wobei die doppelsträngige Struktur als die replikative Form (RF) bezeichnet wird. Die Fähigkeit, eine stabile einzelsträngige ($^+$)-Form des Virus zu isolieren, ist besonders nützlich, um die Integrität irgendeiner darin klonierten Sequenz zu verifizieren. Siehe Messing, J., Meth. Enzymology 101, 20–78 (1983); Yanish-Perron, C. et al., Gene, 33, 103–109 (1985).

[0187] Entsprechend wurde das vWF-cDNA-Insert unter Einsatz des Einzelstrang-Didesoxy-Verfahrens (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 74, 5463–5467 (1977)), unter Verwendung der einzelsträngigen ($^+$)-Form von M13mp18, vollständig sequenziert, um zu bestätigen, daß das vWF-cDNA-Fragment die korrekte kodierende Sequenz für die Reste 441–733 der reifen vWF-Untereinheit enthielt.

[0188] Die Cysteinreste 459, 462, 464, 471, 474, 509 und 695 innerhalb des reifen, den Aminosäuren 641 bis 733 entsprechenden vWF-Fragments, wurden mit Glycinresten durch Substitution von Cystein-Kodons durch Glycin-Kodons in der entsprechenden cDNA ersetzt. Um dies zu erreichen, wurden Oligonukleotide (siehe Sequenzprotokoll ID NO: 5–8), die die Region jedes Cystein-Kodons der vWF-cDNA umfassen, als nichtkodierender Strang (transkribierter Strang) mit den entsprechenden Basensubstitutionen, die zur Ersetzung von Cystein durch Glycin erforderlich waren, hergestellt. Die verwendeten Oligonukleotide waren die folgenden:

Oligonukleotid (3) (SEQ ID NO: 4)

```
3'GGA CTC GTG CCG GTC TAA CCC GTG CAA CTA CAA CAGS'
5'cct gag gac ggc cag att ggc cac ggt gat gtt gtc3'
  Pro Glu His Gly Gln Ile Gly His Gly Asp Val Val
               459         462     464
```

(gleichzeitige Ersetzung der Cysteine 459, 462, 464)

Oligonukleotid (4) (SEQ ID NO: 5)

```
3'TTG GAG TGG CCA CTT CGG CCG GTC CTC GGC5'
5'aac ctc acc ggt gaa gcc ggc cag gag ccg3'
  Asn Leu Thr Gly Glu Ala Gly Gln Glu Pro
               471         474
```

(gleichzeitige Ersetzung der Cysteine 471, 474)

Oligonukleotid (5) (SEQ ID NO: 6)

```
3'CTA AAG ATG CCG TCG TCC G5'
5'gat ttc tac ggc agc agg c3'
  Asp Phe Tyr Gly Ser Arg
               509
```

(Ersetzung von Cystein 509)

Oligonukleotid (6) (SEQ ID NO: 7)

```
3'TCG ATG GAG CCA CTG GAA CGG5'
5'agc tac ctc ggt gac ctt gcc3'
  Ser Tyr Leu Gly Asp Leu Ala
               695
```

(Ersetzung von Cystein 695).

[0189] Hybridisierende Oligonukleotide sind in Großbuchstaben wiedergegeben und entsprechen dem transkribierten Strang (nicht kodierende DNA). Der entsprechende kodierende Strang ist in Kleinbuchstaben mit den entsprechenden Aminosäuren in Form der Standard-Drei-Buchstaben-Bezeichnungen dargestellt (für die Bezeichnungen siehe Tabelle 1).

[0190] Wie unten ausgeführt, wurden die Cysteine 459, 462 und 464 gleichzeitig unter Verwendung von Oligonukleotid (3) ersetzt. Die Cysteinreste 471 und 474 wurden anschließend gleichzeitig unter Verwendung des Oligonukleotids (4) ersetzt. Die Cysteinreste 509 und 695 wurden dann einzeln unter Verwendung der Oligo-

nukleotide (5) beziehungsweise (6) ersetzt.

[0191] Die Cystein-zu-Gycin-cDNA-Ersetzungen wurden vorgenommen nach dem Verfahren von Kunkel, T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488–492 (1985), wobei das Verfahren eine Reihe von Schritten für jedes Oligonukleotid wiederholt und Bedingungen ausnutzt, die gegen eine uracilhaltige DNA-Matrize selektieren:

(A) M13mp18-Phage, enthaltend Wildtyp-vWF-cDNA entsprechend den Aminosäurepositionen 441 bis 733, wird in einem mutierten E.-coli-CJ236-dut$^-$ung$^-$-Stamm in einem uracilreichen Medium angezogen. Da dieser E.-coli-Stamm keine Desoxythymidin-Triphosphatase aufweist (dut$^-$), sammelt sich ein intrazellulärer Pool von dUTP an, der mit dTTP um den Einbau in DNA konkurriert. (Siehe Shlomai, J. et al., J. Biol. Chem., 253 (9), 3305–3312 (1978). Virale DNA, die unter diesen Bedingungen synthetisiert wurde, schließt mehrere Uracil-Insertionen pro viralem Genom ein und ist nur in einem E.-coli-Stamm stabil, der unfähig ist, Uracil abzubauen, wie beispielsweise (ung$^-$)-Stämme, denen Uracil-Glykosylase fehlt. Uracilhaltige Nukleotide sind bei einzelsträngiger ($^+$)-M13mp18-DNA in ung$^+$-Stämmen aufgrund der Bildung von basenfreien ("abasic") Stellen durch Uracil-Glykosylase letal.

(B) Einzelsträngige virale ($^+$)-DNA wird aus Kulturmedien isoliert, in denen Phagen im E.-coli-Stamm CJ236 dut$^-$ung$^-$ angezogen wurden. Die einzelsträngige ($^+$)-Form des Virus enthält die spezifizierte vWF-cDNA an ihrer multiplen Klonierungsstelle, wobei die cDNA äquivalent zu dem nichttranskribierten vWF-DNA-Strang ist.

(C) Oligonukleotid (3), welches Kodon-Änderungen enthält, die erforderlich sind, um Cysteine durch Glycine an den Positionen 459, 462 und 464 zu ersetzen, wird dann in vitro an einzelsträngige ($^+$)-Phagen-DNA angelagert. Grundsätzlich ist bei diesem Verfahren ein weiter Bereich von
Oligonukleotid-Konzentrationen geeignet. Üblicherweise wurden 40 ng Oligonukleotid an 0,5–1,0 µg M13mp18-Phagen-($^+$)-DNA angelagert.

(D) Alle fehlenden Sequenzen des M13mp18($^-$)-Strangs werden dann in vitro unter Verwendung von T7-DNA-Polymerase und T4-DNA-ligase in einer dTTP-reichen Umgebung vervollständigt, wobei eine transkribierbare vWF-cDNA-Sequenz erzeugt wird, die den Aminosäurepositionen 441 bis 733 der reifen vWF-Untereinheit entspricht.

(E) Der doppelsträngige M13mp18-Phage, nun einen normalen Thymin-($^-$)-Strang und einen ($^+$)-Strang mit mehreren Uracil-Substitutionen enthaltend, wird in einen Wildtyp-Stamm E. coli-XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA) transformiert, der normale Niveaus von Uracil-Glykosylase und Desoxyuridin-Triphosphatase enthält.

(F) Uracil-Glykosylase und andere Enzyme, die in dem neuen Wirt vorhanden sind, initiieren die Zerstörung des uracilhaltigen ($^+$)-Strangs des doppelsträngigen Phagen, was nach Replikation von verbliebener Phagen-($^-$)-Strang-DNA zum Vorliegen von stabiler thymin-normaler doppelsträngiger (RF-) DNA führt, welche die durch die Oligonukleotide induzierten Glycinmutationen widerspiegelt.

(G) Die Schritte (A) bis (F) des obigen Verfahrens werden dann für jedes der Oligonukleotide (4), (5) und (6) wiederholt, bis jedes aufeinanderfolgende Cystein-Kodon der vWF-Sequenz innerhalb des M13mp18-Phagen durch ein Glycin-Kodon ersetzt wurde.

(H) Nach Vervollständigung der Mutagenese-Verfahren wurde die Sequenz des vWF-cDNA-Inserts erneut unter Verwendung des Einzelstrang-DNA-Didesoxyverfahrens bestätigt (Sanger, F., et al., oben).

Konstruktion von Expressionsplasmiden

[0192] Das 7 ortsspezifische Cystein-zu-Glycin-Mutationen enthaltende doppelsträngige vWF-cDNA-Fragment wird dann durch Behandlung mit EcoRI- und HindIII-Restriktionsendonukleasen aus dem M13mp18-Phagen entfernt, wonach die Enden des Fragments mit BamHI-Linkern für die Klonierung in einen hocheffizienten E-coli-Expressionsvektor modifiziert werden (Roberts, R. J. et al. Nature, 265, 82–84 (1977)). Der besondere gewählte Expressionsvektor ist der Plasmid pET-3A, entwickelt von Rosenberg, A. H. et al., Gene, Bd. 56, 125–135, (1987), der ein pPR322-Derivat ist, das einen hocheffizienten (Φ10)-T7-Transkriptionspromotor in direkter Nachbarschaft zu der BamHI-Linker-Stelle enthält. Wenn das pET-3A-Vehikel das obengenannte Fragment mutierter vWF-cDNA enthält, wird es als "p7E" oder p7E-Expressionsplasmid bezeichnet.

[0193] Ein zweiter pET-3A-abgeleiteter Expressionsplasmid (bezeichnet als p7D) wurde konstruiert, der die identische, in entgegengesetzter Orientierung in das Plasmid klonierte, kodierende vWF-Sequenz enthielt. p7D sollte unfähig sein, daß vWF-Polypeptid-Fragment zu exprimieren.

[0194] Ein dritter Expressionsplasmid (pJD18) enthielt tryptische Wildtyp-52/48-vWF-Fragment-cDNA, die die vWF-Aminosäuresequenz zwischen den Resten 441 und 733 kodiert, (mit 7 Cysteinen) in demselben pET-3A-Vektor.

[0195] Die p7E-(oder p7D- und pJD18-)Expressionsplasmide wurden dann nach einem gut bekannten Protokoll, Hanahan, D. J., Mol. Biol. 166, 557–580 (1983) in einen ampicillinsensitiven E.-coli Stamm BL21(DE3), Novagen Co., Madison WI, kloniert.

[0196] Stamm BL21(DE3) ist technisch verändert und enthält ein Gen für T7-RNA-Polymerase, so daß das vWF-Insert mit hoher Effizienz transkribiert werden kann.

Expression von mutierten vWF-Polypeptiden

[0197] Drei separate Proben vom E.-coli-Stamm BL21(DE3), enthaltend p7E-, p7D- bzw. pJD18-Expressionsplasmide, wurden in 5–6 ml 2X-YT-Wachstumsmedium, enthaltend 200 µg/ml Ampicillin, angeimpft und über Nacht bei 37°C angezogen, um ausgewachsene Kulturen zu erzeugen. 2X-YT-Wachstumsmedium enthält, pro Liter Wasser, 10 g Bacto-Trypton, 10 g Hefeextrakt und 5 g NaCl. Fünf ml jeder Übernacht-Kultur wurden dann in 500 ml 2X-YT-Medium, erneut 200 µg/ml Ampicillin enthaltend, angeimpft und für 2 Stunden bei 37°C unter Schütteln angezogen.

[0198] Nach der 2-stündigen Inkubationsdauer wurden die Kulturen durch Zugabe von Isopropyl-Beta-d-thiogalactopyranosid zu einer Konzentration von 5 mM für die Proteinexpression induziert. Die Inkubation wurde dann über 3 Stunden bei 37°C fortgesetzt.

[0199] Ein hohes Expressionsniveau von vWF-Polypeptid wurde mit p7E und pJD18 erhalten, was zur Erzeugung von zytoplasmatischen Granula oder "Einschlußkörpern" führte, die hohe Konzentrationen an vWF-Polypeptid in im wesentlichen unlöslicher Form enthalten. Die Solubilisierung von vWF-Polypeptid wurde erreicht nach dem folgenden Verfahren. Wie in Beispiel 2 erklärt, reagierten p7E- und pJD18-Extrakte sehr unterschiedlich auf Solubilisierungsverfahren. Siehe Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, 2. Aufl., Bd. 3, Abs. 17.37, (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, für eine allgemeine Diskussion zu den Eigenschaften von Einschlußkörpern und erfolgreichen Manipulationsstrategien hierfür.

[0200] Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 g für 15 Minuten in einem JA-14-Rotor bei 4°C geerntet. Die niedergeschlagenen Zellen wurden in 50 ml eiskaltem Puffer (0,1 M NaCl, 10 mM Tris pH 9,0, 1 mM EDTA) gewaschen und erneut durch Zentrifugation bei 4000 g bei 4°C niedergeschlagen.

[0201] Die Zellniederschläge von p7E-, p7D- und pJD18-Kulturen wurden jeweils in 5 ml Lysepuffer rückgelöst und für 30 Minuten eiskalt gehalten. Der Lysepuffer umfaßt eine Lösung von Saccharose, 25% (Gew./Vol.), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 2 mg/ml Lysozym und 50 mM Tris-Hydrochlorid, eingestellt auf pH 8,0.

[0202] Nach der 30-minütigen Inkubation wurden Teilmengen von 1,0 M $MgCl_2$ und dem $MnCl_2$ zugegeben, um die Lyse-Lösung für jedes Kation auf 10 mM einzustellen. Sechzig µg DNAseI (Boehringer-Mannheim) wurden dann zugegeben und die Inkubation wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten fortgesetzt.

[0203] Zwanzig ml Puffer Nr. 1 (0,2 M NaCl, 2 mM EDTA, und 1% (Gew./Vol.) 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS), 1% (Gew./Vol.) Non-idet 40 und 20 mM Tris-Hydrochlorid, pH 7,5) wurden dann zu der Inkubationsmischung zugegeben. Das unlösliche Material wurde durch Zentrifugation bei 14.000 g (12.000 UPM in einem JP-20-Rotor) für 30 Minuten bei 4°C niedergeschlagen.

[0204] Das relativ unlösliche niedergeschlagene Material, das aus jeder Kultur (welche, ausgenommen im Fall von p7D, die gewünschten Polypeptide enthielt) erhalten wurde, wurde bei 25°C in 10 ml Puffer Nr. 2 (0,5% (Gew./Vol.) Triton X-100-Tensid, 2 mM EDTA, 0,02 M Tris-Hydrochlorid, pH 7,5) gewaschen und ausgiebig verwirbelt. Die Suspension wurde bei 14.000 g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert der Überstand wurde verworfen. Der Vorgang des Resuspendierens des niedergeschlagenen Materials in Puffer Nr. 2, Verwirbelns und Zentrifugierens wurde zweimal wiederholt.

[0205] Jeder Niederschlag wurde dann in 5 ml Puffer Nr. 3 (0,02 M Tris-Hydrochlorid, pH 7,5 und 2 mM EDTA) bei 25°C gewaschen und ausgiebig verwirbelt. Die Suspension wurde dann bei 4°C für 30 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert, wonach der Überstand verworfen wurde und ein Niederschlag von aus Einschlußkörpern erhaltenem Material, der "feuchte Niederschlag") mit einer Tonartinkonsistenz zurückblieb (Hinsichtlich der folgenden abschließenden Schritte, und als Ersatz dafür, siehe auch Beispiel 20, das ein weiteres verbessertes Verfahren auf zeigt).

