

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 168 342 B1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag der Patentschrift: 03.07.91

(21) Anmeldenummer: 85810268.4

(22) Anmeldetag: 10.06.85

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/15**, C12P 19/34,
C12P 21/02, C07K 7/10,
A61K 37/64, G01N 33/94,
//C12R1/19, C12R1/125,
C12R1/865

(54) Verfahren zur Herstellung von Thrombin-Inhibitoren.

(30) Priorität: 14.06.84 CH 2882/84

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
15.01.86 Patentblatt 86/03

(45) Bekanntmachung des Hinweises auf die
Patenterteilung:
03.07.91 Patentblatt 91/27

(64) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A- 158 564

FEBS LETTERS, vol. 165, no. 2, January 9,
1984, Amsterdam J. DODT et al. "The com-
plete amino acid sequence of hirudin, a
thrombin specific inhibitor" pages 180-184

(73) Patentinhaber: CIBA-GEIGY AG
Klybeckstrasse 141
CH-4002 Basel(CH)

Patentinhaber: UCP GEN-PHARMA AG
Solothurnstrasse 24
CH-3422 Kirchberg(CH)

(72) Erfinder: Liersch, Manfred, Dr.
Rütling 26
CH-4125 Riehen(CH)
Erfinder: Rink, Hans
Rebenstrasse 10
CH-4125 Riehen(CH)
Erfinder: Märkl, Walter, Dr.
Bremenstallstrasse 30
CH-4313 Möhlin(CH)
Erfinder: Grütter, Markus Gerhard, Dr.
Nettenbergweg
CH-4146 Hochwald(CH)
Erfinder: Meyhack, Bernd, Dr.
Höhenweg 9
CH-4312 Magden(CH)

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).

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Expressionsvektoren enthaltend DNA-Sequenzen, welche für die Aminosäuresequenz des Thrombin-Inhibitors Hirudin kodieren, mit solchen Expressionsvektoren transformierte Wirtszellen, Verfahren zur Herstellung dieser Expressionsvektoren, und transformierten Wirtszellen und Verfahren zur Herstellung des Thrombin-Inhibitors Desulfatohirudin mit Hilfe der transformierten Wirtszellen.

Im Plasma des gesunden Säugetierorganismus besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dem fibrinolytischen System und dem Koagulationssystem, wodurch ein funktionstüchtiges Gefässnetz aufrechterhalten wird. Bei Gefässverletzungen lagert das Koagulationssystem eine Fibrin-Matrix ab, welche nach Erreichung des hämostatischen Zustands durch das fibrinolytische System wieder abgebaut wird. In Fällen, in denen das fibrinolytische Potential des Organismus nicht ausreicht, um gebildete intravaskuläre Thrombi abzubauen, z.B. bei Patienten, die unter Thromboembolien oder postoperativen Komplikationen leiden, erweist es sich als unerlässlich, den Organismus durch Verabreichung von thrombolytischen Mitteln oder Antikoagulantien zu unterstützen.

In der herkömmlichen Antikoagulationstherapie wurden bisher vor allem Heparin, ferner auch 4-Hydroxycumarin- und 1,3-Indandion-Derivate eingesetzt. Obwohl mit diesen Mitteln bemerkenswerte Erfolge erzielt worden sind, weisen sie doch einige Nachteile auf. So wirkt Heparin nicht direkt auf den Blutgerinnungsvorgang ein, sondern entfaltet seine koagulationshemmende Wirkung indirekt durch Beschleunigung der Hemmung von Thrombin und des Faktors X durch Antithrombin III. Heparin geht im Organismus weiterhin zahlreiche unspezifische Reaktionen ein und wird vom Platelet-Faktor 4 neutralisiert, was insbesondere seine Anwendbarkeit bei der Verbrauchs-Koagulopathie bzw. disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) beeinträchtigt. Es besteht daher ein Bedarf nach alternativen und spezifischeren Mitteln zur Antikoagulationstherapie.

Seit langem ist ein natürliches im Blutegel (*Hirudo medicinalis*) vorkommendes Antikoagulans, Hirudin, bekannt. Hirudin ist ein aus 65 Aminosäuren bestehendes Polypeptid mit vollständig aufgeklärter Primärstruktur (1) und weist als strukturelle Charakteristika eine Anhäufung hydrophober Aminosäuren am N-Terminus und polarer Aminosäuren am C-Terminus, einen als Sulfatmonoester vorliegenden Tyrosin-Rest (Tyr⁶³) und drei Disulfidbrücken, deren exakte Anordnung allerdings noch nicht bekannt ist, auf.

Hirudin ist mit einem K_f -Wert (Komplex-Dissoziationskonstante) von $6 \cdot 10^{-11}$ M der stärkste bekannte Thrombin-Inhibitor und durch eine spezifische Affinität zu Thrombin charakterisiert; andere Enzyme der Blutgerinnungskaskade werden nicht inhibiert. Im Gegensatz zu Heparin übt Hirudin seinen inhibierenden Einfluss auf Thrombin direkt aus und wirkt nicht, wie jenes, über Antithrombin III. Der einzige pharmakologisch fassbare Effekt von gereinigtem Hirudin ist die Hemmung der Blutkoagulation bzw. die Prophylaxe von Thrombose. Bei intravenöser Verabreichung an Hunden war selbst bei hohen Dosen kein Einfluss auf Herzschlagfrequenz, Atmung, Blutdruck, Thrombocytenzahl, Fibrinogen und Hämoglobin zu beobachten. Bei Versuchen an der Ratte, am Schwein und am Hund erwies sich Hirudin als wirksam bei experimenteller Thrombose (hervorgerufen entweder durch Stasis oder durch Injektion von Thrombin), beim Endotoxinschock sowie bei DIC (disseminierter intravasaler Gerinnung). Bei direkten Vergleichversuchen mit Heparin, wo immer sie durchgeführt wurden, zeigte sich Hirudin diesem überlegen.

Obwohl seit langem bekannt, erlangte Hirudin bis heute nicht die breite therapeutische Anwendung, die man aufgrund seiner ausgezeichneten biologischen Eigenschaften erwarten durfte. Seiner allgemeinen Anwendung in der Medizin steht nämlich als ein schwerwiegender Nachteil seine äusserst beschränkte Zugänglichkeit im Wege. Bis jetzt waren Hirudin-Präparate ausschliesslich aus teurem und schwer zugänglichem Naturmaterial, ausgehend von Blutegel-Extrakten durch zeit- und kostenaufwendige Isolier- und Reinigungsverfahren, erhältlich (vgl. Ref. 2). Die relativ lange Sequenz von 65 Aminosäuren liess auch die klassische Peptid-Synthese aus ökonomischen Gesichtspunkten wenig erfolgsversprechend erscheinen. Zur Herstellung ausreichender Mengen an Hirudin, welche detaillierte klinische Untersuchungen über dessen therapeutisches Potential und seine breite therapeutische Anwendung in der Antikoagulations-Therapie erst ermöglichen, müssen daher neue Wege beschritten werden.

Hierzu bietet sich insbesondere die rekombinierte DNA-Technologie an. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, die unterschiedlichsten physiologisch aktiven Polypeptide durch Kultivierung entsprechend genetisch modifizierter Mikroorganismen oder Säugetierzellkulturen herzustellen. Ein entsprechendes auf rekombinante Gentechnik beruhendes Verfahren zur Herstellung von Hirudin, insbesondere einer als HV2 bezeichneten Hirudin-Variante, die vom Desulfatohirudin gemäss vorliegender Erfindung verschieden ist, zu diesem Zweck bereitgestellte Expressionsvektoren und mit solchen Expressionsvektoren transformierte *E. coli*-Wirtszellen werden in der nicht vorpublizierten Europäischen Patentanmeldung Nr. 158564 beschrieben.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mit Hilfe von gentechnologischen Mitteln ein Expressionssystem zur Verfügung zu stellen, welches die mikrobiologische Herstellung von biologisch

aktivem Desulfatohirudin der Formel

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
 5 GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly (I)
 ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

im industriellen Massstab erlaubt. Diese Aufgabe wird in der vorliegenden Erfindung gelöst durch die
 10 Bereitstellung eines Expressionsvektors, welcher eine für besagtes Desulfatohirudin kodierende DNA-Sequenz enthält, die von einer Expressionskontrollsequenz derart kontrolliert wird, dass in einem mit diesem Expressionsvektor transformierten Mikroorganismus besagtes Desulfatohirudin exprimiert wird.

Es war zu erwarten, dass die Expression derartiger DNA-Sequenzen in transformierten Wirtszellen (mit Ausnahme von transformierten Egelzellen) in Abwesenheit eines zusätzlich eingebauten Sulfat-übertragenden Enzym-Systems zu einem Produkt führen würde, dass sich von natürlichem Hirudin im wesentlichen durch das Fehlen des Sulfatrestes am Tyrosin-63 unterscheidet. Die biologische Funktion des Sulfatrestes in Proteinen im allgemeinen und im Hirudin im besonderen ist im einzelnen nicht definitiv geklärt; jedoch soll der Sulfat-Rest nach dem jetzigen Kenntnisstand die physiologischen Eigenschaften des Proteins nicht unwesentlich beeinflussen. So soll der Sulfat-Rest folgende Funktionen ausüben:

- 20 (1) Positive Beeinflussung der biologischen Aktivität des Proteins;
 (2) Beteiligung an regulatorischen Zellprozessen (wie es bei der reversiblen Phosphorylierung bekannt ist);
 (3) Stimulierung der Sekretion, d.h. die Sulfatierung dient als Markierung für die Erkennung als sekretorisches Protein: Alle bekannten sulfatierten Proteine sind sekretorische oder transmembranale
 25 Proteine.

Ueberraschenderweise wurde jetzt gefunden, dass entgegen den theoretischen Vorstellungen die wertvollen biologischen Eigenschaften des Hirudins auch dann erhalten bleiben, wenn die charakteristische Sulfatmonoester-Gruppe vom phenolischen Hydroxyl des Tyr⁶³-Restes entfernt wird. Die mit Hilfe der erfindungsgemässen transformierten Mikroorganismen hergestellte Hirudin-Verbindung ohne Sulfatrest
 30 ("Desulfatohirudin") erweist sich nämlich gegenüber dem natürlichen Hirudin in ihren biologischen Eigenschaften, insbesondere in ihrer antikoagulativen Wirkung, qualitativ und quantitativ als zumindest ebenbürtig.

Herstellung von DNA-Sequenzen, die für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodieren

35 Das Verfahren zur Herstellung von DNA-Sequenzen, die für die Aminosäuresequenz von Desulfatohirudin der Formel I kodieren und von Fragmenten davon ist dadurch gekennzeichnet, dass man aus genomischer Egel-DNA das Hirudin-Strukturgen isoliert, oder aus Hirudin-mRNA eine komplementäre doppelsträngige Hirudin-DNA (Hirudin-ds cDNA) herstellt, oder dass man ein für besagte Aminosäuresequenz kodierendes Gen oder Fragmente davon mittels chemischer und enzymatischer Verfahren herstellt.

40 Die Gewinnung von genomischer Hirudin-DNA und von Hirudin-ds cDNA erfolgt beispielsweise nach an sich bekannten Methoden. So gewinnt man genomische Hirudin-DNA beispielsweise aus einer Egel-Genbank, welche das Hirudin-Gen enthält, indem man die Egel-DNA-Fragmente in einem Mikroorganismus kloniert und Klone, die Hirudin-DNA enthalten, identifiziert, beispielsweise durch Kolonie-Hybridisierung unter Verwendung eines radioaktiv markierten, Hirudin-DNA spezifischen Oligodesoxynucleotids, welches
 45 mindestens 15, vorzugsweise 15 bis 30, Desoxynucleotide enthält. Die so erhaltenen DNA-Fragmente enthalten neben dem Hirudin-Gen in der Regel weitere unerwünschte DNA-Bestandteile, welche durch Behandlung mit geeigneten Exo- oder Endonucleasen abgespalten werden können.

Doppelsträngige Hirudin-cDNA kann beispielsweise hergestellt werden, indem man aus geeigneten, vorzugsweise zur Hirudin-Bildung induzierten Egelzellen mRNA gewinnt, des so erhaltene mRNA-Gemisch
 50 in an sich bekannter Weise an Hirudin-mRNA anreichert, diese mRNA als Templat für die Herstellung von einsträngiger cDNA verwendet, daraus mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase die ds cDNA synthetisiert und diese in einen geeigneten Vektor kloniert. Klone, die Hirudin-cDNA enthalten, werden beispielsweise, wie oben beschrieben, durch Koloniehybridisierung unter Verwendung eines radioaktiv markierten, Hirudin-DNA spezifischen Oligodesoxynucleotids identifiziert.

55 Die auf diese Weise gewonnene genomische Hirudin-DNA oder die Hirudin-cDNA werden vorzugsweise am 5'- und am 3'-Ende mit chemisch synthetisierte Adapter-Oligodesoxynucleotiden verknüpft, welche die Erkennungssequenz für eine oder verschiedene Restriktionsendonuclease(n) enthalten und damit den Einbau in geeignete Vektoren erleichtern. Zusätzlich muss das Adaptermolekül für das 5'-Ende der Hirudin-

DNA bzw. -cDNA noch das Translationsstartsignal (ATG) enthalten. Das Translationsstartsignal muss derart angeordnet sein, dass ihm das Codon für die erste Aminosäure des Hirudins direkt folgt.

- Da die Struktur des natürlichen Hirudin-Gens nicht bekannt ist und die chemische Synthese eines für die Aminosäuresequenz des Hirudins kodierenden Gens ("Desulfatohirudin-Gen") auf Grund der modernen Synthesemöglichkeiten Vorteile, insbesondere in zeitlicher Hinsicht, bietet, ist die chemische Synthese bevorzugt.

Chemische Synthese eines Desulfatohirudin-Gens

- Das Verfahren zur Herstellung eines Strukturgens für Desulfatohirudin der Formel I oder von Fragmenten davon ist dadurch gekennzeichnet, dass man Segmente des kodierenden und des komplementären Stranges des Desulfatohirudin-Gens chemisch synthetisiert und erhältliche Segmente enzymatisch in ein Strukturgen des Desulfatohirudins oder in Fragmente davon überführt.

- Die DNAs enthalten zusätzlich zu den Codons für Desulfatohirudin Translations-Start- und Stoppsignale, die eine Expression in geeigneten Mikroorganismen beispielsweise E. coli, ermöglichen, ferner Nukleotidsequenzen an den Enden, die für einen Einbau in einen Vektor geeignet sind.

- Bevorzugt umfasst die DNA am 5'-Ende eine durch ein Restriktionsenzym schneidbare Nukleotidsequenz gefolgt vom Translations-Startsignal, Codons für die Aminosäuren von Hirudin, die gegebenenfalls an einer oder mehreren Stellen das Schneiden durch ein Restriktionsenzym ermöglichen, ein Translations-Stoppsignal und am 3'-Ende eine durch ein Restriktionsenzym schneidbare Nukleotidsequenz. Erfindungsgemäss anwendbare Restriktionsenzyme sind beispielsweise EcoRI, EcoRII, BamHI, HpaII, PstI, HinfI oder HindIII.

Eine bevorzugte doppelsträngige DNA besteht aus einer Nukleotidsequenz der Formel I und der komplementären Nukleotidsequenz

25	5' (X') _n	Met ATG						
30	Val GTX	Val GTX	Tyr TAY	Thr ACX	Asp GAY	Cys TGY	Thr ACX	Glu GAM
	Ser QRS	Gly GGX	Gln CAM	Asn AAY	Leu YTZ	Cys TGY	Leu YTZ	Cys TGY
35	Glu GAM	Gly GGX	Ser QRS	Asn AAY	Val GTX	Cys TGY	Gly GGX	Gln CAM
	Gly GGX	Asn AAY	Lys AAM	Cys TGY	Ile ATN	Leu YTZ	Gly GGX	Ser QRS
40	Asp GAY	Gly GGX	Glu CAM	Lys AAM	Asn AAY	Gln CAM	Cys TGY	Val GTX
45	Thr ACX	Gly GGX	Glu GAM	Gly GGX	Thr ACX	Pro CCX	Lys AAM	Pro CCX
	Gln CAM	Ser QRS	His CAY	Asn AAY	Asp GAY	Gly GGX	Asp GAY	Phe TTY
50	Glu GAM	Glu GAM	Ile ATN	Pro CCX	Glu GAM	Glu GAM	Tyr TAY	Leu YTZ
55	Gln CAM	NON TMK	(X') _m	3'				

worin die Nukleotidsequenz beginnend mit dem 5'-Ende dargestellt ist und zum besseren Verständnis die

Aminosäuren, für die jedes Triplet codiert, angegeben sind, und worin bedeuten

	A	Desoxyadenosyl,
	T	Thymidyl,
	G	Desoxyguanosyl,
5	C	Desoxycytidyl,
	X	A, T, C oder G,
	Y	T oder C,
	Z	A, T, C oder G, wenn Y = C, oder Z = A oder G, wenn Y = T,
10	Q	7 oder A,
	R	C und S = A, T, C oder G, wenn Q = T, oder R = G und S = T oder C, wenn Q = A,
	M	A oder G,
15	L	A oder C,
	N	T, C oder A
	K	A oder G, wenn M = A, oder K = A, wenn M = G,

und $(X')_n$ und $(X')_m$ Nukleotidsequenzen mit n und m grösser als 3 und kleiner als 100, insbesondere grösser als 5 und kleiner als 15, bedeuten, welche durch ein Restriktionsenzym erkannt und geschnitten werden können.

Bevorzugt enthält die DNA-Sequenz am 5'-Ende eine durch EcoRI spaltbare, in der Mitte eine durch EcoRII spaltbare und am 3'-Ende eine durch BamHI spaltbare Nukleotidsequenz.

Die doppelsträngige DNA, enthält insbesondere von *E. coli* bevorzugte und für die Aminosäuren von Hirudin kodierende Triplets. Solche Triplets sind insbesondere für

	Glycin (Gly)	GGT
	Cystein (Cys)	TGC
	Valin (Val)	GTT
30	Leucin (Leu)	CTG
	Serin (Ser)	TCT
	Threonin (Thr)	ACC
	Phenylalanin (Phe)	TTC
	Tyrosin (Tyr)	TAC
35	Methionin (Met)	ATG
	Asparaginsäure (Asp)	GAC
	Glutaminsäure (Glu)	GAA
	Lysin (Lys)	AAA
	Isoleucin (Ile)	ATC
40	Histidin (His)	CAC
	Prolin (Pro)	CCG
	Glutamin (Gln)	CAG
	Asparagin (Asn)	AAC

Bevorzugtes Stoppsignal (NON) ist der Codon TAG.

Eine bevorzugte für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende Gen in der oben dargestellten Weise ist die DNA der Formel II,

50

55

MetValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGly
 CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGT
 GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTTGGACACGGACACGCTTCCA
 (EcoRI)

SerAsnValCysGlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysVal
 TCTAACGTTTTCGGGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAACCAGTGCCTT
 AGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTTACGTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTTTGGTCACGCAA
 (EcoRII)

ThrGlyGluGlyThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGlu
 ACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCGCAGTCTCACAACGACGGTGACTTCGAAGAAATCCCGGAAGAA
 TGGCCACTTCCATGGGGCTTTGGCGTCAGAGTGTTGCTGCCACTGAAGCTTCTTTAGGGCCTTCTT

TyrLeuGlnNON
 TACCTGCAGTAGGATCCTG
 ATGGACGTCATCCTAGGAC
 (BamHI)

(II),

worin A, T, G, C die unter Formel I angegebenen Bedeutungen haben und zum besseren Verständnis die Aminosäuren, für die jedes Triplet kodiert, und die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme angegeben sind.

Für die Herstellung eines Strukturgens für Desulfatohirudin nützliche doppelsträngige DNA-Fragmente desselben sind besonders solche, deren Enden durch Restriktionsenzyme geschnitten werden können. Solche doppelsträngigen DNA-Fragmente des Hirudin-Gens haben insbesondere 30 bis 70 Basenpaaren und sind beispielsweise solche der Formel III (F₁) und der Formel IV (F₂):

MetValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGly
 CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGT
 GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTTGGACACGGACACGCTTCCA
 (EcoRI)

SerAsnValCysGlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySer
 TCTAACGTTTTCGGGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCTG
 AGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTTACGTAGGACCCAAGAC
 (EcoRII)

F₁ (III)

IleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGlyThrProLysPro
 CATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAACCAGTGCCTTACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCG
 GTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTTTGGTCACGCAATGGCCACTTCCATGGGGCTTTGGC
 (EcoRII)

GlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGlnNON
 CAGTCTCACAACGACGGTGACTTCGAAGAAATCCCGGAAGAATACCTGCAGTAGGATCCTG
 GTCAGAGTGTTGCTGCCACTGAAGCTTCTTTAGGGCCTTCTTATGGACGTCATCCTAGGAC
 (BamHI)

F₂ (IV)

Methoden der Synthese von DNA sind von S.A. Narang (3) zusammenfassend dargestellt worden. Die bekannten Synthesetechniken erlauben die Herstellung von Polynukleotiden mit einer Länge von gegen 20 Basen in guter Ausbeute, hoher Reinheit und in verhältnismässig kurzer Zeit. Geeignet geschützte Nukleotide werden durch die Phosphodiestertermethode (4), die noch effizientere Phosphotriestertermethode (5) oder Phosphit-Triestertermethode (6) miteinander verknüpft. Eine Vereinfachung der Synthese der Oligo- und Polynukleotide wird mit der Festphasen-Methode ermöglicht, bei der die Nukleotidketten an ein geeignetes

Polymer gebunden sind. Itakura et al. (7) verwenden bei der Festphasen-Synthese anstelle einzelner Nukleotide durch Phosphotriester-Methode geknüpfte Trinukleotide, die so in kurzer Zeit und guten Ausbeuten beispielsweise zu einem Polynukleotid mit 31 Basen kondensiert werden können. Die eigentliche doppelsträngige DNA kann aus chemisch hergestellten kurzen Segmenten enzymatisch aufgebaut werden.

5 Khorana et al. (8) verwenden dazu überlappende Polynukleotid-Sequenzen aus beiden DNA-Strängen, die durch Basen-Paarung in richtiger Anordnung zusammengehalten und dann durch das Enzym DNA-Ligase chemisch verknüpft werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, je eine Polynukleotid-Sequenz aus den beiden DNA-Strängen mit einem kurzen überlappenden Segment in Gegenwart der vier benötigten Desoxynukleosid-Triphosphate mit einer DNA-Polymerase, z.B. DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment der

10 Polymerase I, T₄ DNA-Polymerase, oder mit AMV (avian myeloblastosis virus) reverse Transcriptase, zu inkubieren. Dabei werden durch Basenpaarung die beiden Polynukleotid-Sequenzen in der richtigen Anordnung zusammengehalten und durch das Enzym mit den benötigten Nukleotiden zu einer vollständigen doppelsträngigen DNA ergänzt (9). Itakura et al. (10) beschreiben, wie basierend auf diesem Prinzip in Gegenwart von DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aus 4 chemisch synthetisierten Fragmenten einer

15 Länge von 39 bis 42 Basen ein 132 Basen-Paare langes Segment des humanen Leukozyten-Interferon α_2 -Gens aufgebaut werden kann, wobei 40 % Einsparung an chemischer Synthese gegenüber der oben beschriebenen Methode, bei der nur Ligase verwendet wird, erzielt werden.

Das Verfahren zur Herstellung von DNAs, welche ein Strukturgen des Desulfatohirudins enthalten und für eine Expression in Wirtszellen geeignet sind, und deren Enden einen Einbau in Vektoren ermöglichen, und von Fragmenten davon ist aus sich bekannt und dadurch gekennzeichnet, dass

20

- a) ein geeignet geschütztes Desoxynukleosid an einen festen Träger gebunden wird,
- b) geeignet geschützte Di-, Tri- oder Tetranukleotide nach der Phosphotriester- oder Phosphit-Methode hergestellt werden,
- c) ein an den Träger gebundenes Desoxynukleosid oder Oligodesoxynukleotid mit geeignet geschützten Mono- oder (gemäß b) hergestellten) Di-, Tri- oder Tetranukleotiden nach der Phosphotriester- oder der
- 25 Phosphit-Methode verknüpft wird,
- d) nach c) erhältliche, an Träger gebundene Oligodesoxynukleotide mit einer Länge zwischen etwa 20 und etwa 70 Basen vom Träger abgespalten, gegebenenfalls gereinigt, von Schutzgruppen befreit und die freien 5'-terminalen Hydroxygruppen phosphoryliert werden,
- 30 e1) 2 Oligodesoxynukleotide einer Länge von je etwa 20 bis etwa 70 Basen aus dem kodierenden und aus dem komplementären Strang mit mindestens 3, vorzugsweise 8 bis 15, überlappenden Basenpaaren anelliert und mit einer DNA-Polymerase in Gegenwart der vier Desoxynukleosid-Triphosphate zu doppelsträngigen DNA-Segmenten (Fragmenten des Desulfatohirudin-Gens) ergänzt werden, und gegebenenfalls 2 doppelsträngige DNA-Segmente mit geeigneten gemäß d) phosphorylierten Enden mit
- 35 einer Ligase zum Desulfatohirudin-Strukturgen verknüpft werden, oder 2 erhältliche doppelsträngige DNA-Segmente in geeignete Vektoren subkloniert, anschliessend gemäß d) phosphoryliert und mit einer Ligase zum Desulfatohirudin-Strukturgen verknüpft werden, oder
- e2) alternativ je 2 Oligodesoxynukleotide aus dem kodierenden und aus dem komplementären Strang mit einer Länge von z.B. 20 bis 70 Basen und mit je mindestens 3, vorzugsweise 8 bis 15, überlappenden
- 40 Basenpaaren anelliert, mit einer DNA-Polymerase in Gegenwart der vier Desoxynukleosid-Triphosphate aufgefüllt und mit Ligase zum Desulfatohirudin-Strukturgen verknüpft werden.

Herstellung von Expressionsvektoren, welche ein für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierendes Gen enthalten

45

Die Erfindung betrifft Expressionsvektoren, welche eine für Desulfatohirudin der Formel I kodierende DNA-Sequenz enthalten, die von einer Expressionskontrollsequenz derart reguliert wird, dass in einem mit diesen Expressionsvektoren transformierten Mikroorganismus besagtes Desulfatohirudin exprimiert wird.

Die Expressionsvektoren der vorliegenden Erfindung werden z.B. hergestellt, indem man in eine Vektor-

50 DNA, welche eine Expressionskontrollsequenz enthält, eine für Desulfatohirudin der Formel I kodierende DNA-Sequenz derart einfügt, dass die Expressionskontrollsequenz besagte DNA-Sequenz reguliert.

Die Wahl eines geeigneten Vektors ergibt sich aus dem zur Transformation vorgesehenen Mikroorganismus. Geeignete Mikroorganismen sind z.B. Hefen, z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, und insbesondere Bakterienstämme, die über kein Restriktions- oder Modifikationsenzym verfügen, vor allem Stämme von

55 *Escherichia coli*, z.B. *E. coli* X1776, *E. coli* HB101, *E. coli* W3110 Δ 102, *E. coli* HB101/LM1035, *E. coli* JA221(30) oder *E. coli* K12 Stamm 294, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Streptococcus* und andere. Bevorzugte Mikroorganismen sind die genannten Stämme von *E. coli*, insbesondere *E. coli* HB101, *E. coli* JA221 und *E. coli* W3110 Δ 102.

Grundsätzlich sind alle Vektoren geeignet, welche die erfindungsgemässen heterologen, für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierenden DNA-Sequenzen in dem gewählten Mikroorganismus replizieren und exprimieren.

Beispiele für Vektoren, die zur Expression des Desulfatohirudin-Gens in einem *E. coli*-Stamm geeignet sind, sind Bacteriophagen, z.B. Derivate des Bacteriophagen λ , oder Plasmide, wie insbesondere das Plasmid colE1 und seine Derivate, z.B. pMB9, pSF2124, pBR317 oder pBR322. Die bevorzugten Vektoren der vorliegenden Erfindung leiten sich von Plasmid pBR322 ab. Geeignete Vektoren enthalten ein vollständiges Replicon und ein Markierungsgen, welches die Selektion und Identifizierung der mit den Expressionsplasmiden transformierten Mikroorganismen auf Grund eines phänotypischen Merkmals ermöglicht. Geeignete Markierungsgene verleihen dem Mikroorganismus beispielsweise Resistenz gegenüber Schwermetallen, Antibiotika und dergleichen. Weiterhin enthalten bevorzugte Vektoren der vorliegenden Erfindung ausserhalb der Replicon- und Markierungsgen-Regionen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen, so dass an diesen Stellen die für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende DNA-Sequenz und gegebenenfalls die Expressions-Kontrollsequenz eingefügt werden können. Der bevorzugte Vektor, das Plasmid pBR322, enthält ein intaktes Replicon, gegen Tetracyclin und Ampicillin Resistenz verleihende Markierungsgene (tet^R und amp^R) und eine Reihe von nur einmal vorkommenden Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen, z.B. PstI (schneidet im amp^R -Gen, das tet^R -Gen bleibt intakt), BamHI, HindIII, SalI (schneiden alle im tet^R -Gen, das amp^R -Gen bleibt intakt), NruI und EcoRI.

Mehrere Expressionskontrollsequenzen können zur Regulation der Desulfatohirudin-Expression eingesetzt werden. Insbesondere werden Expressionskontrollsequenzen stark exprimierter Gene der zu transformierenden Wirtszelle verwendet. Im Falle von pBR322 als Hybridvektor und *E. coli* als Wirtsmikroorganismus sind beispielsweise die Expressionskontrollsequenzen (welche unter anderem den Promotor und die ribosomale Bindungsstelle enthalten) des Lactoseoperons, Tryptophanoperons, Arabinoseoperons und dergleichen, des β -Lactamasegens, die entsprechenden Sequenzen des Phage λ N-Gens oder des Phage fd-Schichtproteingens und andere geeignet. Während der Promotor des β -Lactamasegens (β -lac-Gen) bereits im Plasmid pBR322 enthalten ist, müssen die übrigen Expressionskontrollsequenzen in das Plasmid eingeführt werden. Bevorzugt als Expressionskontrollsequenz in der vorliegenden Erfindung ist diejenige des Tryptophanoperons (trp po).

Zur Replikation und Expression in Hefe geeignete Vektoren enthalten einen Hefe-Replikationsstart und einen selektiven genetischen Marker für Hefe. Hybridvektoren, die einen Hefe-Replikationsstart enthalten, z.B. das chromosomale autonom replizierende Segment (ars), bleiben nach der Transformation innerhalb der Hefezelle extrachromosomal erhalten und werden bei der Mitose autonom repliziert. Ferner können Hybridvektoren, die der Hefe-2 μ -Plasmid-DNA homologe Sequenzen enthalten, verwendet werden. Solche Hybridvektoren werden durch Rekombination innerhalb der Zelle bereits vorhandenen 2 μ -Plasmiden einverleibt oder replizieren autonom. 2 μ -Sequenzen sind besonders für Plasmide mit grosser Transformationshäufigkeit geeignet und gestatten eine hohe Kopienzahl. Geeignete Markierungsgene für Hefe sind vor allem solche, die dem Wirt antibiotische Resistenz verleihen oder, im Fall von auxotrophen Hefemutanten, Gene, die Wirtsdefekte komplementieren. Entsprechende Gene verleihen z.B. Resistenz gegen das Antibiotikum Cycloheximid oder sorgen für Prototrophie in einer auxotrophen Hefemutante, z.B. das URA3-, LEU2-, HIS3- oder vor allem das TRP1-Gen. Vorzugsweise enthalten Hefe-Hybridvektoren weiterhin einen Replikationsstart und ein Markierungsgen für einen bakteriellen Wirt, insbesondere *E. coli*, damit die Konstruktion und die Klonierung der Hybridvektoren und ihrer Vorstufen in einem bakteriellen Wirt erfolgen kann. Für die Expression in Hefe geeignete Expressionskontrollsequenzen sind beispielsweise diejenigen des TRP1-, ADHI-, ADHI-, PHO3- oder PHO5-Gens, ferner im glykolytischen Abbau involvierte Promoter, z.B. der PGK- und der GAPDH-Promoter.

Insbesondere betrifft die Erfindung zur Replikation und phänotypischen Selektion befähigte Expressionsvektoren, welche eine Expressionskontrollsequenz und eine für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende DNA-Sequenz enthalten, wobei besagte DNA-Sequenz mitsamt Transkriptionsstartsignal und -terminationssignal sowie Translationsstartsignal und -stoppsignal in besagtem Expressionsplasmid unter Regulation besagter Expressionskontrollsequenz so angeordnet ist, dass in einer mit besagtem Expressionsplasmid transformierten Wirtszelle Desulfatohirudin exprimiert wird.

Um eine effektive Expression zu erreichen, muss das Desulfatohirudin-Gen richtig (in "Phase") mit der Expressionskontrollsequenz angeordnet sein. Es ist vorteilhaft, die Expressionskontrollsequenz in den Bereich zwischen dem Haupt-mRNA-Start und dem ATG der Genkodiersequenz, welche natürlich mit der Expressionskontrollsequenz verknüpft ist (z.B. die β -lac-Kodiersequenz bei Verwendung des β -lac-Promotors), mit dem Desulfatohirudin-Gen, welches vorzugsweise sein eigenes Translationsstartsignal (ATG) und Translationsstoppsignal (z.B. TAG) mitbringt, zu verknüpfen. Dadurch wird eine effektive Transkription und Translation gewährleistet.

Beispielsweise wird ein Vektor, insbesondere pBR322, mit einer Restriktionsendonuclease geschnitten und, gegebenenfalls nach Modifikation des so gebildeten linearisierten Vektors, eine mit entsprechenden Restriktionsenden versehene Expressionakontrollsequenz eingeführt. Die Expressionskontrollsequenz enthält am 3'-Ende (in Translationsrichtung) die Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuclease, sodass der
 5 die Expressionskontrollsequenz bereits enthaltende Vektor mit besagtem Restriktionsenzym verdaut und das mit passenden Enden versehene Desulfatohirudin-Gen eingesetzt werden kann. Dabei entsteht ein Gemisch von zwei Hybridplasmiden, welche das Gen in richtiger bzw. in falscher Orientierung enthalten. Vorteilhaft ist es, den die Expressionskontrollsequenz bereits enthaltenden Vektor noch mit einer zweiten Restriktionsendonuclease innerhalb der Vektor-DNA zu spalten und in das entstandene Vektor-Fragment
 10 das mit richtigen Enden versehene Desulfatohirudin-Gen einzusetzen. Alle Operationen am Vektor erfolgen vorzugsweise in einer Weise, dass die Funktion des Replicons und zumindest eines Markierungsgens nicht beeinträchtigt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein von pBR322 abgeleiteter Vektor, welcher eine Expressionskontrollsequenz, insbesondere diejenige vom Tryptophan-Operon (*trp po*),
 15 enthält, die am 3'-Ende (zwischen dem Haupt-mRNA-Start und dem ersten ATG) die Erkennungssequenz für eine, vorzugsweise kohäsive Enden bildende, Restriktionsendonuclease, z.B. *EcoRI*, trägt, mit der genannten Restriktionsendonuclease und im Vektor-DNA-Teil mit einer zweiten Restriktionsendonuclease, welche flache oder bevorzugt kohäsive Enden bildet, z.B. *BamHI*, verdaut, wonach der so linearisierte Vektor mit dem entsprechende Enden aufweisenden Desulfatohirudin-Gen (z.B. mit einem *EcoRI*-Ende vor
 20 dem ATG-Start und einem *BamHI*-Ende nach dem Translationsstop-Codon) verknüpft wird. Die Verknüpfung erfolgt in bekannter Weise durch Paarung der komplementären (kohäsiven) Enden und Ligierung, z.B. mit *T₄*-DNA-Ligase.

Das über den mRNA-Weg, aus genomischer DNA oder synthetisch gewonnene, mit entsprechenden kohäsiven (insbesondere *EcoRI*- und *BamHI*-) Enden versehene Desulfatohirudin-Gen kann vor dem
 25 Einbringen in ein Expressionsplasmid auch in einen Vektor, z.B. pBR322, kloniert werden, um grössere Mengen an Desulfatohirudin-Gen, beispielsweise für die Sequenzanalyse, zu gewinnen. Die Isolierung der Klone, welche das Hybridplasmid enthalten, wird beispielsweise mit einer Desulfatohirudin-Gen-spezifischen, radioaktiv-markierten Oligodesoxynucleotid-Probe (siehe oben) durchgeführt. Die Charakterisierung des Desulfatohirudin-Gens erfolgt beispielsweise nach dem Verfahren von Maxam und Gilbert (11).

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden zwei Teilstücke des Desulfatohirudin-Gens
 30 synthetisiert. Teilstück 1, welches den 1. Teil des Gens umfasst, enthält vor dem ATG und am Ende jeweils die Erkennungssequenz für kohäsive Enden bildende Restriktionsendonucleasen, z.B. vor dem ATG *EcoRI* und am Ende *EcoRII*. Teilstück 2, welches den hinteren Teil des Gens umfasst, besitzt entsprechende Erkennungssequenzen, am Anfang z.B. *EcoRII* und nach dem Translationsstoppsignal (z.B. TAG) *BamHI*. Die
 35 Teilstücke werden an den äusseren Erkennungssequenzen gespalten (Teilstück 1 z.B. mit *EcoRI* und Teilstück 2 entsprechend mit *BamHI*) und in einen entsprechend zugeschnittenen Vektor (z.B. pBR322) subkloniert. Die Identifizierung der Klone, welche die Teilstücke enthalten, und die Charakterisierung der Teilstücke erfolgt wie oben beschrieben. Die Teilstücke werden dann mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen aus den Hybridvektoren herausgeschnitten (Teilstück 1 z.B. mit *EcoRI* und *EcoRII* und
 40 Teilstück 2 z.B. mit *EcoRII* und *BamHI*) und über ihre kohäsiven Enden, insbesondere *EcoRII*-Enden, ligiert, wobei das komplette Desulfatohirudin-Gen entsteht, das wie angegeben in eine Vektor-DNA eingefügt wird.

Transformation der Mikroorganismen

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines transformierten Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Mikroorganismus mit einem Expressionsvektor, der eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende DNA-Sequenz enthält, transformiert.

