PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 :
C12N 15/58, 9/64, 5/10
A61K 37/547

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/02798

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. März 1991 (07.03.91)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP90/01401

(22) Internationales Anmeldedatum: 22. August 1990 (22.08.90)

(30) Prioritätsdaten:
P 39 27 865.4 23. August 1989 (23.08.89) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US):* BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Straße 112 - 132, D-6800 Mannheim-Waldhof (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)* : WEIDLE, Ulrich [DE/DE]; Landwehrstraße 56, D-8000 München 2 (DE). STERN, Anne [DE/DE]; Karwendelstraße 10, D-8122 Penzberg (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw. ; Möhlstraße 22, D-8000 München 80 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent)*, DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 4. April 1991 (04.04.91)

(54) Title: t-PA MUTANT GK1L

(54) Bezeichnung: t-PA-MUTANTE GK1L

(57) Abstract

Recombinant DNA which codes for a protein with the domains G, K1 and L of t-PA, in which the sequences coding for the domains K2 and F of the wild type t-PA gene or the sequences derived therefrom in the context of the genetic code are completely deleted in accordance with the exact exon/intron limits on the t-PA gene. Process for preparing said recombinant DNA. Vectors which contain said recombinant DNA as well as cells which are transformed with said vectors or said recombinant DNA. Protein with fibrinolytic properties by expression of a DNA sequence according to the invention in suitable host cells, which is composed of the amino acid sequences of the domains G, K1 and L of t-PA in this sequence and is possibly glycosylized. Process for preparing it. Fibrinolytic agent containing a protein according to the invention.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine rekombinante DNA, die für ein Protein mit den Domänen G, K1 und L von t-PA kodiert, bei der die für die Domänen K2 und F des Wildtyp t-PA-Gens kodierenden Sequenzen oder die im Rahmen des genetischen Codes davon abgeleiteten Sequenzen entsprechend der genauen Exon/Intron-Grenzen auf dem t-PA-Gen vollständig deletiert sind. Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer rekombinanter DNA. Die Erfindung betrifft weiterhin Vektoren, die diese rekombinante DNA enthalten, sowie Zellen, die mit erfindungsgemäßen Vektoren bzw. mit der erfindungsgemäßen DNA transformiert sind. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Protein mit fibrinolytischen Eigenschaften durch Expression einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz in geeigneten Wirtszellen, das aus den Aminosäuresequenzen der Domänen G, K1 und L von t-PA in dieser Reihenfolge besteht und gegebenenfalls glykosiliert ist, sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung. Schließlich betrifft die Erfindung auch ein fibrinolytisches Mittel, das ein erfindungsgemäßes Protein enthält.

* Siehe Rückseite

BENENNUNGEN VON "DE"

Bis auf weiteres hat jede Benennung von "DE" in einer internationalen Anmeldung, deren internationaler Anmeldetag vor dem 3. Oktober 1990 liegt, Wirkung im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland mit Ausnahme des Gebietes der früheren DDR.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Fasso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
DE	Deutschland	LU	Luxemburg	TG	Togo
DK	Dänemark	MC	Monac	oUS	Vereinigte Staaten von Amerika

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 90/01401

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [6]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl.[5] C 12 N 15/58, C 12 N 9/64, C 12 N 5/10, A 61 K 37/547

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [7]

Classification System [8]	Classification Symbols
Int. Cl.[5]	C 12 N

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched [9]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [10]

Category *	Citation of Document, [11] with indication, where appropriate, of the relevant passages [12]	Relevant to Claim No. [13]
A	Gene, vol. 79, No. 2, 1989, Elsevier Science Publishers B.V.(Biomedical Division), (Amsterdam, NL), A. Stern et al.: "Functional topology of human tissue-type plasminogen activator: characterization of two deletion derivatives and of a duplication derivative", pages 333-344, see the whole article	
A	WO, A, 87/03906 (THE UPJOHN CO.) 2 July 1987 see claims	
A	Febs Letters, vol. 189, No. 1, September 1985, published by Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), Federation of European Biochemical Societies (Amsterdam, NL), H. Kagitani et al.: "Expression in E. coli of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity", pages 145-149, see the whole article	
P,X	Gene, vol. 87, No. 2, 15 March 1990, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), (Amsterdam, NL), A. Stern et al.: "Kringle 1 domain of human tissue-type plasminogen activator is a functional module mediating fibrinogen-stimulated plasminogenolytic	1-12

./.

* Special categories of cited documents [14]

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
9 November 1990 (09.11.90)	22 February 1991 (22.02.91)
International Searching Authority	**Signature of Authorized Officer**
EUROPEAN PATENT OFFICE	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	activity", pages 305-308 see the whole article ---	

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. EP 9001401 SA 39260

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 06/02/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A- 8703906	02-07-87	AU-B-	600463	16-08-90
		AU-A-	6770187	15-07-87
		EP-A-	0231624	12-08-87
		EP-A-	0289508	09-11-88
		JP-T-	63501841	28-07-88

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 90/01401

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)[6]

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Cl.[5] C 12 N 15/58, C 12 N 9/64, C 12 N 5/10, A 61 K 37/547

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff[7]

Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole
Int.Cl.[5]	C 12 N

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen[8]

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN[9]

Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung[11], soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile[12]	Betr. Anspruch Nr.[13]
A	Gene, Band 79, Nr. 2, 1989, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), (Amsterdam, NL), A. Stern et al.: "Functional topology of human tissue-type plasminogen activator: characterization of two deletion derivatives and of a duplication derivative", Seiten 333-344, siehe den ganzen Artikel --	
A	WO, A, 87/03906 (THE UPJOHN CO.) 2. Juli 1987 siehe Patentansprüche --	

./.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen[10]:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
9. November 1990	22. 02. 91
Internationale Recherchenbehörde	**Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten**
Europäisches Patentamt	Alfredo Prein

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	Febs Letters, Band 189, Nr. 1, September 1985, Published by Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), Federation of European Biochemical Societies, (Amsterdam, NL), H. Kagitani et al.: "Expression in E. coli of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity", Seiten 145-149, siehe den ganzen Artikel --	
P,X	Gene, Band 87, Nr. 2, 15. März 1990, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), (Amsterdam, NL), A. Stern et al.: "Kringle 1 domain of human tissue-type plasminogen activator is a functional module mediating fibrinogen-stimulated plasminogenolytic activity", Seiten 305-308, siehe den ganzen Artikel ----------	1-12

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9001401
SA 39260

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 06/02/91
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A- 8703906	02-07-87	AU-B-	600463	16-08-90
		AU-A-	6770187	15-07-87
		EP-A-	0231624	12-08-87
		EP-A-	0289508	09-11-88
		JP-T-	63501841	28-07-88

EPO FORM P0473