[0206] Der unlösliche Niederschlag wurde langsam für 2 Stunden in einer bei Raumtemperatur gehaltenen 8 M Harnstofflösung rückgelöst, wonach die Solubilisierung über Nacht bei 4°C fortgeführt wurde. Das harnstofflösliche Material wurde ausgiebig gegen eine Lösung von 0,15 M NaCl, enthaltend 20 mM HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure]) (pH 7,4) ("Hepes-gepufferte Salzlösung") bei 4°C dialysiert.

[0207] Die solubilisieren Peptidextrakte wurden auf ihre Reinheit untersucht (Beispiel 2), in vWF-Bindungshemmungtests eingesetzt (Beispiel 3) oder weiterer Reinigung unterzogen. Weitere Reinigungsschritte sollten nicht verzögert werden und die Proben sollten gekühlt werden.

[0208] Das cysteinfreie vWF-Polypeptid (umfassend die Untereinheitenpositionen 441 bis 733) machte mehr als 75% des aus den Einschlußkörpern nach dem obigen Verfahren solubilisierten Materials aus. Die weitere Reinigung des cysteinfreien mutierten vWF-Polypeptids wurde erreicht durch erneutes Dialysieren des teilweise gereinigten Peptidextraktes gegen 6 M Guanidin-HCl, 50 mM Tris·HCl, pH 8,8, mit anschließender Dialyse gegen 6 M Harnstoff, 25 mM Tris·HCl, 20 mM KCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0. Der Extrakt wurde dann einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie unter Verwendung von Q-Sepharose®-Fast-Flow (Pharmacia, Uppsala, Schweden) für den Anionenaustausch unterzogen. Die Säule wurde mit 6 M Harnstoff, 25 mM Tris·HCl, 20 mM KCl, 0,1 mM EDTA pH 8,0 voräquilibriert. Zur Elution des vWF-Polypeptids wurde derselbe Puffer verwendet, mit der Ausnahme, daß die Konzentration von KCl auf 250 mM angehoben wurde. Polypeptidproben, die für weitere Tests verwendet wurden, wurden gegen 0,15 M NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4, erneut dialysiert. Eine Langzeitlagerung wurde jedoch am besten in Harnstoffpuffer (6 M Harnstoff, 25 mM Tris·HCl, 20 mM KCl, 0,1 mM EDTA pH 8,0) erreicht. Die endgültigen prozentualen Aminosäurezusammensetzungen (durch Säurehydrolyse) des p7E-vWF-Polypeptids waren gut mit Werten vergleichbar, die nach veröffentlichten Sequenzinformationen (Bonthron, D. et al. und auch Mancuso, D. et al., in Beispiel 1, oben; siehe auch **Fig.** 1) vorhergesagt wurden.

Beispiel 2 – Charakterisierung der durch den Expressionsplasmid P7E hergestellten cysteinfreien Mutante des von Willebrand-Faktor-Fragments

[0209] Harnstoffsolubilisierte und dialysierte Polypeptide, die aus Einschlußkörpern von Kulturen, enthaltend die Expressionsplasmide p7E, p7D und pJD18, extrahiert wurden, wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Immunblotting analysiert.

Charakterisierung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

[0210] Die Reinheit und Beschaffenheit der Expressionsplasmidextrakte, die harnstoffsolubilisiert und dann ausgiebig dialysiert worden waren, wurden zunächst unter Verwendung des denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese-Verfahrens von Weber, K. et al., J. Biol. Chem. 244, 4406–4412 (1990), modifiziert durch Laemli, U. K. Nature, 227, 680–685 (1970), unter Verwendung einer Acrylamidgel-Konzentration von 10% analysiert. Die erhaltenen Gele wurden mit Coomassie-Blue gefärbt und verglichen.

[0211] Der Extrakt vom Expressionsplasmid p7E enthält als Hauptkomponente das mutierte von-Willebrand-Faktor-Polypeptid, das mit einem apparenten Molekulargewicht von ungefähr 36.000 Dalton wandert. Das Polypeptid erscheint sowohl unter reduzierenden Bedingungen (Zugabe von zwischen 10 und 100 mM Dithiothreitol "DTT" zur Probe für 5 min bei 100°C, bevor das Gel in einem Puffer laufengelassen wird, der ebenfalls dieselbe DTT-Konzentration enthält) als auch nichtreduzierenden Bedingungen als einzelne Bande, wobei das Ergebnis mit der Substitution von Glycinresten für alle Cysteinreste darin übereinstimmt. Kein vWF-Polypeptid konnte aus Wirtszellen extrahiert werden, die p7D-Expressionsplasmide enthielten, was aufgrund der gegensätzlichen Orientierung des vWF-cDNA-Inserts erwartet wurde.

[0212] Das cysteinhaltige vWF-Polypeptid, das von Wirtszellen mit pJD18-Plasmiden exprimiert wurde und das die Wildtyp-Aminosäuresequenz des 52/48-Fragments enthält (hier repräsentiert durch ein kloniertes Fragment mit den Resten 441 bis 733), verhielt sich unter reduzierenden und nichtreduzierenden Elektrophoresebedingungen unterschiedlich. Die von pJD18 exprimierte Wildtyp-Sequenz bildet intermolekulare Disulfidbrücken, was zu Aggregaten mit hohem Molekulargewicht führt, die nicht in der Lage sind, in das 10%-Acrylamidgel einzutreten. Nach Reduktion (Inkubation mit 100 mM DTT für 5 min bei 100°C) wandert das vWF-Peptid als einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von ungefähr 38.000.

Charakterisierung durch Immunblotting

[0213] Von p7D, p7D und pJD18 exprimierte Polypeptide wurden weiter durch Immunblotting ("Westernblot-

ting") nach einem Standardverfahren, Burnett et al., A. Anal. Biochem., 112, 195–203 (1989) und nach Empfehlungen des Reagenzienanbieters charakterisiert. Proben, die ungefähr 10 µg Protein von den harnstoffsolubilisierten und dialysierten Einschlußkörperextrakten von Wirtszellen (enthaltend p7E-, p7D- und pJD18-Plasmide) enthielten, wurden einer Elektrophorese auf 10% Polyacrylamidgelen unterzogen, Laemli, U. K., Nature, 227, 680–685 (1970), in Gegenwart einer Konzentration von 2% Natriumdodecylsulfat.

[0214] Die Proteine wurden auf Nitrozelluloseblätter (Schleicher und Schuell, Keene, NH) geblottet und immobilisiert, und das Muster wurde dann mittels Immunreaktivität visualisiert.

[0215] Die von-Willebrand-Faktor-spezifischen monoklonalen Antikörper (von Mäusen), die zur Identifikation der Polypeptide verwendet wurden, waren RG-46 (siehe Fugimura, Y. et al., J. Biol. Chem., 261(1), 381–385 (1986), Fulcher, C. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1648–1652 (1982)) und NMC-4 (Shima, M. et al., J. Nara Med. Assoc., 36, 662–669 (1989)), die beide Epitope innerhalb des exprimierten vWF-Polypeptids gemäß dieser Erfindung aufweisen.

[0216] Der nach dem Verfahren von Fraker, P. J. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849–857 (1988)), markierte sekundäre Antikörper (^{125}I-Kaninchen-Antimaus-IgG) wurde für 60 Minuten bei 25°C auf dem Nitrozelluloseblatt inkubiert. Nach dem Spülen wurde das Blatt durch Autoradiographie entwickelt.

[0217] Peptidextrakte von Wirtszellen, die p7E- und pJD18-Expressionsplasmide enthalten, zeigen eine starke Immunreaktivität für RG-46-Antikörper und eine schwächere aber deutliche Affinität für NMC-4-Antikörper. Wie erwartet, zeigen Peptidextrakte von p7D-Plasmiden weder mit RG-46 noch mit NMC-4 eine Immunreaktivität.

Beispiel 3 – Hemmung der botrocetininduzierten Bindung von vWF an Blutplättchen durch das durch p7E exprimierte cysteinfreie mutierte Polypeptid

[0218] Es ist gezeigt worden, daß Botrocetin, extrahiert aus dem Gift von Bothrops jararaca, die In-vitro-Bindung des multimeren von-Willebrand-Faktors an Blutplättchen moduliert (Read, et al., Porc. Natl. Acad. Sci., 75, 4514–4518 (1978)) und daß Botrocetin innerhalb der Region an vWF bindet, die die Aminosäuresequenzpositionen 441–733 (der reifen Untereinheit) und daher die GPIb-Bindungsdomäne enthält (Andrews, R. K. et al., Biochemistry, 28, 8317–8326 (1989)).

[0219] Die harnstoffsolubilisierten und dialysierten Polypeptidextrakte, erhalten (nach dem Verfahren aus Beispiel 1) von Kulturen, die die Expressionsplasmide p7E, p7D und pJD18 enthalten, wurden ohne weitere Reinigung auf ihre Fähigkeit getestet, die Botrocetin-induzierte vWF-Bindung an formalinfixierte Blutplättchen auf dosisabhängiger Basis zu hemmen.

[0220] Formalinfixierte Blutplättchen, hergestellt nach dem Verfahren von MacFarlane, D., et al., Thromb. Diath. Haemorrh. 34, 306–308 (1975), wurden bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit vorgegebenen Verdünnungen von Peptidextrakten vorinkubiert, die aus Kulturen erhalten wurden, die pJD18-, p7D- und p7E-Plasmide enthielten. Anschließend wurden Botrocetin (Sigma, St. Louis, MO) in einer Endkonzentration von 0,4 µg/ml und ^{125}I-markierter multimerer vWF (isoliert von menschlichem Plasma-Kryopräzipitat nach dem Verfahren von Fulcher, C. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1648–1652 (1982), und markiert nach dem Verfahren von Fraker, P. J. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, 849–857 (1978)) zu der Inkubationsmischung zugegeben, und die Menge von an die Blutplättchen gebundenem ^{125}I-vWF wurde bestimmt.

[0221] Die ^{125}I-vWF-Bindung an die Blutplättchen wurde auf 100% Bindung bezogen, die als die Menge von ^{125}I-vWF definiert wurde, die in Abwesenheit von zugefügten Peptidextrakten gebunden wurde.

[0222] Es wurde gezeigt, daß Peptidextrakte von den Expressionsplasmiden p7D und PJD18 (unreduziert und unalkyliert) nicht mit plasmaabgeleitetem vWF um Blutplättchen-GPIb-Rezeptor-Bindungsstellen konkurrieren können. Der Peptidextrakt von Plasmid p7D war in einer dosisabhängigen Weise (bei Verwendung eines Bereichs von 0 bis 100 µg Extrakt/ml) bei der Hemmung der vWF-Bindung wirksam. Die Konzentration von harnstoffsolubilisiertem Polypeptid-Extrakt (µg/ml) in der Inkubationsmischung spiegelt die Gesamtproteinkonzentration des Extrakts wider. Die Zugabe von Peptidextrakten zur Reaktionsmischung verursacht gewisse unspezifische Effekte, die die anfängliche apparente Bindung auf 110% des Werts anheben, der in Abwesenheit der zugegebenen Peptidextrakte gefunden wurde. Die verwendete ^{125}I-vWF-Konzentration betrug 2 µg/ml.

Beispiel 4 – Expression eines mutierten vWF-Fragments mit vermindertem Cysteingehalt, der eine Disulfid abhängige Konformation enthält

[0223] Unter Verwendung des Verfahrens nach Beispiel 1, mit Ausnahme der unten beschriebenen Modifikation, wurde ein mutiertes vWF-Polypeptid-Fragment (entsprechend der Sequenz der reifen vWF-Untereinheit von Rest 441 bis Rest 733) hergestellt, bei dem die Cysteine an den Positionen 459, 462, 464, 471 und 474 jeweils durch einen Glycinrest ersetzt worden waren. Die Cysteinreste wurden an den Positionen 509 und 695 bewahrt und ermöglichten die Bildung einer intramolekularen Disulfidbindung.

[0224] Eine ortsgerichtete Mutagenese wurde nur mit den Oligonukleotiden Nr. 459 und 471 durchgeführt, wobei nur die Glycinkodons an den Positionen 459, 462, 464, 471 und 474 substituiert wurden. Nach Vollendung der Mutageneseprozeduren wurde die Sequenz der mutierten vWF-cDNA unter Einsatz des Einzelstrang-Didesoxy-Verfahrens bestätigt.

[0225] Die doppelsträngige Form des vWF-cDNA-Inserts (enthaltend 5 Cystein-zu-Glycin-Mutationen) wurde dann durch Behandlung mit EcoRI- und HindIII-Restriktionsendonuklease aus dem M13mp18-Phagen entfernt, wie in Beispiel 1 mit BamHI-Linkern modifiziert und in pET-3A kloniert. Das so gebildete pET-3A-Vehikel wird als "p5E" oder p5E-Expressionsplasmid bezeichnet.

[0226] Die p5E-Expressionsplasmide wurden dann nach dem Verfahren von Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166, 557–580 (1983), in den ampicillinsensitiven E.-coli-Stamm BL21(DE3), Novagen Co., Madison, WI, kloniert. Das mutierte p5E-Polypeptid wurde von E.-coli-BL21(DE3)-Kulturen nach dem Verfahren von Beispiel 1 exprimiert, ausgenommen, daß die Solubilisierung von Einschlußkörper-Niederschlagsmaterial in Gegenwart von 8 M Harnstoff über die anfängliche 2-stündige Zeitdauer bei Raumtemperatur, wonach das rückgelöste Material eine Konzentration von 200 µg/ml erreicht hatte, nicht fortgesetzt werden mußte. Die Oxidation der Cysteinreste 509 und 695 zur Bildung einer Disulfidbindung wurde durch Dialyse gegen Hepes-gepufferte Salzlösung über Nacht erreicht. Die Bildung von intramolekularen statt intermolekularen Disulfidbindungen wird gefördert, wenn es ermöglicht wird, die Thiol-Oxidation bei einer niedrigen Proteinkonzentration wie beispielsweise 50–100 µg/ml ablaufen zu lassen.

[0227] Wie in Beispiel 1 hinsichtlich der p7E-Extrakte wurde die endgültige Reinigung der harnstoffsolubilisierten Einschlußkörper-Zubereitungen erreicht durch Dialyse gegen die 6 M Guanidin- und 6 M Harnstoffpuffer mit anschließender Anionenaustausch-Chromatographie.

Beispiel 5 – Charakterisierung des durch den Expressionsplasmid p5E hergestellten mutierten vWF-Fragments

[0228] Die mutierten von-Willebrand-Faktor-Polypeptide, die durch Kulturen, die den Expressionsplasmid p5E enthielten hergestellt wurden, wurden unter Verwendung der Verfahren von Beispiel 2 charakterisiert, und insbesondere mit dem durch Plasmid p7E exprimierten vWF-Fragment verglichen.

[0229] Harnstoffsolubilisierte und dialysierte Polypeptide, die (nach dem Verfahren von Beispiel 4) aus Einschlußkörpern extrahiert wurden, wurden mit ähnlichen Extrakten von p7E-Plasmid-Kulturen verglichen, die wie in Beispiel 1 hergestellt wurden.