Geeignete Mikroorganismen sind beispielsweise die oben genannten, wie Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* und insbesondere *Escherichia coli*. Die Transformation mit den erfindungsge-
 50 mässigen Expressionsplasmiden erfolgt beispielsweise wie in der Literatur beschrieben, so für *S. cerevisiae* - (12), *B. subtilis* (13) und *E. coli* (14). Die Isolierung der transformierten Wirtszellen erfolgt vorteilhaft aus einem selektiven Nährmedium, dem das Biocid zugesetzt wird, gegen welches das im Expressionsplasmid enthaltene Markierungs-Gen Resistenz verleiht. Wenn, wie bevorzugt, die Expressionsplasmide das *amp^R*-
 55 Gen enthalten, wird dem Nährmedium demgemäss Ampicillin zugesetzt. Zellen, welche das Expressionsplasmid nicht enthalten, werden in einem solchen Medium abgetötet.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die auf dem genannten Weg erhältlichen transformierten Mikroorganismen.

Kultivierung der transformierten Mikroorganismen und Gewinnung von Desulfatohirudin

Die transformierten Mikroorganismen werden zur Herstellung von biologisch aktiven Desulfatohirudin der Formel I verwendet. Das Verfahren zur Herstellung dieser Verbindung ist dadurch gekennzeichnet, dass die transformierten Mikroorganismen kultiviert und besagtes Desulfatohirudin aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird.

Unter "biologisch aktivem Desulfatohirudin" wird ein Desulfatohirudin-Produkt verstanden, welches eine Thrombin-inhibierende Wirkung und eine positive Reaktion mit anti-Hirudin-Antikörpern zeigt und welche die Primärstruktur von Desulfatohirudin der Formel I aufweist.

Die Erfindung betrifft vor allem ein Verfahren zur Herstellung von Desulfatohirudin der Formel I und von Salzen davon, dadurch gekennzeichnet, dass mit einem Expressionsvektor, welcher eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für besagte Hirudin-Verbindung kodierende DNA-Sequenz enthält, transformierte Mikroorganismen in einem flüssigen Nährmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, kultiviert werden und das Produkt aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird, und, falls gewünscht, ein erhaltenes Salz in das freie Polypeptid und ein erhaltenes Polypeptid in ein Salz desselben überführt wird.

In den verfahrensgemäss erhältlichen Verbindungen mit Hirudin-Aktivität, insbesondere in den Verbindungen der Formel XIV, sind die Cystein-Reste Cys in gleicher Anordnung wie im natürlichen Hirudin paarweise durch Disulfid-Brücken verknüpft.

Die Kultivierung der erfindungsgemässen transformierten Mikroorganismen erfolgt in an sich bekannter Weise. So können für die Kultivierung der erfindungsgemässen, transformierten Wirtsmikroorganismen verschiedene Kohlenstoffquellen verwendet werden. Beispiele bevorzugter Kohlenstoffquellen sind assimilierbare Kohlenhydrate, wie Glucose, Maltose, Mannit oder Lactose, oder ein Acetat, das entweder allein oder in geeigneten Gemischen verwendet werden kann. Geeignete Stickstoffquellen sind beispielsweise Aminosäuren, wie Casaminoäuren, Peptide und Proteine und ihre Abbauprodukte, wie Trypton, Pepton oder Fleischextrakte; weiterhin Hefeextrakte, Malzextrakt, wie auch Ammoniumsalze, z.B. Ammoniumchlorid, -sulfat oder -nitrat, die entweder allein oder in geeigneten Mischungen verwendet werden können. Anorganische Salze, die ebenfalls verwendet werden können, sind z.B. Sulfate, Chloride, Phosphate und Carbonate von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium.

Weiterhin enthält das Medium z.B. wachstumsfördernde Substanzen, wie Spurenelemente, z.B. Eisen, Zink, Mangan und dergleichen, und vorzugsweise Substanzen, die einen Selektionsdruck ausüben und das Wachstum von Zellen, die das Expressionsplasmid verloren haben, verhindern. So wird dem Medium beispielsweise Ampicillin zugesetzt, wenn das Expressionsplasmid ein amp^R -Gen enthält. Ein solcher Zusatz von antibiotisch wirksamen Substanzen bewirkt auch, dass kontaminierende, Antibiotika-empfindliche Mikroorganismen abgetötet werden.

Die Kultivierung erfolgt nach an sich bekannten Verfahren. Die Kultivierungsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert des Mediums und Fermentationszeit, werden so ausgewählt, dass maximale Hirudin-Titer erhalten werden. So wird ein *E. coli*- oder ein Hefe-Stamm bevorzugt unter aeroben Bedingungen in submerser Kultur unter Schütteln oder Rühren bei einer Temperatur von etwas 20 bis 40 °C, vorzugsweise etwa 30 °C, und einem pH-Wert von 4 bis 9, vorzugsweise bei pH 7, während etwa 4 bis 20 h, vorzugsweise 8 bis 12 h, kultiviert. Dabei sammelt sich das Expressionsprodukt intrazellulär an.

Wenn die Zelldichte einen ausreichenden Wert erreicht hat, wird die Kultivierung abgebrochen und das Produkt aus den Zellen des Mikroorganismus freigesetzt. Zu diesem Zweck werden die Zellen zerstört, z.B. durch Behandlung mit einem Detergens, wie SDS oder Triton, oder mit Lysozym oder einem gleichartig wirkenden Enzym lysiert. Alternativ oder zusätzlich kann man mechanische Kräfte, wie Scherkräfte (z.B. X-Press, French-Press, Dyno-Mill) oder Schütteln mit Glasperlen oder Aluminiumoxid, oder abwechselndes Einfrieren, z.B. in flüssigem Stickstoff, und Auftauen, z.B. auf 30 ° bis 40 °C, sowie Ultraschall zum Brechen der Zellen anwenden. Die resultierende Mischung, die Proteine, Nucleinsäuren und andere Zellbestandteile enthält, wird nach der Zentrifugation in an sich bekannter Weise an Proteinen angereichert. So wird z.B. der grösste Teil der Nicht-Protein-Bestandteile durch Polyäthylenimin-Behandlung abgetrennt und die Proteine einschliesslich Desulfatohirudin z.B. durch Sättigen der Lösung mit Ammoniumsulfat oder mit anderen Salzen ausgefällt. Bakterielle Proteine können auch mittels Ansäuern mit Essigsäure (z.B. 0,1 %, pH 4-5) ausgefällt werden. Eine weitere Anreicherung an Desulfatohirudin kann durch Extraktion des essigsauren Ueberstandes mit n-Butanol erreicht werden. Weitere Reinigungsschritte umfassen beispielsweise chromatographische Verfahren, wie Ionenaustauschchromatographie, Gelpermeationschromatographie, Partitionschromatographie, HPLC, Umkehrphasen-HPLC und dergleichen. So erfolgt die Auftrennung der Mischbestandteile durch Dialyse, nach Ladung mittels Gel- oder trägerfreier Elektrophorese, nach Molekülgrösse mittels einer geeigneten Sephadex-Säule, durch Affinitätschromatographie, z.B. mit Antikörpern, insbesondere

monoklonalen Antikörpern, oder mit Thrombin gekuppelt an einen geeigneten Träger zur Affinitätschromatographie, oder durch weitere, insbesondere aus der Literatur bekannte Verfahren.

Beispielsweise umfasst die Isolierung des exprimierten Desulfatohirudins die folgenden Stufen:

- Abtrennung der Zellen aus der Kulturlösung mittels Zentrifugation;
- 5 Herstellung eines Rohextrakts durch Zerstören der Zellen, z.B. durch Behandlung mit einem lysierenden Enzym und/oder abwechselndem Einfrieren und Wiederauftauen;
- Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile;
- Ausfällen der DNA durch Zugabe von Polyäthylenimin;
- 10 Fällung der Proteine durch Ammoniumsulfat;
- Affinitätschromatographie des gelösten Niederschlags an einer monoklonalen Anti-Desulfatohirudin-Antikörper-Säule oder einer Thrombin-Säule;
- Entsalzung der so gewonnenen Lösung mittels Dialyse oder Chromatographie an Sephadex G25 oder Sephadex G10.

- 15 Alternativ können nach Abtrennen der DNA die bakteriellen Proteine mittels 1%iger Essigsäure ausgefällt werden, aus dem sauren Ueberstand die Hirudin-Verbindung mit n-Butanol extrahiert oder der saure Ueberstand direkt der Ionenaustausch-Chromatographie (z.B. an Diäthylaminoäthylcellulose DEAE 53) unterworfen werden. Weitere Reinigungsschritte schliessen Gelfiltration an Sephadex G50 (oder G75), und Umkehrphasen-HPLC ein. Entsalzung erfolgt wieder an Sephadex G25.

- 20 Zum Nachweis der Hirudin-Aktivität kann der Test mit Anti-Hirudin- oder Anti-Desulfatohirudin-Antikörpern (z.B. aus Kaninchen erhältliche, oder aus Hybridomazellen erhältliche monoklonale Antikörper), der Thrombin-Test (15) oder der Blutgerinnungstest (16) herangezogen werden.

- Die erfindungsgemäss herstellbare Verbindung der Formel I, kann nicht nur in freier Form, sondern auch in Form ihrer Salze, insbesondere ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, vorliegen. Da sie 25 mehrere Aminosäurereste mit freien Aminogruppen enthält, kann die erfindungsgemässe Verbindung z.B. in Form von Säureadditionssalzen vorliegen. Als Säureadditionssalze kommen insbesondere physiologisch verträgliche Salze mit üblichen, therapeutisch anwendbaren Säuren in Betracht; als anorganische Säuren sind die Halogenwasserstoffsäuren, wie die Chlorwasserstoffsäure, aber auch Schwefelsäure und Phosphor- bzw. Pyrophosphorsäure zu nennen; als organische Säuren sind in erster Linie Sulfonsäuren, wie die 30 Benzol- oder p-Toluolsulfonsäure oder Niederalkansulfonsäuren, wie Methansulfonsäure, sowie Carbonsäuren, wie Essigsäure, Milchsäure, Palmitin- und Stearinsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Ascorbinsäure und Citronensäure, geeignet. Da die Hirudin-Verbindung auch Aminosäurereste mit freien Carboxylgruppen enthalten, kann sie auch als Metallsalz, insbesondere als Alkalimetall- oder Erdalkalimetallsalz, z.B. Natrium-, Kalium-, Calcium- oder Magnesiumsalz, oder auch als Ammoniumsalz, abgeleitet von Ammoniak oder 35 einer physiologisch verträglichen, organischen stickstoffhaltigen Base, vorliegen. Da sie aber zugleich freie Carboxylgruppen und freie Aminogruppen enthält, kann sie auch als inneres Salz vorliegen.

- Je nach Arbeitsweise erhält man die erfindungsgemässe Verbindung in freier Form, in Form von Säureadditionssalzen oder Salzen mit Basen. Aus den Säureadditionssalzen und den Salzen mit Basen kann in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Einstellen des pH-Wertes auf den isoelektrischen 40 Punkt, die freie Verbindung gewonnen werden. Von letzterer wiederum lassen sich durch Umsetzen mit Säuren bzw. Basen, z.B. mit solchen, die die obengenannten Salze bilden, und Eindampfen oder Lyophilisieren therapeutisch annehmbare Säureadditionssalze bzw. Salze mit Basen gewinnen.

- Das gemäss der vorliegenden Erfindung erhältliche Desulfatohirudin weist wertvolle pharmakologische Eigenschaften auf und kann, wie aus Blutegeln extrahiertes Hirudin, prophylaktisch oder insbesondere 45 therapeutisch angewendet werden.

- Die erfindungsgemäss herstellbare Desulfatohirudin-Verbindung erweist sich hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität als zumindest äquivalent zu natürlichem Hirudin. Sie weist beispielsweise einen K_i -Wert von ca. 10^{-11} H auf. Desulfatohirudin ist vollständig spezifisch für Thrombin und zeigt keinerlei Wechselwirkungen mit anderen Proteinasen des Blutgerinnungssystems. Die aktive Toxizität ist äusserst gering; so sind in 50 der Ratte bei Dosen von z.B. 1 g/kg keinerlei toxische Anzeichen festzustellen. Desgleichen werden keinerlei Hypersensitivitäts- und Allergie-Reaktionen beobachtet.

- Die erfindungsgemäss herstellbare Desulfatohirudin-Verbindung kann daher in Analogie zu natürlichem Hirudin zur Therapie und Prophylaxe von Thrombosen und Thromboembolien, einschliesslich zur Prophylaxe von postoperativen Thrombosen, zur akuten Schock-Therapie (z.B. bei septischem oder polytraumatischem Schock), zur Therapie von Verbrauchskoagulopathien, bei Hämodialysen, Hämosteationen und im 55 extrakorporalen Kreislauf verwendet werden.

Insbesondere betrifft die Erfindung die in den Beispielen beschriebenen Expressionsvektoren, enthaltend eine für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende DNA-Sequenz, mit solchen Expressionsvektoren

ren transformierte Mikroorganismen, die in den Beispielen beschriebenen Verfahren zu ihrer Herstellung und das in den Beispielen beschriebene Verfahren zur Herstellung von Desulfatohirudin mit Hilfe der transformierten Mikroorganismen.

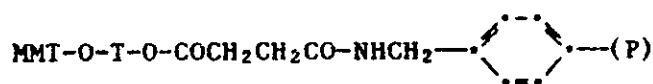
Die folgenden Beispiele und Zeichnungen dienen zur Illustration der Erfindung und sollen sie in keiner
5 Weise einschränken.

Experimenteller Teil

Die in den Beispielen verwendeten Abkürzungen haben die folgende Bedeutung:

- | | | |
|----|----------|---|
| 10 | TNE | Lösung, die 100 mM NaCl, 50 mM Tris·HCl pH 7.5 und 5 mM EDTA enthält, |
| | SDS | Natriumdodecylsulfat |
| | EDTA | Aethylendiamintetraessigsäure |
| | DTT | 1,4-Dithiothreitol (1,4-Dimercapto-2,3-butandiol) |
| | BSA | Rinder-Serumalbumin |
| 15 | EtBr | Ethidiumbromid |
| | Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| | Tris·HCl | Monohydrochlorid von Tris |

Beispiel 1: Herstellung des geschützten Nucleosid-Polystyrol-Harzes



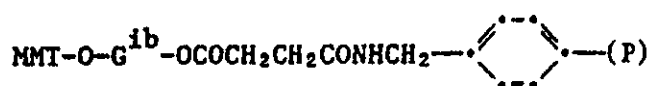
2,57 g (5 mMol) 5'-(4-Methoxytrityl)-thymidin (MMT-O-T-OH) in 20 ml abs. Pyridin werden mit 750 mg Bernsteinsäureanhydrid und 910 mg 4-Dimethylaminopyridin versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur
30 belassen. Nach Einengen der Pyridin-Lösung wird in 200 ml Essigsäureäthylester aufgenommen, zweimal mit je 200 ml 0,1 M Phosphatpuffer unter Zusatz von 10 ml gesättigter Kochsalz-Lösung ausgeschüttelt, nochmals mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet, eingeengt und Hexan zugegeben. Das ausgefallene Produkt wird abgetrennt und zweimal mit Äther zerrieben, dann in 300 ml Essigsäureäthylester gelöst und bei 0 °C mit 180 ml 0,1 M Kaliumhydrogensulfat von pH 2,5 ausgeschüttelt. Nach
35 zweimaligem Waschen mit Wasser wird die Essigesterlösung mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert, mit 0,5 ml Pyridin versetzt, eingeengt und tropfenweise mit Hexan verdünnt. Das ausgefallene Bernsteinsäurederivat wird abfiltriert.

1,0 g dieser Verbindung werden zusammen mit 190 mg N-Hydroxysuccinimid in 4 ml Essigsäureäthylester und 2 ml Dimethylformamid gelöst und bei 0 °C mit 370 mg N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach Stehen über Nacht im Kühlschrank wird der ausgefallene N,N'-Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat mit Essigsäureäthylester verdünnt, mit kaltem 0,1 M Natriumhydrogencarbonat und Wasser extrahiert, getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Essigsäureäthylester an Kieselgel chromatographiert. DC: R_f 0,45 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

100 mg dieses N-Succinimidoyl-bernsteinsäureesters werden mit 1 g Aminomethyl-polystyrol
45 (Amingehalt 110 $\mu\text{Mol/g}$) in 2 ml Dichlormethan und 4 ml Dimethylformamid 20 Stunden gerührt. Das
Polymer-Harz wird abfiltriert und mit Dimethylformamid, Methanol, Dichlormethan und Methanol ausgewa-
schen. Nach dem Trocknen werden die nicht umgesetzten Aminogruppen acetyliert, indem das Harz in 6 ml
Pyridin mit 1 ml Essigsäureanhydrid und 100 mg 4-Dimethylaminopyridin 30 min. gerührt wird. Das
Polymer-Harz wird mit Dichlormethan, Dimethylformamid, Methanol und Dichlormethan ausgewaschen und
50 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die spektroskopische Methoxytrityl (MMT)-Bestimmung ergibt eine
Beladung von 57 $\mu\text{Mol/g}$.

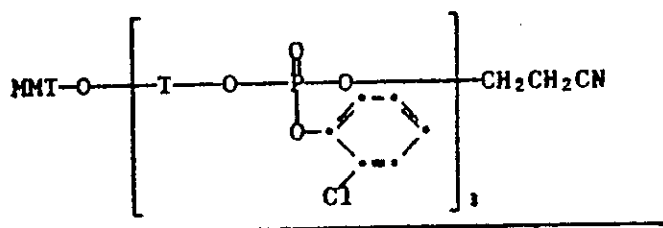
Beispiel 2:

55 Analog Beispiel 1 wird das folgende geschützte Nucleosid-Polystyrol-Harz hergestellt:



5 aus 5'-(4-Methoxytrityl)-N-isobutyryl-deoxyguanosin, Beladung 32 $\mu\text{Mol/g}$.

Beispiel 3: Synthese des Trinukleotids



a) Synthese des Dinukleotids:

7.73 g (15 mMol) 5'-(4-Methoxytrityl)-thymidin (MMT-O-T-OH) werden zweimal mit abs. Pyridin eingedampft. Der Rückstand wird in 20 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und zu 80 ml einer 0,2 M Lösung von 2-Chlorphenyl-di-(1-benzotriazolyl)-phosphat in Tetrahydrofuran unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluss 25 getropft und das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Lösung des 2-Chlorphenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphats wird in drei Teile geteilt.

α) Hydrolyse zu Triethylammonium-2-chlorphenyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat:

Zu einem Drittel der obigen Lösung von 2-Chlorphenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat werden unter Kühlung 100 ml 0,5 M Triäthylammoniumbicarbonat gegeben. Nach 15 min. wird mit Dichlormethan extrahiert. Die Dichlormethan-Lösung wird mit Wasser gewaschen, eingengt und tropfenweise mit Petrolether versetzt. Die erhaltene Fällung wird abgenutscht, mit Aether-Petrolether 1:1 ausgewaschen und im Vakuum getrocknet. DC: R_f 0,35 in Dichlormethan-Methanol-Wasser (75:22:3).

β) Veresterung zu 2-Cyanoäthyl-2-chlorphenyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat und Abspaltung der 4-Methoxytrityl-Schutz-gruppe:

40 Zu einem Drittel der Lösung von 2-Chlorphenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-phosphat werden 1,3 ml 2-Cyanoäthanol und 2 ml Pyridin gegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Die Lösungsmittel werden im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Essigsäureäthylester gelöst und mehrmals mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 und Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird getrocknet, eingengt und in Hexan eingetropft. Der Niederschlag wird abfiltriert, in 50 ml 45 Dichlormethan-Methanol 7:3 gelöst und bei 0 °C mit einer Lösung von 3,8 g p-Toluolsulfonsäuremonohydrat in 75 ml Dichlormethan-Methanol 7:3 versetzt. Nach 2 Stunden wird die Reaktionslösung mit Dichlormethan verdünnt und mit einer kalten Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird eingengt und mit Hexan versetzt. Das ausgefallene 2-Cyanoethyl-2-chlorphenyl-thymidin-3'-phosphat wird an Kieselgel mit Dichlormethan-Methanol 96:4 chromatographiert. DC: R_f von 0,45 in Dichlormethan- 50 Methanol (9:1).

τ) Kondensation zum 5'-(4-Methoxytrityl)-3'-cyanoäthyl-bis-thymidin-dinukleotid:

2,2 g 2-Cyanoäthyl-2-chlorphenyl-thymidin-3'-phosphat werden zweimal durch Eindampfen mit abs. 65 Pyridin entwässert, in 20ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und zum restlichen Drittel der Lösung von 2-Chlorphenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat gegeben. Nach 18 Stunden bei Raumtemperatur werden zur Reaktionslösung unter Eiskühlung 10 ml Wasser und 200 ml Essigsäureäthylester zugegeben. Die organische Phase wird mehrmals mit Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewa-

schen, über Natriumsulfat getrocknet und auf ein kleines Volumen eingeeengt. Das im Phosphat-Teil und am 5'- bzw. 3'-Ende geschützte Dinukleotid wird durch Eintropfen in Aether-Hexan 1:1 gefällt. DG: R_f 0,48 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

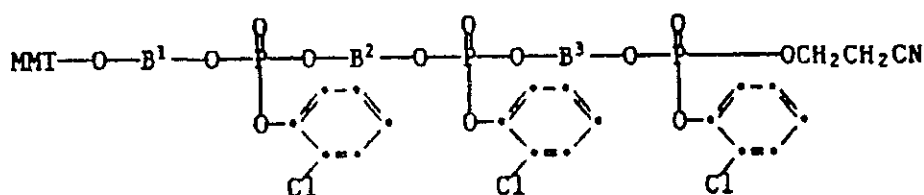
5 b) Synthese des Trinukleotids:

1,17 g (1 mMol) des oben beschriebenen vollgeschützten Dinukleotids werden in 30 ml Dichlormethan-Methanol 7:3 gelöst und unter Eiskühlung mit einer Lösung von 1,9 g p-Toluolsulfonsäuremonohydrat in 20 ml Dichlormethan-Methanol 7:3 versetzt. Nach 2 Stunden wird eiskalte Natriumhydrogencarbonat-Lösung
10 zugegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet, eingeeengt und in Hexan eingetropft. Das ausgefallene rohe Dinukleotid mit freier 5'-Hydroxygruppe wird an Kieselgel mit einem Gradienten von 2-8% Methanol in Dichlormethan chromatographiert. DG: R_f 0,33 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

850 mg dieses 5'-Hydroxy-dinukleotids und 1,06 g Triethylammonium-2-chlorphenyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat [vgl. Abschnitt a)] werden zweimal mit Pyridin eingedampft, dann in 10 ml abs. Pyridin gelöst und mit 560 mg 1-Mesitylsulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) versetzt. Nach 2 Stunden werden 2 ml eiskaltes Wasser zugegeben und nach einer weiteren Stunde mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigtem Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen, getrocknet, eingeeengt und mit Aether versetzt. Das ausgefallene Trinukleotid wird durch Chromatographie an Kieselgel
20 gereinigt. R_f 0,45 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

Beispiel 4:

Analog Beispiel 3 werden folgende geschützte Trinukleotide der allgemeinen Formel



abgekürzt $B^1B^2B^3$, hergestellt. Für die Nukleoside B^1 , B^2 , B werden folgende Abkürzungen verwendet:

- 35
- A = N-Benzoyl-deoxyadenosin
 - C = N-Benzoyl-deoxycytidin
 - G = N-Isobutyryl-deoxyguanosin
 - T = Thymidin
- 40
- 45
- 50
- 55

	Verbindung	R _f ^{a)}	Verbindung	R _f ^{a)}
5	TTT	0,45	ATG	0,48
	TTC	0,55	ACT	0,53
	TCT	0,46	ACC	0,48
10	TAC	0,56	ATT	0,55
	TGC	0,44	ACA	0,53
	TAG	0,60	AAC	0,46
	TGT	0,42	AAA	0,51
15	TGA	0,44	AGT	0,45
	CTT	0,53	AGG	0,38
	CTG	0,46	GTT	0,45
20	CCT	0,45	GTC	0,44
	CCC	0,59	GTG	0,35
	CCG	0,47	GCA	0,49
25	CCA	0,51	GCG	0,48
	CAT	0,55	GAT	0,44
	CAC	0,51	GAC	0,48
	CGC	0,46	GAG	0,48
30	CCA	0,38	GAA	0,50
	CAG	0,44	GGC	0,42
	CGG	0,38	GGT	0,46
35	CGT	0,49	GGG	0,35
			GGA	0,44

40 a) Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel in Dichlormethan-Methanol
9:1.

45 Beispiel 5: Synthese des DNA-Fragments einer Länge von 67 Basen von Base Nr. 96 bis Base Nr. 162 des DNA-Stranges (96/67)

a) Abspaltung der 2-Cyanäthylschutzgruppe der Trinukleotide:

50 10 µMol der Trinukleotide aus Beispiel 3 oder 4 werden unter Feuchtigkeitsausschluss in 60 µl Pyridin-Acetonitril-Triäthylamin 1:1:1 gelöst. Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur werden 0,7 ml peroxidfreier Äther zutropft und der Niederschlag abzentrifugiert. Das rohe Triethylammoniumsalz wird in 50 µl Pyridin gelöst und nochmals mit 0,5 ml Äther ausgefällt, abzentrifugiert und 15 Stunden am Hochvakuum getrocknet.

55 b) Kupplung der teilgeschützten Trinukleotide mit der an PolystyrolHarz gebundenen Oligonukleotidkette:

Alle Operationen werden unter Feuchtigkeitsausschluss in einem Reaktionsgefäß mit 220 µl Inhalt und mikroprozessorgesteuerter Lösungsmittel- und Reagens-Zugabe durchgeführt. 13 mg (0,74 µMol) des

Thymidin-Polystyrol-Harzes (Beispiel 1) werden im Reaktionsgefäß vorgelegt und folgenden Operationen unterworfen:

1. Methylenchlorid, 2 ml/min., 4 min.
2. Methylenchlorid-Isopropanol (85:15), 2 ml/min., 2 min.
- 5 3. Zinkbromid 1 M und 1,2-4-Triazol 0,02 M in Methylenchlorid-Isopropanol (85:15), 2 ml/min., 2-3,5 min.
4. Methylenchlorid-Isopropanol (85:15), 2 ml/min., 4 min.
5. Triäthylammoniumacetat 0,5 M in DMF, 2 ml/min., 5 min.
6. Molekularsieb-getrocknetes Pyridin, 2 ml/min., 3 min.
7. Tetrahydrofuran (Peroxid-frei, Molekularsieb-getrocknet), 2 ml/min., 3 min.
- 10 8. Stickstoffstrom, 10 min.
9. Injektion 10 μ Mol Trinukleotid GTC (Trimethylammoniumsalz aus Abschnitt a)) und 8,9 mg (30 μ Mol) 1-Mesitylsulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) gelöst in 150 μ l Pyridin
10. 45 °C, 20 min.
11. Pyridin, 2 ml/min., 4 min.
- 15 12. Acetanhydrid 5 % und 4-Dimethylaminopyridin 2,5 % in Pyridin, 2 ml/min., 4 min.
13. Pyridin, 2 ml/min., 4 min.
14. Pyridin-Isopropanol (1:1), 2 ml/min., 3 min.

Alle 14 Operationen werden 21 mal wiederholt, wobei bei der 9. Operation anstelle von GTC jeweils folgende Trinukleotide in Form ihrer Triäthylammoniumsalze (Abschnitt a)) in der angegebenen Reihenfolge eingesetzt werden: GCA, ACC, GAA, CCC, TAC, AGG, TGA, CGG, TAC, CGT, GTG, CCA, AAA, AAA, TGA, CGG, TGA, TTC, GGG, CCT, CAT. Die mittlere Kupplungsausbeute beträgt 97 %. Das Endprodukt hat folgende Struktur:

25 **HMT-CATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAAACCAGTGC GTTACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCGCAG**
TCT-Polystyrol

30 c) Abspaltung des DNA-Fragments vom Träger und Abspaltung der Schutzgruppen:

40,0 mg (ca. 0,60 μ Mol) DNA-Syntheseharz 96/67 werden mit 66 mg (0,40 mMol) o-Nitrobenzaldehyd und 50 μ l (0,40 mMol) 1,1,3,3-Tetramethylguanidin in 400 μ l 95%igem Pyridin während 3 Stunden bei 50 °C und während 12 Stunden bei Raumtemperatur gehalten. Nach dem Abblasen des Pyridins mit Stickstoff wird der Rückstand mit 1,6 ml wässrigem Ammoniak (33 %) versetzt und im geschlossenen Gefäß während 24 Stunden bei 50 °C gehalten.

Die abgetrennte flüssige Phase wird im Vakuum vom Ammoniak befreit und 3 mal mit je 3 ml peroxidfreiem Diäthyläther gewaschen. Nach dem Abtrennen der niedermolekularen Bestandteile an einer Biogel P6 Säule (100-200 mesh, 3x66 cm, 0,01 Molar Trimethylammoniumhydrogencarbonat pH 7,5, 1,5 ml/min.) werden 285 ODs (260 nm) DNA isoliert.

Insgesamt 60 ODs werden an einer HPLC-Säule aufgetrennt (PRP-1/Hamilton, 250 x 4,6 mm). Gradient (Lösung A: 0,05 M Triäthylammoniumacetat pH 7,0; Lösung B: Lösung A:Acetonitril 1:1): 30 % B in A $\rightarrow$ 60 % B in A in 20 min. bei 50 °C und 2 ml/min. Der lipophile Hauptpeak (Retentionszeit ca. 14 min.) wird gesammelt, an einer DE52-Cellulose (Whatman) Säule aufkonzentriert, eluiert und mit Äthanol gefällt. Zur Abspaltung der 4-Methoxytrityl-Schutzgruppe wird der Niederschlag in 50 μ l Essigsäure/H₂O (4:1) gelöst und 45 min. bei Raumtemperatur gehalten. Das Reaktionsprodukt wird lyophilisiert, mit Äthanol gefällt und zur Reinigung auf einem 8 % Polyacrylamidgel (7 M Harnstoff) elektrophoretisch aufgetrennt. Die der erwarteten DNA-Größe entsprechende Bande wird ausgeschnitten und das Produkt elektroeluiert, an DE52-Cellulose aufkonzentriert und die DNA 96/67 der Struktur

50

5' -CATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAAACCAGTGC GTTACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCG
CAGTCT-3'

55

mit Äthanol gefällt.

Beispiel 6:

Analog Beispiel 5 werden folgende DNA-Fragmente (5'-3') hergestellt:

1/58

CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGT

46/64 komplementär

CAGAACCCAGGATGCATTTGTTACCTGACCGCAAACGTTAGAACCTTCGCACAGGCACAGGTT

154/64 komplementär

CAGGATCCTACTGCAGGTATTCTTCCGGGATTCTTTCGAAGTCACCGTCGTTGTGAGACTGCCG

Beispiel 7: Phosphorylierung der Fragmente 1/58, 46/64 komplementär, 96/67 und 154/64 komplementär

Die Phosphorylierung und die radioaktive Markierung an den 5'-Enden erfolgt mit [γ - ^{32} P]ATP und T₄ Polynukleotid-Kinase (Boehringer) wie beschrieben (18).

Beispiel 8: Polymerisation zu Duplex II (Teilstück F₂ des Desulfatohirudin-Gens)

Je 50 pMol Fragment 96/67 kinasiert und Fragment 154/64 kinasiert werden in 24 μ l Wasser gelöst, die Lösung während 3 min. auf 90 °C erwärmt und innerhalb von 5 min. auf 12 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 4 μ l Endo-R Puffer (0,1 Molar Tris-HCl pH 7,5, 66 mM MgCl₂, 66 mM β -Mercaptoäthanol, 0,6 M NaCl), 10 μ l Deoxynucleosidtriphosphat-Gemisch (dATP, dCTP, dGTP, TTP, je $2 \cdot 10^{-3}$ Molar, mit NH₃ auf pH 7,0 eingestellt) und 2 μ l (10 Einheiten) DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment (Boehringer) wird während 30 min. bei 12 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch 3 minütiges Erhitzen auf 90 °C gestoppt und das Gemisch bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

In analoger Weise werden die Fragmente 1/58 kinasiert und 46/64 kinasiert zum Duplex I (Teilstück F₁ des Desulfatohirudin-Gens) umgesetzt.

Die Duplexe I und II haben die folgenden Strukturen:

Duplex I

CTGGAATTCATCGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGTTTC
GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCACTCTGGACACGGACACGCTTCCAAG

TAACGTTTGGCGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCTG
ATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTTACGTAGGACCCAAGAC

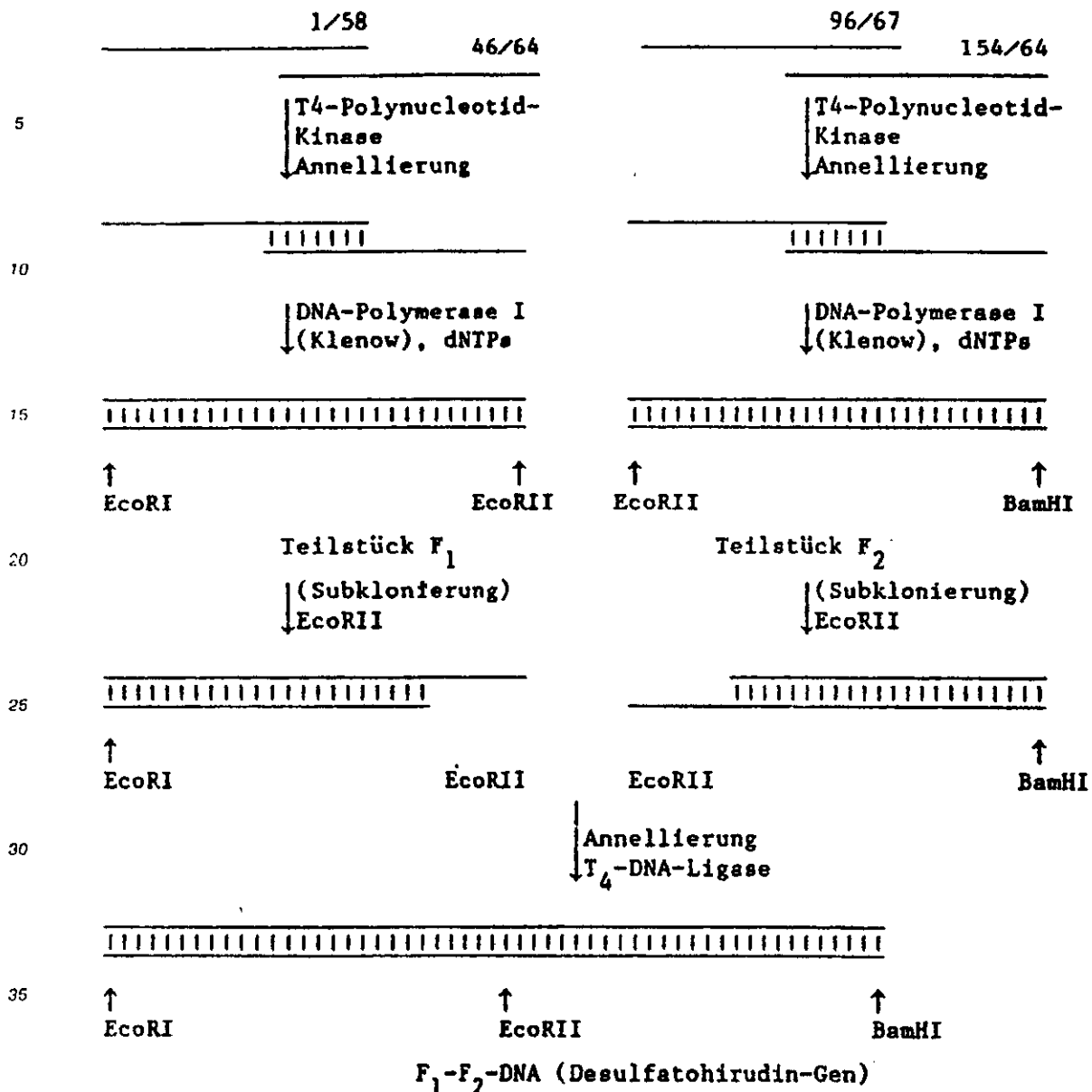
Duplex II

CATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAACCAGTGCCTTACCGGTGAAGGTACCCGAAACCGCAGTCTC
GTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTTTGGTCACGCAATGGCCACTTCCATGGGGCTTTGGCGTCAGAG

ACAACGACGGTGACTTCCAAGAAATCCCGGAAGAATACCTGCAGTAGGATCCTG
TGTTGCTGCCACTGAAGCTTCTTTAGGGCCTTCTTATGGACGTCATCCTAGGAC

Die Herstellung der Teilstücke F₁ und F₂ des Desulfatohirudin-Gens ist im folgenden Schema I dargestellt:

Schema 5: Herstellung der Teilstücke F₁ und F₂ des Desulfatohirudin-Gens und der F₁-F₂-DNA



Beispiel 9: Polymerisation und Ligation der Fragmente 1/58, 46/64 kinasiert, 96/67 kinasiert und 154/64; Herstellung des Desulfatohirudin-Gens

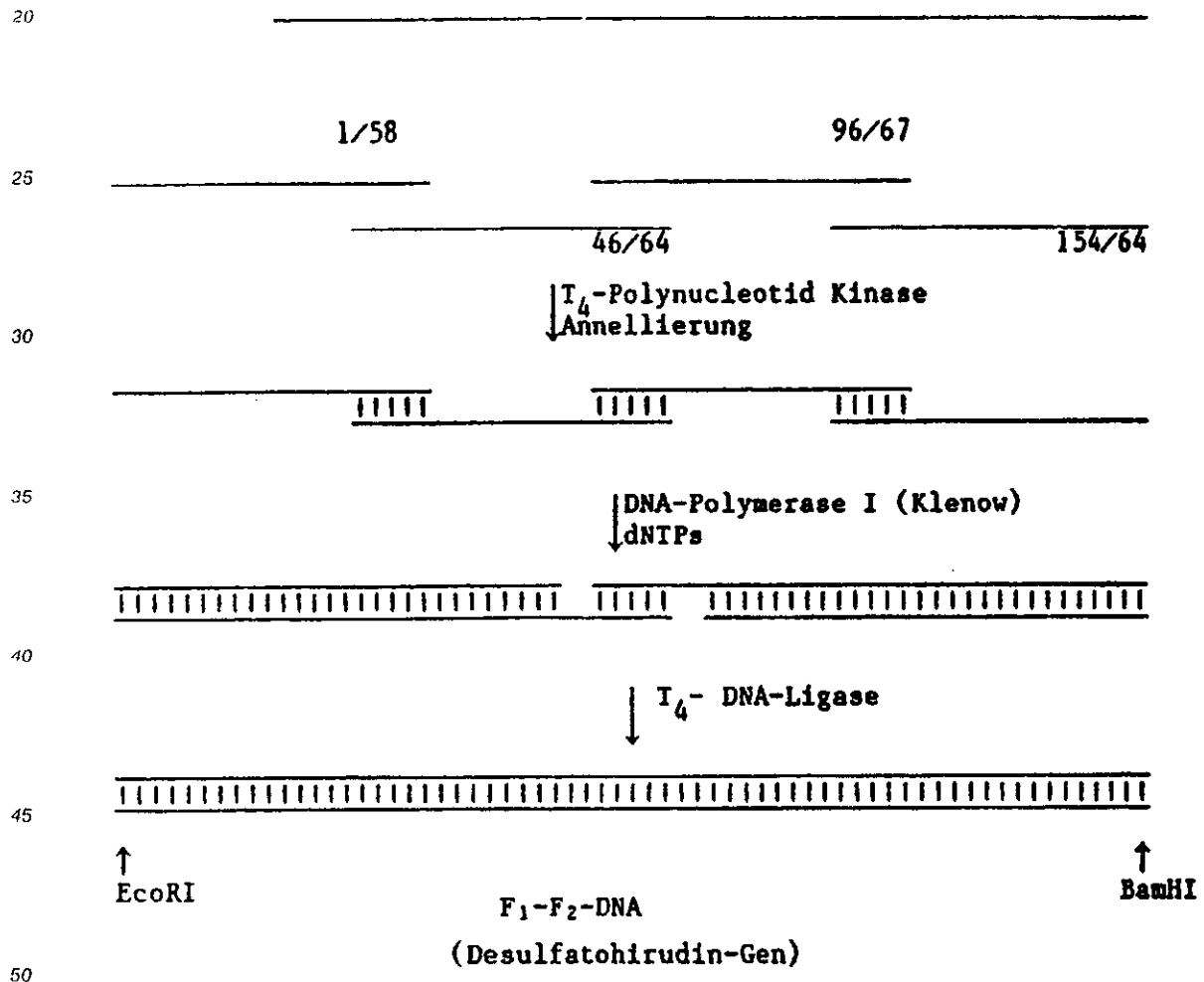
Je 50 pMol Fragment 1/58, 46/64 kinasiert, 96/67 kinasiert und 154/64 werden in 48 μ l Wasser gelöst, die Lösung während 3 min. auf 90° C erwärmt und innerhalb 5 min. auf 12° C abgekühlt. Nach Zugabe von 8 μ l Endo-R Puffer (vgl. Beispiel 8), 20 μ l Deoxynucleosidtriphosphat-Gemisch (daTP, dCTP, dGTP, TTP, je 0,002 Molar, mit NH₃ auf pH 7.0 eingestellt) und 2 μ l (10 Einheiten) DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment (Boehringer) wird während 30 min. bei 12° C inkubiert. Die Reaktion wird durch 3-minütiges Erhitzen auf 90° C gestoppt und die DNA nach Phenol/Chloroform-Extraktion durch Äthanol-fällung isoliert. Das entstandene DNA-Gemisch wird in 100 μ l Ligase-Puffer (66 mM Tris-HCl pH 7.5, 6,6 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 5 mM ATP) gelöst, mit 50 Einheiten (2 μ l) T4 DNA-Ligase (Biolabs) versetzt und während 20 Stunden bei 20° C inkubiert. Die Reaktion wird durch 5-minütiges Erhitzen auf 70° C gestoppt und die DNA nach Phenol/Chloroform-Extraktion durch Äthanol-fällung isoliert. Nach Auftrennung des Gemisches an einem 8 % Polyacrylamidgel (denaturierend) durch Elektrophorese wird das Ligationsprodukt mit 217 Basenpaaren elektroeluiert, an einer DE52-Cellulose-Säule aufkonzentriert und nach Elution durch Ethanol-fällung isoliert.