Charakterisierung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

[0230] Das denaturierende Natriumdodecylsulfatgelverfahren von Beispiel 2 wurde verwendet, um die p5E-vWF-Fragmente, die unter Einsatz der Cysteinreste 509 und 695 Disulfidbindungen bilden können, mit dem p7E-Fragment, das keine Cysteinreste aufweist, zu vergleichen. Eine Elektrophorese wurde unter Verwendung von 7,5 µg Proteinextrakt pro Spur auf 10% Acrylamidgel unter reduzierenden (100 mM Dithiothreitol) und nichtreduzierenden Bedingungen durchgeführt.

[0231] Unter reduzierenden Bedingungen, und nach Färbung mit Coomassie-Blue, weisen die Extrakte von p7D und p5E identische elektrophoretische Mobilitäten auf.

[0232] Elektrophorese unter nichtreduzierenden Bedingungen zeigt jedoch die Wirkungen von Disulfidbindungen, an denen die Reste 509 und 695 beteiligt sind. Eine beträchtliche Menge des p5E-Extrakts erscheint als ein (aus intermolekularen Disulfidbindungen resultierender) Komplex mit hohem Molekulargewicht, welcher nur wenig in das Gel eintritt. Densitometrische Untersuchungen des Gels von Ausgangszubereitungen zeigen,

daß ungefähr 25% des auf nichtreduzierenden Gelen gefundenen p5E-Polypeptid-Materials von Monomeren des 441–733-Fragments mit einem apparenten Molekulargewicht von ungefähr 38.000 gebildet wird. Der prozentuale Anteil von Monomeren, der in p5E-Extrakten vorliegt, kann durch Vornahme von Harnstoffsolubilisierung, Dialyse und Thioloxidation bei. einer stärker verdünnten Proteinkonzentration wie beispielsweise 50–100 µg/ml, um die Bildung intramolekularer statt intermolekularer Disulfidbindungen zu fördern, wesentlich erhöht werden.

[0233] Diese monomere p5E-Spezies weist während der Gelelektrophorese unter nichtreduzierenden Bedingungen eine leicht höhere Mobilität auf als die vergleichbare p7E-Produktspezies, die keine Cysteinreste besitzt. Die Mobilitäten dieser monomeren p5E- und p7D-38-kDa-Spezies erscheinen unter reduzierenden Bedingungen identisch. Die leicht beschleunigte Mobilität eines Polypeptids, das unter nichtreduzierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS die Tertiärstruktur bewahrt, im Vergleich zur Mobilität des homologen Polypeptids, welches das anionische Detergenz unter den genannten Bedingungen vollständig in einen negativ geladenen völlig starren Stab verwandelt, wird allgemein als ein Hinweis auf die Anwesenheit von intramolekularen Disulfidbindungen angesehen.

Charakterisierung durch Immunblotting

[0234] Das Verhalten von p5E- und p7E-Extrakten wurde auch unter Verwendung von immunologischen Verfahren untersucht.

[0235] Wie in Beispiel 2 wurden die vWF-spezifischen murinen monoklonalen Antikörper RG-46 und NMC-4 als Sonden eingesetzt. Von RG-46 wurde gezeigt, daß es als sein Epitop eine die Reste 694 bis 708 umfassende lineare Sequenz von Aminosäuren innerhalb der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit erkennt. Die Bindung dieses Antikörpers an seine Determinante ist im wesentlichen konformationsunabhängig. Mohri H., et al., J. Biol. Chem., 263(34), 17901–17904 (1988).

[0236] NMC-4 hat als sein Epitop jedoch die Domäne der von-Willebrand-Faktor-Untereinheit, die die Glykoprotein-Ib-Bindungsstelle enthält. Die Kartierung des Epitops hat gezeigt, daß es innerhalb zweier diskontinuierlicher Domänen (umfassend ungefähr die Reste 474 bis 488 und ebenfalls ungefähr die Reste 694 bis 708 der reifen vWF-Untereinheit) enthalten ist, die in disulfidabhängige Verbindung gebracht sind, Mohri, H. et al., oben, obwohl unbekannt war, ob die Disulfidbindung, die diese Tertiärkonformation vermittelt, in dem nativen vWF-Molekül intramolekular oder intermolekular war. Ebd. auf 17903.

[0237] 7,5 µg Probe (von Protein) wurden zunächst auf 10% SDS-Polyacrylamid-Gelen laufengelassen, so daß das antigene Verhalten von bestimmten Banden (unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen) mit Ergebnissen verglichen werden konnte, die oben durch Coomassie-Blue-Färbung erhalten wurden. Ein Immunblotting wurde wie in Beispiel 2 durchgeführt, um p5E- und p7E-Extrakte zu vergleichen.

[0238] Die Anwendung von Antikörpern auf die Nitrozelluloseblätter wurde üblicherweise mit Antikörperlösungen vorgenommen, die wie folgt hergestellt wurden. Mäusen wurden B-Lymphozyten-Hybridome injiziert, die NMC-4 oder RG-46 produzierten. Aszites-Flüssigkeit von peritonealen Tumoren wurde gesammelt und enthielt typischerweise ungefähr 5 mg/ml monoklonale Antikörper. Die Aszites-Flüssigkeit wurde gemischt (ein Teil pro 1000) in Blockierungsflüssigkeit (PBS enthaltend 5% (w/v) Magermilchpulver, Carnation), um die unspezifische Hintergrundbindung zu minimieren. Die antikörperhaltige Blockierungsflüssigkeit wurde dann auf die Nitrozellulose aufgebracht.

[0239] Unter nichtreduzierenden Bedingungen zeigte das Einzelketten-p5E-Polypeptid-Fragment (die Sequenz von Rest 441 bis Rest 733 repräsentierend) einen ungefähr 120fache Anstieg in der Bindungsaffinität für NMC-4 im Vergleich zu der vergleichbaren cysteinfreien Spezies, die von p7E isoliert wurde und die ebenfalls die Primärsequenz der Reste 441 bis 733 repräsentiert. Nach Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen (unter Einsatz von 100 mM DTT) zeigte die Einzelketten-p5E-Spezies eine bemerkenswert verminderte Affinität für NMC-4, die dann zu der der cysteinfreien p7E-Spezies sowohl unter reduzierenden als auch nichtreduzierenden Bedingungen sehr ähnlich war. NMC-4 erkannte auch disulfidverknüpfte Dimere vom p5E-Extrakt nicht als Epitop, sowohl unter reduzierenden als auch nichtreduzierenden Bedingungen.

[0240] Die Nitrozellulosefilter, die zur Herstellung von Autoradiographien auf Basis von NMC-4 verwendet wurden, wurden erneut mit RG-46 untersucht, indem die anfängliche NMC-4-Expositionsreaktion abgezogen wurde, die durch eine Kombination von niedrigem Antikörpertiter und kurzer Expositionszeit niedrig gehalten wurde. Die Bindung von RG-46 an das 36.000 kDa-p7E-Polypeptid auf den Filtern ist dieselbe, ob reduzieren-

de oder nichtreduzierende Bedingungen gewählt wurden, was mit dem Austausch von allen Cysteinen in dem exprimierten Polypeptid durch Glycin in Übereinstimmung steht.

[0241] Ein (gegenüber RG-46 reaktives) vWF-Antigen mit hohem Molekulargewicht ist in dem p5E-Polypeptid-Extrakt unter nichtreduzierenden Bedingungen zugegen. Diese p5E-vWF-Aggregate (intramolekulare Disulfidbindungen widerspiegelnd) wandern unter reduzierenden Bedingungen auf dieselbe Position wie das p7E-Polypeptid, was auf die Zerstörung ihrer Disulfid-Kontakte hinweist. Die großen intermolekularen p5E-Aggregate, die unter nichtreduzierenden Bedingungen von RG-46 leicht erkannt werden, werden von NMC-4 jedoch weder unter reduzierenden noch unter nichtreduzierenden Bedingungen erkannt. Es wurde daher gezeigt, daß die Disulfidbindung zwischen den Resten 509 und 695 in nativen multimeren vWF-Untereinheiten einen intramolekularen Kontakt darstellt.

Beispiel 6 – Hemmung der Bindung von monoklonalem Anti-GPIb-Antikörper durch p5E-Polypeptide

[0242] Der monoklonale Antikörper LJ-Ib1 ist dafür bekannt, daß er die Wechselwirkung zwischen von-Willebrand-Faktor und Blutplättchen-Glykoprotein-Ib vollständig hemmt. Handa, M. et al., J. Biol. C 261(27), 12579–12585 (1986). Er reagiert spezifisch mit der aminoterminalen 45-kDa-Domäne von GPIbα, welche die vWF-Bindungsstelle enthält. Vicente, V. et al., J. Biol. Chem., 265, 274–280 (1990).

[0243] Um die hemmende Wirkung von p5E-Extrakten auf die Antikörperbindung zu ermitteln, wurde zunächst eine Konzentration von LJ-Ib1 ausgewählt, die in Abwesenheit von p5E-Extrakten eine halbmaximale Bindung ergeben würde.

[0244] LJ-Ib1 wurde nach dem Verfahren von Fraker, D. J. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, 849–857 (1978) unter Verwendung von I^{125} von Amersham, Arlington Heights, IL und Iodogen (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) iodiert. Gewaschene Blutplättchen wurden durch die Albumin-Dichtegradiententechnik von Walsh et al., Br. J. Haematol., 36, 281–298 (1977) hergestellt und in einer Zahl von 1×10^8/ml eingesetzt. Die halbmaximale Antikörper-Bindung an die Blutplättchen wurde bei einer LJ-Ib1-Konzentration von 10 µg/ml beobachtet, der Konzentration, die für p5E-Polypeptid-Hemmstudien ausgewählt wurde.

[0245] Der p5E-Polypeptidextrakt wurde nach dem Verfahren in Beispiel 4, eingeschlossen die abschließende Reinigung der harnstoffsolubilisierten Einschlußkörperzubereitung mittels Dialyse gegen 6,0 M Guanidin und Harnstofflösung mit anschließender Q-Sepharose®-Chromatographie, gereinigt.

[0246] Um die Bindung zu ermitteln, wurden Blutplättchen für 30 Minuten bei 22–25°C mit LJ-Ib1 (10 µg/ml) und Konzentrationen von gereinigtem p5E-Protein (0,002–10,0 µMolar) wie in **Fig.** 3 angegeben inkubiert. Die Hemmung wurde in Gegenwart von 2 µg/ml Botrocetin, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, (**Fig.** 3, dunkle Kreise) und in Abwesenheit von Botrocetin (offene Kreise) aufgezeichnet.

[0247] Weniger als 5 Prozent der an Blutplättchen gebundenen ^{125}I-Markierung stammte von anderen markierten Substanzen als von LJ-Ib1, wie durch Bindungskompetitionsversuche in Gegenwart eines 100fachen Überschusses von unmarkiertem LJ-Ib1 festgestellt wurde. Die Hintergrundmarkierung wurde von den Datenpunkten abgezogen. Die Bindung von ^{125}I-LJ-Ib1 wurde als Prozentanteil eines Kontrolltests ohne rekombinante Polypeptide ausgedrückt. Fünfzig Prozent Hemmung der ^{125}I-LJ-Ib1-Bindung an Blutplättchen wurde erreicht bei 10 µM p5E-Polypeptid ohne Botrocetin, wohingegen in Anwesenheit von Botrocetin (2 µg/ml) 50% Hemmung bei weniger als 0,1 µM erreicht werden kann. Es ist bekannt, daß Botrocetin beim zirkulierenden Multiuntereinheiten-von-Willebrand-Faktor und einzelnen Untereinheiten davon eine Konformationsänderung induziert, welche die Bindung an den GPIbα-Rezeptor fördert oder ermöglicht. Dieses Beispiel zeigt, daß das p5E-Polypeptid (enthaltend eine intramolekulare Cystein-509–695-Bindung) sich im Hinblick darauf, wie seine Aktivität durch Botrocetin moduliert wird, sehr ähnlich wie der native zirkulierende von-Willebrand-Faktor verhält. Dies ist ein Hinweis auf strukturelle Ähnlichkeit.

Beispiel 7 – Expression des homodimeren 116-kDa-von-Willebrand-Faktor-Fragments in stabilen Säugetier-Transformanten

[0248] Dieses Beispiel veranschaulicht Bedingungen, unter denen eine DNA-Sequenz, die das reife vWF-Untereinheiten-Fragment mit einem Aminoterminus an Rest 441 (Arginin) und einen Carboxyterminus an Rest 730 (Asparagin) kodiert, exprimiert werden kann, und die Sekretion einer glykosylierten homodimeren Form des 441–730-vWF-Fragments mit native Tertiärstruktur aus kultivierten Säugetier-Wirtszellen.

[0249] Die Expression des 116-kDa-Homodimers wird erreicht durch Verwendung eines DNA-Konstrukts, bei dem die folgenden Strukturelemente in 5'-zu-3'-Richtung (in Bezug auf den kodierenden oder nichttranskribierten Strang) verwendet wurden:

(A) eine eukaryotische Konsensus-Translationsinitiationssequenz, CCACC; und

(B) das startende vWF-Methionin-Kodon, gefolgt von den restlichen 21 Aminosäuren des vWF-Signalpeptids; und

(C) die den ersten drei Aminosäuren der Aminoterminusregion des vWF-Propeptids entsprechende kodierende Sequenz

(D) die kodierende Sequenz für die vWF-Aminosäurereste 441–730; und

(E) das "TGA"-Translationsterminationskodon.

[0250] Der cDNA-Klon, pvWF, der das vollständige Prä-pro-vWF-Gen kodiert, wurde von Dr. Dennis Lynch, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, erhalten und wie in Lynch, D. C. et al., Cell, 41, 49–56 (1985) vorbereitet. Die Herstellung von pvWF wurde in Beispiel 1 beschrieben.

[0251] Die detaillierten Verfahren, die für die Expression des homodimeren Arg^{441}-bis-Asn^{730}-Fragments der reifen vWF-Untereinheit von Säugetier-Wirtszellen erforderliche sind, sind in der Veröffentlichung Azuma, H. et al., Independent Domain of von Willebrand Factor Containing the Glycoprotein Ib-Binding Site, J. Biol. Chem., 266(19), 12342–12347 (1991) beschrieben.

[0252] Es sollte beachtet werden, daß diese rekombinant hergestellte Molekül sich intrinsisch durch Bildung intermolekularer Disulfidbindungen selbst zu einem Dimer (116 kDa) der 52/48-kDa-Rest-441–730-Polypeptiddomäne assembliert, wodurch seine Rolle in der endgültigen Struktur von vWF, wie sie aus dem Blut isoliert wird, verdoppelt wird.

[0253] Die Herstellung von monomeren Rest-441–730-Polypeptiden erfordert die Inaktivierung, Entfernung oder Ersetzung von einem oder mehreren der Cysteinreste 459, 462 und 464 davon, (die intermolekularen Disulfidkontakte). Dies kann wirksam durch ortsgerichtete Mutagenese des vWF-Konstrukts erreicht werden, wenn dieses in einem geeigneten Klonierungsvehikel, wie beispielsweise M13mp18, wie unten beschrieben, enthalten ist.

Beispiel 8 – Konstruktion eines Säugetier-Transformanten für die Expression des monomeren reifen 441–730-von-Willebrand-Faktor-Untereinheiten-Fragments mit Cystein-zu-Glycin-Mutationen an den Resten 459, 462 und 464

[0254] Dieses Beispiel veranschaulicht Bedingungen, unter denen eine DNA-Sequenz, die ein reifes vWF-Untereinheitsfragment kodiert, das einen Aminoterminus an Rest 441 (Arginin) und einen Carboxyterminus an Rest 730 (Asparagin) aufweist, und die ferner Glycinreste enthält, die Cysteinreste an den Positionen 459, 462 und 464 ersetzen, konstruiert und in Säugetierzellen transfiziert werden kann.

[0255] Das SalI-XbaI-Insert von pAD3-2 (siehe Beispiel 7) wurde durch Restriktion entfernt und dann in den pcDNA1-Vektor (Invitrogen, San Diego, CA) kloniert, der vorher mit XhoI- und XbaI-Restriktionsenzymen verdaut worden war. Da XhoI und SalI-Restriktionenstellen identische innere Sequenzen -TCGA-/-AGCT- enthalten, kann ein SalI-restringiertes Fragment an eine XhoI-Stelle angelagert werden. Die Fragmente wurden mit T_4-Ligase ligiert; die Integrität der XhoI-Stelle wurde jedoch nicht wiederhergestellt. Dieses Plasmid-Konstrukt wurde als pAD4/WT bezeichnet.

Ortsgerichtete Mutagenese unter Verwendung von M13mp18

[0256] pAD4/WT wurde mit EcoRI- und SmaI-Enzymen restringiert. Der pcDNA1-Vektor enthält eine EcoRI-Stelle innerhalb seiner Polylinker-Region, welche stromaufwärts von der XhoI ("SalI")-Stelle liegt, enthält jedoch keine SmaI-Stelle. Wie in **Fig.** 1 dargestellt (SEQ ID NO: 1) ist eine einzigartige SmaI-Stelle (CCCGGG) in dem vWF-cDNA-Insert enthalten, welches die Reste 716 (Glycin) bis Rest 718 (Glycin) der reifen Untereinheit umfaßt.

[0257] Entsprechend wurde ein ungefähr 950 Basenpaare großes EcoRI-SmaI-Fragment von pAD4/WT in die EcoRI-SmaI-Stelle innerhalb der Polylinker-Region des M13mp18-Phagen subkloniert. Die vWF-Sequenz in M13mp18 wurde dann mutiert und erneut in das vorher restringierte pAD4/WT-Konstrukt inseriert, was zur Remontage der intakten Rest-441-730-vWF-Sequenz führte.

[0258] Die Mutagenese wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 und Kunkel, T. A., oben, durchgeführt und verwendete die folgenden Oligonukleotide.

Oligonukleotid (7) – siehe SEQ ID NO: 8

3' - GGACTCGTGCCGGTCTAACCGGTGCCACTACAACAG - 5'

5' - cctgagcacggccagattggccacggtgatgttgtc - 3'

Gly_{459} Gly_{462} Gly_{464}

[0259] Das hybridisierende Oligonukleotid ist in Großbuchstaben dargestellt (3'-5') und entspricht dem transkribierten Strang (nichtkodierenden DNA-Strang). Die unterstrichenen Buchstaben zeigen die einzelnen Basenmutationen für die mutierten Kodons an. Der äquivalente kodierende Strang ist in Kleinbuchstaben angegeben, wobei die entsprechenden Glycin-Substitutionen durch Drei-Buchstaben-Bezeichnungen angegeben sind.

[0260] Das mutierte 950-Basenpaare-EcoRI-SmaI-Fragment wurde dann in die EcoRI-SmaI-Stelle des vorher restringierten pAD4/WT-Plasmids reinseriert. Das mutierte Konstrukt wurde als pAD4/Δ3C bezeichnet. Um die Langzeitlagerung und Vermehrung zu erleichtern, wurde pAD4/Δ3C nach dem Verfahren von Hanahan, D., J. Mol. Biol, 166, 557–580 (1983), in den ampicillinsensitiven E.-coli-Stamm XS-127 transformiert.

[0261] In Übereinstimmung mit dem Verfahren von Beispiel 1 wurde die Sequenz der mutierten cDNA mittels des Didesoxy-Verfahrens bestätigt und der Plasmid wurde durch CsCl/Ethidiumbromid-Gleichgewichtszentrifugation gereinigt.

Transformation von COS-1 Zellen

[0262] pAD4/Δ3C wurde mit Hilfe eines Kalziumphosphat-vermittelten Standard-Transfektionsverfahrens in COS1-Zellen (SV-40-transformierte Nierenzellen der afrikanischen Grünen Meerkatze, ATCC – CRL 1650) eingeführt. Chen, C. et al., Mol. Cell. Biol., 7(8), 2745–2751 (1987).

[0263] COS-1-Zellen wurden bei 37°C in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) (Gibco/Life Technologies, Inc., Gaitherburg, MD), versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), unter einer 5% CO_2-Atmosphäre angezogen und dann 24 Stunden vor der Transformation zu einer Dichte von $1{,}5 \times 10^5$ Zellen/60 mm-Gewebekulturplatte (ungefähr 25% Konfluenz) subkultiviert. COS1-Zellen haben in DMEM/10% FCS unter diesen Bedingungen eine Verdopplungszeit von ungefähr 20 Stunden.

[0264] Um die Transformation zu bewerkstelligen, wurden pAD4/Δ3C-Plasmide von Kulturen des E.-coli-Stamms XS-127 nach dem Verfahren von Birnboim, H. C. und Doly, J., Nucleic Acids Research, 7, 1513 (1979), gewonnen. Zehn µg Plasmide wurden in einer Kalziumphosphatlösung nach dem Verfahren von Chen et al., oben, auf die Zellen jeder 60-mm-Platte aufgebracht. Nach Impfung mit Plasmid wurden die Zellen für 8 Stunden bei 37°C in einer 5% CO_2-Atmosphäre in DMEM/10% FCS gehalten.

[0265] Das Wachstumsmedium wurde dann mit einer Lösung von phosphatgepufferter Salzlösung/10% (v/v) Glycerin ersetzt. Die Kulturen wurden dann für 2 Minuten in Glycerin-PBS gehalten, um die Bildung von Transformanten zu erleichtern (Ausukel, et al., Hrsg., Current Protocols in Molecular Biology, S. 9.1.3, Wiley & Sons (1987)). Nach 2 Minuten wurde die Glycerin-PBS-Lösung durch DMEM/10% FCS ersetzt. Antibiotikaresistenz wurde nicht eingesetzt, um stabile Transformanten zu selektieren. Die Zellen wurden dann bei 37°C in DMEM/10% FCS in einer 5%-CO_2-Atmosphäre gehalten.

Beispiel 9 – Transformation von COS1-Zellen durch pAD4/WT-Plasmide

[0266] COS1-Zellen wurden auch erfolgreich mit pAD4/WT-Plasmiden transformiert. Obwohl Antibiotikaresistenz nicht verwendet wurde, um stabile Transformanten zu selektieren, war eine vorübergehende Expression des 116-kDa-Fragments davon besonders nützlich, um die Eigenschaften des durch pAD4/Δ3C-Plasmide hergestellten mutierten 116-kDa-Polypeptids mit denen des 116-kDapAD4/WT-Homodimers zu vergleichen.

[0267] Nach dem Verfahren von Beispiel 9 wurden pAD4/WT-Plasmide aus gelagerten Kulturen des E.-coli-Stamms XS-127 gewonnen. Die Transformation von COS1-Zellen mit pAD4/WT wurde dann unter Einsatz der Verfahren von Beispiel 8 bewerkstelligt. Die Zellen wurden dann bei 37°C in DMEM/10% FCS in einer 5%

CO_2-Atmosphäre gehalten.

Beispiel 10 – Konstruktion von Säugetier-Transformanten, die mutierte 441–730-Fragmente der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit exprimieren, wobei jede Mutante eine einzelne Cystein-zu-Glycin-Substitution enthält

[0268] Nach dem Verfahren von Beispiel 8 und unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese wurden drei Plasmide (pAD4/G^{459}, pAD4/G^{459}, und pAD4/G^{464}, zusammen als "pAD4/Δ1C-Plasmide" bezeichnet) konstruiert. Solche Plasmide sind identisch zu pAD4/WT, ausgenommen daß jedes eine einzelne Basenpaarmutationen enthält, die einer einzelnen Cystein-zu-Glycin-Substitution an den Restepositionen 459, 462 bzw. 464 der reifen vWF-Untereinheit entspricht. Die verwendeten Oligonukleotide waren identisch mit Oligonukleotid (7), der verwendet wurde, um pAD4/Δ3C herzustellen, mit der Ausnahme, daß jedes nur eine von drei mutierten Kodons dieses Oligonukleotids enthielt, wobei die anderen zwei Kodons von der kodierenden Sequenz des Wildtyps gebildet wurden. Um die Langzeitlagerung und Vermehrung zu erleichtern, wurden Proben von pAD4/G^{459}, pAD4/G^{462} und pAD4/G^{464} jeweils nach dem Verfahren von Beispiel 8 in den ampicillinsensitiven E.-coli-Stamm XS-127 kloniert.

[0269] In Übereinstimmung mit den Verfahren von Beispiel 8 wurden die Sequenzen der mutierten cDNAs durch das Didesoxy-Verfahren bestätigt und die Plasmide wurden durch CsCl/Ethidiumbromid-Gleichgewichtszentrifugation gereinigt.

[0270] Die Transformation von COS1-Zellen mit pAD4/G^{459}-, pAD4/G^{462}- oder pAD4/G^{464}-Plasmiden wurde nach dem Protokoll von Beispiel 8 vorgenommen. Antibiotikaresistenz wurden nicht eingesetzt, um stabile Transformanten zu selektieren. Die Zellen wurden dann bei 37°C in DMEM/10% FCS in einer 5% CO_2-Atmosphäre gehalten.

Beispiel 11 – Expression und Charakterisierung des von-Willebrand-Faktor-Untereinheitsfragments durch mit pAD4/WT- und pAD4/Δ3C-Plasmiden transformierte COS1-Zellen

[0271] COS1-Zellen, die nach den Verfahren von Beispiel 8 bzw. 9 mit pAD4/Δ3C- oder pAD4/WT-Plasmiden transformiert waren, wurden kultiviert, um die kodierte vWF-DNA wie unten erklärt zu exprimieren. COS1-Zellen, die gleichermaßen mit pcDNA1-Plasmidvektor (der kein vWF-cDNA-Insert enthielt) transformiert waren, wurden als Kontrolle verwendet.

[0272] COS1-Zellen in einer Dichte von 4–5 × 10^5/60-mm-Platte wurden transformiert durch Zugabe, bei Zeit 0, von 10 µg pAD4/WT-, pAD4/Δ3C- oder pcDNA1-Plasmid. Nach dem Verfahren von Beispiele 9 und 10 wurden die Zellen nach einer Zeitdauer von 8 Stunden glyceringeschockt. Die Zellen wurden dann bei 37°C in einer 5% CO_2-Atmosphäre für 32 Stunden mit DMEM/10% FCS bedeckt.

[0273] Die Zellen für jede Kultur wurden dann dreimal mit PBS gespült und die Inkubation wurde mit DMEM (ohne FCS), das mit ^{35}S-Methionin (Amersham Co., Arlington Heights, IL) mit einer spezifischen Aktivität von 1000 Ci/mmol zu einer Endkonzentration von 100 µCi/ml versetzt war, fortgesetzt. Die Zellen wurden für 16 Stunden in den Inkubator zurückgebracht, wonach die jeweiligen Kulturmedien zur Aufreinigung von ausgeschiedenen vWF-Polypeptiden durch Immunpräzipitation geerntet wurden.

[0274] Die Immunpräzipitation folgte generell dem Verfahren von Beispiel 7. Fünf-ml-Volumina von Kulturmedium wurden für 16 Stunden mit 0,5 ml 10 × Immunpräzipitationspuffer, 0,05 mg NMC-4-Antikörper und 0,05 mg RG-46-Antikörper inkubiert.

[0275] Die Behandlung mit Protein-A-Sepharose®4B wurde nach Beispiel 7 durchgeführt. Proben von IgG-komplexiertem vWF-Protein wurden vor der SDS-PAGE in SDS-haltigen Probenpuffer dissoziiert.

[0276] Für die Analyse der vWF-Polypeptide unter reduzierenden Bedingungen wurde der Probenpuffer modifiziert, so daß er 100 mM Dithiothreitol (DTT) enthielt.

Ergebnisse

[0277] Die Gele wurden unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen laufengelassen und wurden getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen, um die ^{35}S-Markierung zu entwickeln. Sowohl unter reduzierenden als auch nichtreduzierenden Bedingungen wurde kein ^{35}S-markiertes Protein als Immunpräzi-

pitat von Kontrollkulturen von COS-1-Zellen (transformiert durch unmodifizierte pcDNA1-Vehikel) erhalten (siehe mit MOCK bezeichnete Gel-Spuren).

[0278] COS-Zellen, die mit pAD4/WT-Plasmiden transformiert waren, produzieren unter nichtreduzierenden Bedingungen eine prominente ^{35}S-markierte Bande mit einem ungefähren apparenten Molekulargewicht von 116.000. Dieser Wert stimmt überein mit einer korrekten Säugetier-Glykosylierung des 441–730-Fragments. Bei einem Lauf unter reduzierenden Bedingungen ist kein 116-kDa-Material ersichtlich, was mit der Reduktion der Disulfidbindungen übereinstimmt, die das 116-kDa-Homodimer stabilisieren. Unter reduzierenden Bedingungen wird eine prominente ^{35}S-markierte Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ungefähr 52.000 sichtbar. Der apparente 52-kDa-Wert stimmt erneut überein mit einer korrekten Glykosylierung des reduzierten monomeren 441–730-Fragments.

[0279] Die Gelspuren, die der Transformation mit pAD4/Δ3C entsprechen, zeigen kein apparentes 116-kDa-Material. Statt dessen ist unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen eine Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von ungefähr 52.000 sichtbar.

[0280] Daher führte die Mutagenese zur Ersetzung der Cysteinreste 459, 462 und 464 in dem 441–730-vWF-Fragment mit Glycinresten zur erfolgreichen Expression eines nicht-dimerisierenden Polypeptids, das vermutlich voraussichtlich nur die intramolekularen (471 zu 474 und 509 zu 695) Disulfidbindungen aufweist. Von der Wechselwirkungen mit NMC-4 (siehe auch Beispiel 7) ist bekannt, daß sie eine intakte intramolekularen 509-zu-695-Disulfidbindung erfordert, wodurch die Anwesenheit der nativen Wildtyp-Tertiärstruktur in dem durch pAD4/Δ3C hergestellten Polypeptid gezeigt wird.

[0281] Die Gele zeigten ebenfalls die Anwesenheit von ^{35}S-markiertem Material mit niedrigem Molekulargewicht (unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen), was möglicherweise anzeigt, daß nicht alle vWF-Polypeptide, die durch pAD4/WT-Konstrukte hergestellt wurden, erfolgreich dimerisieren und daß die Proteolyse und/oder unvollständige Glykosylierung des Polypeptids höhere Ausbeuten verhindern kann. Die Proteolyse und/oder unvollständige Glykosylierung beeinflußt vermutlich auch den Ertrag des monomeren vWF-Polypeptids, das durch pAD4/Δ3C-Transformanten hergestellt wurde. Einiges Aggregat-Material mit hohem Molekulargewicht (das im wesentlichen nicht ihn die Gele eindringt) ist in den nichtreduzierten Proben von pAD4/WT und pAD4/Δ3C anwesend.