Das Desulfatohirudin-Gen hat die folgende Struktur:

CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGT
 GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTTGGACACGGACACGCTTCCA
 5 TCTAACGTTTGGCGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAACAGTGCGTT
 AGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTTACGTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTTGGTCACGCAA
 ACCGGTGAAGGTACCCGAAACCGCAGTCTCACAACGACGGTGACTTCGAAGAAATCCCGGAAGAA
 10 TGGCCACTTCCATGGGGCTTTGGCGTCAGAGTGTTGCTGCCACTGAAGCTTCTTTAGGGCCTTCTT
 TACCTGCAGTAGGATCCTG
 ATGGACGTCATCCTAGGAC

15 Die Herstellung des Desulfatohirudin-Gens aus den vier Fragmenten ist im folgenden Schema II dargestellt:

Schema 6: Herstellung des Hirudin-Gens aus den vier synthetischen Fragmenten



Beispiel 10: Herstellung des Plasmids pML 300, enthaltend die F₁-DNA des Desulfatohirudin-Gens (Fig. 1)

55 a) Herstellung des linearisierten Vektors pBR322/EcoRI/PvuII.

5 μ g pBR322 Plasmid-DNA werden mit 5 Einheiten PvuII Restriktionsendonuclease (Biolabs) in 200 ml einer Lösung aus 100 μ g/ml Gelatine für 1 Stunde bei 37° C verdaut. Anschliessend wird diese Lösung auf

100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl eingestellt und die DNA mit 30 Einheiten EcoRI-Restriktionsendonuclease (Biolabs) für 2 Stunden bei 37°C verdaut. Dann wird die Lösung auf 50 mM Tris-HCl pH 8 eingestellt und bei einer DNA-Konzentration von 10 µg/µl mit 2 Einheiten intestinaler alkalischer Kälber-Phosphatase (Boehringer) während 30 min. bei 37°C inkubiert. Das Enzym wird durch Erhitzen der Lösung während 60 min. bei 65°C inaktiviert. Dann wird die Lösung auf TNE eingestellt, mit 1 Volumen Phenol und Chloroform extrahiert und die verdaute DNA mit 2 Volumen Alkohol bei -20°C über Nacht ausgefällt.

Der aus der pBR322 DNA herausgeschnittene Vektor (pBR322/EcoRI-PvuII, 2297 Basenpaare) wird durch Gelelektrophorese an 1%iger niedrig schmelzender Agarose (Biorad) in Tris-Acetat-EDTA Puffer pH 8 vom kleinen DNA-Fragment (2067 Basenpaare) abgetrennt. Nach Anfärben der DNA im Agarosegel mit EtBr wird die Stelle des Gels, welche die DNA-Bande des pBR322/EcoRI/PvuII Vektors (= 2297 Basenpaare) enthält, aus dem Gel ausgeschnitten und bei 65°C 10 min. verflüssigt. Zu dieser DNA-Lösung werden 20 Volumina TNE hinzugefügt, die DNA nach Mueller et al. (19) durch DE-52 Chromatographie gereinigt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA bei -20°C über Nacht mit Alkohol ausgefällt. Der DNA-Niederschlag wird in 50 µl 0,01 M Tris-HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA gelöst und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. 1,4 µg (= 3,2 pMol Enden) DNA werden erhalten.

b) Herstellung der F₁-DNA/EcoRI

24 ng (= 1,3 pMol Enden) der chemisch synthetisierten F₁-DNA (siehe Beispiel 8) werden mit 5 Einheiten EcoRI Restriktionsendonuclease (Biolabs) in 50 µl 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl und 100 µg/ml Gelatine für 30 min. bei 37°C verdaut. Danach werden der Lösung 0,06 µg (= 0,14 pMol Enden) des linearisierten Vektors pBR322/EcoRI/PvuII (Beispiel 10a) zugesetzt. Anschliessend wird das Enzym durch Erhitzen auf 65°C nach 10 min inaktiviert, die Lösung auf TNE eingestellt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wird mit Alkohol präzipitiert. Die ausgefällte DNA wird unter Alkohol bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

c) Ligierung der pBR322/EcoRI/PvuII Vektor-DNA mit der F₁-DNA/EcoRI und Konstruktion des Plasmids pML300.

Der in Beispiel 10b) erhaltene DNA-Niederschlag, welcher die beiden genannten DNA-Bruchstücke enthält, wird in 20 µl einer Lösung von 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 100 µg/ml Gelatine gelöst und mit 25 Einheiten/µl T₄ DNA-Ligase (Biolabs) bei 15°C für 3 Stunden behandelt. Auf diese Weise entsteht in der Lösung das rekombinierte Plasmid pML300, welches die F₁-DNA enthält.

d) Transformation von E. coli HB101 mit dem Plasmid pML300

Die für die Transformation notwendigen mit Calcium vorbehandelten E. coli HB101 Zellen werden, wie von Handel et. al. (14) beschrieben, hergestellt.

Die unter c) erhaltene Lösung, welche das rekombinierte Plasmid pML300 enthält, wird für 10 min. auf 65°C erhitzt, um die T₄-DNA Ligase zu inaktivieren und anschliessend auf 37°C abgekühlt. 10 µl dieses Reaktionsgemisches werden zu 150 µl Calcium-behandelten E. coli HB101-Zellen in 10 mM MgCl₂ und 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) in einem Gesamtvolumen von 200 µl gegeben.

Danach wird diese Mischung für 30 min. in Eis gekühlt, 2 min. auf 42°C erwärmt und dann 50 min. in 1 ml L-Medium (vgl. Beispiel 18) bei 37°C stehen lassen. Darauf wird die Mischung in Aliquoten à 0,2 ml auf 5 Agarplatten (McConkey-Agar, Difco), welche 60 µg/ml Ampicillin (Serva) enthalten, ausgestrichen. Die Agarplatten werden hernach bei 37°C für 16-18 Stunden gehalten. 484 Ampicillin-resistente Kolonien des transformierten E. coli HB 101 werden erhalten.

e) Screening der Kolonien, die F₁-DNA enthalten

470 transformierte Kolonien (Beispiel 10d) werden auf Nitrozellulosefilter B85 (Schleicher und Schüll) abgedrückt. Nach Grunstein und Hogness (20) werden die Kolonien lysiert und ihre denaturierte DNA auf dem Filter fixiert. Anschliessend erfolgt eine Vorhybridisierung der Filter in 20 ml (pro Filter) 4xSET [= Lösung von 30 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA], 0,1 % (g/v) Ficoll 400 (Pharmacia), 0,5 % SDS, 50 µg/ml denaturierte Kalbsthymus-DNA für 4 Stunden bei 64°C. Danach werden die Nitrozellulosefilter in 20 ml (pro Filter) 5xSET (g/v) Ficoll 400, 0,2 % SDS und 50 µg/ml denaturierter Kalbsthymus-DNA für 16 Stunden bei 64°C mit der ³²P-radioaktiv markierten Probe (ca. 10³-10⁴ Cerencov cpm pro Filter)

behandelt. Als Probe wird das Oligonucleotid 46/64 komplementär (vgl. Beispiel 6) verwendet.

- Anschliessend werden die Filter in 2xSET, 0.2 % SDS bei Raumtemperatur zweimal gewaschen, danach zweimal in 2xSet, 0.5% SDS bei 60° C (zuerst 30 min., dann 60 min. lang). Dann werden die Filter zwischen 3 MM Papfer (Whatman) getrocknet und bei -80° C auf einen Röntgen-Film (Fuji) mit einer Verstärkerfolie (Intensifying screen, Ilford) für 1-2 Tage gelegt.

Das erhaltene Autoradiogramm zeigt 71 positive Kolonien (Klone), die zur Weiterarbeit verwendet werden können, eine davon erhielt die Bezeichnung pML300.

- Beispiel 11: Herstellung des Plasmids pML305, welches die F₂-DNA des Desulfatohirudin-Gens enthält (Fig. 2).

a) Herstellung des linearisierten Vektors pBR322/BamHI/NruI

- 5 µg pBR322 Plasmid-DNA werden mit 30 Einheiten BamHI Restriktionsendonuclease 30 min. bei 37° C in einer Lösung von 100 mM NaCl, 6 mM Tris·HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl₂ und 100 µg/ml Gelatine verdaut. Anschliessend werden der Lösung 15 Einheiten PvuII Restriktionsendonuclease zugefügt und 2 Stunden bei 37° C verdaut.

- Das Reaktionsgemisch wird für 10 min. auf 70° C erwärmt, um die Enzyme zu inaktivieren. Danach werden die beiden DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese an 1%iger niedrigschmelzender Agarose in Tris-Acetat EDTA Puffer pH 8 voneinander getrennt. (siehe Beispiel 10a).

Die DNA-Bande des pBR322 BamHI/PvuII Vektors (= 2672 Basenpaare) wird ausgeschnitten, verflüssigt und nach Mueller et al. (19) durch DE-52 Chromatographie gereinigt. 0,75 µg (= 1,5 pMol Enden) DNA werden erhalten.

b) Herstellung der F₂-DNA/BamHI

- 25 µg (= 1,3 pMol Enden) der chemisch synthetisierten F₂-DNA (Beispiel 8) werden mit 16 Einheiten BamHI Restriktionsendonuclease (Biolabs) in 20 µl 150 mM NaCl, 6 mM Tris·HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl₂ und 100 µg/ml Gelatine für 30 min. bei 37° C verdaut. Anschliessend werden der Lösung 60 ng (= 96 nMol Enden) des linearisierten Vektors pBR322/BamHI/PvuII (Beispiel 11a) zugesetzt, die ganze Lösung auf TNE eingestellt und mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit 2 Volumen Alkohol ausgefällt. Die ausgefällte DNA wird bis zur Weiterverarbeitung unter Alkohol bei -20° C gelagert.

c) Ligierung der pBR322/BamHI/PvuII Vektor-DNA mit der F₂-DNA/BamHI und Konstruktion des Plasmids pML305

- Der unter Beispiel 11b) erhaltene DNA-Niederschlag, der die beiden genannten DNA-Bruchstücke enthält, wird in 20 µl einer Lösung von 50 mM Tris·HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 100 µg/ml Gelatine gelöst und mit 15 Einheiten/µl T₄ DNA-Ligase (Biolabs) bei 15° C für 3 Stunden behandelt. Auf diese Weise entsteht in der Lösung das rekombinierte Plasmid pML305, welches die F₂-DNA enthält.

d) Transformation von E. coli HB101 mit dem Plasmid pML305

- Die Transformation der mit Calcium behandelten E. coli HB101 Zellen erfolgt wie in Beispiel 10d) beschrieben. Es werden 10 µl des in Beispiel 12c) erhaltenen Reaktionsgemisches verwendet. 313 Ampicillin-resistente Kolonien werden erhalten.

e) Screening der Kolonien, die F₂-DNA enthalten

- 65 transformierte Kolonien (Beispiel 11d) werden auf F₂-DNA geprüft, wie in Beispiel 10e) beschrieben. Als radioaktive Probe wird das Oligonucleotid 154/64 komplementär (vgl. Beispiel 6) verwendet. Im Autoradiogramm werden 2 positive Kolonien erhalten, eine davon erhält die Bezeichnung pML305.

Beispiel 12: Charakterisierung der Klone pML300 und pML305

Die DNAs der rekombinierten Plasmide pML300 und pML305 werden nach Ish-Horowitz isoliert (21). Die Nucleotidsequenzen des F₁-DNA- und F₂-DNA-Inserts werden nach Maxam und Gilbert bestimmt (11). Zu

diesem Zweck werden je 10 µg Plasmid-DNA von pML300 mit EcoRI-Restriktionsendonuclease und 10 µg Plasmid-DNA von pML305 mit BamHI-Restriktionsendonuclease gespalten und die linearisierten DNAs durch Gelelektion aus Agarosegel isoliert [vgl. Beispiel 10a)]. Anschliessend werden die isolierten DNAs mit alkalischer Phosphatase verdaut und über DE-52 chromatographiert (vgl. Beispiel 11a). Danach werden die DNAs am 5'-Ende mit [γ - ^{32} P]ATP (spezifische Aktivität > 5000 Ci/mmol, Amersham) und T₄-Polynucleotid-Kinase (P-L-Biochemicals) radioaktiv markiert.

Die radioaktiv markierten DNAs werden dann mit einer zweiten Restriktionsendonuclease (EcoRII) gespalten. Die entstandenen DNA-Fragmente werden durch Gelelektion aus Agarose isoliert. Im Falle von pML300 wird dann vom EcoRII-EcoRI*-Fragment (ca. 109 Basenpaare) die Nucleotidsequenz der F₁-DNA, im Fall vom pML300 die der F₂-DNA im EcoRII-BamHI*-Fragment (ca. 122 Basenpaare) bestimmt.

Die Nucleotidsequenzen, welche für die F₁-DNA, und F₂-DNA bestimmt werden, sind identisch mit den im Beispiel 8 dargestellten.

Beispiel 13: Herstellung des Expressionsplasmids pML310

a) Konstruktion des linearisierten Vektors pHR148/EcoRI/BamHI, welcher den trp-Promotor-Operator enthält (Fig. 3 und Fig. 4)

A. Konstruktion des Plasmids p159

10 µg Plasmid pBRH_{trp} (22) werden mit 50 Einheiten EcoRI (Biolabs) gespalten während 60 min. bei 37°C. und das Verdauungsgemisch wird nach Phenolextraktion durch einen Saccharose-Dichtegradienten (5-23 %) in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA in einem TST41 (Kontron AG) Rotor fraktioniert. Die Zentrifugation dauert 14 Stunden bei 40 000 upm und 15°C. 0,3 ml Fraktionen werden mit einem ISCO-Gradientenkollektor bei 1 ml/min. gesammelt. Die Fraktionen, welche das kleinere Fragment enthalten, werden vereinigt, die Lösung wird auf TNE eingestellt und mit 2 Volumen Aethanol bei -20°C gefällt. Die DNA wird nach Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge in 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA gelöst. 5 µg dieses DNA-Fragmentes werden mit 5 Einheiten BglII (Biolabs) 60 min. bei 37°C gespalten. Das Reaktionsgemisch wird mit Phenol und Chloroform extrahiert und die DNA wird mit 2 Volumen Aethanol bei -80°C während 10 min. inkubiert und die DNA durch Zentrifugation gesammelt und erneut in 50 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) gelöst. 2 µl von dieser Lösung werden entnommen (0,2 µg DNA) und bei einer DNA-Konzentration von 10 ng/µl in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) mit 1 Einheit intestinaler alkalischer Kälber-Phosphatase (Boehringer) während 30 min. bei 37°C inkubiert. Das Enzym wird durch Erhitzen der Lösung während 60 min. bei 65°C inaktiviert. 0,04 µg DNA wird entnommen und 5'-terminal mit 10 µCi [γ - ^{32} P]-ATP (>5000 Ci/mmol, Amersham) und 5 Einheiten T₄ Polynucleotid-Kinase (P-L Biochemicals) in 20 µl Reaktionsvolumen in 50 mM Tris-HCl (pH 9,5), 10 mM MgCl₂, und 5 mM DTT, während 30 min. bei 37°C inkubiert. Die radioaktive Probe wird mit der nicht-markierten Probe (siehe oben) gemischt und die DNA-Fragmente werden durch einen 5-23 % Saccharose-Dichtegradienten in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA in einem TST60 Rotor fraktioniert. Die Zentrifugation erfolgt während 5 Stunden bei 60 000 upm und 15°C. Es werden 0,2 ml Fraktionen gesammelt. Die Radioaktivität jeder Fraktion wird durch Messung der Cerencov-Strahlung bestimmt und die Fragmente damit identifiziert. Die gewünschten Fraktionen, welche das kleine DNA-Fragment enthalten, werden vereinigt, die DNA mit 2 Volumina Aethanol gefällt und nach Zentrifugation wieder in 20 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA gelöst.

Das ^{32} P-markierte EcoRI-BglII DNA-Fragment wird mit 0,2 Einheiten TaqI (Biolabs) in 50 µl Volumen während 10 min. bei 37°C partiell gespalten. Das Reaktionsgemisch wird auf 0,2 % SDS, 10 % Glycerin, 10 mM EDTA, 0,05 % Bromphenol-Blau eingestellt und die DNA-Fragmente auf einem 6 % Polyacrylamid-gel in Tris-Borat-EDTA (23) aufgetrennt. Auf dem Autoradiogramm wird die das gewünschte EcoRI-TaqI enthaltende Bande (das grösste Teilfragment) identifiziert. Dieses Fragment (L, siehe Fig. 3) wird aus dem Gel extrahiert und gereinigt (19) und in 10 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA gelöst.

Als Akzeptor-Plasmid wird pBR322, welches mit ClaI und EcoRI gespalten ist, verwendet: 2 µg pBR322 werden mit 4 Einheiten ClaI (Biolabs) in 20 µl Reaktionsvolumen während 60 min. bei 37°C verdaut. Das Protein wird mit Phenol extrahiert und die DNA anschliessend mit 2 Volumina Aethanol bei -80°C während 10 min. gefällt. Die DNA wird durch Zentrifugation gesammelt und dann mit 10 Einheiten EcoRI (Biolabs) während 30 min. bei 37°C in 20 µl Reaktionsvolumen verdaut. Anschliessend wird die Lösung mit 2 Volumina 0,1 M Tris-HCl (pH 8,7) versetzt und mit 1 Einheit alkalischer Kälber-Phosphatase (Boehringer) während 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wird anschliessend durch Inkubation bei 65°C

(* gibt das DNA-Ende an, das radioaktiv markiert ist).

während 60 min. inaktiviert.

100 ng des Akzeptor-Plasmids werden mit 5 µl Fragment L-DNA in 15 µl Reaktionsvolumen in 10 mM MgCl₂, 20 mM Tris·HCl (pH 7,8), 10 mM DTT, 0,5 mM ATP mit 30 Einheiten pro µl Reaktionsvolumen T₄ DNA-Ligase (Biolabs) während 2 Stunden inkubiert.

- 5 5 µl dieser Lösung werden zu einem Gemisch gegeben, das 150 ml mit Calciumchlorid behandelte E. coli HB101-Zellen (14) in 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ und 10 mM Tris·HCl (pH 7,5) in einem Gesamtvolumen von 200 µl enthält. Das Gemisch wird 20 min. in Eis gekühlt, 1 min. auf 42°C erhitzt und 10 min. bei 20°C inkubiert. 1 ml Trypton-Medium [Trypton-Medium enthält 10 g Bacto-Trypton (Difco); 1 g Hefeextrakt (Difco); 1 g Glucose; 8 g NaCl und 294 mg CaCl₂·2H₂O in 1 l destilliertem Wasser] wird
10 zugesetzt und das Gemisch 30 min. bei 37°C unter Schütteln bei 300 U/min. inkubiert. Die Mischung wird auf zwei Agarplatten (McConkey Agar, Difco; 0,6 ml/Platte), supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin (Sigma), plattiert. Die Platten werden 12 bis 17 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Plasmid-DNA von 10 verschiedenen Kolonien wird wie folgt isoliert:

- Die Kolonien werden zur Inokulierung von 10 ml Trypton-Medium, supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin,
15 wie oben, in einem 25 ml Erlenmeyerkolben verwendet. Die Kulturen werden 15 bis 18 Stunden bei 37°C und 300 U/min. geschüttelt. Die Zellen werden durch Zentrifugieren (Sorval, HS-4 Rotor, 10 min. bei 4000 U/min., 4°C) geerntet. Man erhält etwa 0,1 g Zellen, und diese werden in 1 ml 50 mM Tris·HCl (pH 8,0) resuspendiert. 0,25 ml Lysozymlösung [10 mg/ml in 50 mM Tris·HCl (pH 8,0); Lysozym wird von Sigma
20 vertrieben] werden zugesetzt und nach 10-minütiger Inkubation bei 0°C werden 0,15 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5) zugegeben. Nach weiteren 10 min. bei 0°C werden 60 µl 2%iges Triton x-100 (Merck) zugegeben. Nach 30 min. bei 0°C wird die Probe 30 min. bei 15'000 U/min. und 4°C in einem Sorval SA-600 Rotor zentrifugiert. Der Ueberstand wird mit 1 Vol. Phenol (gesättigt in TNE) deproteinisiert. Die Phasen werden
25 durch Zentrifugieren (Sorval HB-4 Rotor) während 10 min. bei 5000 U/min. und 4°C getrennt. Die obere Phase wird zweimal mit 1 Vol. Chloroform extrahiert. Pankreatische RNase A (Sigma; 10 mg/ml in TNE 10 min. bei 85°C vorerhitzt) wird bis zu einer Endkonzentration von 25 µg/ml zugegeben und das Gemisch 40 min. bei 37°C inkubiert. Die Lösung wird dann auf 1M NaCl und 10 % Polyethylenglykol 6000 (Fluka, 20 min. bei 120°C im Autoklaven behandelt) eingestellt und 2 Stunden bei -10°C inkubiert. Das Präzipitat wird in einem Sorval HB-4 Rotor (20 min. bei 10 000 U/min., 0°C) gesammelt und erneut in 100 µl TNE gelöst. Die DNA-Lösung wird mit 1 Vol. Phenol extrahiert und die DNA wird mit 2 Vol. Aethanol 10 min. bei -80°C
30 präzipitiert. Das Präzipitat wird durch Zentrifugieren in einer Eppendorf-Zentrifuge gesammelt und die DNA erneut in 20 µl 10 mM Tris·HCl (pH 7,5) und 0,5 mM EDTA gelöst. Aus einer 10 ml Kultur gewinnt man 8 bis 10 µg Plasmid-DNA.

Die Plasmid-DNAs werden nach Verdauung mit den folgenden Restriktionsenzymen analysiert:

- Je 0,5 µg Plasmid-DNA wird mit HpaI (Biolabs) sowie mit HpaI (Biolabs) und EcoRI (Biolabs) mit ClaI
35 (Biolabs) nach Standard-Vorschriften, gemäss Angaben des Enzym-Herstellers, gespalten. Die DNAs werden auf einem 1 % Agarose-Gel in 40 mM Tris·Acetat (pH 7,8) 1 mM EDTA und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid fraktioniert. Die gewünschten Plasmide enthalten eine HpaI-Stelle und ergeben nach der 3-fachen Verdauung neben dem grossen DNA-Fragment 2 kleinere Fragmente, welche grösser sind als das kleine EcoRI-ClaI-Fragment von pBR322. Eines dieser Plasmide wird mit p159 bezeichnet (siehe Fig. 3).

40

B. Konstruktion des Plasmids pHRI145

- 2 µg p159-DNA werden mit 10 Einheiten EcoRI (Biolabs) während 30 min. bei 37°C verdaut. Die DNA wird mit Phenol extrahiert, mit Aethanol gefällt und nach Zentrifugation in 10 µl 10 mM Tris·HCl (pH 7,5),
45 0,5 mM EDTA gelöst. Die mit EcoRI verdaute DNA wird weiterhin mit 5 Einheiten DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) (Boehringer) in 10 mM MgCl₂, 10 mM β-Mercaptoethanol, 50 mM NaCl, 0,1 mM dATP (P&L Biochemicals), 0,1 mM dTTP (P&L Biochemicals) während 15 min. bei 12°C behandelt. Die Polymerase wird anschliessend durch Inkubation bei 85°C während 5 min. inaktiviert. Das Reaktionsgemisch wird in 20 mM Tris·HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP (Sigma) auf das 10fache
50 verdünnt und mit 30 Einheiten T₄ DNA-Ligase pro µl Reaktionsgemisch während 1 Stunde bei 15°C inkubiert.

50 ng der DNA werden in E. coli transformiert (wie oben beschrieben) und auf McConkey-Agarplatten supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin, ausplattiert.

- Die Plasmid-DNAs von 10 verschiedenen Kolonien wird, wie oben beschrieben, isoliert. Die Plasmid-
55 DNAs werden analysiert durch Verdauung mit EcoRI. Die gewünschten Plasmide sind EcoRI-resistent. Die Analyse erfolgt wie oben beschrieben. Eines der gewünschten Plasmide wird als HRI145 bezeichnet (Fig. 3).

C. Konstruktion des Plasmids pHri148

2 µg pHri145-DNA werden mit 5 Einheiten ClaI (Boehringer) während 60 min. bei 37° C behandelt, dann mittels Phenol-Extraktion deproteiniert. Die DNA wird mit Aethanol gefällt und dann in 20 µl 10 mM Tris·HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA gelöst. Die überhängenden Enden werden, wie oben beschrieben, mit DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt, mit der Aenderung, dass dATP und dTTP ersetzt werden durch dCTP (P&L Biochemicals) und dGTP (P&L Biochemicals). Die Polymerase wird inaktiviert durch Inkubation bei 85° C während 5 min. Das Reaktionsgemisch wird mit 2 Volumina 0,1 M Tris·HCl (pH 8,7) versetzt und mit 0,5 Einheiten Kälber-Phosphatase (Boehringer) während 30 min. bei 37° C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird deproteiniert durch Phenol-Extraktion. Die DNA wird mit Aethanol gefällt und in 8 µl 10 mM Tris·HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA gelöst.

Ein chemisch synthetisierter DNA-Linker der Formel



wird am 5'-Ende phosphoryliert, indem 8 pMol des Linkers mit 5 µCi [γ -³²P]-ATP (5500 Ci·mmol⁻¹ Amersham) in 8 µl Reaktionsvolumen, welches 0,1 mM rATP (Sigma), 50 mM Tris·HCl (pH 9,5), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 2 Einheiten T₄ Polynucleotid-Kinase (P&L Biochemicals) enthält, während 30 min. bei 37° C inkubiert werden. Die Reaktion wird gestoppt durch Einfrieren bei -80° C.

Der radioaktiv markierte Linker wird anschliessend mit 1 µg ClaI und Phosphatase behandelt und mit pHri145-DNA (siehe oben) in einem 20 µl Reaktionsvolumen ligiert, welches 0,5 mM rATP (Sigma), 10 mM DTT (Calbiochem), 20 mM Tris·HCl (pH 7,8), 1 mM MgCl₂ und 800 Einheiten T₄ DNA-Ligase (Biolabs) enthält. Die Inkubation erfolgt bei 15° C während 2 Stunden. Die Ligase wird inaktiviert durch Inkubation bei 85° C während 10 min. Anschliessend werden 2 Volumina Wasser hinzugegeben, die Kochsalz-Konzentration auf 10 mM eingestellt und 20 Einheiten KpnI (Biolabs) hinzugegeben während 30 min. bei 37° C. Nach der Extraktion mit Phenol und Chloroform wird die Mischung durch ein 0,9 % niedrigschmelzendes Agarose-Gel (Biorad) in 40 mM Tris·Acetat (pH 7,8), 1 mM EDTA und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid fraktioniert. Die durch UV-Bestrahlung sichtbare Bande, welche die gleiche Mobilität wie eine Marker-DNA gleicher Grösse aufzeigt, wird mit einem Skalpell herausgeschnitten. Das Gelstück wird 5 min. bei 65° C geschmolzen und dann auf 37° C abgekühlt. Man erhält ein Volumen von ca. 20 µl. 5 µl dieser Lösung werden entnommen und mit 400 Einheiten T₄-Ligase (Biolabs) in 10 µl Reaktionsvolumen, welches auf 0,5 mM ATP, 10 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 20 mM Tris·HCl (pH 7,8) eingestellt wird, während 12 Stunden bei 15° C inkubiert. 1/10 Volumen einer Lösung mit 100 mM Tris·HCl (pH 7,5), 100 mM CaCl₂ und 100 mM MgCl₂ werden zum Ligase-Gemisch (solifidiert bei 15° C) hinzugegeben und bei 65° C während 5 min. inkubiert. Die Lösung wird dann verwendet, um mit Calcium behandelte *E. coli* HB101-Zellen, wie oben beschrieben, zu transformieren. Es wird auf McConkey-Agarplatten, supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin, ausplattiert.

Die Plasmid-DNAs von 10 verschiedenen Kolonien werden isoliert, wie oben beschrieben, und die DNA wird der folgenden Restriktionsenzymanalyse unterworfen: Je 0,5 µg Plasmid DNA wird nacheinander mit KpnI (Biolabs), NcoI (Biolabs) und EcoRI (Biolabs) nach den Vorschriften des Enzym-Herstellers gespalten. Die Spaltprodukte werden auf 1 % Agarose-Gelen in 40 mM Tris·Acetat (pH 7,8), 1 mM EDTA, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid fraktioniert. Alle Plasmide zeigen je eine dieser Enzymspaltstellen, wie gewünscht. Eines wird als Hri148 bezeichnet.

Das Plasmid Hri148 enthält einen Tryptophan-Promotor-Operator und eine ribosomale Bindungsstelle bis und mit ATG. Hirudin als auch andere heterologe Gene können direkt über die einmalig im Plasmid vorhandenen EcoRI, NcoI, KpnI-Stellen angekoppelt werden. Desweiteren ermöglicht diese Konstruktion das direkte Koppeln und Exprimieren von heterologen Genen, ohne dass das für die Initiation der Translation notwendige ATG auf dem entsprechenden Gen vorhanden sein muss. Dies kann leicht erreicht werden durch Spaltung mit NcoI und Auffüllen der überhängenden Enden mit DNA-Polymerase I, wie beschrieben, oder durch Spalten mit KpnI und Entfernen der überhängenden Enden durch Nuklease S₁. Das Plasmid Hri148 ist somit ein breit anwendbares Expressionsplasmid.

D. Herstellung des linearisierten Vektors pHri148/EcoRI/BamHI

5 µg Plasmid-DNA von pHri148 werden mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI und BamHI, verdaut. Der herausgeschnittene Vektor pHri148/EcoRI/BamHI wird mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

b) Herstellung der F₁-DNA/EcoRI/EcoRII und der F₂-DNA/BamHI/EcoRIII. Herstellung der F₁-DNA/EcoRI/EcoRII

5 5 µg Plasmid DNA vom pML 300 werden zuerst mit 10 Einheiten EcoRI Restriktionsendonuclease in 50 µl einer Lösung von 100 mM Tris·HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl und 100 µg/ml Gelatine für 1 Stunde bei 37 °C verdaut. Ein Aliquot (0,5 µg) dieser linearisierten Plasmid DNA/EcoRI wird durch Gelelektrophorese aus einem Agarosegel isoliert (vgl. Beispiel 10a)) und mit [γ -³²P]ATP radioaktiv markiert (vgl. Beispiel 12). Die Hauptmenge der Plasmid DNA/EcoRI wird dann mit dieser radioaktiv markierten DNA vermischt, mit EcoRII
 10 Restriktionsendonuclease verdaut und das EcoRII-EcoRI* DNA Fragment (109 Basenpaare) durch Gelelektrophorese an 8 % Polyacrylamid getrennt. 200 µg der F₁-DNA/EcoRI*/EcoRII werden durch Gelelektrophorese isoliert.

II) Herstellung der F₂-DNA/BamHI/EcoRII

15 5 µg Plasmid DNA vom pML 305 werden mit 10 Einheiten BamHI Restriktionsendonuclease gespalten. Ein Aliquot (0,5 µg) dieser linearisierte Plasmid DNA/BamHI wird durch Gelelektrophorese aus einem Agarosegel isoliert (vgl. Beispiel 10a)) und mit [γ -³²P] radioaktiv markiert (vgl. Beispiel 12)). Die Hauptmenge der Plasmid DNA/BamHI wird dann mit dieser radioaktiv markierten DNA vermischt, mit EcoRII Restriktionsendonuclease verdaut und das EcoRII-BamHI* DNA Fragment (122 Basenpaare) durch Gelelektrophorese an 8
 20 % Polyacrylamid getrennt. 250 µg der F₂-DNA/BamHI*/EcoRII werden isoliert.

c) Ligation der F₁-DNA mit der F₂-DNA und Konstruktion des Expressions-Plasmids pML310

25 10 ng (= 473 nMol Enden) F₁-DNA/EcoRI*/EcoRII und 9 ng (= 495 nMol Enden) F₂-DNA/BamHI*/EcoRII werden in einem Volumen von 20 µl mit T₄-DNA Ligase, wie bereits unter Beispiel 10c) beschrieben, behandelt. Anschliessend wird die Mischung mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Alkohol präzipitiert. Der DNA-Niederschlag wird dann wie in Beispiel 10c) beschrieben gelöst und mit EcoRI- und BamHI-Restriktionsendonuclease verdaut. Die Lösung wird dann auf TNE eingestellt und 30 ng (= 50 nMol
 30 Enden) der Vektor-DNA pHR148/EcoRI/BamHI (vgl. Beispiel 13aD) zugegeben. Anschliessend wird die Lösung abermals mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Alkohol ausgefällt. Die präzipitierte DNA-Mischung wird, wie in Beispiel 10c) angegeben, mit T₄-DNA Ligase (Biolabs) behandelt. Auf diese Weise entsteht in der Lösung ein rekombiniertes Plasmid, welches die F₁-F₂-DNA (Desulfatohirudin-Gen) als Insert enthält.

35 d) Transformation von E. coli HB101 mit dem Plasmid pML 310

Die Transformation der mit Calcium behandelten E. coli HB101 Zellen erfolgt wie in Beispiel 10d) beschrieben. Es werden 10 µl des in Beispiel 13c) erhaltenen Reaktionsgemisches verwendet. 420 Ampicillin
 40 resistente Kolonien werden erhalten.

e) Screening der Kolonien, die F₁-F₂-DNA enthalten

18 transformierte Kolonien (Beispiel 13d) werden auf ihren F₁-F₂-DNA-Gehalt geprüft, wie in Beispiel
 45 10e) beschrieben. Als radioaktive Probe wird eine Mischung der in den Beispielen 5 und 6 beschriebenen Oligodeoxynucleotide verwendet. Im Autoradiogramm werden 12 positive Kolonien erhalten, fünf davon erhalten die Bezeichnung pML310, pML311, pML312, pML313, pML314.