Beispiel 12 – Verwendung von monoklonalem NMC-4-Antikörper zur Immunpräzipitation von vWF-Polypeptiden, die durch pAD4/WT- und pAD4/Δ3C-transformierte COS1-Zellen ausgeschieden wurden

[0282] Der monoklonale Antikörper NMC-4 weist als sein Epitop die Domäne der von-Willebrand-Faktor-Untereinheit auf, die die Bindungsstelle des Glykoproteins Ib enthält. Die Kartierung des Epitops hat gezeigt, daß es in zwei diskontinuierlichen Domänen (umfassend ungefähr die Reste 474 bis 488 und ebenfalls ungefähr die Reste 694 bis 708 der reifen vWF-Untereinheit) enthalten ist, die durch eine intramolekulare Disulfidbindung (Reste 509 zu 695) in disulfidabhängige Verbindung gebracht sind.

[0283] Die Reaktivität mit NMC-4 ist daher ein wichtiger Beweis dafür, ob ein bestimmtes rekombinantes 441–730-Fragment der reifen vWF-Untereinheit die Tertiärstruktur der analogen Rest-441–730-Domäne des Wildtyps angenommen hat.

[0284] Entsprechend wurde das Verfahren von Beispiel 11 angewendet, um vWF-Polypeptide zu charakterisieren, die von pAD4/WT- und pAD4/Δ3C-transformierten COS-1-Zellen ausgeschieden wurden, mit der Modifikation, daß die Immunpräzipitation der Kulturmedien ausschließlich mit NMC-4-Antikörper (0,05 mg NMC-4 pro 5 ml Kulturmedium, zu dem 0,5 ml 10 × Immunpräzipitationspuffer zugegeben worden waren) bewirkt wurde.

[0285] Proben wurden unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen laufengelassen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Beispiel 11 weist die aus pAD4/WT-Kulturmedium isolierte Hauptkomponenten unter nichtreduzierenden Bedingungen ein apparentes Molekulargewicht von 116.000 kDa und unter reduzierenden Bedingungen von 52 kDa auf. Obwohl nur eine kleine Fraktion des gesamten pAD4/Δ3C-abgeleiteten vWF-Polypeptid-Materials an NMC-4 bindet (im Vergleich zum konformationsunabhängigen RG-46) ist in Gelen von NMC-4-Immunpräzipitaten unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen eine Bande mit dem apparenten Molekulargewicht von 52 kDa sichtbar.

Beispiel 13 – Expression und Charakterisierung des von-Willebrand-Faktor-Untereinheitsfragments, hergestellt durch COS-1-Zellen, die mit pAD4/G^{459}-, pAD4/G^{462}- oder pAD4/G^{464}-Plasmide transformiert waren

[0286] Die Transformation von COS-1-Zellen mit pAD4/G^{459}-, pAD4/G^{462}- oder pAD4/G^{464}-Plasmiden (zusammen als "pAD4/ΔC1-Plasmide" bezeichnet) wurde erreicht nach dem Verfahren von Beispiel 10. Kulturmedien wurden nach dem Verfahren von Beispiel 7, unter ausschließlicher Verwendung von NMC-4 für die Immunpräzipitation, auf ausgeschiedenes vWF-Polypeptid analysiert.

[0287] ^{35}S-markierte Proteine, hergestellt nach Beispiel 11, wurden durch NMC-4 immunpräzipitiert und unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamid-Gelen laufengelassen und mit vWF-Antigen verglichen, das durch pAD4/WT- und pAD4/Δ3C-Transformanten hergestellt wurde.

[0288] Die Gele zeigten, daß die Substitution jedes der 3 Cysteine (459, 462, 464), die für die intermolekularen Disulfidkontakte in nativen reifen Untereinheiten verantwortlich gemacht werden, die Bildung des homodimeren 116-kDa-Polypeptids verhindert, das für pAD4/WT-transformierte COS1-Zellen charakteristisch ist. Diese drei vWF-Antigene mit einer einzelnen Glycin-Substitution erscheinen unter reduzierenden oder nichtreduzierenden Bedingungen vornehmlich als monomere Polypeptide mit einem apparenten Molekulargewicht von 52.000. Daß das vorherrschende Material ein apparentes Molekulargewicht von 52 kDa aufweist, weist stark auf die korrekte Glykosylierung durch die COS-1-Zelltransformanten hin, die die in dem tryptischen menschlichen 52/48-kDa-Fragment beobachtete Glykosylierung verdoppelt. Ein wenig ungenügend glykosyliertes und/oder proteolysiertes vWF-Antigen (Molekulargewicht weniger als 52 kDa) ist in den Gelen ebenfalls ersichtlich. Der vergleichsweise kleine Anteil von pAD4/Δ3C-vWF-Polypeptid, der erfolgreich gefaltet und ausgeschieden wird, und dadurch ein NMC-4-Epitop präsentiert, wurde durch die geringe Intensität der Autoradiographiebande der pAD4/Δ3C-Transformanten mit einem apparenten Molekulargewicht von 52.000 aufgezeigt.

Beispiel 14 – Herstellung von Untergruppen des 52/48-kDa-Polypeptids

[0289] Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung von Polypeptiden, die Ausführungsformen der Erfindung repräsentieren, die Cystein-defiziente von dem Rest-441–733-Fragment der vWF-Untereinheit abgeleitete Untergruppen darstellen. Das Beispiel veranschaulicht Bedingungen, unter denen solche Untergruppen von rekombinanten bakteriellen Wirtszellen exprimiert werden können. Die Untergruppen können zum Beispiel nach den allgemeinen Verfahren in Beispiel 7 und 8 auch von rekombinanten eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Die Untergruppen sind in der Lage, die Wechselwirkung zwischen multimerem vWF und Blutplättchens-GPIbα zu beeinflussen, d. h. sie weisen eine Eignung als Antithrombotika auf.

[0290] Im Anschluß folgt eine Darstellung der Herstellung von drei die vorgenannten Untergruppentypen umfassenden Gruppen von Polypeptiden, wobei die erste Gruppe von Untergruppen cysteinfrei ist und die der zweiten und dritten Gruppe von Untergruppen nur zwei Cysteinreste aufweisen (fünf der Cysteinreste sind entfernt worden). Die Untergruppen der zweiten und dritten Gruppe unterscheiden sich darin, daß entweder die N-terminale Region (zweite Gruppe) oder die C-terminale Region (dritte Gruppe) des Polypeptids erhalten ist.

Polypeptid-Untergruppen (cysteinfrei) der Rest-441–733-Domäne der vWF-Untereinheit

[0291] Mutierte (Fusions-)Polypeptide, bestehend aus der Rest-441–733-Sequenz, jedoch ohne die innere G10- (Reste 474–488) oder D5-Region (Reste 694–708) wurden mittels Loopout-Mutagenese von Restriktionsfragmenten von p7E-Konstrukten in M13mp18-Phagen hergestellt und dann auf antithrombotische Aktivität getestet.

[0292] Insbesondere wurden p7E-Plasmide von E.-coli-BL21(DE3)-Kulturen unter Verwendung eines alkalischen Zellyse-Verfahrens, Birnboim, H. C. und Doly, J., Nucleic Acids Research, 7, 1513 (1979), mit anschließender Reinigung durch CsCl/Ethidiumbromid-Gleichgewichtszentrifugationen gewonnen. Eine (von dem elterlichen pET-3A-Vektor beigesteuerte) XbaI-Restriktionenstelle ist stromaufwärts vom T7-Transkriptionspromotor im p7E-Plasmid vorhanden. Entsprechend wurde das vWF-Insert (für die Reste 441–733) als XbaI-HindIII-Restriktionsfragment für die Loopout-Mutagenese (siehe Beispiel 1) im M13mp18-Phagen entfernt. Der "Loopout" der G10-Region bzw. D5-Region wurden unter Verwendung der folgenden Oligonukleotide, die den nichtkodierenden DNA-Strang (transkribierten DNA-Strang) repräsentieren, bewerkstelligt. Unter den beiden 3'-5'-Oligonukleotiden sind die entsprechenden kodierenden Stränge und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen dargestellt.

Oligonukleotid (8) – siehe SEQ ID NO: 9

```
3' - GAG TGG CCA CTT CGG CAC TCG GGG TGG TGA - 5'


5' - ctc acc ggt gaa gac gtg agc ccc acc act - 3'
     Leu Thr Gly Glu Ala Val Ser Pro Thr Thr
     469 470 471 472 473 489 490 491 492 493
                         ↑
        Deletion des G10-Bindungspeptids
```

Oligonukleotid (9) – siehe SEQ ID NO: 10

```
3' - CTC TAG CAA TCG ATG CTG TAC CGT GTT CAG - 5'
5' - gag atc gtt agc tac gac atg gca caa gtc -3'
     Glu Ile Val Ser Tyr Asp Met Ala Gln Val
     689 690 691 692 693 709 710 711 712 713
                         ↑
        Deletion des D5-Bindungspeptids
```

[0293] Eine DNA-Sequenzanalyse wurde eingesetzt, um zu bestätigen, daß die vorgesehenen vWF-Kodierungssequenzen hergestellt wurden. Die zwei mutierten XbaI-HindIII-Restriktionsfragmente wurden dann in separate pET-3A-Plasmide inseriert, die mit XbaI- und HindIII-Restriktionsendonukleasen geschnitten worden waren und die danach als p7E/ΔG10 und p7E/ΔD5 bezeichnet worden.

[0294] Die erhaltenen mutierten (Fusions-)vWF-Polypeptide wurden dann auf ihre Fähigkeit getestet, an GPIbα zu binden. Unter Verwendung des Testverfahrens nach Beispiel 6 (Hemmung der Bindung von LJ-Ib1-Antikörper an GPIbα in Abwesenheit des Modulators Botrocetin) wurde festgestellt, daß das Reste-441–733-Fragment, das von p7E exprimiert worden war und von dem die "G10"-Peptidsequenz entfernt worden war, GPIbα bindet. Das p7E-abgeleitete Fusionsfragment, dem die "D5"-Peptidsequenz fehlte, tat dies nicht. Wenn die Experimente jedoch unter Verwendung von Botrocetin als Modulator der Bindung (siehe das Verfahren von Beispiel 6) wiederholt wurden, waren beide fusionierten Unterfragmente bei der Hemmung der Bindung durch LJ-Ib1 wirksam, und weisen damit antithrombotische Eignung auf.

[0295] Andere In-vitro-Tests, die eingesetzt werden können, um vWF-abgeleitete Polypeptide mit antithrombotischer Aktivität zu identifizieren, schließen die Hemmung der Botrocetin-induzierten Bindung von vWF an Blutplättchen durch das mutierte Polypeptid (siehe Beispiel 3) sowie die Hemmung der Agglutination menschlicher Blutplättchen in einem System unter Verwendung von Rinder-vWF, jedoch ohne einen Modulator wie Botrocetin oder Ristocetin, ein.

Cysteindefiziente Polypeptid-Untergruppen mit N-terminalen Deletionen

[0296] Es sind auch therapeutische als Antithrombotika wirksame Polypeptid-Untergruppen nach dem Muster des Rest-441–733-vWF-Untereinheitenfragments, die jedoch N-terminale Deletionen enthalten, hergestellt worden.

[0297] Die Herstellung solcher Polypeptide wurde erreicht durch Loopout-Mutagenese des XbaI-HindIII-Restriktionsfragments vom p5E-Expressionsplasmid im M13mp18-Phagen. Die vWF-Kodierungssequenz (p5E) kodierte daher Cystein für die Restepositionen 509 und 695 und Glycin an den Restepositionen 459, 462, 464, 471 und 474. Die p7E-Sequenz ist auch geeignet zur Expression solcher antithrombotischen Polypeptide. Antithrombotischen Polypeptide, die zu solchen äquivalent sind, die von p7E-Konstrukten exprimiert werden, können durch Reduktion und Alkylierung von Cysteinresten hergestellt werden, die anderweitig darin enthalten sind.

[0298] Die Entwicklung von Oligonukleotiden, die zur Erzeugung von N-terminalen Deletionen in dem vWF-Untereinheitsfragment verwendet wurden, bezog sich auf eine DNA-Sequenz des pET-3A-Vektors stromaufwärts (5') von dem den vWF-Rest-441 kodierenden Kodon. Die Expression des Reste-441–733-Fragments als E.-coRI-HindIII-Insert (sowohl mit 5'- als auch mit 3'-Enden, die durch BamHI-Linker modifiziert wurden, Beispiel 1) in pET-3A beinhaltet auch die Expression einer Aminosäuresequenz von zwanzig Resten (SEQ ID NO: 11), die an den Aminoterminus des vWF-Fragments gebunden bleibt. Diese Sequenz wird, wie unten dargestellt, durch Vektor-cDNA stromabwärts von der T7-Promotorstelle kodiert, beeinflußt die therapeutische Wirkung des vWF-Polypeptids jedoch nicht nachteilig.

Initiationskodon

↓

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met

Gly Arg Gly Ser Pro Gly Leu Gln Glu Phe Arg_{441}

↑

von EcoRI

[0299] Es sei darauf hingewiesen, daß die EcoRI-Kodierungssequenz (Glu-Phe) die Modifikation mit einem BamHI-Linker in dem T_4-DNA-Ligase-Verfahren (Beispiel 1) in diesem besonderen Fall überstanden hat. Die entsprechende kodierende Sequenz für den pET-3A-Vektor stromaufwärts von dem Start-Methionin und Rest-441 (Arginin) ist wie folgt.

Oligonukleotid (11) – siehe SEQ ID NO: 12

5' - GAA GGA GAT ATA CAT ATG GCT AGC . . .

Met Ala Ser

[0300] Entsprechend wurde die Erzeugung von N-terminalen Deletionen erreicht durch Verwendung von Loopout-Mutagenese mit einem hybridisierenden Oligonukleotid, welches die Sequenz von dem Vektor (endend am Start-Methionin) und dann die vorgesehene N-terminale Region des neuen vWF-Polypeptids kodiert.

[0301] Repräsentativ für die Oligonukleotide, die für die Herstellung der therapeutischen Polypeptide erforderlich sind, ist Oligonukleotid 12 (SEQ ID NO: 13), welches dem nichtkodierenden DNA-Strang (transkribierten DNA-Strang) entspricht. Unter diesem Oligonukleotid sind der entsprechende kodierende Strang und die resultierenden Aminosäuren dargestellt.

3' - CCT CTA TAT GTA TAC GTC CTC GGC CCT CCG - 5'

gga gat ata cat atg cag gag ccg gga ggc

Met Gln Glu Pro Gly Gly

474' 475 476 477 478 479

[0302] Repräsentativ für cysteindefiziente Polypeptide, die solche N-terminalen Deletionen widerspiegeln, sind Met·Gln^{475} zu Val^{733}, Met·Thr^{492} zu Val^{733} und Met·Tyr^{508} zu Val^{733}. Solche Polypeptide (und andere Spezies mit terminalen Deletionen jedweder Untergruppen der vWF-Rest-441–508-Sequenz, die ein oder mehrere Cysteinreste enthalten) weisen antithrombotische therapeutische Aktivität auf. Diese Polypeptide können bei Expression von p5E-Konstrukten auch die Cystein-509–695-Schleife präsentieren. Sequenzierungsexperimente wurden nicht durchgeführt, um feststellen, ob das bakterielle Expressionssystem eine Spaltung des Start-Methionin-Rests von den erhaltenen Polypeptiden hervorruft.