Beispiel 14: Charakterisierung des Klon pML310

50 Die Charakterisierung der F₁-F₂-DNA-Sequenz in dem rekombinierten Plasmid pML310 erfolgt durch Sequenzierung der F₁-F₂-DNA nach Maxam und Gilbert (11), wie in Beispiel 12 beschrieben. 10 µg Plasmid-DNA werden geprüft. Die Nucleotidsequenz der F₁-F₂-DNA ist mit der für das synthetische Desulfatohirudin-Gen beschriebenen identisch.

55 Beispiel 15: Herstellung des Expressionsplasmids pML 315a. Ligation der F₁-DNA mit der F₂-DNA und Konstruktion des Expressionsplasmids pML315

24 μg (= 1,3 pMol Enden) bzw. 26 μg (= 1,3 pMol Enden) des chemisch synthetisierten F_1 - bzw. F_2 -DNA (siehe Beispiel 8 und Schema 1) werden in einem Volumen von 20 μl mit 5 Einheiten EcoRII Restriktionsendonuclease (Biolabs) in 50 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 100 $\mu\text{g/ml}$ Gelatine für 30 min. bei 37°C verdaut. Anschliessend wird die Mischung mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Alkohol präzipitiert. Der DNA-Niederschlag wird dann wie in Beispiel 10c) beschrieben gelöst und mit T_4 -DNA-Ligase drei Stunden bei 15°C behandelt. Danach wird die Mischung mit Phenol/Chloroform extrahiert und wie in Beispiel 10b) beschrieben gefällt. Der DNA-Niederschlag wird anschliessend gelöst (vgl. Beispiel 10c) und mit EcoRI- und BamHI-Restriktionsendonuclease für 30 min. bei 37°C verdaut. Danach werden der Lösung 70 ng (= 0,1 pMol Enden) des linearisierten Vektors pHRi148/EcoRI/BamHI (Beispiel 13aD) zugesetzt, die ganze Lösung auf TNE eingestellt und mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit 2 Volumen Alkohol ausgefällt.

Der erhaltene DNA Niederschlag, der die beiden DNA Bruchstücke (F_1 - F_2 -DNA/EcoRI/BamHI und pHRi148/EcoRI/BamHI) enthält, wird in 20 μl einer Lösung von 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 100 $\mu\text{g/ml}$ Gelatine gelöst und mit 15 Einheiten/ μl T_4 -DNA Ligase (Biolabs) bei 15°C für 3 Stunden behandelt. Auf diese Weise entsteht in der Lösung das rekombinierte Plasmid pML315, welches die F_1 - F_2 -DNA (= Desulfatohirudin-Gen) enthält.

b) Transformation von *E. coli* HB101 mit dem Plasmid pML315

10 μl des das Plasmid pML315 enthaltenden Gemisches (Beispiel 15a) werden für die Transformation der Calcium-behandelten *E. coli* HB101 Zellen verwendet. Ca. 236 Ampicillin-resistente Kolonien werden erhalten.

c) Screening der Kolonien, die F_1 - F_2 -DNA enthalten

Transformierte Kolonien (Beispiel 15b) werden auf das Vorhandensein von F_1 - F_2 -DNA geprüft, wie in Beispiel 13e) angegeben.

Es werden fünf positive Kolonien erhalten, welche die Bezeichnung pML315 - pML319 erhalten.

Beispiel 16: Herstellung des Expressionsplasmids pML320

a. Ligation der synthetischen F_1 - F_2 -DNA mit der Vektor-DNA pHRi148/EcoRI/BamHI

20 μg des total synthetisch hergestellten Desulfatohirudin-Gens (F_1 - F_2 -DNA, vgl. Beispiel 9) werden in 20 μl einer Lösung von 50 μl 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl und 100 $\mu\text{g/ml}$ Gelatine mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschliessend mit BamHI verdaut. Die Lösung wird auf TNE eingestellt, woraufhin 30 μg (= 50 nMol Enden) der Vektor-DNA pHRi148/EcoRI/BamHI (vgl. Beispiel 13aD) zugegeben wird. Die Lösung wird mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Alkohol ausgefällt. Der DNA-Niederschlag wird, wie in Beispiel 10c) angegeben, mit T_4 -DNA-Ligase (Biolabs) behandelt. Auf diese Weise entsteht in der Lösung ein rekombiniertes Plasmid (pML320), welches die F_1 - F_2 -DNA (Hirudin-Gen) als Insert enthält.

b. Transformation von *E. coli* HB101 mit dem Plasmid pML320

Die Transformation der mit Calcium behandelten *E. coli* HB101 Zellen erfolgt wie in Beispiel 10d) beschrieben. Es werden 10 μl des in Beispiel 16a) erhaltenen Reaktionsgemisches verwendet. 173 Ampicillin resistente Kolonien werden erhalten.

c. Screening der Kolonien, die F_1 - F_2 -DNA enthalten

11 transformierte Kolonien (Beispiel 16b) werden, wie in Beispiel 10e) beschrieben, auf ihren F_1 - F_2 -DNA-Gehalt geprüft. Als radioaktive Probe wird eine Mischung der in den Beispielen 5 und 6 beschriebenen Oligodesoxynucleotide verwendet. Im Autoradiogramm werden 14 positive Kolonien erhalten. Fünf davon erhalten die Bezeichnung pML320, pML321, pML322, pML323 und pML324.

Beispiel 17: Charakterisierung der Klone pML315 und pML320

Die Charakterisierung der F_1 - F_2 -Sequenzen in den Plasmiden pML315 und pML320 erfolgt durch

Sequenzierung der F₁-F₂-DNA nach Maxam und Gilbert (11), wie in Beispiel 12 beschrieben. Die Nucleotidsequenzen der DNA-Inserts beider Plasmide sind mit derjenigen des synthetischen Hirudin-Gens identisch.

5 Beispiel 18: Synthese von Polypeptiden mit Hirudin-Aktivität durch E. coli-Zellen, die Plasmide mit rekombinierten Hirudin-Genen enthalten

a. Synthese von Polypeptiden mit Hirudin-Aktivität

Jeder der 15 Klone, die das rekombinierte Desulfatohirudin-Gen enthalten, nämlich

10

E. coli HB101 pML 310, E. coli HB101 pML 311, E. coli HB101 pML 312,
E. coli HB101 pML 313, E. coli HB101 pML 314, E. coli HB101 pML 315,
 15 E. coli HB101 pML 316, E. coli HB101 pML 317, E. coli HB101 pML 318,
E. coli HB101 pML 319, E. coli HB101 pML 320, E. coli HB101 pML 321,
E. coli HB101 pML 322, E. coli HB101 pML 323, E. coli HB101 pML 324

20

wird auf die Bildung von Hirudin-Aktivität getestet.

Zu diesem Zweck werden die oben genannten Klone in 5 ml L-Medium über Nacht (16 Stunden) bei 37° C und 250 upm kultiviert. L-Medium ist wie folgt zusammengesetzt:

25

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	5 g
30 Ampicillin	0,1 g

30

1 ml dieser Uebernachtkultur wird am nächsten Tag in 25 ml M9-Medium übertragen. M9-Medium ist wie folgt zusammengesetzt:

35

Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	13,25 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
40 NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,015 g
45 MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25 g
Casamino-säuren	2,5 g
Vitamin B ₁	0,0099 g
Glucose	5,0 g
50 Ampicillin	0,1 g

Es wird bei 37° C und 250 upm solange kultiviert, bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte (OD₆₂₃) von ca. 0,9.-1,0 erreicht hat. Anschliessend erntet man die Zellen (5 ml der wachsenden Kultur) und resuspendiert die Bakterien in 0,5 ml einer Lösung von 50 mM Tris-HCl (pH 8) und 30 mM NaCl. Danach wird die Suspension auf 1 mg/ml Lysozym (Boehringer) eingestellt und 30 min. in Eis gestellt. Durch abwechselndes Einfrieren der Suspension in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37° C werden die

Bakterien zerstört. Dieser Vorgang wird 5 mal wiederholt, anschliessend wird die Mischung 30 min. bei 16000 upm bei 4°C zentrifugiert. Die Ueberstände werden auf Desulfatohirudin-Gehalt untersucht, indem man mit Antikörpern (vgl. Beispiel 18) versetzt, die Ueberstände im HPLC prüft oder die Hemmung von Thrombin (15) misst.

5

Folgende Resultate werden erhalten:

	Bakterienextrakt	Desulfatohirudin-Bildung
10	<u>E. coli</u> HB101 pML 310	+
	<u>E. coli</u> HB101 pML 311	+
15	<u>E. coli</u> HB101 pML 312	+
	<u>E. coli</u> HB101 pML 313	+
	<u>E. coli</u> HB101 pML 314	+
20	<u>E. coli</u> HB101 pML 315	+
	<u>E. coli</u> HB101 pML 316	+
	<u>E. coli</u> HB101 pML 317	+
	<u>E. coli</u> HB101 pML 318	+
25	<u>E. coli</u> HB101 pML 319	+
	<u>E. coli</u> HB101 pML 320	+
	<u>E. coli</u> HB101 pML 321	+
30	<u>E. coli</u> HB101 pML 322	+
	<u>E. coli</u> HB101 pML 323	+
	<u>E. coli</u> HB101 pML 324	+
35	<u>E. coli</u> HB101 pHR1 148 (Kontrolle)	-
	<u>E. coli</u> HB101 pBR322 (Kontrolle)	-
	<u>E. coli</u> HB101 (Kontrolle)	-
40		

Beispiel 19 : Nachweis der Hirudin-Aktivität

Ca. 5-10 µl einer Probe, welche Polypeptide mit Hirudin-Aktivität enthält (vgl. Beispiel 18), werden auf 1 cm² Nitrocellulosepapier (NZ) (BIORAD) aufgetropft und 30 min. bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wird das NZ für 1 Stunde bei 37°C in einer Lösung von 3 % Serumalbumin in 0,01 M Tris-HCl (pH 8) und 0,9 % NaCl inkubiert.

Anschliessend wird das NZ in einer Lösung von 0,01 M Tris-HCl (pH 8) und 0,9 % NaCl für 30 min. gewaschen. Dabei wird die Lösung 5 mal gewechselt. Danach wird das gewaschene NZ für 2 Stunden bei 25°C in einer Lösung von 3 % Serumalbumin in 0,01 M Tris-HCl (pH 8) und 0,9 % NaCl, die 2 µg/ml Antikörper (aus Kaninchen hergestellte, oder monoklonale Antikörper) gegen Hirudin enthält, behandelt. Danach wird das NZ, wie oben beschrieben gewaschen.

Anschliessend wird das NZ für 2-3 Stunden bei 25°C mit einer Lösung von 3 % Serumalbumin in 0,01 M Tris-HCl (pH 8) und 0,9 % NaCl, die 0,2 µCi/ml ¹²⁵I-Protein A (sp. Aktivität 89,8 µCi/mg) (NEN) enthält, behandelt. Danach wird abermals das NZ, wie oben beschrieben, gewaschen, getrocknet und in einem γ-Zähler (Multi Gamma, 1260 gamma counter, LKB, Wallace) die gebundene Radioaktivität bestimmt, welche ein Mass für das auf dem NZ vorhandene Polypeptid mit Hirudin-Aktivität ist.

In einem alternativen Verfahren wird obige Probe einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

unterworfen [vgl. (24)]. Das PAGE-Elektropherogramm wird durch Elektro-Blotting auf NZ übertragen. Danach wird die NZ wie oben beschrieben behandelt und/oder über Nacht zusammen mit einem Röntgenfilm (Fuji) autoradiographiert. Stellen auf dem NZ, welche Polypeptide mit Hirudin-Aktivität enthalten, erscheinen auf dem Film als schwarze Flecken.

5

Beispiel 20: Isolierung und Reinigung von Desulfatohirudin mit Hilfe einer Thrombin-Säule

a. Herstellung der Polypeptidlösung für die Thrombin-Säule.

10 150 ml Kulturbrühe (erhalten gemäss Beispiel 18) werden auf 4°C abgekühlt und die Zellen durch Zentrifugation (5000 upm, 15 min., Sorvall RC 3B) abgetrennt. Der klare Ueberstand enthält keine Hirudin-Aktivität.

15 Anschliessend werden die Zellen in 12 ml Lyse Puffer (50 mM Tris·HCl pH 8, 30 mM NaCl) suspendiert. Dieser Mischung werden 15 mg Lysozym (Boehringer) zugesetzt und diese dann 30 min. bei 4°C aufbewahrt. Anschliessend werden die Zellen durch 4 maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschliessendem Auftauen bei 37°C zerstört. Danach wird 30 min. bei 16000 upm 4°C zentrifugiert. Der Ueberstand enthält die Hirudin-Aktivität. In dem Ueberstand (15 ml) werden dann 7,7 g festes Ammoniumsulfat aufgelöst. Die trübe Mischung wird bei 4°C für 30 min. stehengelassen und dann zentrifugiert (s. oben). Das nasse Sediment wird in 1 ml 0,05 mM Tris·HCl pH 8 Puffer gelöst und man erhält die
20 gewünschte Polypeptidlösung.

b. Reinigung von Hirudin auf einer Thrombin-Säule.

Die Thrombin-Säule (Bettvolumen 4 ml) ist mit 0,05 M Tris-HCl pH 8 äquilibriert. 5 ml-Portionen der
25 oben erhaltenen Polypeptid-Lösung werden bei 4°C auf die Säule mit einer Fliessgeschwindigkeit von 7 ml/Stunde aufgetragen. Gewaschen wird dann mit 25 ml 0,05 M Tris·HCl (pH 8). Die ersten Fraktionen enthalten die nicht adsorbierten Polypeptide, welche verworfen werden. Anschliessend wird die Säule mit 10 ml 1,5 M Benzamidin (Merck) [vgl. (25)] in 0,05 M Tris·HCl (pH 8) gewaschen und die erhaltenen Fraktionen auf Hirudin-Aktivität mit dem Thrombin-Test (15) geprüft. Die Fraktionen, welche die Polypeptide
30 enthalten, werden durch Messung der OD_{280nm} bestimmt. Fraktionen 25 und 26 enthalten die Hirudin-Aktivität; sie werden bei -20°C aufbewahrt oder bis zur Weiterverarbeitung im Eisbad. Die Hirudin-Aktivität beträgt in Fraktion 25 20 µg/ml und in Fraktion 26 52 µg/ml. Danach werden die Fraktionen dialysiert oder über Sephadex-G25 (Pharmacia) entsalzt. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (24) des Produktes ergibt ein Molekulargewicht von ca. 7000-8000 Dalton und ganzzahlige Vielfache davon (Oligomere).

35

c. Herstellung der Thrombin-Säule

Affi-Gel 10 (Bio Rad) wird nach Angaben des Herstellers mit kaltem destilliertem Wasser und Kupplungspuffer pH 8,5 (0,1 M NaHCO₃/Na₂CO₃-Lösung) gewaschen. Eine 50 %ige Suspension der Gels
40 in Kupplungspuffer (4 ml) wird in ein Plastikrohr übertragen, mit der gleichen Menge Thrombinlösung (120 mg in 4 ml Kupplungspuffer) (Calbiochem) vermischt und über Nacht bei 4°C rotiert. Danach wird das Gel mit Kupplungspuffer gewaschen. Zur Blockierung der noch freien aktiven Stellen wird das Gel mit 0,1 ml 1 M Aethanolamin-HCl (pH 8,0) pro Gel während 3 Stunden bei 4°C behandelt dann mit phosphatgepufferter Salzlösung, enthaltend 10 mM Natriumazid pro ml Gel gewaschen und darin bei 4°C gehalten. Der
45 Kupplungsgrad wird durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt und beträgt 15 bis 30 mg Hirudin pro ml Gel.

4 ml des entstandenen Thrombin-Gels werden verwendet, um die Affinitätssäule herzustellen.

Beispiel 21: Transformation verschiedener E. coli-Stämme mit dem Plasmid pML310 und Kultivierung der transformierten Wirtszellen

50

In analoger Weise, wie in Beispiel 10d) beschrieben, werden die Stämme E. coli JA221, E. coli LM1035 und E. coli W3110Δ102 mit dem Plasmid pML310 transformiert. Transformierte Kolonien werden auf das Vorhandensein von F₁-F₂-DNA geprüft, wie in Beispiel 10e) beschrieben. Es werden 5, 3 bzw. 5 positive
55 Kolonien erhalten, die die folgenden Bezeichnungen erhalten:

	<u>E. coli</u> JA221/pML310/1
	<u>E. coli</u> JA221/pML310/2
5	<u>E. coli</u> JA221/pML310/3
	<u>E. coli</u> JA221/pML310/4
	<u>E. coli</u> JA221/pML310/5
10	<u>E. coli</u> LM 1035/pML310/1
	<u>E. coli</u> LM 1035/pML310/2
	<u>E. coli</u> LM 1035/pML310/3
15	<u>E. coli</u> W3110Δ102/pML310/1
	<u>E. coli</u> W3110Δ102/pML310/2
	<u>E. coli</u> W3110Δ102/pML310/3
	<u>E. coli</u> W3110Δ102/pML310/4
20	<u>E. coli</u> W3110Δ102/pML310/5

Die genannten Klone werden in einem modifizierten M9-Medium kultiviert, welches die folgende Zusammensetzung aufweist:

25	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9,0	g
	KH_2PO_4	3,0	g
30	NaCl	0,5	g
	NH_4Cl	3,5	g
35	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,015	g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	g
	Casamino-säuren	7,0	g
40	Hefeextrakt	5,0	g
	Vitamin B ₁	0,0099	g
	Eisen-III-citrat	0,006	g
45	MOPS (3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure)	34,0	g
	Glucose	20,0	g
50	Ampicillin	0,1	g

Es wird bei 37°C und 180 upm solange kultiviert, bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte (OD₆₂₃) von ca. 1 erreicht hat. Anschliessend erntet man die Zellen (5 ml der wachsenden Kultur) und resuspendiert die Bakterien in 0,5 ml einer Lösung von 50 mM Tris-HCl (pH 8) und 30 mM NaCl. Danach wird die Suspension auf 1 mg/ml Lysozym (Boehringer) eingestellt und 30 min. in Eis gestellt. Durch abwechselndes Einfrieren der Suspension in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C werden die Bakterien zerstört. Dieser Vorgang wird 5 mal wiederholt. Anschliessend wird die Mischung 30 min. bei

16000 upm bei 4 °C zentrifugiert.

Alle Klone werden auf die Bildung von Polypeptiden mit Hirudin-Aktivität untersucht, in dem die Hemmung von Thrombin (15) gemessen wird. In allen Bakterienextrakten wird Hirudin-Aktivität (300-600 ng/ml Kulturlösung) festgestellt. Beispielsweise werden folgende Hirudin-Aktivitäten bestimmt:

5

Stamm	Hirudin-Aktivität (µg/l Kulturlösung)
<u>E. coli</u> LM1035/pML310/1	300
<u>E. coli</u> JA 221/pML310/1	500
<u>E. coli</u> W3110Δ102/pML310/1	600

10

15

Beispiel 22: Fermentation des transformierten Stammes E. coli W3110Δ102/pML310/1 im 5000 l Fermenter und Aufarbeitung der Kulturbrühe

20

In analoger Weise, wie in Beispiel 21 beschrieben, werden in einem 5000 l Fermenter E. coli W3110Δ102/pML310/1-Zellen in 3000 l modifiziertem M9-Medium kultiviert, bis die Suspension eine optische Dichte (OD₆₂₃) von ca. 10-13 erreicht hat.

25

Die Kulturbrühe (pH 7,4) wird auf 10 °C abgekühlt, und die Zellen werden mit einer Alfa-Laval BRPX-207 Entschlammvorrichtung behandelt. Der klare Ueberstand enthält keine Hirudin-Aktivität und wird verworfen. Während der Entschlammung wird der Schlammraum fortwährend mit Lysepuffer A (50 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl, eingestellt mit HCl auf pH 8,0) teilentschlamm und am Schluss der Inhalt der Zentrifugenschale (7 l) unter voller Entschlammung mit Lysepuffer A ausgestossen. Die erhaltene Zellmasse wird mit Puffer A auf 375 l eingestellt und besitzt einen pH-Wert von 7,6. Nach dem Kühlen auf 5-10 °C wird die Suspension durch eine Dyno-Mühle (Typ KD5) geleitet, welche mit 4,2 l Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,5-0,75 mm ausgerüstet ist. Dabei werden die Zellen zerstört. Die so erhaltene Suspension wird mit Essigsäure auf einen Essigsäuregehalt um 2 % (v/v) eingestellt und über Nacht bei 10 °C gerührt. Die Suspension mit einem pH von 3,9 wird mit der oben beschriebenen Technik entschlamm. Der klare Ueberstand von 300 l wird in einem Fallfilmverdampfer (Stundenleistung 60 l Wasser) auf 35 l aufkonzentriert. Das leicht trübe Konzentrat wird zentrifugiert und der so erhaltene klare Ueberstand auf einer Ultrafiltrationsanlage DDS = Lab 35, welche mit GR 81 PP Membrane bestückt ist (Fläche 2,5 m²), gegen 2 % Essigsäure oder 0.02 M Tris-HCl pH 7.5 Puffer diafiltriert. Das Endvolumen beträgt 31 l.

30

35

Ein aliquoter Teil von 2 l dieser klaren Proteinlösung wird auf eine Sephadex G-50 F-Säule (KS 370 Pharmacia) mit einem Bettvolumen von 96 l aufgetragen, wobei die Säule mit 2 % Essigsäure äquilibriert ist. Die in 15 l Eluat enthaltene Hauptfraktion wird mittels Ultrafiltration eingeeengt und anschliessend gegen Wasser diafiltriert. Die so erhaltene klare wässrige Lösung wird lyophilisiert. Die Aufarbeitung kann, wie in den folgenden Beispielen beschrieben, durchgeführt werden.

40

Beispiel 23: Kultivierung des Stammes E. coli W3110Δ102/pML310/1 im Labormassstab

45

Der Stamm E. coli W3110Δ102/pML310/1 wird bei 37 °C und 200 upm 24 Stunden in Schüttelkolben inkubiert. Das Medium weist folgende Zusammensetzung auf (g/l):

50

55

	Na₂HPO₄ · 7H₂O	9,0 g
	KH₂PO₄	3,0
5	NaCl	0,5
	CaCl₂	0,015
	MgSO₄ · 7H₂O	0,25
10	Eisen(III)-citrat	0,006
	MOPS	40
	NH₄Cl	3,5
15	Casamino Säuren	7,0
	Hefeextrakt	5,0
	Cerelose (Glucose)	20
20	Ampicillin	0,1

Das Medium hat einen pH-Wert von 6,54. Während der Kultivierung wird eine optische Dichte (OD_{605nm}) von 14,9 erreicht.

Die Zellen (50 ml der wachsenden Kultur) werden geerntet und in 5 ml einer Lösung von 50 mM Tris · HCl (pH 8.0) und 30 mM NaCl resuspendiert. Danach wird die Suspension mit 5 g gekühlten Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm), oder durch Zugabe von Lysozym (Boehringer), Endkonzentration 1 mg/ml, während 30 bis 45 Minuten in Intervallen auf einem Multi-Tube Vortexer bei hoher Intensität geschüttelt. Zu 0,5 ml der Mischung werden 0,5 ml 2 % Essigsäure zugegeben und die Mischung wird 20 min bei 4 ° C und 12'000 upm zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird auf Hirudin-Aktivität (Hemmung von Thrombin) geprüft. Der Thrombin-Hemmtest wird wie folgt durchgeführt:

Der Test beruht auf der Bestimmung der enzymatischen Abspaltung von p-Nitroanilin aus dem Substrat Chromozym TH (Tosyl-glycyl-prolylarginin-4-nitroanilid-acetat). Das gebildete p-Nitroanilin wird kolorimetrisch bei 405 nm gemessen (Micro-Elisa Auto Reader von Dynatech, Kloten). Der Test wird in Mikrotiterplatten mit flachem Boden (Costar, Seroccluster, Catalog Nr. 3590) durchgeführt. Die Reaktionszeit beträgt 2 h bei 37 ° C im Brutschrank. Für den Test werden 20 µl der zu bestimmten Lösung mit 30 µl Füllpuffer (0,2 M Tris · HCl pH 7,5, 1 M NaCl, 100 µg/ml Rinderserumalbumin) verdünnt und mit 20 µl Enzym-Lösung [10 mg lyophilisiertes Thrombin aus Humanplasma (Boehringer) in 1 ml bidestilliertem Wasser gelöst und ca. 1:400 mit obigem Füllpuffer verdünnt] und mit 150 µl Substrat-Lösung [20 ng Chromozym TH (Boehringer) in 4 ml bidestilliertem Wasser gelöst und 1:15 mit obigem Füllpuffer verdünnt] versetzt. Alle Lösungen werden gegen eine Blank-Lösung, bestehend aus 70 µl Füllpuffer (s.o.) und 150 µl Substrat-Lösung und gegen eine Enzym-Kontrollösung, bestehend aus 50 µl Füllpuffer, 20 µl Enzym-Lösung und 150 µl Substrat-Lösung gemessen. Der OD_{405nm}-Wert der Enzym-Kontrollösung nach 2 h bei 37 ° C ergibt 100 % Aktivität und sollte ca. 0,8 ± 0,2 betragen. Die Thrombin-Hemmung (in %) der Proben errechnet sich nach der Formel %-Thrombin-Hemmung =

$$100 - \frac{100 \times \text{OD}_{405\text{nm}} \text{ der Probe}}{\text{OD}_{405\text{nm}} \text{ der Enzym-Kontrollösung}}$$

Die überstehende Lösung weist eine Thrombin-Hemmung von 49,7 %/20 µl auf.

Beispiel 24: Reinigungsverfahren zur Anreicherung von Hirudin-Verbindungen aus Kulturbrühen

In analoger Weise wie in Beispiel 22 beschrieben, wird der Stamm E. coli W3110Δ102/pML310/1 im Fermenter kultiviert. Dann werden die Zellen aufgeschlossen, abzentrifugiert und der aufkonzentrierte Ueberstand nach Essigsäurebehandlung ultrafiltriert oder dialysiert. Solcherart gewonnene Lösungen kön-

nen beispielsweise mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigt werden.

a) Anionenaustauschchromatographie über eine MONO Q Säule (Pharmacia) zur Gewinnung von Thrombin hemmenden Fraktionen)

5

8,5 ml Proteinlösung (20 mM Tris • HCl pH 7,5/150 mM NaCl) werden auf die Mono Q Säule mittels eines Chromatographiesystems der Fa. Pharmacia ("fast protein liquid chromatography" FPLC) aufgetragen und bei folgenden Bedingungen eluiert.

10 Experimentelle Bedingungen:

Säule: Mono Q, 4,6mm x 150 mm. Puffer A: 20 mM Tris • HCl pH 7,5; Puffer B: 20 mM Tris • HCl/1 M NaCl. Linearer Salzgradient: A: während 9 ml mit 15 % Puffer B eluieren, während 10,7 ml auf 70 % Puffer B steigern. AUFS 1.0 bei 280 nm, 1 ml Fraktionen.

15 Im Ausschlussvolumen (Fraktionen 1-10) wird ein grosser Proteingipfel von den nachfolgend eluierenden Hirudin-Verbindungen abgetrennt. Die Fraktionen 17-23 zeigen im Thrombin-Test eine Thrombin-Hemmung zwischen 20 und 100 %, wobei die Hauptfraktion (Fraktionen 20 und 21) mit 92 % Hemmung, bei einer Konzentration von ca. 500 mM NaCl eluiert.

20 b) Anionenaustauschchromatographie an einer DEAE Cellulose-Säule zur Anreicherung von Hirudin Verbindungen.

10 ml eines Dialysats wird der Anionenaustauschchromatographie an DE 53 (Fa. Whatman) bei pH 7,5 unterworfen (Chromatographiebedingungen: Säule 1 x 5 cm (10 ml). Elutionspuffer A: 20 mM Ammoniumacetat, 100 mM NaCl, pH 7,5. Elutionspuffer B: 20 mM Ammoniumacetat 1 M NaCl, pH 4,0. Linearer Salzgradient je 4 Säulenvolumen Puffer A, resp. B). Hirudin-Verbindungen eluieren ab 0,4 M NaCl. Der Nachweis gelingt mit dem Thrombin-Hemmtest.

30 c) Entsalzung an P-6 DG "Desalting Gel" (Fa. Bio-Rad)

110 ml Dialysat (20 mM Tris • HCl, pH 7,5, konzentrierte Proteinlösung aus 2,6 l Ueberstand) wurden in analoger Weise wie in Beispiel 24b beschrieben an DE 53 getrennt. Hirudin-Verbindungen eluieren zwischen Fraktionen 46 und 52 (150 ml), getrennt von verschiedenen, rascher eluierenden nicht-aktiven Proteingipfel, und werden am Rotationsverdampfer auf ca. 12 ml konzentriert. Die so erhaltene, klare Proteinlösung wird auf eine Biogel P-6 DG Säule aufgetragen und wässrig eluiert.

Experimentelle Bedingungen:

40 Säule 2,5 x 9 cm, stationäre Phase 45 ml Biogel P-6 DG Desalting Gel, Durchflussgeschwindigkeit 1,15 ml/min, 4,6 ml Fraktionen. Der Salzgehalt kann durch Leitfähigkeitmessung oder Testierung mittels Silbernitrat (AgCl-Fällung) überprüft werden. Die Hauptaktivität eluiert zwischen den Fraktionen 7 bis 10, wobei der Nachweis mittels dem Thrombin Hemmtest gelingt. Die Fraktionen 8-10 (13,5 ml) werden vereinigt, am Rotationsverdampfer auf 1 ml aufkonzentriert und die klare Lösung auf eine Sephadex G 50 fine-Säule (Pharmacia) mit einem Bettvolumen von 160 ml aufgetragen, wobei die Säule mit 1 % Essigsäure 45 äquilibriert ist.

d) Gelfiltration an Sephadex G50 fine (Fa. Pharmacia)

Experimentelle Bedingungen: Säule: Sephadex G50 fine (31 g), 2,5 cm x 64 cm, Volumen 310 ml; 50 Lösungsmittel: 1 % Essigsäure; Durchflussgeschwindigkeit 43 ml/h, 3,8 ml Fraktionsgrösse. AUFS: 0,1 bei 282 nm. Papiervorschub 3,0 cm/h. Der Nachweis der eluierten Aktivität erfolgt mit dem Thrombin-Hemmtest. Die in 50 ml Eluat (Fraktionen 39-52) enthaltene Hauptfraktion eluiert rascher als nicht-aktive Nebenkompenten. (Fraktionen 53 bis 80). Die Thrombin-Hemmung der aktiven Fraktionen beträgt zwischen 80 und 100 % Hemmung.

55

e) Kationenaustauschchromatographie an einer CM-Cellulose zur Voranreicherung von aktiven Lysaten

10 ml Dialysat [20 mM Tris • HCl, Konzentrat (1:20) aus 200 ml Ueberstand, pH 2,0 eingestellt mit 3 ml

4N HCl] wurden auf einem Kationentauscher (CM-Cellulose) getrennt. Hirudinverbindungen eluieren im Ausschlussvolumen zwischen Fraktionen 4-8. Der Nachweis erfolgt mittels des Thrombin-Hemmtests. Die Fraktionen 5 und 6 hemmen zu 89 %, respektive 88 % pro 20 µl Eluat.

6 Experimentelle Bedingungen:

Säule: 1,5 x 8 cm, stationäre Phase: 19 ml CM-Cellulose (Ios MZ-3146). Durchflussgeschwindigkeit: 43 ml/h, 3,8 ml Fraktionen. Linearer Salzgradient Puffer A: 20 mM NH₄OAc, pH 2 eingestellt mit 4N HCl, Puffer B: 200 mM NH₄OAc pH 6,5, je 5 Säulenvolumen, AUFS 1,0 bei 282nm.

10

Beispiel 25: Fermentation des transformierten Stammes E. coli W3110Δ102/pML310/1 und Aufarbeitung der Kulturbrühe

In analoger Weise wie in Beispiel 22 beschrieben, werden in einem Fermenter E. coli W3110Δ102/pML310/1 Zellen in 8 l Medium L während 5 h kultiviert, wobei die Suspension eine optische Dichte (OD₆₂₃) von ca. 5 erreicht hat.

Die aus der Kulturbrühe (pH 7,2) abzentrifugierten Zellen werden auf 10 °C abgekühlt, durch Lysozymbehandlung und durch mehrmaliges (4x) abwechselndes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen auf ca. 30 °C aufgeschlossen. Die so erhaltene Suspension (2,5 l) wird mit 1,5 % Essigsäure (2,4 l) verdünnt und 30 min. bei 4 °C gerührt. Die ausgefallenen bakteriellen Proteine und andere Zellbestandteile werden für 30 min. bei 4 °C bei 9000 Upm abzentrifugiert. Der klare Ueberstand von 3,2 l wird in einem Rotationsverdampfer (Fa. Büchi) auf 320 ml aufkonzentriert. Das Konzentrat wird über Nacht gegen 20 mM Tris · HCl pH 7,5 bei 4 °C dialysiert und das leicht trübe Dialysat nochmals zentrifugiert. Das Endvolumen beträgt 300 ml. Die klare Proteinlösung (0,02 M Tris · HCl pH 7,0) wird auf eine Diäthylaminoäthylcellulose (DE53 der Fa. Whatman) (20 g) Säule mit einem Bettvolumen von 20 ml aufgetragen, wobei die Säule mit Puffer A äquilibriert ist (Puffer A: 20 mM Ammoniumacetat/100 mM NaCl, pH 7,5). Vorerst wird mit 1 Säulenvolumen (45 ml) bei konstantem Fluss (43 ml/h) gewaschen und anschliessend mit einem linearen Salzgradienten mit je fünf Säulenvolumen Puffer A, respektive Puffer B eluiert (Puffer B: 20 mM Ammoniumacetat/4 M NaCl, pH 5,0). Die in 100 ml Eluat enthaltene, im Thrombin-Hemmtest aktive Hauptfraktion (Fr. 24-26) wird über Nacht bei 4 °C gegen 20 mM Tris · HCl pH 7,5 dialysiert und anschliessend am Rotationsverdampfer bei 35 °C auf 5 ml Endvolumen aufkonzentriert.

Die so erhaltene klare wässrige Lösung wird auf eine Sephadex G-50 fine Säule (Pharmacia) mit einem Bettvolumen von 160 ml aufgetragen, wobei die Säule (2,5 x 64 cm Biorad) mit 5 % Essigsäure äquilibriert ist. Die in 50 ml Eluat (Fraktionen 5-7, Fluss 50 ml/h, 25 min./Fraktion) enthaltene Hauptaktivität wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und anschliessend einer "Reverse Phase" HPLC-Trennung unterworfen. Ein Aliquot (500 µl) der einzelnen Fraktionen wird am "speed vac" Konzentrator (Fa. Savant) 1:10 konzentriert und mittels der "Reversed Phase"-HPLC-Analyse auf ihren Gehalt an Desulfatohirudin-Verbindungen untersucht. Die Lösungen enthalten Desulfatohirudin-Verbindungen. Fraktion 6 (18 ml) enthält prozentual den geringsten Anteil an Nebenkomponten und wird mittels semipräparativer "Reversed Phase"-HPLC weiter gereinigt.

Experimentelle Bedingungen:

Vydac 218 TP 510 RP-HPLC-Säule, 10 x 250 mm; Aliquote Anteile der Fraktion 6 (200 µl 1:10 konzentriert) pro Trennung; AUFS 0,5 bei 220 nm; Durchflussgeschwindigkeit: 2 ml/min. Eluent: A: 0,1 % Trifluoressigsäure, B: Acetonitril/Wasser 8:2 + 0,07 % Trifluoressigsäure, 1 min 16 % B, dann während 40 min auf 64 % B steigen. Die so erhaltenen Fraktionen werden 1:1 mit Wasser verdünnt und lyophilisiert. Der Rückstand besteht aus reinen Desulfatohirudin-Verbindungen.

Beispiel 26: Analyse des Produktgemisches aus der Fermentation von E. coli W3110Δ102/pML310/1

Die gemäss Beispiel 25 erhaltenen, im Thrombin-Hemmtest aktiven Fraktionen werden einer HPLC-Analyse unter zwei verschiedenen Bedingungen unterworfen.

55 a) Experimentelle Bedingungen Nr. 1:

Nucleosil (MN) C18, 5 µm RP-HPLC Säule, 4,6 x 120 mm; 50 µl Hirudin-Verbindungen pro Trennung, Att. 6 bei 214 nm; Durchflussgeschwindigkeit 1,2 ml/min; Eluent: A: 0,1 % Trifluoressigsäure, B:

Acetonitril/Wasser 8:2 mit 0.07 % Trifluoressigsäure, 2 min 16 % B, dann während 30 min. auf 64 % B steigern. Gegendruck: 107 bar.

In einminütigem Abstand werden Fraktionen genommen (insgesamt 30), die dem Thrombin-Hemmtest und dem Antikörpertest (vgl. Beispiel 19) unterworfen werden. Fraktionen 12-15 erweisen sich als aktiv. Ausserdem werden die Aminosäurezusammensetzung, der N-Terminus und der C-Terminus für die aktive Hirudin-Verbindung der Fraktion 14 bestimmt. Diese Fraktion (Nr. 14) wird zudem mit Desulfatohirudin verglichen, welches analog wie in Beispiel 28 beschrieben durch Umsetzung von natürlichem Hirudin aus Blutegel mit dem Enzym Arylsulfatase erhalten wird. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefasst:

Tabelle 1:

Fraktion	Retentionszeit (min)	Thrombin-Hemmung (%)	Antikörper Test Δ (cpm)
Fr 12	11,75	+ 35	+
Fr 13	12,50	++	+
Fr 14	12,80	++ 79	+ 13850
Fr 15	13,14	+ 27	+ 12440
Kontrolle	-	- 9	- 250
Desulfato-Hirudin	12.8	++ 86	+

Fraktionen des Kontrollstammes *E. coli* W3110 Δ 102 ("Kontrolle") sind weder im Thrombin-Hemmtest noch im Antikörpertest aktiv. Solche Fraktionen werden erhalten durch Kultivierung des nicht-transformierten Stammes *E. coli* W3110 Δ 102 unter den gleichen Bedingungen, wie in Beispiel 22 beschrieben, und durch Aufarbeitung der Kulturbühe gemäss Beispiel 25.

b.) Experimentelle Bedingungen Nr. 2:

RP-HPLC Säule, Vydac 218 TP 5415 4,6 x 150 mm; 100 μ l (1:10 Konz.) Fraktion 6 (vgl. Beispiel 25) pro Trennung; AUFS 0,1 bei 214 nm; Durchflussgeschwindigkeit 1,2 ml/min; Eluent: A: 0,1 % Trifluoressigsäure, B: Acetonitril/Wasser 8:2 + 0.07 % Trifluoressigsäure. Gradient: 2 min 16 % B, dann während 3 min. auf 20 % B steigern, dann während 15 min auf 25 % B steigern, dann während 27 min. auf 64 % B steigern. Gegendruck 160 bar.

In der folgenden Tabelle 2 sind die im Thrombin-Hemmtest und im Antikörpertest aktiven Fraktionen aufgelistet. Die Tabelle enthält weiterhin die Konzentrationen an NaCl in mM, die zur Eluierung der Fraktionen von einer Mono Q-Säule (Anionenaustauschchromatographie) erforderlich sind (vgl. Beispiel 24a), sowie die langwelligsten UV-Absorptionsbanden einiger Fraktionen. Alle Fraktionen zeigen zudem eine positive Reaktion mit anti-Hirudin-Antikörpern (vgl. Beispiel 30).

Tabelle 2

Fraktion Nr.	Retentionszeit (min.) RP-HPLC	Thrombin-Hemmung %	Antikörper Test Δ /cpm	FPLC	UV($\lambda_{\max}$) mM NaCl	Ausbeute μ g
1	15,63	97,8 $\pm$ 2	16'196	350	223 _B , 274	4
2	16,83	91,9 $\pm$ 2	14'157	390	275	1.6
3	18,43	79,9 $\pm$ 2	9'257			1
4	19,6	81,7 $\pm$ 5	11'877	420		1.5
5	20,6	50,4 $\pm$ 5	7'647	460		1.5
6	21,53	66,1 $\pm$ 5	9'584	500	273	1.5
Kontrolle	-	0	508		---	-
PBS-Puffer	-	-	66			-
Desulfato-Hirudin	15,45	97,3 $\pm$ 2	15'400	350	274	ca. 4

Beispiel 27: Charakterisierung von Desulfatohirudin-Verbindungen aus der Fermentation des Stammes E. coli W3110 Δ 102/pML310/1

I. Die Hirudin Verbindung aus Fraktion 14 (vgl. Beispiel 26 unter "Experimentelle Bedingungen Nr. 1", Tabelle 1) oder Fraktion 1 (vgl. Beispiel 26 "Experimentelle Bedingungen Nr. 2", Tabelle 2) wird wie folgt charakterisiert:

a) Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

Ca. 2,5 μ g Hirudin-Verbindung werden mit 6 N HCl bei 110° C während 24 h hydrolysiert und dann nach Chang et al. (DABS-Cl-Methode) (Zitat 31) analysiert. Das Hydrolysat weist die folgende Zusammensetzung auf.

	Aminosäure	Hydrolysat		Aminosäure	Hydrolysat	
5	Asp	9,8	(9)	Ile	1,8	(2)
	Thr	4,2	(4)	Leu	3,9	(4)
	Ser	4,4	(4)	Tyr	1,5	(2)
10	Glu	12,6	(13)	Phe	1	(1)
	Pro	3,7	(3)	His	1,1	(1)
	Gly	9,3	(9)	Lys	3,4	(3)
	Val	3,5	(4)	Met	0	(0)
15	Cystin	2,2	(3)	Total		(65)

20 b) Partielle Sequenzanalyse

5 µg (750 pMol) der Hirudin-Verbindung wird einer klassischen Sequenzanalyse nach Edman unterworfen und die N-terminalen Phenylthiohydantoin (PTH)-amino-säuren mittels RP-HPLC bestimmt.

25 Ergebnis:

	Cyclus	1			5					10	
30	Aminosäure	Val	Val	Tyr	Thr	Asp	n.b.	Thr	Glu	Ser	Gly
	Cyclus	11				15					
	Aminosäure	Gln	Asn	Leu	n.b.	Leu	n.b.	Glu			
35		(n.b. nicht bestimmt).									

40 Die N-terminale Sequenz der untersuchten biosynthetischen Hirudin-Verbindung ist somit identisch mit derjenigen des natürlichen Hirudins (Zitat 1).

c) Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren mittels Carboxypeptidase Y-Abbau

45 Der zeitabhängige Abbau der C-terminalen Aminosäuren mit Carboxypeptidase Y ergibt als C-Terminus

	60	65
50	- Ile - Pro - Glu - Glu - Tyr - Leu - Gln	

Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mit dem Aminosäureanalysator. Es ergibt sich, dass Tyr⁶³ nicht sulfatiert ist (Desulfato-hirudin!).

55 Bei dem Hauptprodukt der Fermentation des transformierten Stammes *E. coli* W3110Δ102/pML310/1 handelt es sich, wie die Strukturdaten und der Vergleich mit aus natürlichem Hirudin gewonnenen Desulfatohirudin beweisen, um Desulfatohirudin.

II. Die Struktur der übrigen Fermentationsprodukte ist noch nicht vollständig geklärt. Bei den Fraktionen

2-6 (vgl. Tabelle 2) handelt es sich um definierte Verbindungen, die anhand der HPLC- und FPLC-Daten sowie des UV-Absorptionsmaximums ausreichend definiert sind. Mit Sicherheit handelt es sich bei diesen Verbindungen um Desulfatohirudin-ähnliche Verbindungen, die sich von Desulfatohirudin durch eine strukturelle Mikroheterogenität (z.B. unterschiedliche verknüpfte S-S-Brücken) oder durch Modifikation am N- bzw. C-Terminus unterscheiden (z.B. N-terminaler Methionyl-Rest oder N-terminal acyliert, wie formyliert oder acetyliert).

Auch bei der Fermentation der Stämme *E. coli* LM1035/pML310/1, *E. coli* JA221/pML 310/1 und *E. coli* HB101/pML310 kann Desulfatohirudin als Hauptprodukt identifiziert werden.

10 Beispiel 28: Herstellung von Desulfatohirudin aus natürlichem Hirudin zu Vergleichszwecken

Natürliches Hirudin wird zu 2 mg/ml Puffer (0,1 M Ammoniumacetat, pH 5,5) gelöst. Zu 20 µg Hirudin (10 µl Lösung) werden 100 µl einer entsalzten Arylsulfatase (Boehringer)-Lösung gegeben, die 16 µg Arylsulfatase enthält. Man inkubiert bei 25 °C und verfolgt die Umsetzung mittels HPLC-Analyse. Nach 6 Stunden Inkubation sind über 90 % des Hirudins desulfatiert. Die Retentionszeit des gebildeten Desulfatohirudins beträgt unter den in Beispiel 26 ("Experimentelle Bedingungen a") beschriebenen Bedingungen 12,8 min. und unter den in Beispiel 26 ("Experimentelle Bedingungen b") beschriebenen Bedingungen 15,45 min.

Die Aminosäurezusammensetzung, die Sequenzanalyse mittels Edman-Abbau und die Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren durch Carboxypeptidase Y-Abbau ergeben das für Desulfatohirudin erwartete Ergebnis.

Beispiel 29: Expression von Desulfatohirudin-Verbindungen in Hefe (*S. cerevisiae*)

Die Expression von Fremdproteinen in Hefe erfordert ein definiertes Expressionssystem. Es soll einen starken Hefe-Promoter, bevorzugt einen induzierbaren Hefe-Promoter, und geeignete Transkriptionsstoppsignale auf einem Plasmidvektor enthalten, mit dem Hefezellen transformiert werden können. Der Vektor enthält auch DNA-Sequenzen, bevorzugt Hefe 2µ Sequenzen, die extrachromosomale Replikation mit hoher Kopienzahl gewährleisten. Er soll ausserdem einen Selektionsmarker für Hefe, bevorzugt das Hefe LEU2 Gen, und pBR322 DNA Sequenzen mit Replikationsursprung und Selektionsmarker, bevorzugt das Ampicillin-Resistenzgen, für die Verwendung in *E. coli* enthalten. Solche Vektoren sind als sog. Shuttle-Vektoren für die Vermehrung in *E. coli* und Hefe geeignet.

Ein Expressionssystem, das diese Voraussetzungen erfüllt, ist in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 100,561 beschrieben und mit Beispielen für effiziente Expression in Hefe belegt. Fremdgene werden unter der Kontrolle des induzierbaren PHO5 Promoters der sauren Phosphatase aus Hefe exprimiert. PHO5 Promoter, Fremdgen und PHO5 Transkriptionsstop sind in Serie in dem Hefe Vektor pJDB207 integriert, der auch DNA Sequenzen des Hefe 2µ Plasmids, das Hefe LEU2 Gen, das Ampicillin Resistenzgen und den *E. coli* Replikationsursprung enthält.

Das Expressionsplasmid pJDB207R/PHO5-HIR wird wie folgt hergestellt:

40

a) Isolierung des pJDB207 Vektor Fragments:

6 µg des Plasmids pJDB207R/IF(α-3) (EP 100,561) werden mit der Restriktionsendonuclease BamHI komplett verdaut. Die entstehenden DNA Fragmente (6,85 kb und 1,15 kb) werden mit Äthanol gefällt und in 400 µl 50 mM Tris·HCl pH 8,0 aufgenommen. 4,5 Einheiten Kälberdarm-Phosphatase (Boehringer, Mannheim) werden zugegeben. Die Mischung wird 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, danach wird die Phosphatase bei 65 °C für 1,5 Stunden inaktiviert. Die Lösung wird auf 150 mM NaCl gebracht und dann auf eine DE52 (Whatman) Anionenaustauschersäule (100 µl Volumen) aufgetragen, die vorher mit 10 mM Tris·HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA äquilibriert wurde. Nach einem Waschgang mit demselben Puffer wird die DNA mit 400 µl 1,5 M NaCl, 10 mM Tris·HCl pH 7,5, 1 mM EDTA eluiert und mit Äthanol gefällt. Das grosse 6,85 kb BamHI Fragment wird vom kleinen Fragment auf einem 1,2 %igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA Puffer pH 8,3 abgetrennt.

55

b) Isolierung des 534 bp PHO5 Promoter Fragments

6 µg des Plasmids p31/R (EP 100,561) werden mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI und BamHI verdaut. Die entstehenden 3 DNA Fragmente werden auf einem 1,2 %igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA Puffer pH 8,3 getrennt. Das 534 bp BamHI-EcoRI Fragment wird isoliert. Es enthält den PHO5 Promoter

einschliesslich der Transkriptionsstartstellen.

c) Isolierung eines 206 bp DNA Fragments mit der für Hirudin kodierenden Sequenz

- 5 9 µg des Plasmids pML310 (vgl. Beispiel 13c) werden mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI komplett verdaut. Die entstehenden zwei DNA Fragmente werden auf einem 1,2 %igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA Puffer pH 8,3 getrennt. Das 206 bp EcoRI-BamHI Fragment wird isoliert.

d) Ligierung der DNA Fragmente:

10

Die drei in Abschnitt a-c (s.o.) erwähnten DNA Fragmente werden aus Agarosegelblöcken durch Elektroelution gewonnen, über DE52 (Whatman) Anionen-Austauscher gereinigt, mit Aethanol gefällt und in H₂O resuspendiert.

- 15 0,1 pMol (0,45 µg) des 6,85 kb BamHI Vektor Fragmente, 0,3 pMol (0,1 µg) des 534 bp BamHI-EcoRI PHO5 Promoter Fragments und 0,25 pMol (34 ng) des 206 bp EcoRI-BamHI Fragments von pML310 werden in 15 µl 60 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP mit 600 Einheiten T4 DNA Ligase (Biolabs) bei 15 °C für 16 Stunden ligiert.

- 20 24 transformierte, amp^R Kolonien werden getrennt in LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Plasmid DNA wird nach der Methode von Holmes et al. (32) isoliert und durch einen HindIII/EcoRI Doppelverdau analysiert. Das Auftreten eines ca. 600 bp grossen EcoRI-HindIII Fragments zeigt an, dass bei dem betreffenden Klon das PHO5 Promoter-Hirudin DNA Fragment in der richtigen Orientierung zu den Transkriptionsstoppsignalen auf dem Vektor vorliegt. Wie erwartet haben etwa 50 % der Klone die richtige Orientierung des Inserts. Einer dieser Klone wird als pJDB207R/PHO5-HIR bezeichnet.

25 e) Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* GRF18:

- Saccharomyces cerevisiae* Stamm GRF18 (α, his3-11, his3-15, leu2-3, leu2-112, can^R) wird mit dem Plasmid pJDB207R/PHO5-HIR nach dem Protokoll von Hinnen et al. (12) transformiert. Für transformierte Hefezellen wird auf Agarplatten mit Hefe-Minimalmedium ohne Leucin selektioniert. Eine transformierte Hefekolonie wird isoliert und als *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207R/PHO5-HIR bezeichnet.

f) Züchten von *S. cerevisiae* GRF18/pJDB207R/PHO5-HIR:

- 35 Zellen von *S. cerevisiae* GRF18/pJDB207R/PHO5-HIR werden in 20 ml Hefe-Minimalmedium (Difco Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren mit Zusatz von 2 % Glukose und 20 mg/l L-Histidin) bei 30 °C geschüttelt und bis zu einer Zelldichte von 3·10⁷ Zellen/ml gezüchtet. Die Zellen werden in 0,9 % NaCl gewaschen und dann zum Animpfen von 50 ml Kulturen in low P_r-Minimalmedium benutzt. Low P_r-Minimalmedium wird entsprechend der Zusammensetzung des Difco Yeast Nitrogen Base Mediums (ohne Aminosäuren) angesetzt, enthält jedoch 0,03 g/l KH₂PO₄, 1 g/l KCl, 10 g/l L-Asparagin anstelle von (NH₄)-₂SO₄, 2 % Glukose und 1 g/l L-Histidin. Die Kulturen werden bis zu einer Zelldichte von 4·10⁶ Zellen/ml angeimpft und bei 30 °C für 24 Stunden bei 200 upm geschüttelt.

g. Analyse des Produktgemisches aus der Fermentation von *S. cerevisiae* GRF18/pJDB207R/PHO5-HIR

- 45 Die Zellen (vgl. Beispiel 29f) werden wie üblich aufgeschlossen (vgl. z.B. Europäische Patentanmeldung Nr. 100,561). Der mit 1,5 % Essigsäure behandelte Ueberstand wird zentrifugiert und je 2 ml der klaren Lösung am "Speed Vac" Konzentrator und im Hochvakuum getrocknet. Die Proben werden einzeln in 100 µl Wasser gelöst und einer HPLC-Analyse (Bedingungen wie in Beispiel 26a) unterworfen. Die Thrombin-Hemmung der einzelnen Fraktionen wird getestet. Die Fraktion mit einer Retentionszeit von 12,8 min weist eine Thrombin-Hemmung von 89,6 % auf. Gemäss Aminosäurezusammensetzung handelt es sich um Desulfatohirudin.

Beispiel 30: Test-Kit mit monoklonalen anti-Hirudin-Antikörpern zur Bestimmung von Hirudin, kompetitiver Radio-Immunoassay

55

a. Herstellung der monoklonalen Anti-Hirudin-Antikörper

A) Immunisierung von Mäusen

Reines Hirudin (3 mg) in lyophilisierter Form wird in wenig 0,1 % Essigsäure gelöst und dann mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung auf 3 ml ergänzt. Der pH wird auf 7,2 eingestellt. Portionen dieser Antigen-Lösung werden mit gleichen Mengen komplettem Freund's Adjuvans oder phosphatgepufferter Salzlösung gemischt.

- 5 Weibliche Balb/c Mäuse (8 Wochen alt, erhalten von der Tierfarm Sisseln, Schweiz) werden durch Injektion von 100 µg Hirudin-Lösung in gepufferter Salzlösung intravenös injiziert. Vier Tage später wird die Milz für die Fusion entnommen.

B) Herstellung der Hybridoma und Antikörper-Test

10

Die Herstellung der Hybridomazellen erfolgt durch Verschmelzung der erhaltenen Milzzellen mit der Myeloma-Zelllinie X63-Ag8.6.5.3 (26). Dabei werden 10^8 Milzzellen und 10^7 Myelomazellen eingesetzt. Die Fusion wird wie beschrieben (27) durchgeführt.

- 15 Die Bestimmung der anti-Hirudin-Aktivität in den Hybridoma-Ueberständen erfolgt mit Hilfe eines Radioimmunoassays [RIA, (28)].

c) Isolierung und Reinigung der Anti-Hirudin-Antikörper aus Aszites

- 20 Balb/c Mäuse werden intraperitoneal mit 0,4 ml Pristan (Carl Roth) vorbehandelt. Nach einer Woche werden 2 bis 5×10^6 klonierte Hybridoma-Zellen intraperitoneal injiziert. Aszitische Flüssigkeit wird von jeder Maus wiederholt genommen und bei -80°C gefroren. Die gesammelte Flüssigkeit wird aufgetaut und 30 min. bei 4°C mit 16 000 upm zentrifugiert. Das Fett wird abgesaugt und zum verbleibenden Debrl-freien Ueberstand langsam unter Rühren bei 0°C 0,9 Volumenäquivalente einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugetropft. Die erhaltene rohe Immunoglobulin-Fraktion wird unter Verwendung von 0,1 m Tris-HCl
- 25 (pH 8,2) durch Sephacryl G 2000 (Pharmacia), gemäss den Angaben des Herstellers, gegeben. Aktive Fraktionen werden vereinigt und mit Amicon XM50-Filter (Amicon) konzentriert.

b. Test-Kit für kompetitiven Radio-Immunoassay

- 30 Eine nach Beispiel 30aC) hergestellte Lösung von anti-Hirudin-Antikörpern wird mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Lösung) auf eine Konzentration von 1 µg pro 100 µl verdünnt. 100 µl dieser Lösung werden 2 Stunden bei 37°C in Plastik-Röhrchen oder auf Plastik-Mikrotiterplatten inkubiert, wobei Antikörper unspezifisch auf die Plastikoberfläche adsorbiert werden. Zur Absättigung der noch freien aktiven Stellen auf der Plastikoberfläche wird mit einer Bovinserum-Albumin-Lösung (BSA-Lösung) nachbehandelt.

- 35 Verdünnungsreihen einer Probelösung oder der Standardlösung in BSA-Lösung werden mit je 50 µl einer Lösung von nach bekannter Weise (29) mit radioaktivem ^{125}I markiertem Hirudin der Aktivität 10 000 cpm pro 50 µl versetzt und dann auf der Plastikoberfläche 2 Stunden bei 37°C und anschliessend 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Röhrchen oder Mikrotiterplatten werden mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und die Radioaktivität gemessen. Die Konzentration an Hirudin in der Probelösung wird durch
- 40 eine mit Standardlösung gemessene Eichkurve bestimmt.

Ein Test-Kit für den beschriebenen Radio-Immunoassay enthält:

- | | |
|-----------|---|
| 2 ml | Lösung von anti-Hirudin-Antikörper aus Beispiel 30aC) mit einer Konzentration von 1 bis 10 mg pro ml, |
| 100 ml | phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Lösung) |
| 45 100 ml | 0,3 % Bovinserum-Albumin und 0,1% Natriumazid in PBS-Lösung (BSA-Lösung), |
| 2 ml | Lösung von radioaktivem Hirudin der Aktivität 200 000 cpm/ml, |
| 2 ml | Standardlösung enthaltend 100 ng/ml Hirudin, |
| 1 ml | -Röhrchen oder Mikrotiterplatten aus Plastik. |

50 Beispiel 31: Pharmazeutisches Präparat enthaltend eine Desulfatohirudinverbindung für parenterale Applikation

- Eine Lösung, welche eine Desulfatohirudin-Verbindung gemäss Beispiel 27 enthält, wird gegen eine 0,9 %ige NaCl-Lösung dialysiert. Die Konzentration der Lösung wird danach durch Verdünnen mit der gleichen
- 55 NaCl-Lösung auf 0,2 mg/ml oder 2 mg/ml eingestellt. Diese Lösungen werden durch Ultrafiltration (Membranen mit $0,22\text{ }\mu\text{m}$ Poren) sterilisiert.

Die sterilisierten Lösungen sind direkt verwendbar, z.B. für die intravenöse Verabreichung. In analoger Weise werden parenteral applizierbare Lösungen hergestellt, die Mischungen von Desulfatohirudin-Verbin-

dungen gemäss Beispiel 27 enthalten.

Referenzen

1. J. Dodt et al., FEBS Letters 165, 180 (1984)
2. P. Walsmann et al., Pharmazie 36, 653 (1981)
3. S.A. Narang, Tetrahedron 39, 3 (1983)
4. K.L. Agarwal et al., Angew. Chem. 84, 489 (1972)
5. C.B. Reese, Tetrahedron 34, 3143 (1972)
6. R.L. Letsinger and W.B. Lunsford, J. Am. Chem. Soc. 98, 3655 (1976)
7. K. Itakura et al., J. Am. Chem. Soc. 103, 706 (1981)
8. H.G. Khorana et al., J. Biol. Chem. 251, 565 (1976)
9. S.A. Narang et al., Anal. Biochem. 121, 356 (1982)
10. K. Itakura et al., J. Biol. Chem. 257, 9226 (1982)
11. A.M. Maxam und W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560 (1977); siehe auch Meth. Enzym. 65, 499 (1980)
12. A. Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978)
13. Anagnostopoulos et al., J. Bacteriol. 81, 741 (1961)
14. M. Mandel et al., J. Mol. Biol. 53, 159 (1970)
15. H.U. Bergmeyer (Hrsgb.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. II, 3. Auflage, S. 314-316, Verlag Chemie, Weinheim 1983.
16. F. Markwardt et al., Thromb. Haemostasis 47, 226 (1982)
17. Köhler und Milstein, Nature 256, 495 (1975)
18. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (ed. T. Maniatis et al.), Cold Spring Harbor Lab., 1982, S. 125
19. W. Müller et al., J. Mol. Biol. 124, 343 (1978)
20. M. Grunstein und D.S. Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961 (1979)
21. Ish-Horowitz, in loc. cit. 18), S. 358
22. DE-OS 3 111 405 (Genentech)
23. A.C. Peacock et al., Biochemistry 6, 1818 (1967)
24. U.K. Laemmli, Nature 227, 680 (1970)
25. P. Walsmann, Pharmazie 36, 860 (1981)
26. J.F. Kearney et al., J. Immunol. 123, 1548 (1979)
27. S. Alkan et al., Mol. Immunol. 20, 203 (1983)
28. T. Chard, An Introduction to Radioimmunoassay and related Techniques, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1978
29. A.E. Bolton und W.M. Hunter, Biochem. J. 133, 529 (1973)
30. J. Clarke und J. Carbon, J. Mol. Biol. 120, 517 (1978)
31. J.Y. Chang et al., Methods in Enzymology, 91, 41 (1983)
32. D.S. Holmes et al., Anal. Biochem. 114, 193 (1981)

Ansprüche

1. Ein Expressionsvektor, welcher eine für Desulfatohirudin der Formel

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

kodierende DNA-Sequenz enthält, die von einer Expressionskontrollsequenz derart reguliert wird, dass besagtes Desulfatohirudin in einem mit diesem Expressionsvektor transformierten Mikroorganismus exprimiert wird.

2. Ein Expressionsvektor gemäss Anspruch 1, worin die Expressionskontrollsequenz diejenige des E. coli Tryptophanoperons ist.

3. Ein Expressionsvektor gemäss Anspruch 1, worin die Expressionskontrollsequenz diejenige des Hefe-PHO5-Gens ist.

5 4. Verfahren zur Herstellung eines Expressionsvektors gemäss einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man in eine Vektor-DNA, welche eine Expressionskontrollsequenz enthält, eine für Desulfatohirudin der Formel

10 ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

15 kodierende DNA-Sequenz derart einfügt, dass die Expressionskontrollsequenz besagte DNA-Sequenz reguliert.

5. Ein Mikroorganismus, der mit einem Expressionsvektor gemäss einem der Ansprüche 1 bis 3 transformiert ist.

20 6. Ein transformierter Mikroorganismus gemäss Anspruch 5, ausgewählt aus einem Stamm von Escherichia coli, Bacillus subtilis oder Saccharomyces cerevisiae.

7. Ein transformierter Escherichia coli-Stamm gemäss Anspruch 5.

25 8. Ein transformierter Saccharomyces cerevisiae-Stamm gemäss Anspruch 5.

9. Verfahren zur Herstellung eines transformierten Mikroorganismus gemäss einem der Ansprüche 5-8, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Mikroorganismus mit einem Expressionsvektor gemäss einem der Ansprüche 1-3 transformiert.

30

10. Verfahren zur Herstellung von biologisch aktivem Desulfatohirudin der Formel

35 ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

40

(I .)

45 und Salzen davon, dadurch gekennzeichnet, dass mit einem Expressionsvektor, welcher eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für besagte Hirudin-Verbindung kodierende DNA-Sequenz enthält, transformierte Mikroorganismen in einem flüssigen Nährmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, kultiviert werden und besagtes Desulfatohirudin aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird.

50 11. Verfahren gemäss Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man ein erhaltenes freies Desulfatohirudin in ein Salz desselben oder ein erhaltenes Desulfatohirudin-Salz in die freie Verbindung überführt.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat: AT

55 1. Verfahren zur Herstellung eines Expressionsvektors, welcher eine für Desulfatohirudin der Formel

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
 GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
 ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

5

10 kodierende DNA-Sequenz enthält, die von einer Expressionskontrollsequenz derart reguliert wird, dass besagtes Desulfatohirudin in einem mit diesem Expressionsvektor transformierten Mikroorganismus exprimiert wird, dadurch gekennzeichnet, dass man in eine Vektor-DNA, welche eine Expressionskontrollsequenz enthält, eine für besagtes Desulfatohirudin kodierende DNA-Sequenz derart einfügt, dass die Expressionskontrollsequenz besagte DNA-Sequenz reguliert.

- 15 2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionskontrollsequenz diejenige des E. coli Tryptophanoperons ist.
3. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionskontrollsequenz diejenige des Hefe-PHO5-Gens ist.
- 20 4. Verfahren zur Herstellung eines transformierten Mikroorganismus, der einen gemäss einem der Ansprüche 1-3 herstellbaren Expressionsvektor enthält, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Mikroorganismus mit einem Expressionsvektor, der eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für Desulfatohirudin der Formel

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
 GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
 ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

25

30 kodierende DNA-Sequenz enthält, transformiert.

5. Verfahren gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus ein Stamm von Escherichia coli, Bacillus subtilis oder Saccharomyces cerevisiae ist.
- 35 6. Verfahren gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus ein Escherichia coli-Stamm ist.
7. Verfahren gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus ein Saccharomyces cerevisiae-Stamm ist.
- 40 8. Verfahren zur Herstellung von biologisch aktivem Desulfatohirudin der Formel

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
 GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
 ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

45

(I),

50

55 und Salzen davon, dadurch gekennzeichnet, dass mit einem Expressionsvektor, welcher eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für besagte Hirudin-Verbindung kodierende DNA-Sequenz enthält, transformierte Mikroorganismen in einem flüssigen Nährmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, kultiviert werden und besagtes Desulfatohirudin aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird.

9. Verfahren gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man ein erhaltenes freies Desulfatohirudin in ein Salz desselben oder ein erhaltenes Desulfatohirudin-Salz in die freie Verbindung überführt.

Claims

5

1. An expression vector that contains a DNA sequence coding for desulphatohirudin of the formula

10

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln ,

15

which sequence is regulated by an expression control sequence in such a manner that the said desulphatohirudin is expressed in a microorganism transformed with that expression vector.

20

2. An expression vector according to claim 1, in which the expression control sequence is that of the E. coli tryptophan operon.
3. An expression vector according to claim 1, in which the expression control sequence is that of the yeast-PHO5 gene.
4. A process for the manufacture of an expression vector according to any one of claims 1 to 3, characterised in that a DNA sequence coding for desulphatohirudin of the formula

25

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

30

is inserted in such a manner into a vector DNA that contains an expression control sequence that the expression control sequence regulates the said DNA sequence.

35

5. A microorganism that is transformed with an expression vector according to any one of claims 1 to 3.
6. A transformed microorganism according to claim 5, wherein the microorganism is selected from a strain of Escherichia coli, Bacillus subtilis or Saccharomyces cerevisiae.
7. A transformed Escherichia coli strain according to claim 5.
8. A transformed Saccharomyces cerevisiae strain according to claim 5.
9. A process for the manufacture of a transformed microorganism according to any one of claims 5-8, characterised in that a microorganism is transformed with an expression vector according to any one of claims 1-3.
10. A process for the manufacture of biologically active desulfatohirudin of the formula

50

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

55

(I)

and salts thereof, characterised in that microorganisms transformed with an expression vector that contains a DNA sequence coding for the said hirudin compound and regulated by an expression control sequence are cultivated in a liquid nutrient medium that contains assimilable carbon and nitrogen sources, and the said desulphatohirudin is freed from the host cells and isolated.

- 5 11. A process according to claim 10, characterised in that a free desulphatohirudin obtained is converted into a salt thereof or a desulphatohirudin salt obtained is converted into the free compound.

Claims for the following Contracting State: AT

- 10 1. A process for the manufacture of an expression vector that contains a DNA sequence coding for desulphatohirudin of the formula

15 ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln,

20 which sequence is regulated by an expression control sequence in such a manner that the said desulphatohirudin is expressed in a microorganism transformed with that expression vector, characterised in that a DNA sequence coding for the said desulphatohirudin is inserted in such a manner into a vector DNA that contains an expression control sequence that the expression control sequence regulates the said DNA sequence.

- 25 2. A process according to claim 1, characterised in that the expression control sequence is that of the E. coli tryptophan operon.
- 30 3. A process according to claim 1, characterised in that the expression control sequence is that of the yeast-PHO5 gene.
- 35 4. A process for the manufacture of a transformed microorganism that contains an expression vector that can be manufactured according to any one of claims 1-3, characterised in that a microorganism is transformed with an expression vector that contains a DNA sequence coding for desulphatohirudin of the formula

40 ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

and regulated by an expression control sequence.

- 45 5. A process according to claim 4, characterised in that the microorganism is a strain of Escherichia coli, Bacillus subtilis or Saccharomyces cerevisiae.
6. A process according to claim 4, characterised in that the microorganism is an Escherichia coli strain.
- 50 7. A process according to claim 4, characterised in that the microorganism is a Saccharomyces cerevisiae strain.
8. A process for the manufacture of biologically active desulphatohirudin of the formula

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
 GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
 ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

5

(I)

and salts thereof, characterised in that microorganisms transformed with an expression vector that contains a DNA sequence coding for the said hirudin compound and regulated by an expression control
 10 sequence are cultivated in a liquid nutrient medium that contains assimilable carbon and nitrogen sources, and the said desulphatohirudin is freed from the host cells and isolated.

9. A process according to claim 8, characterised in that a free desulphatohirudin obtained is converted into a salt thereof or a desulphatohirudin salt obtained is converted into the free compound.

15

Revendications

1. Vecteur d'expression qui contient une séquence d'ADN codant pour la désulfatohirudine de formule

20

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
 GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
 ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

25

qui est régulée par une séquence de commande d'expression de manière que la désulfatohirudine en question soit exprimée dans un microorganisme transformé avec ce vecteur d'expression.

2. Vecteur d'expression selon la revendication 1, dans lequel la séquence de commande d'expression est celle de l'opéron Tryptophane d' E. coli.

30

3. Vecteur d'expression selon la revendication 1, dans lequel la séquence de commande d'expression est celle du gène PHO5 de levure.

- 35 4. Procédé de préparation d'un vecteur d'expression selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on introduit dans un ADN vecteur qui contient une séquence de commande d'expression une séquence d'ADN codant pour la désulfatohirudine de formule

40

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
 GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
 ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

45

de manière que la séquence de commande d'expression régule ladite séquence d'ADN.

5. Microorganisme qui est transformé avec un vecteur d'expression selon l'une des revendications 1 à 3.

- 50 6. Microorganisme transformé selon la revendication 5, choisi dans une souche d' Escherichia coli, Bacillus subtilis ou Saccharomyces cerevisiae.

7. Souche d' Escherichia coli transformée selon la revendication 5.

- 55 8. Souche de Saccharomyces cerevisiae transformée selon la revendication 5.

9. Procédé de préparation d'un microorganisme transformé selon l'une des revendication 5-8, caractérisé en ce qu'on transforme un microorganisme avec un vecteur d'expression selon l'une des revendica-

tions 1-3.

10. Procédé de préparation de désulfatohirudine biologiquement active de formule

5 ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln
10 (I)

15 et de ses sels, caractérisé en ce qu'on cultive des microorganismes transformés avec un vecteur d'expression qui contient une séquence d'ADN régulée par une séquence de commande d'expression, codant pour le composé d'hirudine mentionné, dans un milieu nutritif liquide qui contient des sources de carbone et d'azote assimilables, et en ce qu'on libère et isole la désulfatohirudine mentionnée à partir des cellules-hôtes.

20 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'on transforme une désulfatohirudine libre obtenue en un de ses sels ou un sel de désulfatohirudine obtenu en le composé libre.

Revendications pour l'Etat contractant suivant: AT

25 1. Procédé de préparation d'un vecteur d'expression qui contient une séquence d'ADN codant pour la désulfatohirudine de formule

30 ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

35 qui est régulée par une séquence de commande d'expression de manière que la désulfatohirudine mentionnée soit exprimée dans un microorganisme transformé avec ce vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'on introduit dans un ADN de vecteur qui contient une séquence de commande d'expression une séquence d'ADN codant pour la désulfatohirudine en question de manière que la séquence de commande d'expression, ladite séquence d'ADN.

40 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence de commande d'expression est celle de l'opéron Tryptophane d' E. coli.

45 3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence de commande d'expression est celle du gène PHO5 de levure.

50 4. Procédé de préparation d'un microorganisme transformé qui contient un vecteur d'expression que l'on peut préparer selon l'une des revendications 1-3, caractérisé en ce qu'on transforme un microorganisme avec un vecteur d'expression qui contient une séquence d'ADN régulée par une séquence de commande d'expression, codant pour la désulfatohirudine de formule

55 ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le microorganisme est une souche d'Escherichia coli, Bacillus subtilis ou Saccharomyces cerevisiae.
6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le microorganisme est une souche d'Escherichia coli.
7. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le microorganisme est une souche de Saccharomyces cerevisiae.
8. Procédé de préparation de désulfatohirudine biologiquement active de formule

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
 GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
 ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

(I)

et de ses sels, caractérisé en ce qu'on cultive des microorganismes transformés avec un vecteur d'expression, qui contient une séquence d'ADN régulée par une séquence de commande d'expression, codant pour le composé d'hirudine mentionné, dans un milieu nutritif liquide qui contient des sources de carbone et d'azote assimilables et en ce qu'on libère et isole la désulfatohirudine en question à partir des cellules-hôtes.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'on transforme une désulfatohirudine libre obtenue en un de ses sels, ou un sel de désulfatohirudine obtenu en le composé libre.