Cysteindefiziente Polypeptid-Untergruppen mit C-terminalen Deletionen

[0303] Das Verfahren, das zur Expression rekombinanter bakterieller Polypeptide unter Verwendung des pET-3A-Vektors angewendet wurde, führt zu Polypeptiden, die auch eine Reihe von Aminosäuren auf der C-terminalen Seite von Val^{733} umfassen, wobei die zusätzliche Reste von der Translation der Vektorsequenz (siehe SEQ ID NO: 14) herrühren.

[0304] Insbesondere enthalten Rest-441–733-Fragmente, die vom p5E-(oder p7E-)Konstrukten exprimiert wurden, auch 22 Reste, die an die C-terminalen Seite vom Rest 733 (Valin) fusioniert sind, die von der Expression der Vektorsequenz vor dem ersten Vektor-Stopkodon herrühren.

[0305] Diese pET-3A-Vektorsequenz, die auch eine Modifikation (Beispiel 1) der HindIII-Stelle des EcoRI-HindIII-Fragments durch einen BamHI-Linker widerspiegelt, ist (SEQ ID NO: 14):

```
Val Ser Ser Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala
733
Arg·Lys Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr
Ala Glu Gln *
            ↑
        Stopkodon
```

[0306] Um eine geeignete kodierende DNA-Sequenz für vWF-Polypeptide mit C-terminalen Deletionen herzustellen, wurde eine Loopout-Mutagenese in p5E unter Verwendung hybridisierender Oligonukleotide nach dem Muster des nichtkodierenden DNA-Strangs durchgeführt. Um ein Polypeptid (unter Verwendung des am Rest Asp^{709} endenden Polypeptids als Beispiel) herzustellen, wurde ein hybridisierendes Oligonukleotid erzeugt, das eine vWF-Untereinheitssequenz (zum Beispiel vom Rest 706 bis 713) kodiert, die zwischen bestimmten Kodons davon (z. B. Kodon 709 und Kodon 710) auch die Stopkodon/Leserahmenverschiebungssequenz 3'-ACT·ACT·T-5' enthielt.

[0307] Entsprechend wurden vWF-abgeleitete Polypeptide erzeugt, die C-terminale Deletionen aufweisen und die an den Resten 709, 704, 700 beziehungsweise 696 enden.

Cysteindefiziente Polypeptid-Untergruppen mit N-terminalen und C-terminalen Deletionen

[0308] Es sind auch als Antithrombotika wirksame therapeutische Polypeptid-Untergruppen nach dem Muster des Reste-441–733-vWF-Untereinheitsfragments hergestellt worden, die jedoch sowohl N-terminale als auch C-terminale Deletionen davon aufweisen.

[0309] Die Zubereitung von zweien solcher Polypeptide (Met·Tyr^{508} zu Pro^{704} und ebenfalls Met·Tyr^{508} zu Asp^{696}) erfolgte nach dem oben für die Herstellung von N-terminalen Deletionen (Herstellung von Met·Tyr^{508} zu Val^{733}) beschriebenen Verfahren, gefolgt von der oben beschriebenen Strategie zur Herstellung von C-terminalen Deletionen davon. Insbesondere wurden hybridisierende Oligonukleotide für die Loopout-Mutagenese in M13mp18 ausgewählt, um die obengenannte Stopkodon/Leserahmenverschiebungssequenz zwischen den Resten 704 und 705 beziehungsweise zwischen den Resten 696 und 697 zu inserieren.

Beispiel 15 – Wechselwirkung von vWF-Domänen mit GPIbα

[0310] Um die strukturellen Erfordernisse zu bestimmen, die notwendig sind, um die Bindung von multimerem vWF an Blutplättchen-GPIbα zu fördern, wurde eine Reihe von rekombinanten Polypeptiden hergestellt, die eine oder mehrere Domänen der Aminosäuresequenz (Beispiel 14) von dem rekombinanten vWF-Rest-441–733-Fragment ("$rvWF^{441–733}$"), umfassen. Die Sequenzen der resultierenden Polypeptide (Deletionsfragmente) von rvWF sind in **Fig. 2** dargestellt. Diese Polypeptide (im folgenden "Domänen") enthielten Deletionen in einem oder beiden der zwei Abschnitte der Aminosäuresequenz von rvWF, die den Schleifenbereich (definiert als die Aminosäuresequenz zwischen Cystein 509 und Cystein 695) flankieren. Einige der mutierten Moleküle wiesen vollständige oder teilweise Deletionen von einem oder beiden der kurzen Sequenz-Abschnitte auf, Mohri, H. et al., J. Biol. Chem., 263(34), 17901–17904 (1988), die an der effizienten Bindung von vWF an GPIbα beteiligt sind – Reste 474 bis 488 und ebenfalls 694 bis 708, wie durch die kreuzschraffierten Kästchen in **Fig. 2** angegeben.

[0311] Die Wechselwirkung der mutierten Moleküle mit GPIbα wurde unter Verwendung eines Tests (Sugimoto, M. et al., Biochemistry, 30, 5202–5209 (1991)) auf Grundlage der Hemmung der Bindung von Antikörper LJ-Ib1 an Blutplättchen ermittelt. Die entsprechenden IC_{50}-Werte (Fragmentkonzentration, die erforderlich ist, um die Antikörperbindung um 50% zu hemmen) sind in Tabelle 2 (kein Modulator) und Tabelle 3 (Botrocetin zugegeben) dargestellt. Die niedrigsten IC_{50}-Werte, die auf die größte Bindungsaffinität hinweisen, wurden mit

mutierten Molekülen erhalten, die eine vollständige Deletion der Sequenz auf der aminoterminalen Seite der Schleife besitzen. Unter den reduzierten und alkylierten mutierten Molekülen, die Deletionen enthalten, zeigten alle Moleküle mit Ausnahme von zweien eine Affinität für GPIbα, die der von $rvWF^{441–733}$ entsprach oder größer war. Zwei Spezies (in reduzierter und alkylierter Form), die vollständige Deletionen der Sequenz auf der carboxyterminalen Seite von Cystein 695 aufwiesen ($rvWF^{508–696}$, $rvWF^{441–696}$), wiesen eine stark reduzierte Fähigkeit auf, die Bindung von LJ-Ib1 an Blutplättchen zu hemmen (Tabelle 2).

TABELLE 2

Hemmung der LJ-Ib1-Bindung an Blutplättchen durch rekombinante vWF-Fragmente in Abwesenheit von Modulatoren

	(Oxidiert)		(Reduziert/alkyliert)	
Bezeichnung	IC50 (μM)	n	IC50(μM)	n
$rvWF^{441-733}$	3-5	6	0,07-0,3	6
$rvWF^{492-733}$	1,2-4	3	0,04-0,05	2
$rvWF^{508-733}$	0,1-0,3	4	0,02-0,03	3
$rvWF^{441-704}$	2,6-3,2	2	0,03-0,04	2
$rvWF^{441-700}$	2,0-3,1	2	0,5	2
$rvWF^{441-696}$	1,0-1,3	3	>4	3
$rvWF^{508-704}$	0,6	1	0,09	1
$rvWF^{508-696}$	0,4-0,7	2	>4	2

[0312] Die wiedergegebenen Werte repräsentieren den Bereich von Ergebnissen, die bei der angegebenen Zahl von Versuchen beobachtet wurden.

TABELLE 3

Hemmung der LJ-Ib1-Bindung an Blutplättchen durch rekombinante vWF-Fragmente in Anwesenheit von Botrocetin

	(Oxidiert)		(Reduziert/alkyliert)	
Bezeichnung	IC50 (nM)	n	IC50(nM)	n
$rvWF^{441-733}$	13-25	3	4-24	3
$rvWF^{492-733}$	36	1	28	1
$rvWF^{508-733}$	2,6	1	17	1
$rvWF^{441-704}$	6	1	6	1
$rvWF^{441-700}$	8	1	30,36	2
$rvWF^{441-696}$	33	1	20	1
$rvWF^{508-704}$	6	1	31	1
$rvWF^{508-696}$	200	2	51	1

[0313] Die wiedergegebenen Werte repräsentieren den Bereich von Ergebnissen, die bei der angegebenen

Zahl von Versuchen beobachtet wurden.

[0314] Es zeigt sich, daß die Integrität der 185-Reste-Schleife zwischen den Cysteinresten 599 und 695 wesentlich zur GPIb-Bindungsfunktion beiträgt. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch die Beobachtung, daß, wenn die intramolekulare Cys^{509}-Cys^{695}-Bindung oxidiert wird, die vollständige Deletion der die Disulfidschleife flankierenden Sequenzen sowohl auf der amino- als auch der carboxyterminalen Seite davon keinen schädlichen Einfluß auf die Wechselwirkung der Schleife mit GPIbα hat. Diese Ergebnisse implizieren, daß keiner der Reste innerhalb der Aminosäuresequenzen 441–508 und 696–733 der vWF-Untereinheit für die Expression der GPIbα-Bindung durch vWF-abgeleitete antithrombotische Polypeptide unbedingt erforderlich ist. Hinsichtlich der potentiellen Verwendung von isolierten rekombinanten Fragmenten von vWF als therapeutische antithrombotische Mittel, schließen wirksame Strukturen, die eine Funktionshemmung der vWF-Bindungsstelle auf GPIbα erreichen, das die Cys^{509}-Cys^{695}-Disulfidbindung enthaltende zyklische 508–696-Molekül und auch ein Reste-508–704-Polypeptid sowohl in reduzierter als auch oxidierter Form ein.

Beispiel 16 – Verhalten von (an Cystein) oxidierten und reduzierten Formen des Rest-441–733-vWF-Fragments in Gegenwart von Botrocetin

[0315] Die Wechselwirkung von $rvWF^{441–733}$ mit GPIbα wurde gemessen durch die Fähigkeit von $rvWF^{441–733}$, die Bindung eines monoklonalen Anti-GPIbα-Antikörpers, LJ-IB1, an Blutplättchen zu hemmen. Dieser Test, früher im Detail beschrieben (Sugimoto, M. et al., Biochemistry, 30, 5202–5208 (1991)) bietet den Vorteil, daß die Bindung von LJ-Ib1, anders als die des nativen vWF, nicht von der Gegenwart von Modulatoren wie Botrocetin oder Ristocetin abhängig ist. Von der Bindung von $vWF^{441–773}$ an GPIbα wird angenommen, daß sie die Region, von GPIbα blockiert, an die LJ-Ib1 bindet.

[0316] Zwei Formen von $rvWF^{441–733}$ wurden in diesen Versuchen verwendet; eine oxidierter Form, die die Cys^{509}-Cys^{695}-Disulfidbindung (als p5E-Konstrukt) beibehalten hat und eine reduzierte und alkylierte Form von $rvWF^{441–733}$, der die Disulfidbindung fehlt.

[0317] Die Ergebnisse dieser Versuche sind in **Fig.** 3 dargestellt. In Abwesenheit von Modulator wechselwirkten die reduzierte und alkylierte Form von $rvWF^{441–733}$ mit GPIbα mit weit größerer Affinität als die oxidierte Form (die Konzentration von reduziertem und alkyliertem $rvWF^{441–733}$, die erforderlich war, um die LJ-Ib1-Bindung um 50% zu hemmen (IC_{50}) war um mehr als das Zehnfach niedriger als die Menge von oxidiertem $rvWF^{441–733}$, die erforderlich war, um eine ähnliche Hemmung der LJ-Ib1-Bindung zu erzeugen, **Fig.** 3, Tafel A). Der Modulator Botrocetin hatte eine dramatische Wirkung auf die GPIbα-Bindungsaffinität beider Formen von $rvWF^{441–733}$. Die Wirkung von Botrocetin war für die oxidierte Spezies jedoch proportional viel größer, so daß die oxidierte Form die Bindung von LJ-Ib1 an Blutplättchen in Gegenwart von Botrocetin mit einer Affinität hemmte, die der der reduzierten und alkylierten Form ähnlich war (**Fig.** 3, Tafel B)

[0318] Die Cys^{509}-Cys^{695}-Bindung trägt daher zur Stabilisierung einer Konformation von nativem vWF in Lösung bei, die seine Wechselwirkung mit zirkulierenden Blutplättchen verhindert, jedoch die Ausprägung der vollen Bindungsaktivität in Anwesenheit von geeigneten Modulatoren ermöglicht.

Beispiel 17 – Polypeptid-Reinigung

[0319] Die rekombinanten Rest-441–733-vWF-Fragmente wurden sowohl in oxidierter Form als auch nach Reduktion und Alkylierung der zwei p5E-Cysteinreste (509, 695) zur Homogenität gereinigt, und die zwei Formen konnten durch Umkehrphasen-HPLC auf Basis einer bestimmten Retentionszeit differenziert werden. Sie zeigten bei SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auch eine unterschiedliche Mobilität.

Hinterlegung von Hybridomen und Stämmen, die zur Ausübung der Erfindung geeignet sind

[0320] Hinterlegungen von biologischen Reinkulturen der folgenden Hybridome/Stämme wurden bei der American Type Culture Collection, 13201 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, unter dem Budapester Vertrag vorgenommen. Die angegebenen Zugriffsnummern wurden nach erfolgreicher Lebensfähigkeitsuntersuchung und Zahlung der erforderlichen Gebühren vergeben.

[0321] Ein Zugang zu den Kulturen wird erhältlich sein, sofern und sobald solch ein Zugang nach dem Budapester Vertrag erforderlich ist. Alle Beschränkungen hinsichtlich der Verfügbarkeit der Kulturen für die Öffentlichkeit werden bei Gewährung eines Patentes auf die Anmeldung unwiderruflich entfernt und die Kulturen werden für einen Zeitraum von mindestens fünf Jahren nach dem letzten Antrag auf Bereitstellung von Proben und

in jedem Falle für eine Zeitdauer von mindestens 30 Jahren nach dem Datum der Hinterlegung permanent erhältlich sein. Sollten die Kulturen ihre Lebensfähigkeit verlieren oder versehentlich zerstört werden, werden sie mit (einer) lebensfähigen Kultur(en) derselben taxonomischen Beschreibung ersetzt werden.