Fig. 1 KONSTRUKTION DES PLASMIDS pML300

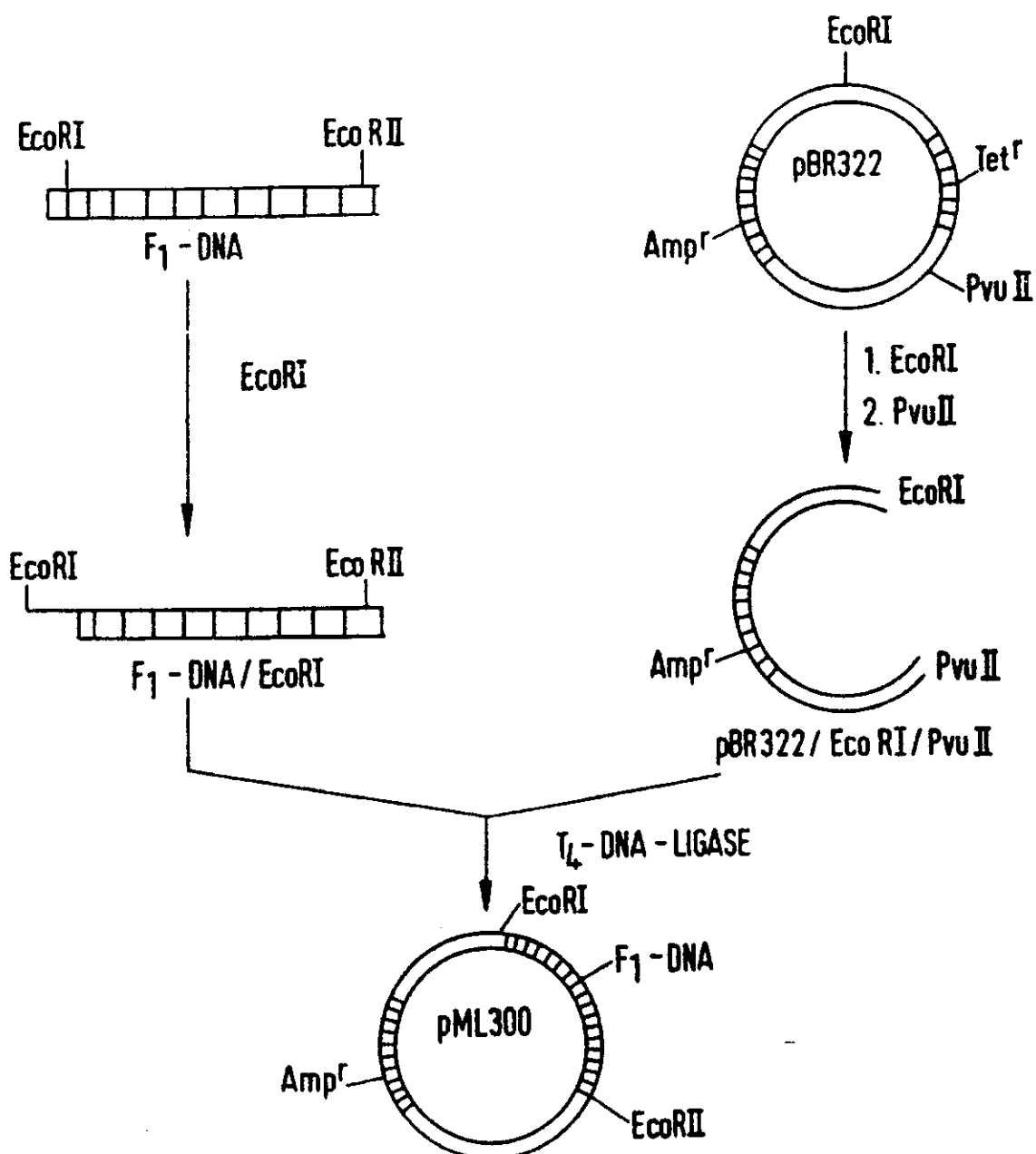


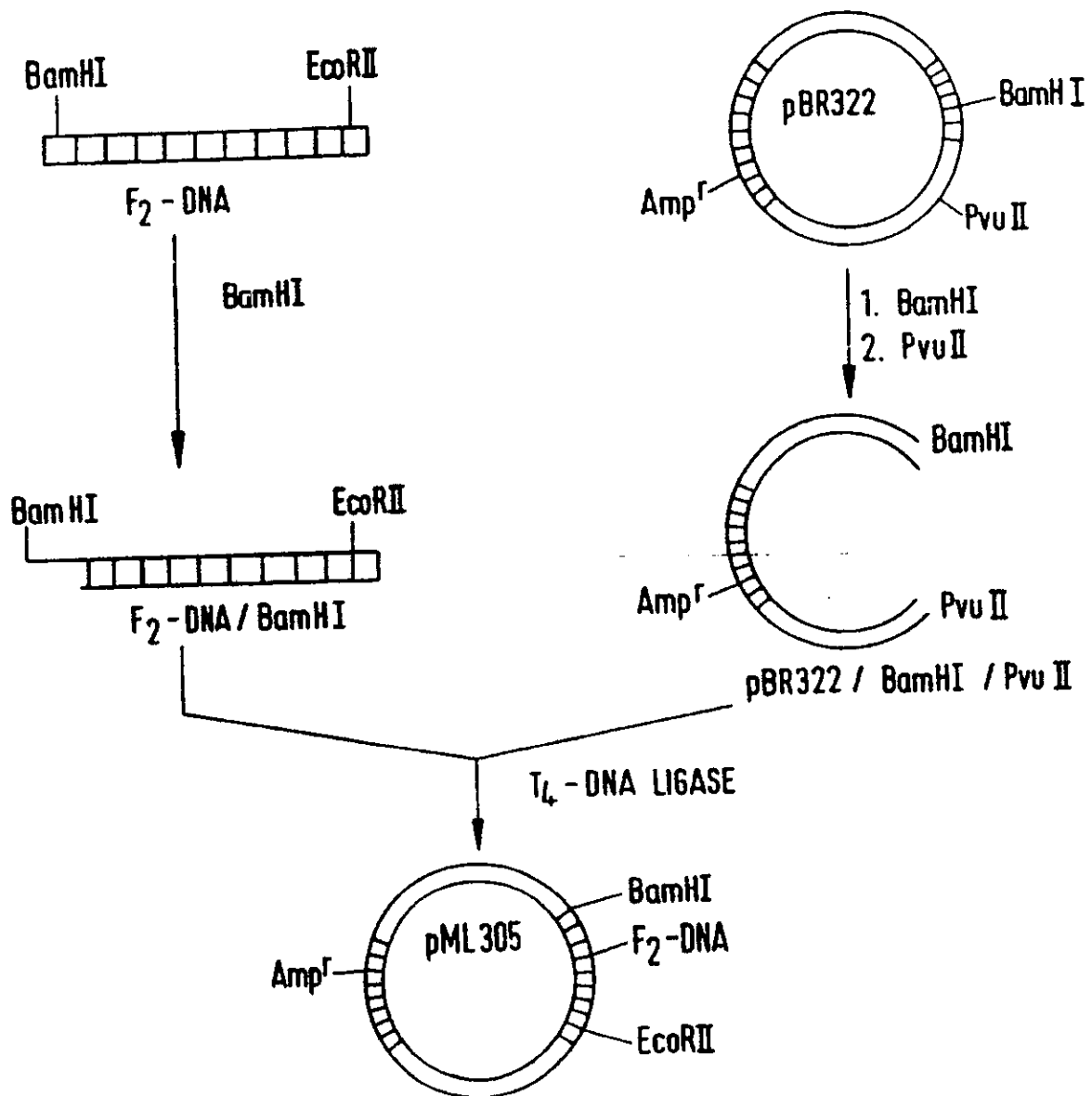
Fig. 2 KONSTRUKTION DES PLASMIDS pML305

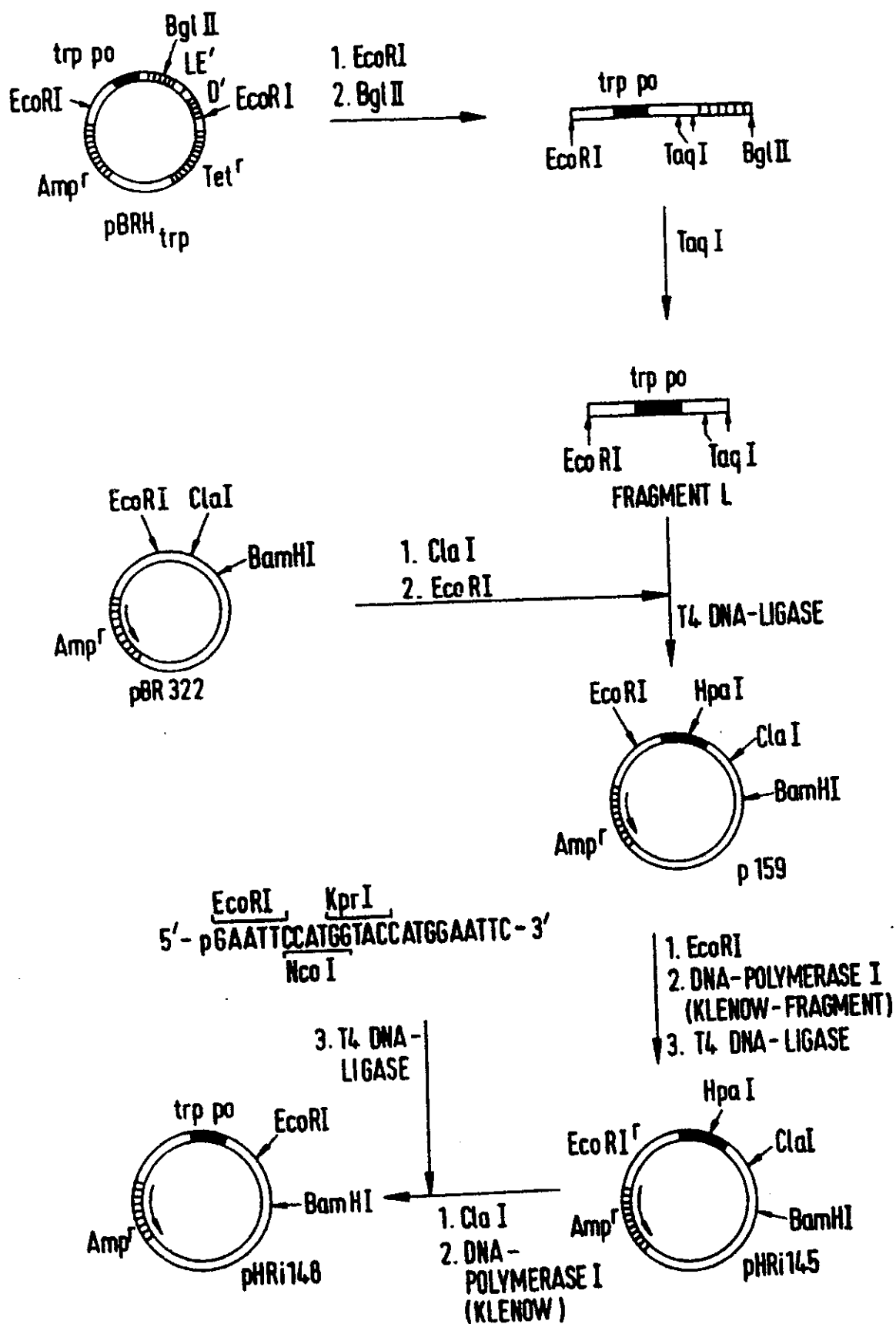
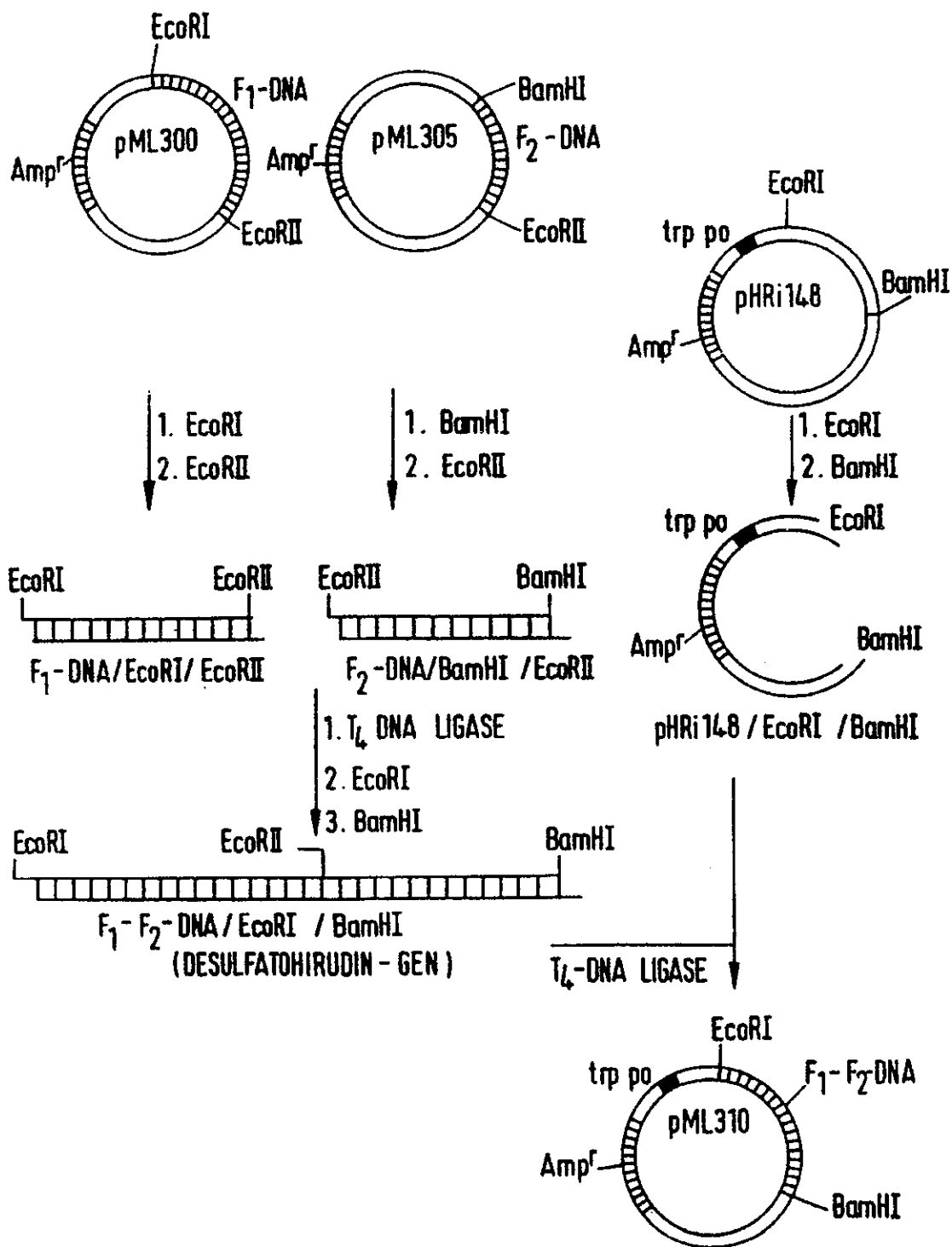
Fig. 3 KONSTRUKTION DES PLASMIDS pHRi748

Fig. 4 KONSTRUKTION DES EXPRESSIONSPLASMIDS pML310

REGISTER ENTRY FOR EP0168342

European Application No EP85810268.4 filing date 10.06.1985

Application in German

Priority claimed:

14.06.1984 in Switzerland - doc: 288284

Designated States BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE AT

Title PROCESS FOR THE PREPARATION OF THROMBIN INHIBITORS

Applicant/Proprietor

CIBA-GEIGY AG, Klybeckstrasse 141, CH-4002 Basel, Switzerland

[ADP No. 50706951002]

Inventors

DR. MANFRED LIERSCH, Rütiring 26, CH-4125 Riehen, Switzerland

[ADP No. 53815346001]

HANS RINK, Rebenstrasse 10, CH-4125 Riehen, Switzerland

[ADP No. 53815353001]

DR. WALTER MÄRKI, Bremenstallstrasse 30, CH-4313 Möhlin, Switzerland

[ADP No. 53815361001]

DR. MARKUS GERHARD GRÜTTER, Nettenbergweg, CH-4146 Hochwald, Switzerland

[ADP No. 53815379001]

DR. BERND MEYHACK, Höhenweg 9, CH-4312 Magden, Switzerland

[ADP No. 53815387001]

Classified to

C3H C6Y U1S

C12N A61K C07K C12P G01N

Address for Service

CIBA-GEIGY PLC, Patent Department, Tenax Road, Trafford Park, Manchester,
M17 1WT, United Kingdom

[ADP No. 00000521001]

Publication No EP0168342 dated 15.01.1986 and granted by EPO 03.07.1991.

Publication in German

Examination requested 10.06.1985

Patent Granted with effect from 03.07.1991 (Section 25(1)) with title PROCESS
FOR THE PREPARATION OF THROMBIN INHIBITORS.. Translation filed 20.06.1991

11.02.1991 CIBA-GEIGY PLC, Patent Department, Tenax Road, Trafford Park,
Manchester, M17 1WT, United Kingdom

[ADP No. 00000521001]

registered as address for service

Entry Type 8.11 Staff ID. CA1 Auth ID. AA

REGISTER ENTRY FOR EP0168342

(Cont.)

TIMED: 19/01/94 12:08:46

PAGE: 2

04.03.1991 Notification from EPO of change of Applicant/Proprietor details
from

CIBA-GEIGY AG, Klybeckstrasse 141, CH-4002 Basel, Switzerland

[ADP No. 50706951002]

to

CIBA-GEIGY AG, Klybeckstrasse 141, CH-4002 Basel, Switzerland

[ADP No. 50706951002]

UCP GEN-PHARMA AG, Solothurnstrasse 24, CH-3422 Kirchberg,
Switzerland

[ADP No. 56591704001]

Entry Type 25.14 Staff ID. RD06 Auth ID. EPT

11.06.1991 FILE RAISED.

Entry Type 10.1 Staff ID. CA1 Auth ID. AA

**** END OF REGISTER ENTRY ****

OA80-01
EP

OPTICS - PATENTS

19/01/94 12:09:14
PAGE: 1

RENEWAL DETAILS

PUBLICATION NUMBER EP0168342

PROPRIETOR(S)

CIBA-GEIGY AG, Klybeckstrasse 141, CH-4002 Basel, Switzerland

UCP GEN-PHARMA AG, Solothurnstrasse 24, CH-3422 Kirchberg,
Switzerland

DATE FILED 10.06.1985

DATE GRANTED 03.07.1991

DATE NEXT RENEWAL DUE 10.06.1994

DATE NOT IN FORCE

DATE OF LAST RENEWAL 18.05.1993

YEAR OF LAST RENEWAL 09

STATUS PATENT IN FORCE

IN THE MATTER OF European
Patent No. 0 168 342
in the name of
CIBA-GEIGY AG

and
IN THE MATTER OF an Application
for a Patent in Hong Kong

I, VIVIEN IRENE COULSON, employed as a translator by
Abel & Imray, Chartered Patent Agents of Northumberland
House, 303-306 High Holborn, London WC1V 7LH, do solemnly
and sincerely declare as follows:

1. I am well acquainted with the English and German
languages;
2. The following is a true and correct translation
into the English language of European Patent
Specification No. 0 168 342 B1

AND I MAKE this Solemn Declaration conscientiously
believing the same to be true and by virtue of the
provisions of the Statutory Declarations Act 1835.

DECLARED AT WATFORD IN
THE COUNTY OF HERTFORD

THIS 15th DAY OF
MARCH, 1994

BEFORE ME:



NOTARY PUBLIC

V.I. Coulson

(19) European Patent Office

(11) Publication Number
0 168 342 B1

(12)

EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

(45) Date of publication of patent specification:
03.07.91

(51) Int. Cl.⁵: C12N 15/15,
C12P 19/34
C12P 21/02,
C07K 7/10,
A61K 37/64,
G01N 33/94,
//C12R1/19,
C12R1/125
C12R1/865

(21) Application Number: 85810268.4

(22) Date of filing: 10.06.85

(54) Process for the preparation of thrombin inhibitors*

(30) Priority: 14.06.84
CH 2882/84

(73) Patent proprietor:
CIBA-GEIGY AG,
Klybeckstrasse 141,
CH-4002 Basle (CH)

(43) Date of publication of application: 15.01.86
Patent Bulletin 86/03

Patent proprietor:
UCP GEN-PHARMA AG
Solothurnstrasse 24
CH-3422 Kirchberg (CH)

(45) Publication of the mention of the grant of the patent:
03.07.91
Patent Bulletin 91/27

(72) Inventor: Liersch, Manfred, Dr.
Rütiring 26
CH-4125 Riehen (CH)
Inventor: Rink, Hans
Rebenstrasse 10
CH-4125 Riehen (CH)
Inventor: Märki, Walter, Dr.
Bremenstallstrasse 30
CH-4313 Möhlin (CH)
Inventor: Grütter, Markus Gerhard, Dr.
Nettenbergweg
CH-4146 Hochwald (CH)
Inventor: Meyhack, Bernd, Dr.
Höhenweg 9
CH-4312 Magden (CH)

(84) Designated contracting states:
AT BE CH DE FR GB
IT LI LU NL SE

(56) Citations:
EP-A- 158 564

FEBS LETTERS, vol. 165,
no. 2, January 9, 1984,
Amsterdam J. DODT et
al. "The complete
amino acid sequence of
hirudin, a thrombin
specific inhibitor"
pages 180-184

*Translator's note: The title is taken from the U.K. Patent Register and is not the responsibility of the Applicant.

Note: Within nine months from the publication of the mention of the grant of the European Patent, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to the European Patent granted. Notice of opposition shall be filed in a written reasoned statement. It shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid (Art. 99(1) of the European Patent Convention)

Rank Xerox (UK) Business Services

The invention relates to expression vectors containing DNA sequences that code for the amino acid sequence of the thrombin inhibitor hirudin, host cells transformed with such expression vectors, processes for the manufacture of those expression vectors and transformed host cells, and processes for the manufacture of the thrombin inhibitor desulfatohirudin using the transformed host cells.

In the plasma of a healthy mammalian organism a dynamic equilibrium exists between the fibrinolytic system and the coagulation system, as a result of which an efficiently operating vascular network is maintained. When vascular lesions occur, the coagulation system deposits a fibrin matrix which, after achieving the haemostatic condition, is broken down again by the fibrinolytic system. In cases in which the fibrinolytic potential of the organism is not sufficient to break down intravascular thrombi that have been formed, for example in patients who suffer from thromboembolisms or post-operative complications, supporting the organism by the administration of thrombolytic agents or anticoagulants proves indispensable.

In conventional anticoagulation therapy especially heparin, but also 4-hydroxycoumarin derivatives and 1,3-indanedione derivatives, have been used hitherto. Although notable success has been achieved with these agents they nevertheless have some disadvantages. For example, heparin does not act directly on the blood coagulation process but demonstrates its coagulation-inhibiting action indirectly by accelerating the inhibition of thrombin and factor X by antithrombin III. Heparin furthermore enters into numerous non-specific reactions in the organism and is neutralised by platelet factor 4, which prejudices its use

especially in consumption coagulopathy and disseminated intravascular coagulation (DIC). There is therefore a need for alternative and more specific agents for anti-coagulation therapy.

An anticoagulant that occurs naturally in leeches (Hirudo medicinalis), hirudin, has been known for a long time. Hirudin is a polypeptide consisting of 65 amino acids with a completely determined primary structure (1) and has as structural characteristics an accumulation of hydrophobic amino acids at the N-terminus and of polar amino acids at the C-terminus, a tyrosine residue (Tyr⁶³) present as sulphate monoester, and three disulphide bridges of which the exact arrangement is, however, not yet known.

Hirudin, with a K_i -value (complex dissociation constant) of $6 \times 10^{-11} M$, is the strongest thrombin inhibitor known and is characterised by a specific affinity to thrombin; other enzymes of the blood coagulation cascade are not inhibited by hirudin. In contrast to heparin, hirudin exerts its inhibiting action directly on thrombin and, unlike the former, does not act through antithrombin III. The only pharmacologically detectable effect of purified hirudin is the inhibition of blood coagulation and the prophylaxis of thrombosis. No effect on heart rate, respiration, blood pressure, thrombocyte count, fibrinogen and haemoglobin could be observed when administered intravenously to dogs, even in high doses. In tests on rats, pigs and dogs, hirudin has proved effective in experimental thrombosis (induced either by stasis or by the injection of thrombin), in endotoxin shock, and also in DIC (disseminated intravascular coagulation). Whenever direct comparison tests have been carried out, hirudin has proved to be superior to heparin.

Although long known, hirudin has not as yet

achieved the broad therapeutic use that might be expected on the basis of its excellent biological properties. Its extremely limited availability is a serious drawback which stands in the way of its widespread use in medicine. Up until now, hirudin preparations have been obtainable exclusively from natural material, which is expensive and difficult to obtain, using leech extracts, and employing time-consuming and costly isolation and purification processes (cf. ref. 2). The relatively long sequence of 65 amino acids has meant that, for economic reasons, also the conventional peptide synthesis offers little hope of success. New methods must therefore be applied for the manufacture of adequate amounts of hirudin that render possible detailed clinical tests of its therapeutic potential and its broad therapeutic use in anticoagulation therapy.

Such methods are offered especially by recombinant DNA technology. By means of this technology it is possible to manufacture the most varied physiologically active polypeptides by the cultivation of correspondingly genetically modified microorganisms or mammalian cell cultures. A corresponding process, based on recombinant genetic technology, for the manufacture of hirudin, especially a hirudin variant called HV₂, which is different from the desulphatohirudin according to the present invention, expression vectors prepared for that purpose, and E. Coli hosts transformed with such expression vectors, are described in the not prepublished European Patent Application No. 158 564.

The problem underlying the present invention is accordingly, with the aid of genetic technology techniques, to provide an expression system that permits the microbiological manufacture on an industrial scale of biologically active desulphatohirudin of the

formula

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly (I)
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

This problem is solved in the present invention by the preparation of an expression vector that contains a DNA sequence coding for the said desulphatohirudin, which DNA sequence is controlled by an expression control sequence in such a manner that the said desulphatohirudin is expressed in a microorganism transformed with that expression vector.

It was to be expected that the expression of such DNA sequences in transformed host cells (with the exception of transformed leech cells), in the absence of an additionally incorporated sulphate-transferring enzyme system, would result in a product that would differ from natural hirudin essentially by the absence of the sulphate radical at the tyrosine-63 residue. The biological function of the sulphate radical in proteins in general, and in hirudin in particular, has not been definitively clarified in detail, but the sulphate radical, in accordance with current knowledge, is said to have a not unimportant influence on the physiological properties of the protein. The sulphate radical is thus said to have the following functions:

- (1) positive influence on the biological activity of the protein;
- (2) participation in regulatory cell processes (as known in the case of reversible phosphorylation);
- (3) stimulation of secretion, that is to say the sulphated moiety acts as a marker for recognition as a secretory protein: all known sulphated proteins are secretory or transmembranal proteins.

Surprisingly, it has now been found that, contrary

to theoretical ideas, the valuable biological properties of hirudin are retained even if the characteristic sulphate monoester group is removed from the phenolic hydroxy of the Tyr⁶³ residue. The hirudin compound without the sulphate radical ("desulphato-hirudin") produced by means of the transformed microorganisms according to the invention have, by comparison with natural hirudin, proved in their biological properties, especially in their anticoagulative activity, to be qualitatively and quantitatively at least equivalent.

Manufacture of DNA sequences that code for the amino acid sequence of hirudin

The process for the manufacture of DNA sequences that code for the amino acid sequence of desulphato-hirudin of formula I, and for the manufacture of fragments thereof, is characterised in that the hirudin structural gene is isolated from genomic leech DNA, or a complementary double-stranded hirudin DNA (hirudin-ds cDNA) is produced from hirudin mRNA, or a gene coding for the said amino acid sequence, or fragments thereof, is (are) produced by means of chemical and enzymatic processes.

Genomic hirudin DNA and hirudin-ds cDNA are obtained, for example, according to methods that are known per se. For example, genomic hirudin DNA is obtained, for example, from a leech gene bank that contains the hirudin gene by cloning the leech DNA fragments in a microorganism and identifying clones that contain hirudin DNA, for example by colony hybridisation using a radioactively labelled, hirudin DNA-specific oligodeoxynucleotide that contains at least 15, and preferably from 15 to 30, deoxynucleotides. The resulting DNA fragments as a rule contain

in addition to the hirudin gene other undesired DNA constituents that can be removed by treatment with suitable exo- or endo-nucleases.

Double-stranded hirudin cDNA can be produced, for example, by obtaining mRNA from suitable leech cells, which are preferably induced to form hirudin, enriching the hirudin-mRNA in the resulting mRNA mixture in a manner known per se, using this mRNA as a template for the preparation of single-stranded cDNA, synthesising from this, by means of an RNA-dependent DNA polymerase, ds cDNA, and cloning the latter into a suitable vector. Clones that contain hirudin cDNA are identified, for example in the manner described above, by colony hybridisation using a radioactively labelled, hirudin DNA-specific oligodeoxynucleotide.

The genomic hirudin DNA obtained in this manner or the hirudin cDNA is linked preferably at the 5'- and at the 3'-end with chemically synthesised adapter oligodeoxynucleotides that contain the recognition sequence for one or various restriction endonuclease(s) and thus facilitate insertion into suitable vectors. In addition, the adapter molecule for the 5'-end of the hirudin DNA or cDNA must also contain the translation start signal (ATG). The translation start signal must be so arranged that the codon for the first amino acid of hirudin directly follows it.

Since the structure of the natural hirudin gene is not known and the chemical synthesis of a gene ("desulphatohirudin gene") coding for the amino acid sequence of hirudin, owing to modern synthesising methods, offers advantages especially from the point of view of time, chemical synthesis is preferred.

Chemical synthesis of a desulphatohirudin gene

The process for the manufacture of a structural

gene for desulphatohirudin of formula I or fragments thereof is characterised in that segments of the coding and of the complementary strand of the desulphatohirudin gene are chemically synthesised and resulting segments are converted enzymatically into a structural gene of desulphatohirudin or into fragments thereof.

The DNAs contain, in addition to the codons for desulphatohirudin, translation start and stop signals that render possible expression in suitable microorganisms, for example E.coli, and also nucleotide sequences at the ends which are suitable for insertion into a vector.

Preferably, the DNA includes at the 5'-end a nucleotide sequence that can be cleaved by a restriction enzyme, followed by the translation start signal, codons for the amino acids of hirudin, which render possible cleavage optionally at one or more sites by a restriction enzyme, a translation stop signal and, at the 3'-end, a nucleotide sequence that can be cleaved by a restriction enzyme. Restriction enzymes that can be used in accordance with the invention are, for example, EcoRI, EcoRII, BamHI, HpaII, PstI, HinfI or HindIII.

A preferred double-stranded DNA consists of a nucleotide sequence of the formula I and the complementary nucleotide sequence

5'	Met						
(X')	ATG						
n							
Val	Val	Tyr	Thr	Asp	Cys	Thr	Glu
GTX	GTX	TAY	ACX	GAY	TGY	ACX	GAM
Ser	Gly	Gln	Asn	Leu	Cys	Leu	Cys
QRS	GGX	CAM	AAZ	YTZ	TGY	YTZ	TGY
Glu	Gly	Ser	Asn	Val	Cys	Gly	Gln
GAM	GGX	QRS	AAZ	GTX	TGY	GGX	CAM
Gly	Asn	Lys	Cys	Ile	Leu	Gly	Ser
GGX	AAZ	AAM	TGY	ATN	YTZ	GGX	QRS
Asp	Gly	Glu	Lys	Asn	Gln	Cys	Val
GAY	GGX	GAM	AAM	AAZ	CAM	TGY	GTX
Thr	Gly	Glu	Gly	Thr	Pro	Lys	Pro
ACX	GGX	GAM	GGX	ACX	CCX	AAM	CCX
Gln	Ser	His	Asn	Asp	Gly	Asp	Phe
CAM	QRS	CAY	AAZ	GAY	GGX	GAY	TTY
Glu	Glu	Ile	Pro	Glu	Glu	Tyr	Leu
GAM	GAM	ATN	CCX	GAM	GAM	TAY	YTZ
Gln	NON	(X')					
CAM	TMK						
		3'					
		m					

in which the nucleotide sequence is represented commencing with the 5'-end and, for the purpose of better understanding, the amino acids for which each triplet codes are indicated, and in which the symbols have the following meanings:

A = deoxyadenosyl,
T = thymidyl,
G = deoxyguanosyl,
C = deoxycytidyl,
X = A, T, C or G,
Y = T or C,

$Z = A, T, C \text{ or } G \text{ when } Y = C,$
 or
 $Z = A \text{ or } G \text{ when } Y = T,$
 $Q = T \text{ or } A,$
 $R = C \text{ and } S = A, T, C \text{ or } G \text{ when } Q = T,$
 or
 $R = G \text{ and } S = T \text{ or } C \text{ when } Q = A,$
 $M = A \text{ or } G,$
 $L = A \text{ or } C,$
 $N = T, C \text{ or } A,$
 $K = A \text{ or } G \text{ when } M = A,$
 or
 $K = A \text{ when } M = G,$

and $(X')_n$ and $(X')_m$ represent nucleotide sequences with n and m being more than 3 and less than 100, especially more than 5 and less than 15, which may be recognised and cleaved by a restriction enzyme.

Preferably, the DNA sequence contains at the 5'-end a nucleotide sequence that can be cleaved by EcoRI, in the middle a nucleotide sequence that can be cleaved by EcoRII and at the 3'-end a nucleotide sequence that can be cleaved by BamHI.

The double-stranded DNA contains especially triplets that are preferred by E. coli and code for the amino acids of hirudin. Such triplets are especially:

for glycine (Gly)	GGT
cysteine (Cys)	TGC
valine (Val)	GTT
leucine (Leu)	CTG
serine (Ser)	TCT
threonine (Thr)	ACC
phenylalanine (Phe)	TTC

tyrosine (Tyr)	TAC
methionine (Met)	ATG
aspartic acid (Asp)	GAC
glutamic acid (Glu)	GAA
lysine (Lys)	AAA
isoleucine (Ile)	ATC
histidine (His)	CAC
proline (Pro)	CCG
glutamine (Gln)	CAG
asparagine (Asn)	AAC

The preferred stop signal (NON) is the codon TAG.

A preferred gene coding for the amino acid sequence of hirudin in the above-described manner is the DNA of the formula II,

MetValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGly
CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGT
GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTTGGACACGGACACGCTTCCA
(EcoRI)

SerAsnValCysGlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysVal
TCTAACGTTTGGCGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAACCAGTGCGTT
AGATTGCAAACGCCAGTCCCATTTGTTTACGTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTTTGGTCACGCAA
(EcoRII)

ThrGlyGluGlyThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGlu
ACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCGCAGTCTCACAACGACGGTGACTTCCAAGAAATCCCGGAAGAA
TGGCCACTTCCATGGGGCTTTGGCGTCAGAGTGTTGCTGCCACTGAAGCTTCTTTAGGGCCTTCTT

TyrLeuGlnNON
TACCTGCAGTAGGATCCTG
ATGGACGTCATCCTAGGAC
(BamHI)

(II),

in which A, T, G and C have the meanings given under formula I and, for the purpose of better understanding, the amino acids for which each triplet codes and the cleavage sites for the restriction enzymes are indicated.

Double-stranded DNA fragments of desulphatohirudin that are advantageous for the manufacture of a structural gene for desulphatohirudin are especially those of which the ends may be cleaved by restriction enzymes. Such double-stranded DNA fragments of the hirudin gene have especially from 30 to 70 base pairs and are, for example, those of the formula III (F₁) and of the formula IV (F₂):

MetValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGly
CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGT
GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTTGACACGGACACGCTTCCA
(EcoRI)

SerAsnValCysGlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySer
TCTAACGTTTGCGGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCTG
AGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTTACCTAGGACCCAAGAC
(EcoRII)

F₁ (III)

IleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGlyThrProLysPro
CATCCTGGGTTTCTGACGGTGAAAAAACCAGTGCGTTACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCG
GTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTTTGGTCACGCAATGGCCACTTCCATGGGGCTTTGGC
(EcoRII)

GlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGlnNON
CAGTCTCACAACGACGGTGACTTCCGAAGAAATCCCGGAAGAATACCTGCAGTAGGATCCTG
GTCAGAGTGTGCTGCCACTGAAGCTTCTTTAGGGCCTTCTTATGGACGTCATCCTAGGAC
(BamHI)

F₂ (IV)

Methods of synthesising DNA have been summarised by S.A. Narang (3). The known synthesising techniques permit the manufacture of polynucleotides having a length of towards 20 bases in a good yield, high purity and in a relatively short time. Suitably protected nucleotides are linked with one another by the phosphodiester method (4) or the even more efficient phosphotriester method (5) or phosphite triester method (6). Simplification of the synthesis of oligo- and polynucleotides is rendered possible by the solid phase method in which the nucleotide chains are bonded to a suitable polymer. Itakura *et al.* (7) use in solid phase synthesis instead of individual nucleotides

trinucleotides linked by the phosphotriester method, which can then be condensed within a short time and in good yields, for example to form a polynucleotide with 31 bases. The authentic double-stranded DNA can be built up enzymatically from chemically produced short segments. Khorana et al. (8) use for this purpose overlapping polynucleotide sequences from both DNA strands, which are held together in the correct arrangements by base pairing and are then chemically linked by the enzyme DNA ligase. A further possibility comprises incubating one polynucleotide sequence from each of the two DNA strands having a short overlapping segment, in the presence of the four required deoxynucleoside triphosphates, with a DNA polymerase, for example DNA polymerase I, Klenow fragment of polymerase I, T₄ DNA polymerase, or with AMV (avian myeloblastosis virus) reverse transcriptase. In this process the two polynucleotide sequences are held together in the correct arrangement by base pairing and supplemented by the enzyme with the required nucleotides to form a complete double-stranded DNA (9). Itakura et al. (10) describe how, based on this principle, a 132 base pair-long segment of the human leucocyte interferon α_2 -gene can be built up in the presence of DNA-polymerase I (Klenow fragment) from 4 chemically synthesised fragments having a length of from 39 to 42 bases, achieving a 40% saving of chemical synthesis by comparison with the above-described method in which only ligase is used.

The process for the manufacture of DNAs that contain a structural gene of desulphatohirudin and are suitable for expression in host cells, and the ends of which render possible insertion into vectors, and the manufacture of fragments thereof, is known per se and is characterised in that

- a) a suitably protected deoxynucleoside is bonded to a solid carrier,
- b) suitably protected di-, tri- or tetra-nucleotides are manufactured according to the phosphotriester or phosphite method,
- c) a deoxynucleoside or oligodeoxynucleotide bonded to the carrier is linked with suitably protected mono-nucleotides or di-, tri- or tetra-nucleotides (produced according to b)) in accordance with the phosphotriester or the phosphite method,
- d) oligodeoxynucleotides obtainable according to c) which are bonded to carriers and have a length of from approximately 20 to approximately 70 bases are removed from the carrier, if desired purified, freed of protecting groups, and the free 5'-terminal hydroxy groups are phosphorylated,
- e1) 2 oligodeoxynucleotides each of a length of from approximately 20 to approximately 70 bases from the coding and from the complementary strand having at least 3, and preferably from 8 to 15, overlapping base pairs are annealed and are supplemented with a DNA polymerase in the presence of the four deoxynucleoside triphosphates to form double-stranded DNA segments (fragments of the desulphatohirudin gene), and, optionally, 2 double-stranded DNA segments with suitable ends phosphorylated in accordance with d) are linked using a ligase to form the desulphatohirudin structural gene, or 2 obtainable double-stranded DNA segments are subcloned into suitable vectors, then phosphorylated in accordance with d) and linked using a ligase to form the desulphatohirudin structural gene, or
- e2) alternatively each 2 oligodeoxynucleotides

originating from the coding and from the complementary strand having a length of, for example, from 20 to 70 bases and each having at least 3, and preferably from 8 to 15, overlapping base pairs, are annealed, made up with a DNA polymerase in the presence of the four deoxynucleoside triphosphates, and linked using ligase to form the desulphatohirudin structural gene.

Manufacture of expression vectors that contain a gene coding for the amino acid sequence of hirudin

The invention relates to expression vectors that contain a DNA sequence coding for desulphatohirudin of formula I, which sequence is regulated by an expression control sequence in such a manner that the said desulphatohirudin is expressed in a microorganism transformed with those expression vectors.

The expression vectors of the present invention are produced, for example, by inserting a DNA sequence coding for desulphatohirudin of formula I into a vector DNA that contains an expression control sequence in such a manner that the expression control sequence regulates the said DNA sequence.

The selection of a suitable vector is determined by the microorganism provided for the transformation. Suitable microorganisms are, for example, yeasts, for example Saccharomyces cerevisiae, and especially bacterial strains that have no restriction or modification enzyme, especially strains of Escherichia coli, for example E. coli X1776, E. coli HB101, E. coli W3110A102, E. coli HB101/LM1035, E. coli JA221(30) or E. coli K12 strain 294, Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus, Pseudomonas, Haemophilus, Streptococcus, and others. Preferred microorganisms are the mentioned

strains of E. coli, especially E. coli HB101, E. coli JA221 and E. coli W3110Δ102.

There are suitable, in principle, all those vectors which replicate and express in the selected microorganism the heterologous DNA sequences according to the invention that code for the amino acid sequence of hirudin.

Examples of vectors that are suitable for the expression of the desulphatohirudin gene in an E. coli strain are bacteriophages, for example derivatives of the bacteriophage λ , or plasmids, such as, especially, the plasmid colE1 and its derivatives, for example pMB9, pSF2124, pBR317 or pBR322. The preferred vectors of the present invention are derived from plasmid pBR322. Suitable vectors contain a complete replicon and a marker gene, which renders possible the selection and identification of the microorganisms transformed by the expression plasmids by means of a phenotype feature. Suitable marker genes impart to the microorganism, for example, resistance to heavy metals, antibiotics and the like. Furthermore, preferred vectors of the present invention contain outside the replicon and marker gene regions recognition sequences for restriction endonucleases, so that the DNA sequence coding for the amino acid sequence of hirudin and optionally the expression control sequence can be inserted at these sites. The preferred vector, plasmid pBR322, contains an intact replicon, marker genes (tet^R and amp^R) imparting resistance to tetracycline and ampicillin, and a series of recognition sequences, occurring only once, for restriction endonucleases, for example PstI (cleaves in the amp^R gene, the tet^R gene remains intact), BamHI, HindIII, SalI (all cleave in the tet^R gene, the amp^R gene remains intact), NruI and EcoRI.

Several expression control sequences can be used for regulating the desulphatohirudin expression. Especially expression control sequences of strongly expressed genes of the host cell to be transformed are used. When using pBR322 as hybrid vector and E. coli as host microorganism, suitable expression control sequences (which inter alia contain the promoter and the ribosomal binding site) are those of the lactose operon, the tryptophan operon, the arabinose operon and the like, and of the β -lactamase gene, the corresponding sequences of the phage λ N-gene or of the phage fd-layer protein gene, and others. Whereas the promoter of the β -lactamase gene (β -lac-gene) is already contained in the plasmid pBR322, the other expression control sequences must be introduced into the plasmid. In the present invention, the preferred expression control sequence is that of the tryptophan operon (trp po).

Vectors suitable for replication and expression in yeast contain a yeast-replication origin and a selective genetic marker for yeast. Hybrid vectors that contain a yeast replication origin, for example the chromosomal autonomously replicating segment (ars), are retained extrachromosomally within the yeast cell after transformation and are replicated autonomously during mitosis. Also, hybrid vectors that contain sequences homologous to the yeast 2 μ plasmid DNA can be used. Such hybrid vectors are integrated by recombination in 2 μ plasmids already present within the cell, or replicate autonomously. 2 μ sequences are especially suitable for plasmids having a high transformation frequency and permit a high copy number. Suitable marker genes for yeast are especially those that impart antibiotic resistance to the host or, in the case of auxotrophic yeast mutants, genes that

complement the host lesions. Corresponding genes impart, for example, resistance to the antibiotic cycloheximide or provide for prototrophy in an auxotrophic yeast mutant, for example the URA3, LEU2, HIS3 or, especially, the TRPI gene. Preferably, yeast hybrid vectors furthermore contain a replication origin and a marker gene for a bacterial host, especially E. coli, so that the construction and the cloning of the hybrid vectors and their precursors can be carried out in one bacterial host. Expression control sequences suitable for expression in yeast are, for example, those of the TRPI, ADHI, ADHII, PHO3 or PHO5 gene, and also promoters involved in glycolytic degradation, for example the PGK and the GAPDH promoter.

The invention relates especially to expression vectors capable of replication and phenotypic selection that contain an expression control sequence and a DNA sequence coding for the amino acid sequence of hirudin, wherein the said DNA sequence together with transcription start signal and termination signal and translation start signal and stop signal in the said expression plasmid is so arranged, with regulation of the said expression control sequence, that desulphatohirudin is expressed in a host cell transformed with the said expression plasmid.

In order to achieve effective expression, the desulphatohirudin gene must be correctly arranged ("in phase") with the expression control sequence. It is advantageous to link the expression control sequence into the region between the main mRNA origin and the ATG of the gene coding sequence, which is naturally linked to the expression control sequence (for example the β -lac coding sequence when using the β -lac promoter), with the desulphatohirudin gene, which

preferably has its own translation start signal (ATG) and translation stop signal (for example TAG). An effective transcription and translation is thus ensured.

For example, a vector, especially pBR322, is cleaved with a restriction endonuclease and, optionally after modification of the resulting linearised vector, an expression control sequence provided with corresponding restriction ends is introduced. The expression control sequence contains at the 3'-end (in the translation direction) the recognition sequence of a restriction endonuclease, so that the vector already containing the expression control sequence can be digested with the said restriction enzyme, and the desulphatohirudin gene provided with matching ends can be inserted. The result is a mixture of two hybrid plasmids which contain the gene in the correct and in the incorrect orientation, respectively. It is advantageous to cleave the vector already containing the expression control sequence with a second restriction endonuclease within the vector DNA and to insert into the resulting vector fragment the desulphatohirudin gene provided with correct ends. All operations on the vector are carried out preferably in such a manner that the function of the replicon and of at least one marker gene is not impaired.

In a preferred embodiment of the present invention, a vector derived from pBR322 that contains an expression control sequence, especially that of the tryptophan operon (*trp* *po*), which at the 3'-end (between the main mRNA origin and the first ATG) carries the recognition sequence for a restriction endonuclease preferably forming cohesive ends, for example *EcoRI*, is digested with the mentioned restriction endonuclease and, in the vector DNA fragment, with

a second restriction endonuclease that forms blunt, or preferably cohesive, ends, for example BamHI, after which the so linearised vector is linked with the desulphatohirudin gene having corresponding ends (for example with an EcoRI end before the ATG start and a BamHI end after the translation stop codon). The linking is carried out in known manner by pairing the complementary (cohesive) ends and ligation, for example with T₄ DNA ligase.

The desulphatohirudin gene, obtained synthetically or from genomic DNA by the mRNA route, and provided with corresponding cohesive (especially EcoRI and BamHI) ends can, before introduction into an expression plasmid, also be cloned into a vector, for example pBR322, in order to obtain larger amounts of the desulphatohirudin gene, for example for the sequence analysis. The isolation of the clones that contain the hybrid plasmid is carried out, for example, with a desulphatohirudin gene-specific, radioactively labelled oligodeoxynucleotide probe (see above). The characterisation of the desulphatohirudin gene is effected, for example, in accordance with the process according to Maxam and Gilbert (11).

In a further embodiment of the invention, two fragments of the desulphatohirudin gene are synthesised. Fragment 1, which includes the first part of the gene, contains before the ATG and at the end in each case the recognition sequence for restriction endonucleases forming cohesive ends, for example before the ATG EcoRI and at the end EcoRII. Fragment 2, which includes the latter part of the gene, has corresponding recognition sequences, for example EcoRII at the beginning, and BamHI after the translation stop signal (for example TAG). The fragments are cleaved at the outer recognition sequences (fragment 1, for example,

with EcoRI and fragment 2 correspondingly with BamHI) and subcloned into a correspondingly cleaved vector (for example pBR322). The identification of the clones that contain the fragments and the characterisation of the fragments are effected as described above. The fragments are then cut out of the hybrid vectors with the corresponding restriction endonucleases (fragment 1, for example, with EcoRI and EcoRII and fragment 2, for example, with EcoRII and BamHI) and ligated by way of their cohesive ends, especially EcoRII ends, resulting in the complete desulphatohirudin gene, which is introduced into a vector DNA in the manner indicated.

Transformation of the microorganisms

The invention relates also to a process for the manufacture of a transformed microorganism, characterised in that a microorganism is transformed with an expression vector that contains a DNA sequence regulated by an expression control sequence and coding for the amino acid sequence of hirudin.

Suitable microorganisms are, for example, those mentioned above, such as strains of Saccharomyces cerevisiae, Bacillus subtilis and, especially, Escherichia coli. The transformation with the expression plasmids according to the invention is carried out, for example, in the manner described in the literature, for example for S. cerevisiae (12), B. subtilis (13) and E. coli (14). The isolation of the transformed host cells is effected advantageously from a selective nutrient medium to which there has been added the biocide against which the marker gene contained in the expression plasmid imparts resistance. If, as preferred, the expression plasmids contain the amp^R gene, ampicillin is accordingly added to the nutrient medium. Cells that do not

contain the expression plasmid are destroyed in such a medium.

The invention relates also to the transformed microorganisms obtainable in the manner mentioned.

Cultivation of the transformed microorganisms and the production of desulphatohirudin

The transformed microorganisms are used for the manufacture of biologically active desulphatohirudin of formula I. The process for the manufacture of that compound is characterised in that the transformed microorganisms are cultivated and the said desulphatohirudin is freed from the host cells and isolated.

There is to be understood by "biologically active desulphatohirudin" a desulphatohirudin product that has a thrombin-inhibiting action and a positive reaction with antihirudin antibodies and that has the primary structure of desulphatohirudin of formula I.

The invention relates especially to a process for the manufacture of desulphatohirudin of formula I and salts thereof, characterised in that microorganisms transformed with an expression vector that contains a DNA sequence coding for the said hirudin compound and regulated by an expression control sequence are cultivated in a liquid nutrient medium that contains assimilable carbon and nitrogen sources, and the product is freed from the host cells and isolated and, if necessary, a resulting salt is converted into the free polypeptide or a resulting polypeptide is converted into a salt thereof.

In the compounds with hirudin activity obtainable according to the process, especially in the compounds of the formula XIV, the cysteine residues Cys are linked in pairs by disulphide bridges in the same

arrangement as in natural hirudin.

The cultivation of the transformed microorganisms according to the invention is effected in a manner known per se. For example, various carbon sources can be used for the cultivation of the transformed host microorganisms according to the invention. Examples of preferred carbon sources are assimilable carbohydrates, such as glucose, maltose, mannitol or lactose, or an acetate, which can be used either alone or in suitable mixtures. Suitable nitrogen sources are, for example, amino acids, such as casamino acids, peptides and proteins and their degradation products, such as tryptone, peptone or meat extracts; also yeast extracts, malt extract, and also ammonium salts, for example ammonium chloride, sulphate or nitrate, which can be used either alone or in suitable mixtures. Inorganic salts, which can also be used, are, for example, sulphates, chlorides, phosphates and carbonates of sodium, potassium, magnesium and calcium.

Furthermore, the medium contains, for example, growth-promoting substances, such as trace elements, for example iron, zinc, manganese and the like, and preferably substances that exert a selection pressure and prevent the growth of cells that have lost the expression plasmid. Thus, for example, ampicillin is added to the medium when the expression plasmid contains an amp^R gene. Such an addition of anti-biotically active substances also has the effect of destroying the contaminating antibiotic-sensitive microorganisms.

The cultivation is carried out in accordance with processes that are known per se. The cultivating conditions, such as temperature, pH value of the medium and fermentation time, are so selected that maximum hirudin titres are obtained. Thus, an E. coli or a

yeast strain is preferably cultivated under aerobic conditions in submersed culture with shaking or stirring at a temperature of approximately from 20 to 40°C, preferably approximately 30°C, and a pH value of from 4 to 9, preferably pH 7, for approximately from 4 to 20 hours, preferably from 8 to 12 hours. During cultivation, the expression product accumulates intracellularly.

When the cell density has reached an adequate value, the cultivation is terminated and the product is freed from the cells of the microorganism. For this purpose the cells are destroyed, for example by treatment with a detergent, such as SDS or Triton, or are lysed with lysozyme or a similarly acting enzyme. Alternatively, or in addition, mechanical forces, such as shearing forces (for example X-press, French press, Dyno-mill) or shaking with glass beads or aluminium oxide, or alternate freezing, for example in liquid nitrogen, and thawing, for example to from 30° to 40°C, and ultrasound, can be used to break the cells. The resulting mixture, which contains proteins, nucleic acids and other cell constituents, after centrifuging is enriched in a manner known per se with regard to the protein content. Thus, for example, the non-protein constituents are for the most part removed by polyethyleneimine treatment and the proteins, including desulphatohirudin, are precipitated, for example by saturating the solution with ammonium sulphate or with other salts. Bacterial proteins can also be precipitated by means of acidification with acetic acid (for example 0.1%, pH 4-5). A further enrichment of desulphatohirudin can be achieved by extracting the acetic acid supernatant with n-butanol. Other purification steps include, for example, chromatographic processes, such as ion exchange chromatography,

gel filtration chromatography, partition chromatography, HPLC, reverse phase HPLC and the like. Thus, the separation of the constituents of the mixture is effected by dialysis, according to charge by means of gel electrophoresis or carrier-free electrophoresis, according to molecular size by means of a suitable Sephadex column, by affinity chromatography, for example with antibodies, especially monoclonal antibodies, or with thrombin coupled to a suitable carrier for affinity chromatography, or by other processes, especially those known from the literature.

For example, the isolation of the expressed desuphatohirudin comprises the following steps:
Separation of the cells from the culture solution by centrifugation;
production of a crude extract by destroying the cells, for example by treatment with a lysing enzyme and/or alternate freezing and thawing again;
Removal by centrifugation of the insoluble constituents;
Precipitation of the DNA by the addition of polyethyleneimine;
Precipitation of the proteins by ammonium sulphate;
Affinity chromatography of the dissolved precipitate on a monoclonal anti-desulphatohirudin antibody column or a thrombin column;
Desalination of the resulting solution by means of dialysis or chromatography on Sephadex G25 or Sephadex G10.

Alternatively, after separating off the DNA the bacterial proteins can be precipitated by means of 1% acetic acid and the hirudin compound extracted from the acidic supernatant with n-butanol, or the acidic supernatant can be subjected directly to ion exchange chromatography (for example on diethylamino-

ethylcellulose DEAE 53). Other purification steps include gel filtration on Sephadex G50 (or G75), and reverse phase HPLC. Desalination is effected again on Sephadex G25.

The test with anti-hirudin or anti-desulphato-hirudin antibodies (for example monoclonal antibodies obtainable from rabbits or from hybridoma cells), the thrombin test (15) or the blood coagulation test (16) can be used to detect the hirudin activity.

The compound of formula I that can be produced in accordance with the invention may be not only in free form but also in the form of its salts, especially its pharmaceutically acceptable salts. Since it contains several amino acid residues with free amino groups the compound according to the invention can, for example, be in the form of acid addition salts. There come into consideration as acid addition salts especially physiologically tolerable salts with customary therapeutically acceptable acids; there may be mentioned as inorganic acids hydrohalic acids, such as hydrochloric acid, and also sulphuric acid and phosphoric or pyrophosphoric acid; suitable organic acids are especially sulphonic acids, such as benzene- or p-toluene-sulphonic acid or lower alkanesulphonic acids, such as methanesulphonic acid, and also carboxylic acids, such as acetic acid, lactic acid, palmitic and stearic acids, malic acid, tartaric acid, ascorbic acid and citric acid. Since the hirudin compound also contains amino acid residues with free carboxyl groups it can also be in the form of a metal salt, especially an alkali metal or alkaline earth metal salt, for example a sodium, potassium, calcium or magnesium salt, or in the form of an ammonium salt derived from ammonia or a physiologically tolerable organic nitrogen-containing base. Since, however, it

contains free carboxyl groups and free amino groups simultaneously, it can also be in the form of an internal salt.

Depending on the procedure, the compound according to the invention is obtained in free form, in the form of acid addition salts or salts with bases. The free compound can be obtained from the acid addition salts and the salts with bases in a manner known per se, for example by adjusting the pH value to the isoelectric point. From the free compound it is possible in turn to obtain therapeutically acceptable acid addition salts or salts with bases by reaction with acids or bases, respectively, for example with those that form the above-mentioned salts, and concentration by evaporation or lyophilisation.

The desulphatohirudin obtainable in accordance with the present invention has valuable pharmacological properties and can, like hirudin extracted from leeches, be used prophylactically or, especially, therapeutically.

The desulphatohirudin compound that can be manufactured in accordance with the invention is at least equivalent to natural hirudin as regards its biological activity. Thus, for example, it has a K_i value of approximately 10^{-11} M. Desulphatohirudin is completely specific to thrombin and exhibits no interactions with other proteinases of the blood coagulation system. The active toxicity is extremely low; for example, in rats, at a dose of, for example, 1 g/kg, no toxic effects can be detected. Similarly, no hypersensitivity reactions or allergic reactions are observed.

The desulphatohirudin compound that can be manufactured in accordance with the invention can therefore be used analogously to natural hirudin for

the therapy and prophylaxis of thromboses and thromboembolisms, including the prophylaxis of post-operative thromboses, for acute shock therapy (for example for septic or polytraumatic shock), for the therapy of consumption coagulopathies, in haemodialyses, haemoseparations and in extracorporeal blood circulation.

The invention relates especially to the expression vectors described in the Examples containing a DNA sequence coding for the amino acid sequence of hirudin, to microorganisms transformed with such expression vectors, to the processes for their manufacture described in the Examples and to the process described in the Examples for the manufacture of desulphatohirudin using transformed microorganisms.

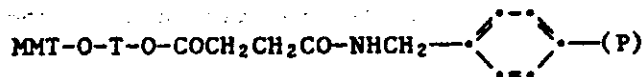
The following Examples and drawings serve to illustrate the invention and are in no way intended to limit it.

Experimental Section

The meanings of the abbreviations used in the Examples are as follows:

TNE	solution that contains 100 mM NaCl, 50 mM tris·HCl pH 7.5 and 5 mM EDTA,
SDS	sodium dodecyl sulphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
DTT	1,4-dithiothreitol (1,4-dimercapto-2,3-butanediol)
BSA	bovine serum albumin
EtBr	ethidium bromide
tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
tris.HCl	tris monohydrochloride

Example 1: Manufacture of protected nucleoside/ polystyrene resin



750 mg of succinic acid anhydride and 910 mg of 4-dimethylaminopyridine are added to 2.57 g (5 mmol) of 5'-(4-methoxytrityl)-thymidine (MMT-O-T-OH) in 20 ml of absolute pyridine and the whole is left at room temperature for 16 hours. After concentrating the pyridine solution, this is taken up in 200 ml of ethyl acetate, extracted by shaking twice, with 200 ml of 0.1M phosphate buffer each time with the addition of 10 ml of saturated sodium chloride solution, washed

again with saturated sodium chloride solution, dried, concentrated and hexane is added dropwise. The precipitated product is separated off and triturated twice with ether, then dissolved in 300 ml of ethyl acetate and extracted by shaking at 0°C with 180 ml of 0.1M potassium bisulphate of pH 2.5. After washing twice with water, the ethyl acetate solution is dried with sodium sulphate, filtered, 0.5 ml of pyridine is added and the whole is concentrated and diluted by the dropwise addition of hexane. The precipitated succinic acid derivative is removed by filtration.

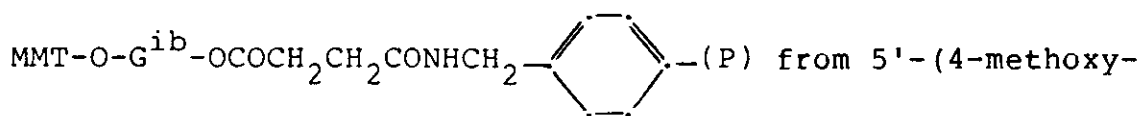
1.0 g of this compound are dissolved together with 190 mg of N-hydroxysuccinimide in 4 ml of ethyl acetate and 2 ml of dimethylformamide, and 370 mg of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide are added at 0°C. After standing overnight in a refrigerator, the precipitated N,N'-dicyclohexyl urea is filtered off, the filtrate is diluted with ethyl acetate, extracted with cold 0.1M sodium bicarbonate and water, dried and concentrated to dryness by evaporation in vacuo. The residue is chromatographed with ethyl acetate on silica gel. TLC: R_f 0.45 in dichloromethane/methanol (9:1).

100 mg of this N-succinimidoylsuccinic acid ester are stirred for 20 hours with 1 g of aminomethylpolystyrene (amine content 110 $\mu\text{mol/g}$) in 2 ml of dichloromethane and 4 ml of dimethylformamide. The polymer resin is filtered off and extracted by washing with dimethylformamide, methanol, dichloromethane and methanol. After drying, the amino groups that have not reacted are acetylated by stirring the resin in 6 ml of pyridine with 1 ml of acetic anhydride and 100 mg of 4-dimethylaminopyridine for 30 minutes. The polymer resin is extracted by washing with dichloromethane, dimethylformamide, methanol and dichloromethane, and dried until a constant weight is reached. The

spectroscopic methoxytrityl (MMT)-determination gives a charge of 57 $\mu\text{mol/g}$.

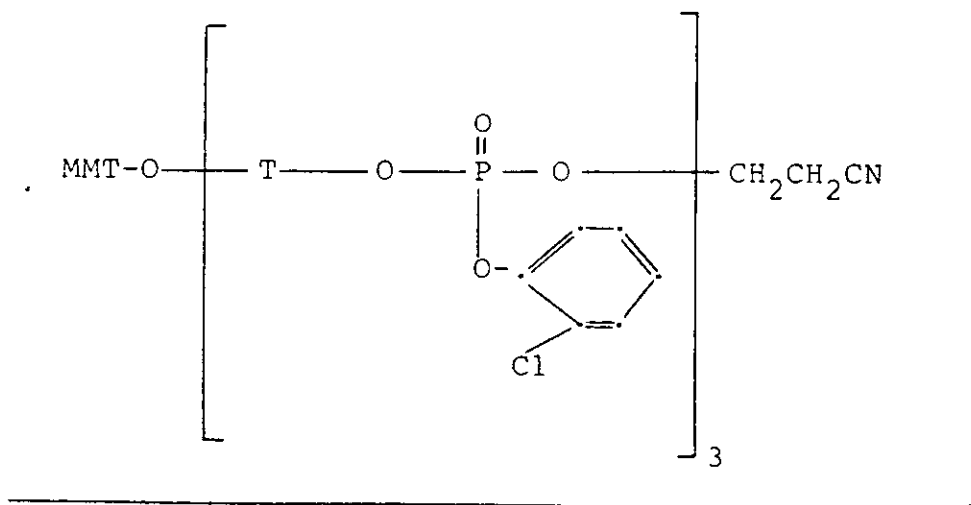
Example 2:

The following protected nucleoside/polystyrene resin is manufactured analogously to Example 1:



trityl)-N-isobutyryl-deoxyguanosine, charge 32 $\mu\text{mol/g}$.

Example 3: Synthesis of the trinucleotide



a) Synthesis of the dinucleotide:

7.73 g (15 mmol) of 5'-(4-methoxytrityl)-thymidine (MMT-O-T-OH) are twice concentrated by evaporation with absolute pyridine. The residue is dissolved in 20 ml of absolute tetrahydrofuran and added dropwise to 80 ml of a 0.2M solution of 2-chlorophenyl-di-(1-benzotriazolyl)-phosphate in tetrahydrofuran while stirring and with the exclusion of moisture and the reaction mixture

is stirred for 1 hour at room temperature. The resulting solution of 2-chlorophenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidine-3'-phosphate is divided into 3 portions.

α) Hydrolysis to triethylammonium-2-chlorophenyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidine-3'-phosphate:

100 ml of 0.5M triethylammonium bicarbonate are added to a third of the above solution of 2-chlorophenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidine-3'-phosphate while cooling. After 15 minutes extraction is carried out with dichloromethane. The dichloromethane solution is washed with water, concentrated, and petroleum ether is added dropwise thereto. The resulting precipitate is filtered off with suction, extracted by washing with ether/petroleum ether 1:1 and dried in vacuo. TLC: R_f 0.35 in dichloromethane/methanol/water (75:22:3).

β) Esterification to 2-cyanoethyl-2-chlorophenyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidine-3'-phosphate and removal of the 4-methoxytrityl protecting group:

1.3 ml of 2-cyanoethanol and 2 ml of pyridine are added to a third of the solution of 2-chlorophenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidine-phosphate. The mixture is left overnight at room temperature. The solvents are distilled off in vacuo and the residue is dissolved in ethyl acetate and repeatedly extracted by shaking with 0.1M phosphate buffer of pH 7 and water. The organic phase is dried, concentrated and added dropwise to hexane. The precipitate is filtered off, dissolved in 50 ml of dichloromethane/methanol 7:3 and, at 0°C, a solution of 3.8 g of *p*-toluene-

sulphonic acid monohydrate in 75 ml of dichloromethane/-methanol 7:3 is added. After 2 hours, the reaction solution is diluted with dichloromethane and extracted by shaking with a cold sodium bicarbonate solution. The organic phase is concentrated and hexane is added. The precipitated 2-cyanoethyl-2-chlorophenylthymidine-3'-phosphate is chromatographed on silica gel with dichloromethane/methanol 96:4. TLC: R_f of 0.45 in dichloromethane/methanol (9:1).

γ) Condensation to the 5'-(4-methoxytrityl)-3'-cyanoethyl)-bis-thymidine dinucleotide:

2.2 g of 2-cyanoethyl-2-chlorophenyl-thymidine-3'-phosphate are dehydrated by twice concentrating by evaporation with absolute pyridine, and the product is dissolved in 20 ml of absolute tetrahydrofuran and added to the remaining third of the solution of 2-chlorophenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidine-3'-phosphate. After 18 hours at room temperature 10 ml of water and 200 ml of ethyl acetate are added to the reaction solution while cooling with ice. The organic phase is washed repeatedly with sodium bicarbonate and water, dried over sodium sulphate and concentrated to a small volume. The dinucleotide, protected in the phosphate moiety and at the 5'- and 3'-end, is precipitated by adding dropwise to ether/hexane 1:1. TLC: R_f 0.48 in dichloromethane/methanol (9:1).

b) Synthesis of the trinucleotide:

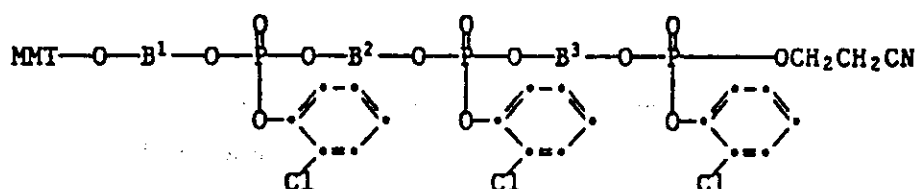
1.17 g (1 mmol) of the above-described fully protected dinucleotide are dissolved in 30 ml of dichloromethane/methanol 7:3 and, while cooling with ice, a solution of 1.9 g of p-toluenesulphonic acid

monohydrate in 20 ml of dichloromethane/methanol 7:3 is added. After 2 hours, ice-cold sodium bicarbonate solution is added and extraction is carried out with dichloromethane. The organic phase is dried, concentrated and added dropwise to hexane. The precipitated crude dinucleotide with a free 5'-hydroxy group is chromatographed on silica gel with a gradient of 2-8% methanol in dichloromethane.

TLC: R_f 0.33 in dichloromethane/methanol (9:1).

850 mg of this 5'-hydroxy-dinucleotide and 1.06 g of triethylammonium-2-chlorophenyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidine-3'-phosphate [cf. paragraph a)] are twice concentrated by evaporation with pyridine, then dissolved in 10 ml of absolute pyridine and 560 mg of 1-mesitylenesulphonyl-3-nitro-1,2,4-triazole (MSNT) are added. After 2 hours, 2 ml of ice-cold water are added and, after a further hour, extraction is carried out with dichloromethane. The organic phase is washed with saturated sodium bicarbonate solution and water, dried, concentrated and ether is added. The precipitated trinucleotide is purified by chromatography on silica gel. R_f 0.45 in dichloromethane/methanol (9:1).

Example 4: Analogously to Example 3, the following protected trinucleotides of the general formula



abbreviated to $\text{B}^1\text{B}^2\text{B}^3$, are manufactured. The following abbreviations are used for the nucleosides B^1 , B^2 , B^3 :

A = N-benzoyl-deoxyadenosine
 C = N-benzoyl-deoxycytidine
 G = N-isobutyryl-deoxyguanosine
 T = thymidine

Compound	R _f ^{a)}	Compound	R _f ^{a)}
TTT	0.45	ATG	0.48
TTC	0.55	ACT	0.53
TCT	0.46	ACC	0.48
TAC	0.56	ATT	0.55
TGC	0.44	ACA	0.53
TAG	0.60	AAC	0.46
TGT	0.42	AAA	0.51
TGA	0.44	AGT	0.45
CTT	0.53	AGG	0.38
CTG	0.46	GTT	0.45
CCT	0.45	GTC	0.44
CCC	0.59	GTG	0.35
CCG	0.47	GCA	0.49
CCA	0.51	GCG	0.48
CAT	0.55	GAT	0.44
CAC	0.51	GAC	0.48
Compound	R _f ^{a)}	Compound	R _f ^{a)}
CGC	0.46	GAG	0.48
CGA	0.38	GAA	0.50
CAG	0.44	GGC	0.42
CGG	0.38	GGT	0.46
CGT	0.49	GGG	0.35
		GGA	0.44

a) Thin layer chromatogram on silica gel in dichloromethane/methanol 9:1.

Example 5: Synthesis of the DNA fragment of a
length of 67 bases from base No. 96 to
base No. 162 of the DNA strand (96/97)

a) Removal of the 2-cyanoethyl protecting group from
the trinucleotides:

10 μ mol of the trinucleotides from Example 3 or 4 are dissolved, with the exclusion of moisture, in 60 μ l of pyridine/acetonitrile/triethylamine 1:1:1. After 1 hour at room temperature, 0.7 ml of peroxide-free ether is added dropwise and the precipitate is removed by centrifuging. The crude triethylammonium salt is dissolved in 50 μ l of pyridine and again precipitated with 0.5 ml of ether, centrifuged off, and dried in a high vacuum for 15 hours.

b) Coupling the partially protected trinucleotides
with the oligonucleotide chain bonded to
polystyrene resin:

All operations are carried out with the exclusion of moisture in a reaction vessel of 220 μ l capacity with microprocessor-controlled addition of solvent and reagent. 13 mg (0.74 μ mol) of the thymidine/polystyrene resin (Example 1) are placed in the reaction vessel and subjected to the following operations:

1. Methylene chloride, 2 ml/min., 4 min.
2. Methylene chloride/isopropanol (85:15), 2 ml/min., 2 min.
3. Zinc bromide 1M and 1,2,4-triazole 0.02M in methylene chloride/isopropanol (85:15), 2 ml/min., 2-3.5 min.
4. Methylene chloride/isopropanol (85:15), 2 ml/min., 4 min.
5. Triethylammonium acetate 0.5M in DMF, 2 ml/min.,

5 min.

6. Molecular sieve-dried pyridine, 2 ml/min., 3 min.
7. Tetrahydrofuran (peroxide-free, molecular sieve-dried), 2 ml/min., 3 min.
8. Nitrogen stream, 10 min.
9. Injection of 10 μ mol of trinucleotide GTC (tri-methylammonium salt from paragraph a)) and 8.9 mg (30 μ mol) of 1-mesitylenesulphonyl-3-nitro-1,2,4-triazole (MSNT) dissolved in 150 μ l of pyridine.
10. 45°C, 20 min.
11. Pyridine, 2 ml/min., 4 min.
12. Acetic anhydride 5% and 4-dimethylaminopyridine 2.5% in pyridine, 2 ml/min., 4 min.
13. Pyridine, 2 ml/min., 4 min.
14. Pyridine/isopropanol (1:1), 2 ml/min., 3 min.

All 14 operations are repeated 21 times, but in the 9th operation, instead of GTC the following trinucleotides, respectively, are used in the form of their triethylammonium salts (paragraph a)) in the sequence indicated: GCA, ACC, GAA, CCC, TAC, AGG, TGA, CGG, TAC, CGT, GTG, CCA, AAA, AAA, TGA, CGG, TGA, TTC, GGG, CCT, CAT. The mean coupling yield is 97%. The end product has the following structure:

MMT-CATCCTGGGTCTGACGGTGAAAAAAACCAGTGCGTTACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCGCAG
TCT-polystyrene

c) Removal of the DNA fragment from the carrier and removal of the protecting groups:

40.0 mg (approximately 0.60 μ mol) of DNA synthesis resin 96/67 are maintained at 50°C for 3 hours and at room temperature for 12 hours with 66 mg (0.40 mmol) of o-nitrobenzaloxime and 50 μ l (0.40 mmol) of 1,1,3,3-tetramethylguanidine in 400 μ l of 95% pyridine. After blowing off the pyridine with nitrogen, 1.6 ml of

aqueous ammonia (33%) are added to the residue and the whole is maintained for 24 hours at 50°C in a closed vessel.

The liquid phase separated off is freed of ammonia in vacuo and washed 3 times with 3 ml of peroxide-free diethyl ether each time. After removing the lower molecular weight constituents on a Biogel P6 column (100-200 mesh, 3x66 cm, 0.01 molar trimethylammonium bicarbonate pH 7.5, 1.5 ml/min.), 285 ODs (260 nm) of DNA are isolated.

A total of 60 ODs are separated on an HPLC column (PRP-1/Hamilton, 250 x 4.6 mm). Gradient (solution A: 0.05M triethylammonium acetate pH 7.0; solution B: solution A:acetonitrile 1:1): 30 % B in A → 60 % B in A in 20 min. at 50°C and 2 ml/min. The lipophilic main peak (retention time approximately 14 min.) is collected, concentrated over a DE52 cellulose (Whatman) column, eluted and precipitated with ethanol. To remove the 4-methoxytrityl protecting group, the precipitate is dissolved in 50 µl of acetic acid/H₂O (4:1) and maintained at room temperature for 45 minutes. The reaction product is lyophilised, precipitated with ethanol and, for purification, electrophoretically separated on an 8% polyacrylamide gel (7M urea). The band corresponding to the desired DNA size is cut out and the product is electroeluted, concentrated over DE52 cellulose and the DNA 96/67 of the following structure

5'-CATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAACCAGTGCGTTACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCG
CAGTCT-3'

is precipitated with ethanol.

Example 6: The following DNA fragments (5'-3') are produced analogously to Example 5:

1/58

CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGT

46/64 Complementary

CAGAACCCAGGATGCATTGTGTTACCGTGACCGCAAACGTTAGAACCTTCGCACAGGCACAGGTT

154/64 complementary

CAGGATCCTACTGCAGGTATTCTTCCGGGATTTCTTCGAAGTCACCGTCGTTGTGAGACTGCGG

Example 7: Phosphorylation of the fragments 1/58, 46/64 complementary, 96/67 and 154/64 complementary

The phosphorylation and the radioactive labelling at the 5'-ends is effected with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ and T_4 polynucleotide kinase (Boehringer) as described (18).

Example 8: Polymerisation to duplex II (fragment F_2 of the desulphatohirudin gene)

50 pmol in each case of kinased fragment 96/67 and kinased fragment 154/64 are dissolved in 24 μl of water, the solution is heated at 90°C for 3 minutes and cooled to 12°C within a period of 5 minutes. After the addition of 4 μl of endo-R buffer (0.1 molar tris·HCl pH 7.5, 66 mM MgCl_2 , 66 mM β -mercaptoethanol, 0.6M NaCl), 10 μl of deoxynucleoside triphosphate mixture (dATP, dCTP, dGTP, TTP, each 2×10^{-3} molar, adjusted with NH_3 to pH 7.0) and 2 μl (10 units) of DNA polymerase I, Klenow fragment (Boehringer) incubation is carried out for 30 minutes at 12°C . The reaction is stopped by heating at 90°C for 3 minutes and the mixture is stored at -80°C until required for further processing.

In an analogous manner the kinased fragments 1/58 and 46/64 are reacted to form duplex I (fragment F₁ of the desulphatohirudin gene).