Hybridome oder Stämme	ATCC-Nr.	Hinterlegungsdatum
E. coli p5E BL21 (DE3) 96.3	ATCC 68406	19/9/90
E. coli XS127 96.4	ATCC 68407	19/9/90
Murines Hybridom LJ-Ibl (TSRI 138.5)	ATCC HB10940	3/12/91

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: Ruggeri, Zaverio M. und Ware, Jerry, Erfinder im Namen des Scripps Research Institute

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: THERAPEUTISCHE DOMÄNEN DES VON WILLEBRAND-FAKTORS

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 15

(iv) KORRSPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: The Scripps Research Institute

(B) STRASSE: 10666 North Torrey Pines Road

(C) STADT: La Jolla

(D) STAAT: Kalifornien

(E) LAND: Vereinigte Staaten

(F) POSTLEITZAHL: 92037

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIENTYP: 2-Megabyte 3,5"-Diskette

(B) COMPUTER: AST Bravo 386SX

(C) BETRIEBSSYSTEM: MS DOS version 3.2

(D) SOFTWARE: WordPerfect 5.1 conv. to ASCII

(vi) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER:

(B) ANMELDETAG: 23. FEB 1993

(C) KLASSIFIKATION

(vii) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG: Dies ist eine CIP der

(A) ANMELDENUMMER: PCT/US91/07756

(B) ANMELDETAG: 17. OKT 1991

(viii) DATEN DES VERTRETERS/ANWALTS:

(A) NAME: Barron, Alexis

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 22702

(C) AKTENZEICHEN/LISTENNUMMER: P16,633-H PCT

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSDATEN:

(A) TELEFON: (215) 923-4466

(B) TELEFAX: (215) 923-2189

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 960

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
GAA GAC TGT CCA GTG TGT GAG GTG GCT GGC                          30
Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
                435                 440
CGG CGT TTT GCC TCA GGA AAG AAA GTC ACC                          60
Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr
                445                 450
TTG AAT CCC AGT GAC CCT GAG CAC TGC CAG                          90
Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln
                455                 460
ATT TGC CAC TGT GAT GTT GTC AAC CTC ACC                         120
Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
                465                 470
TGT GAA GCC TGC CAG GAG CCG GGA GGC CTG                         150
Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu
                475                 480
GTG GTG CCT CCC ACA GAT GCC CCG GTG AGC                         180
Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser
                485                 490
CCC ACC ACT CTG TAT GTG GAG GAC ATC TCG                         210
Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser
                495                 500
GAA CCG CCG TTG CAC GAT TTC TAC TGC AGC                         240
Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser
                505                 510
AGG CTA CTG GAC CTG GTC TTC CTG CTG GAT                         270
Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp
                515                 520
GGC TCC TCC AGG CTG TCC GAG GCT GAG TTT                         300
Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe
                525                 530
GAA GTG CTG AAG GCC TTT GTG GTG GAC ATG                         330
Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met
                535                 540
ATG GAG CGG CTG CGC ATC TCC CAG AAG TGG                         360
```

```
Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys Trp
                545                 550
GTC CGC GTG GCC GTG GTG GAG TAC CAC GAC                              390
Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
                555                 560
GGC TTC CAC GCC TAC ATC GGG CTC AAG GAC                              420
Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp
                565                 570
CGG AAG CGA CCG TCA GAG CTG CGG CGC ATT                              450
Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile
                575                 580
GCC AGC CAG GTG AAG TAT GCG GGC AGC CAG                              480
Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln
                585                 590
GTG GCC TCC ACC AGC GAG GTC TTG AAA TAC                              510
Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr
                595                 600
ACA CTG TTC CAA ATC TTC AGC AAG ATC GAC                              540
Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp
                605                 610
CGC CCT GAA GCC TCC CGC ATC GCC CTG CTC                              570
Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu
                615                 620
CTG ATG GCC AGC CAG GAG CCC CAA CGG ATG                              600
Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met
                625                 630
TCC CGG AAC TTT GTC CGC TAC GTC CAG GGC                              630
Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly
                635                 640
CTG AAG AAG AAG AAG GTC ATT GTG ATC CCG                              660
Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro
                645                 650
GTG GGC ATT GGG CCC CAT GCC AAC CTC AAG                              690
Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys
                655                 660
CAG ATC CGC CTC ATC GAG AAG CAG GCC CCT                              720
Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro
                665                 670
```

```
GAG AAC AAG GCC TTC GTC CTG AGC AGT GTG                          750
Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val
                675                 680
GAT GAG CTG GAG CAG CAA AGG GAC GAG ATC                          780
Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile
                685                 690
GTT AGC TAC CTC TGT GAC CTT GCC CCT GAA                          810
Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu
                695                 700
GCC CCT CCT CCT ACT CTG CCC CCC CAC ATG                          840
Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met
                705                 710
GCA CAA GTC ACT GTG GGC CCG GGG CTC TTG                          870
Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu
                715                 720
GGG GTT TCG ACC CTG GGG CCC AAG AGG AAC                          900
Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn
                725                 730
TCC ATG GTT CTG GAT GTC <RTI GCG TTC GTC CTG                     930
Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu
                735                 740
GAA GGA TCG GAC AAA ATT GGT GAA GCC GAC                          960
Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp
                745                 750
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 26

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```
ACGAATTC CGG CGT TTT GCC TCA GGA                                  26
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 35 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAAGCT TAC CAT GGA GTT CCT CTT GGG CCC CAG GG 35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 36 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GAC AAC ATC AAC GTG GCC AAT CTG GCC GTG CTC AGG 36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CGG CTC CTG GCC GGC TTC ACC GGT GAG GTT 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 19 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6

G CCT GCT GCC GTA GAA ATC 19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7

GGC AAG GTC ACC GAG GTA GCT 21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 36

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8

GAC AAC ATC ACC GTG GCC 18

AAT CTG GCC GTG CTC AGG 36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 36

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9

GAC AAC ATC ACC GTG GCC AAT CTG GCC GTG CTC AGG 36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10

GAC TTG TGC CAT GTC GTA GCT AAC GAT CTC 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 21

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met
5 10
Gly Arg Gly Ser Pro Gly Leu Gln Glu Phe Arg
15 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGY: linear
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12
GAA GGA GAT ATA CAT ATG GCT AGC 24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGY: linear
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13
GCC TCC CGG CTC CTG CAT ATG TAT ATC TCC 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN
(A) LÄNGE: 23
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang
(D) TOPOLOGY: linear
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14
Val Ser Ser Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala
5 10
Arg Lys Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr
15 20
Ala Glu Gln

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15
(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 320

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15

```
Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
                435                 440
Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr
                445                 450
Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln
                455                 460
Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
                465                 470
Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu
                475                 480
Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser
                485                 490
Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser
                495                 500
Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser
                505                 510
Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp
                515                 520
Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe
                525                 530
Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met
                535                 540
Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys Trp
                545                 550
Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
                555                 560
Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp
                565                 570
Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile
                575                 580
Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln
                585                 590
Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr
```

```
                595                 600
Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp
                605                 610
Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu
                615                 620
Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met
                625                 630
Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly
                635                 640
Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro
                645                 650
Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys
                655                 660
Gln lie Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro
                665                 670
Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val
                675                 680
Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile
                685                 690
Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu
                695                 700
Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met
                705                 710
Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu
                715                 720
Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn
                725                 730
Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu
                735                 740
Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp
                745                 750
```

Patentansprüche

1. Polypeptid, das die Fähigkeit hat, eine Bindung des von-Willebrand-Faktors (vWF) an Thrombozyten zu inhibieren, und das aus der Gruppe gewählt wird, bestehend aus:
(A) einem Polypeptid, bestehend aus der Aminosäuresequenz desjenigen Fragments der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit, dessen Aminoterminus bei Cys^{509} und dessen Carboxyterminus bei Cys^{695} liegt, und in dem der Cys^{509}-Rest und der Cys^{695}-Rest im natürlich vorkommenden Fragment durch eine intramolekulare Disulfidbindung verbunden sind, wobei das Polypeptid eine modifizierte Form dieses Fragments ist, insofern die Cysteinreste so modifiziert sind, dass sie keine Disulfidbindung bilden können;
(B) einem Polypeptid, bestehend aus: (i) dem modifizierten Fragment von (A); und (ii) der Aminosäuresequenz desjenigen Fragments der reifen vWF-Untereinheit, dessen Aminoterminus bei Arg^{441} und dessen Carboxyterminus bei Tyr^{508} liegt, oder einem Unterfragment davon oder einer Kombination von Unterfragmenten davon; wobei die Sequenzen von (B)(i) und (B)(ii) durch eine kovalente Bindung zwischen dem Aminoterminus des modifizierten Fragments von (B)(i) und dem Carboxyterminus des Fragments von (B)(ii) verbunden sind; und
(C) einem Polypeptid, bestehend aus; (i) dem modifizierten Fragment von (A); und (ii) der Aminosäuresequenz desjenigen Fragments der reifen vWF-Untereinheit, dessen Aminoterminus bei Asp^{696} und dessen Carboxyter-

minus bei Val^{733} liegt, oder einem Unterfragment davon oder einer Kombination von Unterfragmenten davon; wobei die Sequenzen von (C)(i) und (C)(ii) durch eine kovalente Bindung zwischen dem Carboxyterminus des modifizierten Fragments von (C)(i) und dem Aminosäureterminus des Fragments von (C)(ii) verbunden sind.

2. Polypeptid nach Anspruch 1, wobei die Cysteinreste in Positionen 509 und 695 reduzierte und alkylierte Form aufweisen.

3. Polypeptid nach Anspruch 2, wobei eine Acetamidgruppe an das Schwefelatom der Cysteinreste kovalent gebunden ist.

4. Polypeptid, das die Fähigkeit hat, die Bindung des von-Willebrand-Faktors (vWF) an Thrombozyten zu inhibieren und aus einem Fragment der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit besteht, das aus der Gruppe gewählt wird, bestehend aus Arg^{441} bis Asp^{709}, Arg^{441} bis Pro^{704}, Arg^{441} bis Glu^{700}, Arg^{441} bis Asp^{696}, Gln^{475}, bis Val^{733}, Thr^{492} bis Val^{733}, Tyr^{508} bis Val^{733}, Tyr^{508} bis His^{709}, Tyr^{508} bis Pro^{704} und Tyr^{508} bis Glu^{700}, wobei die Cysteinreste Cys^{509} und Cys^{695} dieser Fragmente im natürlich vorkommenden Fragment durch eine intramolekulare Disulfidbindung verbunden sind und das Polypeptid eine modifizierte Form des Fragments ist, insofern das Polypeptid die Disulfidbindung nicht enthält.

5. Polypeptid nach Anspruch 4, wobei die Cysteinreste in Positionen 509 und 695 reduzierte und alkylierte Form aufweisen.

6. Polypeptid nach Anspruch 4 oder Anspruch 5, das einen Aminoterminus bei Tyr^{508} und einen Carboxyterminus bei Pro^{704} aufweist.

7. Polypeptid nach Anspruch 4 oder Anspruch 5, das einen Aminoterminus bei Arg^{441} und einen Carboxyterminus bei Asp^{709} aufweist,

8. Polypeptid, das die Fähigkeit hat, die Bindung des von-Willebrand-Faktors (vWF) an Thrombozyten zu inhibieren, und das aus der Gruppe gewählt wird, bestehend aus:
(A) einem Polypeptid, bestehend aus: der Aminosäuresequenz desjenigen Fragments der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit, dessen Aminoterminus bei Cys^{509} und dessen Carboxyterminus bei Cys^{695} liegt, und in dem der Aminosäurerest Cys^{509} und der Aminosäurerest Cys^{695} im natürlich vorkommenden Fragment durch eine intramolekulare Disulfidbindung verbunden sind, wobei das Polypeptid eine modifizierte Form des Fragments ist, insofern das Polypeptid keine Disulfidbindung enthält und die Aminosäurereste von Cystein-Aminosäureresten verschieden sind;
(B) einem Polypeptid, bestehend aus: (i) dem modifizierten Fragment von (A); und (ii) der Aminosäuresequenz desjenigen Fragments der reifen vWF-Untereinheit, dessen Aminoterminus bei Arg^{441} und dessen Carboxyterminus bei Tyr^{508} liegt, oder einem Unterfragment davon oder einer Kombination von Unterfragmenten davon; wobei die Sequenzen von (B)(i) und (B)(ii) durch eine kovalente Bindung zwischen dem Aminoterminus des modifizierten Fragments von (B)(i) und dem Carboxyterminus des Fragments von (B)(ii) verbunden sind;
(C) einem Polypeptid, bestehend aus: (i) dem modifizierten Fragment von (A); und (ii) der Aminosäuresequenz desjenigen Fragments der reifen vWF-Untereinheit, dessen Aminoterminus bei Asp^{696} und dessen Carboxyterminus bei Val^{733} liegt, oder einem Unterfragment davon oder einer Kombination von Unterfragmenten davon; wobei die Sequenzen von (C) (i) und (C) (ii) durch eine kovalente Bindung zwischen dem Carboxyterminus des modifizierten Fragments von (C)(i) und dem Aminoterminus des Fragments von (C)(ii) verbunden sind.

9. Polypeptid nach Anspruch 6, bestehend aus einem Fragment der reifen von-Willebrand-Faktor-Untereinheit, das aus der Gruppe gewählt wird, bestehend aus Arg^{441} bis Asp^{709}, Arg^{441} bis Pro^{704}, Arg^{441} bis Asp^{696}, Gln^{475} bis Val^{733}, Thr^{492} bis Val^{733}, Tyr^{508} bis Val^{733}, Tyr^{508} bis His^{709}, Tyr^{508} bis Pro^{704} und Tyr^{508} bis Glu^{700}, wobei die Cysteinreste Cys^{509} und Cys^{695} der Fragmente durch eine intramolekulare Disulfidbindung verbunden sind und das Polypeptid eine modifizierte Form des Fragments ist, insofern von Cystein verschiedene Aminosäurereste in Positionen 509 und 695 des Polypeptids vorhanden sind.

10. Polypeptid nach Anspruch 9, das einen Aminoterminus bei Tyr^{508} und einen Carboxyterminus bei Pro^{704} aufweist.

11. Polypeptid nach Anspruch 9, das einen Aminoterminus bei Arg^{441} und einen Carboxyterminus bei Asp^{709} aufweist.

12. Polypeptid nach Anspruch 9, wobei es sich bei den Aminosäureresten in Positionen 509 und 695 um

Glycin- oder Alaninreste handelt.

13. DNA-Sequenz, die ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1–12 kodiert.

14. Klonierungshilfsmittel, das eine DNA-Sequenz nach Anspruch 13 enthält.

15. Expressionsplasmid oder viraler Expressionsvektor, eine DNA-Sequenz nach Anspruch 13 enthaltend.

16. Rekombinante Wirtszelle, die mit einem Expressionsplasmid oder einem viralen Expressionsvektor nach Anspruch 15 transformiert wird.

17. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids aus einer kodierenden DNA-Sequenz nach Anspruch 13, das folgende Schritte umfasst:
(A) Bereitstellen der DNA-Sequenz;
(B) Einbringen der DNA-Sequenz in einen geeigneten Vektor, um ein Konstrukt zu erzeugen, das ein Expressionsplasmid oder einen viralen Expressionsvektor enthält, wobei das Konstrukt befähigt ist, die Expression des Polypeptids in einer Wirtszelle zu lenken; und
(C) Transformieren einer Wirtszelle mit dem Expressionsplasmid oder dem viralen Expressionsvektor; und
(D) Kultivieren der transformierten Wirtszelle unter Bedingungen, die eine Expression des Polypeptids innerhalb der Wirtszelle verursachen.

18. Antikörper, spezifisch für ein Polypeptid, das die Bindung des vWF an Thrombozyten inhibieren kann, wobei der Antikörper ein Epitop erkennt, das zwischen den Aminosäureresten Cys^{509} und Cys^{695} der reifen vWF-Untereinheit liegt.

19. Therapeutische Zusammensetzung aus einem oder mehreren der Polypeptide nach einem der Ansprüche 1–12, die befähigt ist, eine Bindung des von-Willebrand-Faktors (vWF) an Thrombozyten zu inhibieren, und einem pharmazeutisch annehmbaren Träger.

20. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1–12 zur Herstellung eines Medikaments, das bei einem Verfahren verwendet wird, das eine Aktivierung und/oder Aggregation von Thrombozyten inhibiert.

21. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1–12 zur Herstellung eines Medikaments, das bei einem Verfahren verwendet wird, das eine Adhäsion der Thrombozyten an vaskulare Oberflächen inhibiert.

22. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1–12 zur Herstellung eines Medikaments, das bei einem Verfahren verwendet wird, das eine Thrombose eines Patienten inhibiert oder behandelt.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

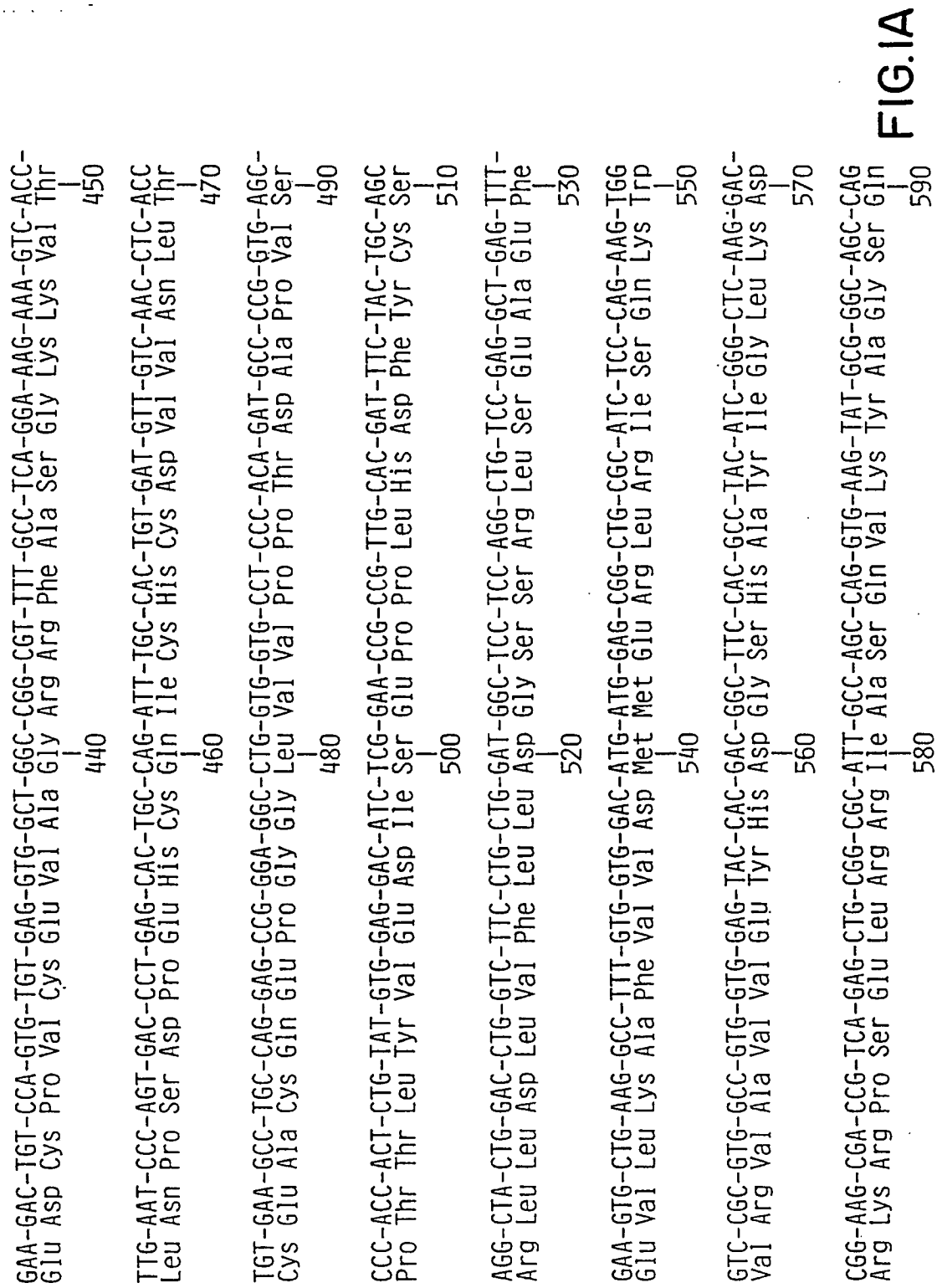

FIG.1A

```
GTG-GCC-TCC-ACC-AGC-GAG-GTC-TTG-AAA-TAC-ACA-CTG-TTC-CAA-ATC-TTC-AGC-AAG-ATC-GAC-
Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp
                                       |                                       |
                                      600                                     610

CGC-CCT-GAA-GCC-TCC-CGC-ATC-GCC-CTG-CTC-CTG-ATG-GCC-AGC-CAG-GAG-CCC-CAA-CGG-ATG
Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met
                                       |                                       |
                                      620                                     630

TCC-CGG-AAC-TTT-GTC-CGC-TAC-GTC-CAG-GGC-CTG-AAG-AAG-AAG-AAG-GTC-ATT-GTG-ATC-CCG-
Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro
                                       |                                       |
                                      640                                     650

GTG-GGC-ATT-GGG-CCC-CAT-GCC-AAC-CTC-AAG-CAG-ATC-CGC-CTC-ATC-GAG-AAG-CAG-GCC-CCT
Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro
                                       |                                       |
                                      660                                     670

GAG-AAC-AAG-GCC-TTC-GTG-CTG-AGC-AGT-GTG-GAT-GAG-CTG-GAG-CAG-CAA-AGG-GAC-GAG-ATC-
Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile
                                       |                                       |
                                      680                                     690

GTT-AGC-TAC-CTC-TGT-GAC-CTT-GCC-CCT-GAA-GCC-CCT-CCT-CCT-ACT-CTG-CCC-CCC-CAC-ATG
Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met
                                       |                                       |
                                      700                                     710

GCA-CAA-GTC-ACT-GTG-GGC-CCG-GGG-CTC-TTG-GGG-GTT-TCG-ACC-CTG-GGG-CCC-AAG-AGG-AAC-
Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn
                                       |                                       |
                                      720                                     730

TCC-ATG-GTT-CTG-GAT-GTG-GCG-TTC-GTC-CTG-GAA-GGA-TCG-GAC-AAA-ATT-GGT-GAA-GCC-GAC
Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp
                                       |                                       |
                                      740                                     750
```

FIG.IB

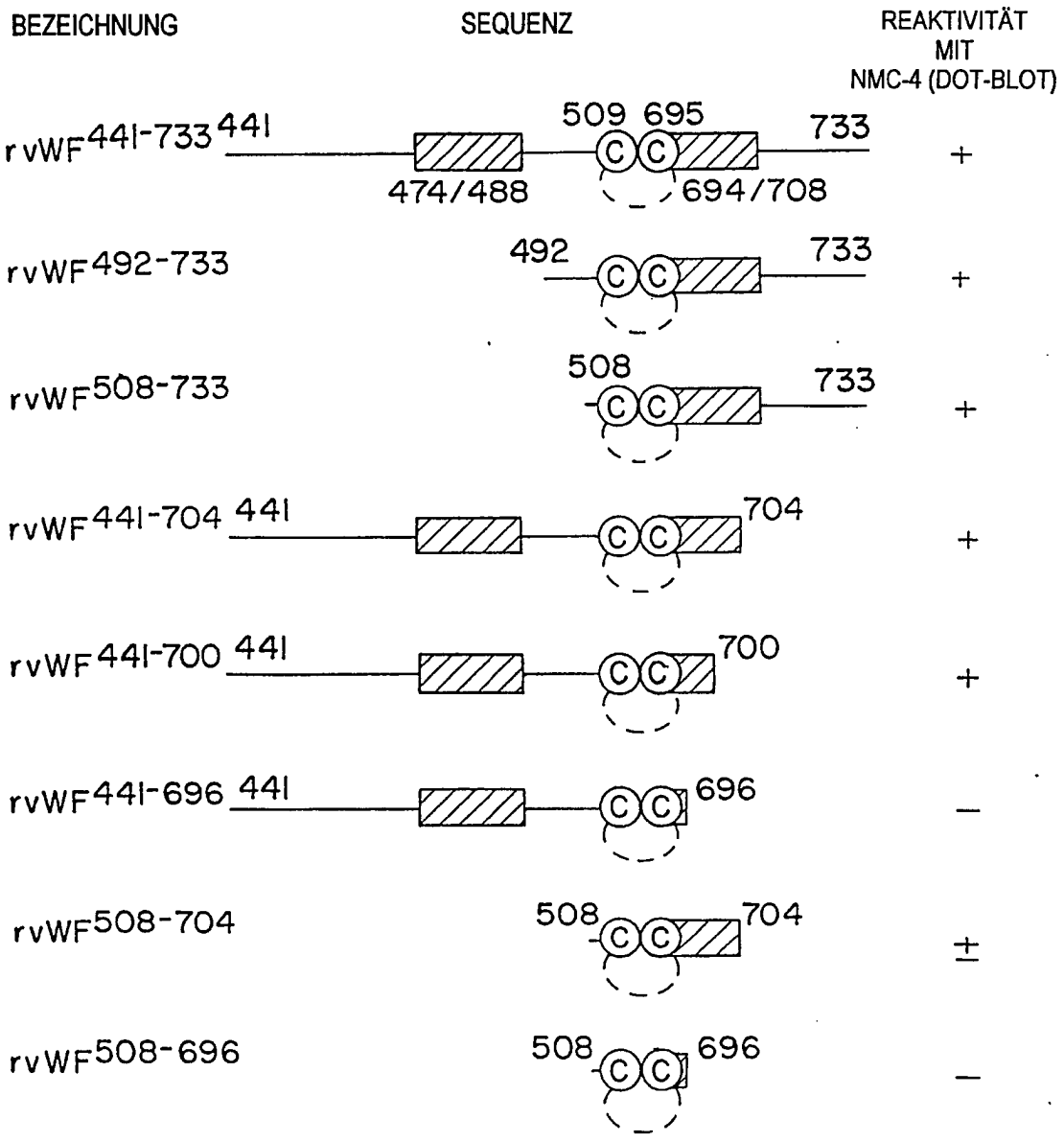
BEZEICHNUNG
SEQUENZ
REAKTIVITÄT MIT NMC-4 (DOT-BLOT)
rvWF441-733
441
509 695
733
474/488
694/708
+
rvWF492-733
492
733
+
rvWF508-733
508
733
+
rvWF441-704
441
704
+
rvWF441-700
441
700
+
rvWF441-696
441
696
−
rvWF508-704
508
704
±
rvWF508-696
508
696
−

FIG. 2

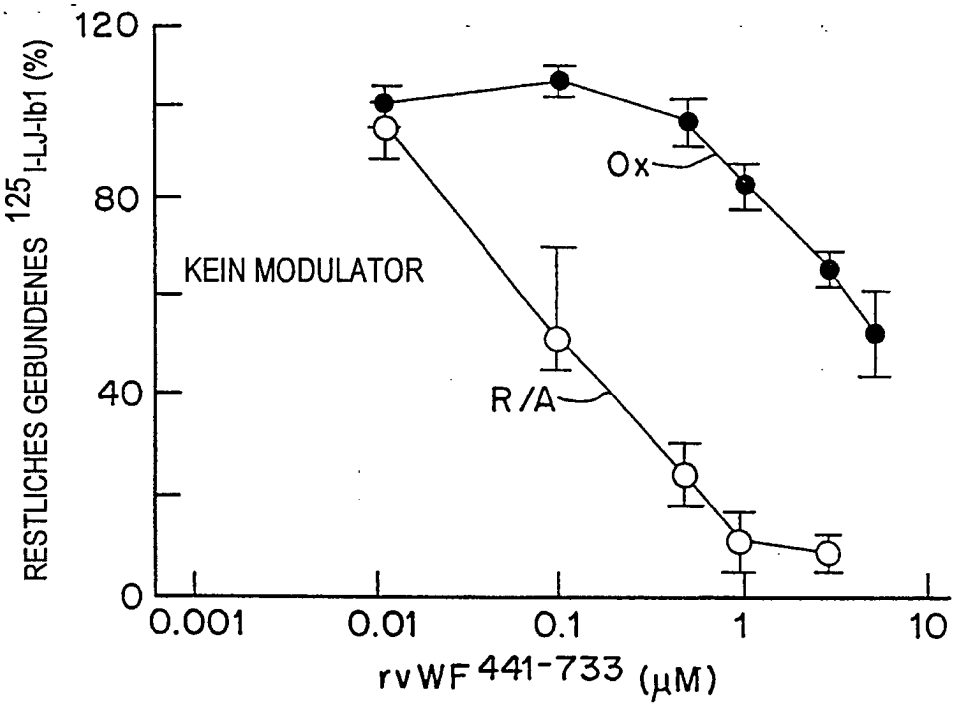
120
80
40
0
RESTLICHES GEBUNDENES ^{125}I-LJ-Ib1 (%)
KEIN MODULATOR
Ox
R/A
0.001
0.01
0.1
1
10
rvWF 441-733 (μM)

FIG. 3A

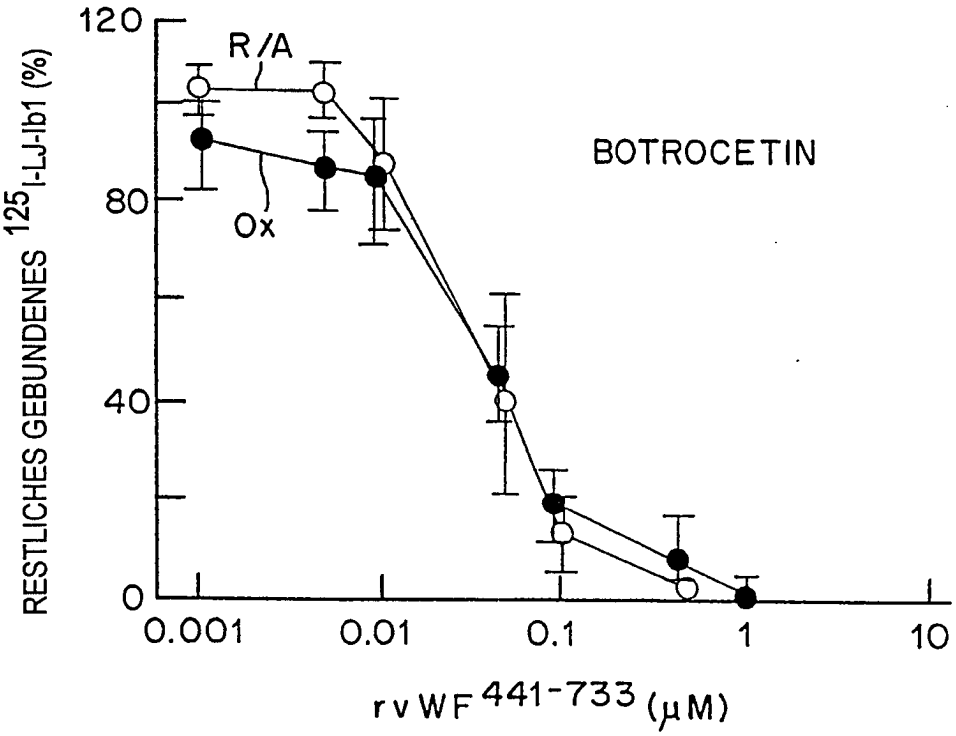
120
80
40
0
RESTLICHES GEBUNDENES ^{125}I-LJ-Ib1 (%)
R/A
Ox
BOTROCETIN
0.001
0.01
0.1
1
10
rvWF 441-733 (μM)

FIG. 3B