Duplexes I and II have the following structures:

Duplex I

CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGTTG
GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTTGGACACGGACACGCTTCCAAG

TAACGTTTGGCGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCTG
ATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTTACGTAGGACCCAAGAC

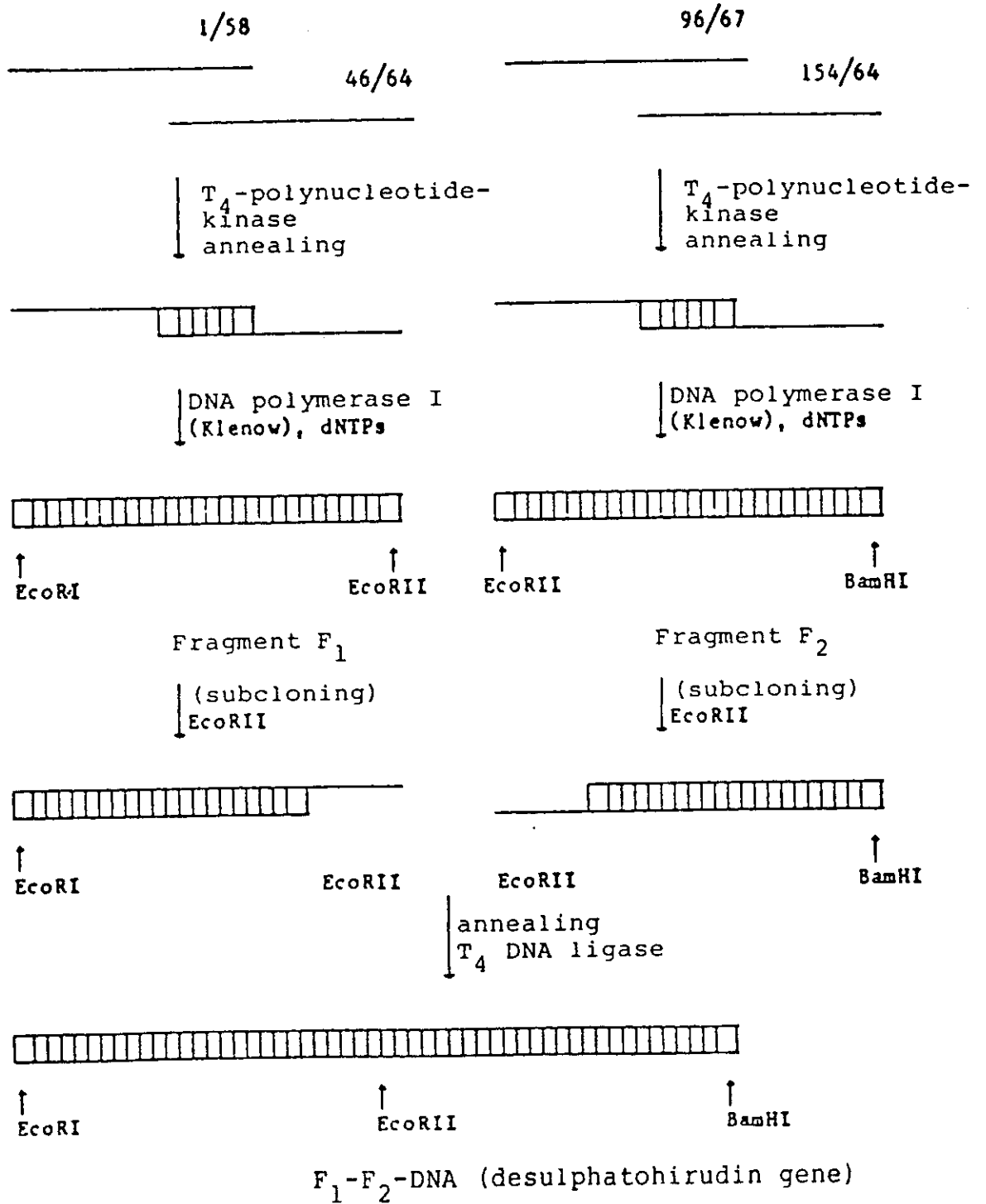
Duplex II

CATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAAACCAGTGCGTTACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCGCAGTCTC
GTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTTTGGTCACGCAATGGCCACTTCCATGGGGCTTTGGCGTCAGAG

ACAACGACGGTGACTTCGAAGAAATCCCGGAAGAATACCTGCAGTAGGATCCTG
TGTTGCTGCCACTGAAGCTTCTTTAGGGCCTTCTTATGGACGTCATCCTAGGAC

The manufacture of the fragments F₁ and F₂ of the desulphatohirudin gene is illustrated in the following scheme 1:

Scheme 5: Manufacture of the fragments F_1 and F_2 of the desulphatohirudin gene and of F_1 - F_2 DNA



Example 9: Polymerisation and ligation of the fragments 1/58, kinased 46/64, kinased 96/67, and 154/64; manufacture of the desulphatohirudin gene

In each case 50 pmol of fragment 1/58, kinased 46/64, kinased 96/67 and 154/64 are dissolved in 48 μ l of water, the solution is heated for 3 minutes at 90°C and cooled within 5 minutes to 12°C. After the addition of 8 μ l of Endo-R buffer (cf. Example 8), 20 μ l of deoxynucleoside triphosphate mixture (dATP, dCTP, dGTP, TTP, in each case 0.002 molar, adjusted to pH 7.0 with NH_3) and 2 μ l (10 units) of DNA polymerase I, Klenow fragment (Boehringer) incubation is carried out for 30 minutes at 12°C. The reaction is stopped by heating for 3 minutes at 90°C and the DNA is isolated, after extraction with phenol/-chloroform, by precipitation with ethanol. The resulting DNA mixture is dissolved in 100 μ l of ligase/buffer (66 mM tris·HCl pH 7.5, 6.6 mM MgCl_2 , 10 mM dithiothreitol, 5 mM ATP), 50 units (2 μ l) of T_4 DNA ligase (Biolabs) are added and the whole is incubated for 20 hours at 20°C. The reaction is stopped by heating for 5 minutes at 70°C and the DNA, after extraction with phenol/chloroform, is isolated by precipitation with ethanol. After separating the mixture on an 8% polyacrylamide gel (denaturing) by electrophoresis, the ligation product with 217 base pairs is electroeluted, concentrated on a DE52 cellulose column and, after elution, isolated by precipitation with ethanol.

The desulphatohirudin gene has the following structure

CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGT
 GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTTGGACACGGACACGCTTCCA

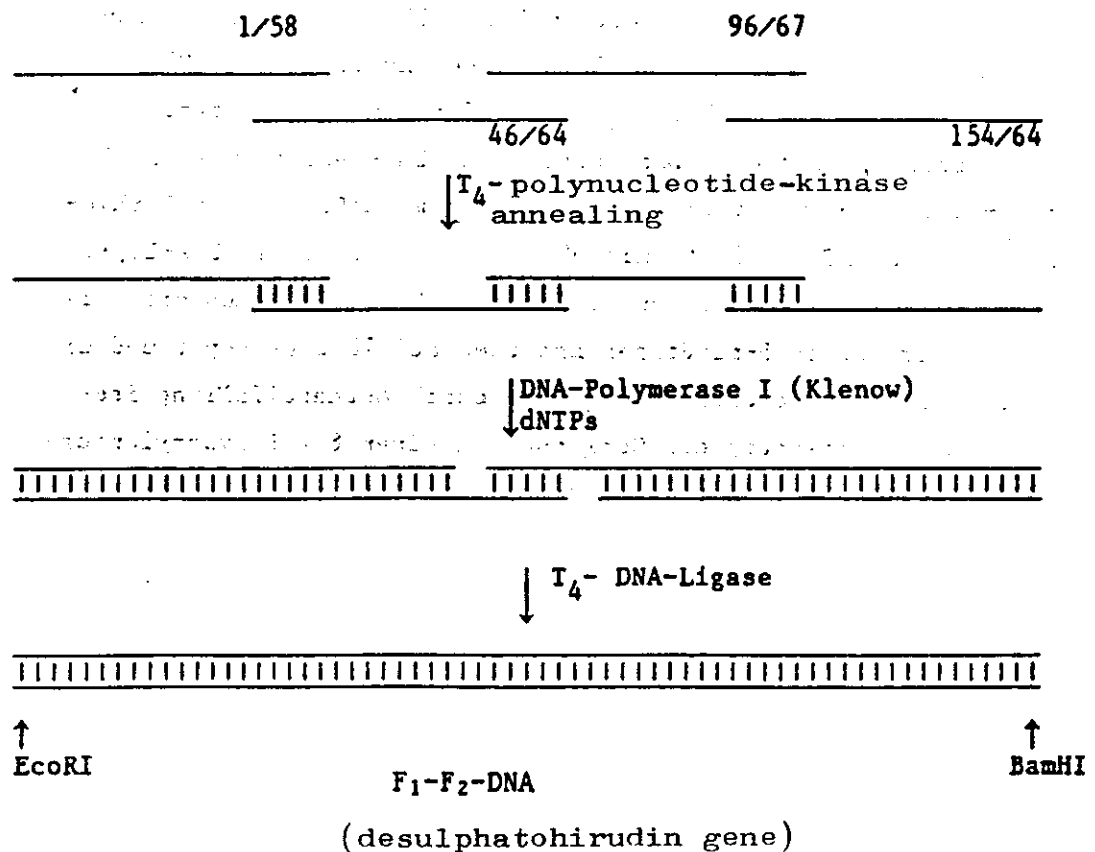
TCTAACGTTTGGCGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAACAGTGCCTT
 AGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTTACGTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTTGGTCACGCAA

ACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCGCAGTCTCACAACGACGGTGACTTCGAAGAAATCCCGGAAGAA
 TGGCCACTTCCATGGGGCTTTGGCGTCAGAGTGTTGCTGCCACTGAAGCTTCTTTAGGGCCTTCTT

TACCTGCAGTAGGATCCTG
 ATGGACGTCATCCTAGGAC

The manufacture of the desulphatohirudin gene from the four fragments is illustrated in the following scheme II:

Scheme 6: Manufacture of the hirudin gene from the four synthetic fragments



Example 10: Manufacture of the plasmid pML 300
 containing the F₁-DNA of the
 desulphatohirudin gene (Fig. 1)

a) Manufacture of the linearised vector pBR322/
 EcoRI/PvuII.

5 µg of pBR322 plasmid DNA are digested with 5 units of PvuII restriction endonuclease (Biolabs) in 200 µl of a solution of 100 µg/ml of gelatin for 1 hour at 37°C. Subsequently this solution is adjusted to 100 mM tris·HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl and the DNA is digested with 30 units of EcoRI restriction endonuclease (Biolabs) for 2 hours at 37°C. The solution is then adjusted to 50 mM tris-HCl pH 8 and, at a DNA concentration of 10 µg/µl, incubated with 2 units of intestinal alkaline calf phosphatase (Boehringer) for 30 mins at 37°C. The enzyme is inactivated by heating the solution for 60 minutes at 65°C. The solution is then standardised with TNE, extracted with 1 volume of phenol and chloroform, and the digested DNA is precipitated with 2 volumes of alcohol at -20°C overnight.

The vector (pBR322/EcoRI/PvuII, 2297 base pairs) excised from the pBR322 DNA is separated from the small DNA fragment (2067 base pairs) by gel electrophoresis on 1 % low-melting agarose (Biorad) in tris-acetate-EDTA buffer pH 8. After staining the DNA in the agarose gel with EtBr, the area of the gel that contains the DNA band of the pBR322/EcoRI/PvuII vector (= 2297 base pairs) is cut out of the gel and liquefied for 10 minutes at 65°C. 20 volumes of TNE are added to this DNA solution, the DNA is purified in accordance with Mueller et al. (19) by DE-52 chromatography, extracted with phenol/chloroform and the DNA is precipitated with alcohol at -20°C overnight. The

DNA precipitate is dissolved in 50 μ l of 0.01M tris·HCl (pH 8), 0.1 mM EDTA, and stored at -20°C until required for use. 1.4 μg (= 3.2 pmol of ends) of DNA are obtained.

b) Manufacture of F_1 -DNA/EcoRI

24 ng (= 1.3 pmol of ends) of the chemically synthesised F_1 -DNA (see Example 8) are digested with 5 units of EcoRI restriction endonuclease (Biolabs) in 50 μ l of 100 mM tris·HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gelatin for 30 minutes at 37°C . Subsequently, 0.06 μg (= 0.14 pmol of ends) of the linearised vector pBR322/EcoRI/PvuII (Example 10a) is added to the solution. The enzyme is then, by heating at 65°C , inactivated after 10 minutes, and the solution is standardised with TNE and extracted with phenol/chloroform. The DNA is precipitated with alcohol. The precipitated DNA is stored under alcohol at -20°C until required for further processing.

c) Ligation of pBR322/EcoRI/PvuII vector DNA with F_1 -DNA/EcoRI and construction of plasmid pML300

The DNA precipitate obtained in Example 10b), which contains the two mentioned DNA fragments, is dissolved in 20 μ l of a solution of 50 mM tris·HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 0.5 mM ATP and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gelatin and treated with 25 units/ μ l T_4 DNA ligase (Biolabs) at 15°C for 3 hours. In this manner the recombinant plasmid pML300, which contains the F_1 -DNA, is obtained in the solution.

d) Transformation of *E. coli* HB101 with plasmid pML300

The *E. coli* HB101 cells pretreated with calcium that are required for the transformation are produced as described by Mandel et al. (14).

The solution obtained in c), which contains the recombinant plasmid pML300, is heated at 65°C for 10 minutes in order to inactivate the T₄ DNA ligase and is then cooled to 37°C. 10 µl of this reaction mixture are added to 150 µl of calcium-treated *E. coli* HB101 cells in 10 mM MgCl₂ and 10 mM tris·HCl (pH 7.5) in a total volume of 200 µl.

Subsequently, this mixture is cooled in ice for 30 minutes, heated for 2 minutes at 42°C and then left to stand for 50 minutes in 1 ml of L-medium (cf. Example 18) at 37°C. The mixture is then spread out in aliquots of 0.2 ml on 5 agar plates (McConkey Agar, Difco), which contain 60 µg/ml of ampicillin (Serva). The agar plates are then maintained at 37°C for 16-18 hours. 484 ampicillin-resistant colonies of the transformed *E. coli* HB101 are obtained.

e) Screening the colonies that contain F₁-DNA

470 transformed colonies (Example 10d) are pressed off onto nitrocellulose filter B85 (Schleicher and Schüll). In accordance with Grunstein and Hogness (20) the colonies are lysed and their denatured DNA is fixed on the filter. Subsequently prehybridisation of the filters is carried out in 20 ml (per filter) of 4xSET [= solution of 30 mM tris·HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA], 0.1 % (w/v) Ficoll 400 (Pharmacia), 0.5 % SDS, 50 µg/ml denatured calf thymus DNA for 4 hours at 64°C. Subsequently the nitrocellulose filters are treated in 20 ml (per filter) of 5xSET (w/v) Ficoll

400, 0.2 % SDS and 50 µg/ml denatured calf thymus DNA for 16 hours at 64°C with the ³²P radioactively labelled probe (approximately 10³-10⁴ Cerencov' cpm per filter). The oligonucleotide 46/64 complementary (cf. Example 6) is used as probe.

Subsequently, the filters are washed twice in 2xSET, 0.2 % SDS at room temperature, then twice in 2xSET, 0.5 % SDS at 60°C (first for 30 minutes, then for 60 minutes). The filters are then dried between 3 MM paper (Whatman) and placed at -80°C on an X-ray film (Fuji) with an intensifying screen (Ilford) for 1-2 days.

The resulting autoradiogram shows 71 positive colonies (clones) which can be used for further processing, one of which received the designation pML300.

Example 11: Manufacture of plasmid pML305, which contains the F₂-DNA of the desulphatohirudin gene (Fig. 2)

a) Manufacture of linearised vector pBR322/BamHI/NruI

5 µg of pBR322 plasmid DNA are digested with 30 units of BamHI restriction endonuclease for 30 minutes at 37°C in a solution of 100 mM NaCl, 6 mM tris·HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl₂ and 100 µg/ml gelatin. 15 units of PvuII restriction endonuclease are then added to the solution and the solution is digested for 2 hours at 37°C.

The reaction mixture is heated at 70°C for 10 minutes in order to inactivate the enzyme. Subsequently the two DNA fragments are separated from each other by gel electrophoresis on 1 % low-melting agarose in tris-acetate-EDTA buffer, pH 8. (see Example 10a).

The DNA band of the pBR322 BamHI/PvuII vector (= 2672 base pairs) is cut out, liquefied, and purified in accordance with Mueller et al. (19) by DE-52 chromatography. 0.75 μ g (= 1.5 pmol of ends) of DNA are obtained.

b) Manufacture of F₂-DNA/BamHI

25 μ g (= 1.3 pmol of ends) of chemically synthesised F₂-DNA (Example 8) are digested with 16 units of BamHI restriction endonuclease (Biolabs) in 20 μ l of 150 mM NaCl, 6 mM tris·HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl₂ and 100 μ g/ml gelatin for 30 minutes at 37°C. 60 ng (= 96 nmol of ends) of the linearised vector pBR322/BamHI/PvuII (Example 11a) are then added to the solution, the whole solution is standardised with TNE and extracted with phenol/chloroform, and the DNA is precipitated with 2 volumes of alcohol. The precipitated DNA is stored under alcohol at -20°C until required for further processing.

c) Ligation of pBR322/BamHI/PvuII vector DNA with F₂-DNA/BamHI and construction of plasmid pML305

The DNA precipitate obtained in Example 11b), which contains the two mentioned DNA fragments, is dissolved in 20 μ l of a solution of 50 mM tris·HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, and 100 μ g/ml gelatine and treated with 15 units/ μ l T₄ DNA ligase (Biolabs) at 15°C for 3 hours. In this manner the recombinant plasmid pML305, which contains F₂-DNA, is obtained in the solution.

d) Transformation of E. coli HB101 with plasmid pML305

The transformation of the calcium-treated E. coli HB101 cells is carried out as described in Example 10d). 10 μ l of the reaction mixture obtained in Example 12c) are used. 313 ampicillin-resistant colonies are obtained.

e) Screening the colonies that contain F₂-DNA

65 transformed colonies (Example 11d) are examined for F₂-DNA in the manner described in Example 10e). The oligonucleotide 154/64 complementary (cf. Example 6) is used as radioactive probe. 2 positive colonies are obtained in the autoradiogram, one of which is designated pML305.

Example 12: Characterisation of clones pML300 and pML305

The DNAs of recombinant plasmids pML300 and pML305 are isolated in accordance with Ish-Horowitz (21). The nucleotide sequences of the F₁-DNA and F₂-DNA inserts are ascertained in accordance with Maxam and Gilbert (11). For this purpose, in each case 10 μ g of plasmid DNA of pML300 are cleaved with EcoRI restriction endonuclease and 10 μ g of plasmid DNA of pML305 are cleaved with BamHI restriction endonuclease and the linearised DNAs are isolated by gel elution from agarose gel [cf. Example 10a)]. Subsequently the isolated DNAs are digested with alkaline phosphatase and chromatographed over DE-52 (cf. Example 11a). The DNAs are then radioactively labelled at the 5'-end with [γ -³²P]ATP (specific activity > 5000 Ci/mmol, Amersham) and T₄ polynucleotide kinase (P-L-Biochemicals).

The radioactively labelled DNAs are then cleaved with a second restriction endonuclease (EcoRII). The resulting DNA fragments are isolated by gel elution from agarose. In the case of pML300 the nucleotide sequence of F₁-DNA is then determined from the EcoRII-EcoRI* fragment (approximately 109 base pairs) and in the case of pML300 that of F₂-DNA is determined in the EcoRII-BamHI* fragment (approximately 122 base pairs).

(* indicates the DNA end that is radioactively labelled).

The nucleotide sequences that are determined for F₁-DNA and F₂-DNA are identical to those illustrated in Example 8.

Example 13: Manufacture of expression plasmid pML310

- a) Construction of linearised vector pHRi148/EcoRI/BamHI, which contains the trp promoter-operator (Fig. 3 and Fig. 4)

A. Construction of plasmid p159

10 µg of plasmid pBRH_{trp} (22) are cleaved with 50 units of EcoRI (Biolabs) for 60 minutes at 37°C and the digestion mixture, after phenol extraction, is fractionated on a saccharose density gradient (5-23%) in 50 mM tris·HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA in a TST41 (Kontron AG) rotor. The centrifugation lasts for 14 hours at 40,000 revs/min and 15°C. 0.3 ml fractions are collected with an ISCO gradient collector at 1 ml/min. The fractions that contain the smaller fragment are combined, the solution is standardised with TNE and precipitation is effected with 2 volumes of ethanol at -20°C. After centrifugation in an Eppendorf centrifuge, the DNA is dissolved in 100 µl of

10 mM tris·HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA. 5 µg of this DNA fragment are cleaved with 5 units of BglIII (Biolabs) for 60 minutes at 37°C. The reaction mixture is extracted with phenol and chloroform and the DNA is incubated with 2 volumes of ethanol at -80°C for 10 minutes; the DNA is collected by centrifugation and dissolved again in 50 µl of 50 mM tris·HCl (pH 8.0). 2 µl of this solution are removed (0.2 µg of DNA) and incubated at a DNA concentration of 10 ng/µl in 50 mM tris·HCl (pH 8.0) with 1 unit of intestinal alkaline calf phosphatase (Boehringer) for 30 minutes at 37°C. The enzyme is inactivated by heating the solution for 60 minutes at 65°C. 0.04 µg of DNA is removed and incubated 5'-terminally with 10 µCi [γ -³²P]-ATP (>5000 Ci/mmol, Amersham) and 5 units of T₄ polynucleotide kinase (P-L Biochemicals) in 20 µl of reaction volume in 50 mM tris·HCl (pH 9.5), 10 mM MgCl₂, and 5 mM DTT, for 30 minutes at 37°C. The radioactive sample is mixed with the non-labelled sample (see above) and the DNA fragments are fractionated by a 5-23 % saccharose density gradient in 50 mM tris·HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA in a TST60 rotor. The centrifugation is carried out for 5 hours at 60,000 revs/min and 15°C. 0.2 ml fractions are collected. The radioactivity of each fraction is determined by measuring the Cerencov radiation and the fragments are thereby identified. The desired fractions, which contain the small DNA fragment, are combined, the DNA is precipitated with 2 volumes of ethanol and, after centrifugation, is dissolved again in 20 µl of 10 mM tris·HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA.

The ³²p-labelled EcoRI-BglIII DNA fragment is partially cleaved with 0.2 units of TaqI (Biolabs) in 50 µl volume for 10 minutes at 37°C. The reaction mixture is adjusted to 0.2% SDS, 10% glycerin, 10 mM

EDTA, 0.05% bromophenol-blue, and the DNA fragments are separated on a 6% polyacrylamide gel in tris-borate-EDTA (23). The band containing the desired EcoRI-TaqI (the largest partial fragment) is identified on the autoradiogram. This fragment (L, see Fig. 3) is extracted from the gel and purified (19) and dissolved in 10 μ l of 10 mM tris·HCl pH 7.5, 1 mM EDTA.

There is used as acceptor plasmid pBR322, which is cleaved with ClaI and EcoRI: 2 μ g of pBR322 are digested with 4 units of ClaI (Biolabs) in 20 μ l of reaction volume for 60 minutes at 37°C. The protein is extracted with phenol and the DNA is then precipitated with 2 volumes of ethanol at -80°C for 10 minutes. The DNA is collected by centrifugation and then digested with 10 units of EcoRI (Biolabs) for 30 minutes at 37°C in 20 μ l of reaction volume. Subsequently, 2 volumes of 0.1M tris·HCl (pH 8.7) are added to the solution and the whole is incubated with 1 unit of alkaline calf phosphatase (Boehringer) at 37°C for 30 minutes. The phosphatase is then inactivated by incubation at 65°C for 60 minutes.

100 ng of the acceptor plasmid are incubated with 5 μ l of fragment L-DNA in 15 μ l of reaction volume in 10 mM MgCl₂, 20 mM tris·HCl (pH 7.8), 10 mM DTT, 0.5 mM ATP with 30 units per μ l of reaction volume of T₄ DNA ligase (Biolabs) for 2 hours.

5 μ l of this solution are added to a mixture that contains 150 ml of E. coli HB101 cells treated with calcium chloride (14) in 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ and 10 mM tris·HCl (pH 7.5) in a total volume of 200 μ l. The mixture is cooled for 20 minutes in ice, heated for 1 minute at 42°C and incubated for 10 minutes at 20°C. 1 ml of tryptone medium [tryptone medium contains 10 g of bacto-tryptone (Difco); 1 g of yeast extract (Difco); 1 g of glucose; 8 g of NaCl and 294 mg of CaCl₂·2H₂O

in 1 litre of distilled water] is added and the mixture is incubated for 30 minutes at 37°C while agitating at 300 revs/min. The mixture is plated on two agar plates (McConkey Agar, Difco; 0.6 ml/plate), supplemented with 50 µg/ml of ampicillin (Sigma). The plates are incubated for from 12 to 17 hours at 37°C.

The plasmid DNA of 10 different colonies is isolated as follows:

The colonies are, as above, used for inoculation of 10 ml of tryptone medium supplemented by 50 µg/ml of ampicillin, in a 25 ml Erlenmeyer flask. The cultures are agitated for from 15 to 18 hours at 37°C and 300 revs/min. The cells are harvested by centrifuging (Sorval, HS-4 rotor, 10 minutes at 4000 revs/min., 4°C). Approximately 0.1 g of cells are obtained, and these are resuspended in 1 ml of 50 mM tris·HCl (pH 8.0). 0.25 ml of lysozyme solution [10 mg/ml in 50 mM tris·HCl (pH 8.0); lysozyme is marketed by Sigma] are added and, after incubation for 10 minutes at 0°C, 0.15 ml of 0.5 mM EDTA (pH 7.5) are added. After a further 10 minutes at 0°C, 60 µl of 2% Triton X-100 (Merck) are added. After 30 minutes at 0°C the sample is centrifuged for 30 minutes at 15,000 revs/min and 4°C in a Sorval SA-600 rotor. The supernatant is deproteinated with 1 vol. of phenol (saturated with TNE). The phases are separated by centrifuging (Sorval HB-4 rotor) for 10 minutes at 5000 revs/min and 4°C. The upper phase is extracted twice with 1 vol. of chloroform. Pancreatic RNase A (Sigma; 10 mg/ml in TNE preheated for 10 minutes at 85°C) is added until a final concentration of 25 µg/ml is reached and the mixture is incubated for 40 minutes at 37°C. The solution is then adjusted with 1M NaCl and 10% polyethylene glycol 6000 (Fluka, treated for 20 minutes at 120°C in an autoclave) and incubated for

2 hours at -10°C . The precipitate is collected in a Sorval HB-4 rotor (20 minutes at 10,000 revs/min., 0°C) and dissolved again in 100 μl of TNE. The DNA solution is extracted with 1 volume of phenol and the DNA is precipitated with 2 volumes of ethanol for 10 minutes at -80°C . The precipitate is collected by centrifuging in an Eppendorf centrifuge and the DNA is dissolved again in 20 μl of 10 mM tris·HCl (pH 7.5) and 0.5 mM EDTA. 8 to 10 μg of plasmid DNA are obtained from a 10 ml culture.

The plasmid DNAs are analysed after digestion with the following restriction enzymes:

In each case 0.5 μg of plasmid DNA is cleaved with HpaI (Biolabs) and with HpaI (Biolabs) and EcoRI (Biolabs) with ClaI (Biolabs) according to standard directions, in accordance with the instructions of the enzyme manufacturer. The DNAs are fractionated on a 1% agarose gel in 40 mM tris·acetate (pH 7.8), 1 mM EDTA and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide. The desired plasmids contain an HpaI site and, after digesting 3 times, yield in addition to the large DNA fragment 2 smaller fragments which are larger than the small EcoRI-ClaI fragment of pBR322. One of these plasmids is designated p159 (see Fig. 3).

B. Construction of plasmid pHRI145

2 μg of p159 DNA are digested with 10 units of EcoRI (Biolabs) for 30 minutes at 37°C . The DNA is extracted with phenol, precipitated with ethanol and, after centrifugation, dissolved in 10 μl of 10 mM tris·HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA. The DNA digested with EcoRI is furthermore treated with 5 units of DNA polymerase (Klenow fragment) (Boehringer) in 10 mM MgCl_2 , 10 mM β -mercaptoethanol, 50 mM NaCl, 0.1 mM dATP (P&L Biochemicals), 0.1 mM dTTP (P&L Biochemicals)

for 15 minutes at 12°C. The polymerase is then inactivated by incubation at 85°C for 5 minutes. The reaction mixture is diluted in 20 mM tris·HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP (Sigma) by a factor of 10 and incubated with 30 units of T₄ DNA ligase per µl of reaction mixture for 1 hour at 15°C.

50 ng of the DNA are transformed in E. coli (in the manner described above) and plated out on McConkey agar plates supplemented with 50 µg/ml ampicillin.

The plasmid DNAs of 10 different colonies are isolated in the manner described above. The plasmid DNAs are analysed by digesting with EcoRI. The desired plasmids are EcoRI-resistant. The analysis is carried out in the manner described above. One of the desired plasmids is designated Hri145 (Fig. 3).

C. Construction of plasmid pHri148

2 µg of pHri145-DNA are treated with 5 units of ClaI (Boehringer) for 60 minutes at 37°C, then deproteinated by means of phenol extraction. The DNA is precipitated with ethanol and then dissolved in 20 µl of 10 mM tris·HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA. The projecting ends are, as described above, made up with DNA polymerase I (Klenow fragment), except that dATP and dTTP are replaced by dCTP (P&L Biochemicals) and dGTP (P&L Biochemicals). The polymerase is inactivated by incubation at 85°C for 5 minutes. 2 volumes of 0.1M tris·HCl (pH 8.7) are added to the reaction mixture which is incubated with 0.5 units of calf phosphatase (Boehringer) for 30 minutes at 37°C. The reaction mixture is deproteinated by extraction with phenol. The DNA is precipitated with ethanol and dissolved in 8 µl of 10 mM tris·HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA.

A chemically synthesised DNA linker of the formula
5'-GAATTCATGGTACCATGGAATTC-3'
is phosphorylated at the 5' end by incubating 8 pmol of
the linker with 5 μ Ci [γ - ^{32} P]-ATP (5500 Ci $\cdot$ mmol $^{-1}$
Amersham) in 8 μ l of reaction volume that contains
0.1 mM rATP (Sigma), 50 mM tris $\cdot$ HCl (pH 9.5), 10 mM
MgCl $_2$, 5 mM DTT and 2 units of T $_4$ polynucleotide
kinase (P&L Biochemicals) for 30 minutes at 37 $^{\circ}$ C.
The reaction is stopped by freezing at -80 $^{\circ}$ C.

The radioactively labelled linker is then treated
with 1 μ g of ClaI and phosphatase and ligated with
pHR1145-DNA (see above) in a 20 μ l reaction volume that
contains 0.5 mM rATP (Sigma), 10 mM DTT (Calbiochem),
20 mM tris $\cdot$ HCl (pH 7.8), 1 mM MgCl $_2$ and 800 units
of T $_4$ DNA ligase (Biolabs). The incubation is
carried out for 2 hours at 15 $^{\circ}$ C. The ligase is
inactivated by incubation at 85 $^{\circ}$ C for 10 minutes.
Subsequently, 2 volumes of water are added, the sodium
chloride concentration is adjusted to 10 mM and 20
units of KpnI (Biolabs) are added over 30 minutes at
37 $^{\circ}$ C. After extraction with phenol and chloroform,
the mixture is fractionated through 0.9% low-melting
agarose gel (Biorad) in 40 mM tris $\cdot$ acetate (pH 7.8),
1 mM EDTA and 0.5 μ g/ml ethidium bromide. The band,
visible by UV radiation, that demonstrates the same
mobility as a marker DNA of the same size is cut out
with a scalpel. The portion of gel is melted for
5 minutes at 65 $^{\circ}$ C and then cooled to 37 $^{\circ}$ C. A
volume of approximately 20 μ l is obtained. 5 μ l of
this solution are removed and incubated for 12 hours at
15 $^{\circ}$ C with 400 units of T $_4$ ligase (Biolabs) in 10 μ l
of reaction volume, which has been adjusted to 0.5 mM
ATP, 10 mM DTT, 10 mM MgCl $_2$, 20 mM tris $\cdot$ HCl (pH 7.8).
1/10 volume of a solution with 100 mM tris $\cdot$ HCl (pH
7.5), 100 mM CaCl $_2$ and 100 mM MgCl $_2$ are added to

the ligase mixture (solidified at 15°C) and the whole is incubated at 65°C for 5 minutes. The solution is then used to transform calcium-treated E. coli HB101 cells in the manner described above. Plating out on McConkey Agar plates supplemented with 50 µg/ml ampicillin is carried out.

The plasmid DNAs of 10 different colonies are isolated in the manner described above, and the DNA is subjected to the following restriction enzyme analysis: In each case 0.5 µg of plasmid DNA is cleaved in succession with KpnI (Biolabs), NcoI (Biolabs) and EcoRI (Biolabs) in accordance with the instructions of the enzyme manufacturer. The cleavage products are fractionated on 1% agarose gels in 40 mM tris⁺ acetate (pH 7.8), 1 mM EDTA, 0.5 µg/ml ethidium bromide. All plasmids exhibit one of these enzyme cleavage sites each, as desired. One is designated HRi148.

The plasmid HRi148 contains a tryptophan promoter-operator and a ribosomal binding site up to and including ATG. Hirudin and also other heterologous genes can be coupled directly by way of the EcoRI, NcoI, KpnI sites occurring once in the plasmid. Furthermore, this construction renders possible direct coupling and expressing of heterologous genes without the ATG necessary for the initiation of translation having to be present on the corresponding gene. This can easily be achieved by cleaving with NcoI and making up the projecting ends with DNA polymerase I, in the manner described, or by cleaving with KpnI and removing the projecting ends by nuclease S₁. The plasmid HRi148 is thus an expression plasmid with broad application.

D. Manufacture of the linearised vector pHRi148/
EcoRI/BamHI

5 µg of plasmid DNA of pHRi148 are digested with the restriction endonucleases EcoRI and BamHI. The excised vector pHRi148/EcoRI/BamHI is isolated by means of density gradient centrifugation.

b) Manufacture of F₁-DNA/EcoRI/EcoRII and
F₂-DNA/BamHI/EcoRII

I. Manufacture of F₁-DNA/EcoRI/EcoRII

5 µg of plasmid DNA of pML 300 are first digested with 10 units of EcoRI restriction endonuclease in 50 µl of a solution of 100 mM tris·HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl and 100 µg/ml gelatine for 1 hour at 37°C. An aliquot (0.5 µg) of this linearised plasmid DNA/EcoRI is isolated by gel elution from an agarose gel (cf. Example 10a)) and radioactively labelled with [γ -³²P]ATP (cf. Example 12). The main amount of the plasmid DNA/EcoRI is then mixed with this radioactively labelled DNA, digested with EcoRII restriction endonuclease and the EcoRII-EcoRI* DNA fragment (109 base pairs) is separated by gel electrophoresis on 8% polyacrylamide. 200 µg of F₁-DNA/EcoRI*/EcoRII are isolated by gel elution.

II) Manufacture of F₂-DNA/BamHI/EcoRII

5 µg of plasmid DNA of pML 305 are cleaved with 10 units of BamHI restriction endonuclease. An aliquot (0.5 µg) of this linearised plasmid DNA/BamHI is isolated by gel elution from an agarose gel (cf. Example 10a)) and radioactively labelled with [γ -³²P] (cf. Example 12). The main amount of the plasmid

DNA/BamHI is then mixed with this radioactively labelled DNA, digested with EcoRII restriction endonuclease and the EcoRII-BamHI* DNA fragment (122 base pairs) is separated by gel electrophoresis on 8% polyacrylamide. 250 µg of the F₂-DNA/BamHI*/EcoRII are isolated.

c) Ligation of F₁-DNA with F₂-DNA and construction of the expression plasmid pML310

10 ng (= 473 nmol of ends) of F₁-DNA/EcoRI/EcoRII and 9 ng (= 495 nmol of ends) of F₂-DNA/BamHI/EcoRII are treated in a volume of 20 µl with T₄ DNA ligase in the manner already described in Example 10c). Subsequently, the mixture is extracted with phenol/chloroform and the DNA is precipitated with alcohol. The DNA precipitate is then dissolved as described in Example 10c) and digested with EcoRI and BamHI restriction endonuclease. The solution is then standardised with TNE and 30 ng (= 50 nmol of ends) of the vector DNA pHR148/EcoRI/BamHI (cf. Example 13aD) are added. Subsequently, the solution is again extracted with phenol/chloroform and the DNA is precipitated with alcohol. The precipitated DNA mixture is treated in the manner indicated in Example 10c) with T₄ DNA ligase (Biolabs). In this manner there is produced in the solution a recombinant plasmid that contains as insert F₁-F₂-DNA (desulphato-hirudin gene).

d) Transformation of E. coli HB101 with plasmid pML310

The transformation of E. coli HB101 cells treated with calcium is carried out in the manner described in

Example 10d). 10 μ l of the reaction mixture obtained in Example 13c) are used. 420 ampicillin-resistant colonies are obtained.

e) Screening the colonies that contain F_1 - F_2 -DNA

18 transformed colonies (Example 13d) are examined for their F_1 - F_2 -DNA content in the manner described in Example 10e). A mixture of the oligodeoxynucleotides described in Examples 5 and 6 is used as radioactive probe. In the autoradiogram 12 positive colonies are obtained, five of which are designated pML310, pML311, pML312, pML313, pML314.

Example 14: Characterisation of the clone pML310

The characterisation of the F_1 - F_2 -DNA sequence in the recombinant plasmid pML310 is effected by sequencing the F_1 - F_2 -DNA according to Maxam and Gilbert (11) in the manner described in Example 12. 10 μ g of plasmid DNA are examined. The nucleotide sequence of the F_1 - F_2 -DNA is identical to that described for the synthetic desulphatohirudin gene.

Example 15: Manufacture of the expression plasmid pML315

a) Ligation of F_1 -DNA with F_2 -DNA and construction of the expression plasmid pML315

24 μ g (= 1.3 pmol of ends) and 26 μ g (= 1.3 pmol of ends) of chemically synthesised F_1 -DNA and F_2 -DNA, respectively, (see Example 8 and scheme I) are digested in a volume of 20 μ l with 5 units of EcoRII restriction endonuclease (Biolabs) in 50 mM

tris·HCl (pH 8), 5 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 100 ug/ml gelatin for 30 minutes at 37°C. Subsequently, the mixture is extracted with phenol/chloroform and the DNA is precipitated with alcohol. The DNA precipitate is then dissolved as described in Example 10c) and treated with T₄ DNA ligase for 3 hours at 15°C. The mixture is then extracted with phenol/chloroform and precipitated in the manner described in Example 10b). The DNA precipitate is subsequently dissolved (cf. Example 10c)) and digested with EcoRI and BamHI restriction endonuclease for 30 minutes at 37°C. 70 ng (= 0.1 pmol of ends) of the linearised vector pHRi148/EcoRI/BamHI (Example 13aD) are then added to the solution, the whole solution is standardised with TNE and extracted with phenol/chloroform and the DNA is precipitated with 2 volumes of alcohol.

The resulting DNA precipitate, which contains both DNA fragments (F₁-F₂-DNA/EcoRI/BamHI and pHRi148/EcoRI/BamHI), is dissolved in 20 µl of a solution of 50 mM tris·HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, 100 ug/ml gelatin and treated with 15 units/µl T₄ DNA ligase (Biolabs) at 15°C for 3 hours. In this manner there is produced in the solution the recombinant plasmid pML315 which contains the F₁-F₂-DNA (=desulphatohirudin gene).

b) Transformation of E. coli HB101 with plasmid pML315

10 µl of the mixture containing plasmid pML315 (Example 15a) are used for the transformation of calcium-treated E. coli HB101 cells. Approximately 236 ampicillin-resistant colonies are obtained.

c) Screening the colonies that contain F₁-F₂-DNA

Transformed colonies (Example 15b) are examined for the presence of F₁-F₂-DNA in the manner indicated in Example 13e).

Five positive colonies are obtained, which are designated pML315 to pML319.

Example 16: Manufacture of expression plasmid pML320

a. Ligation of synthetic F₁-F₂-DNA with vector DNA pHRi148/EcoRI/BamHI

20 ug of the totally synthetically produced desulphatohirudin gene (F₁-F₂-DNA, cf. Example 9) are digested in 20 ul of a solution of 50 ul of 100 mM tris·HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl and 100 ug/ml gelatin with the restriction enzyme EcoRI and then with BamHI. The solution is standardised with TNE, whereupon 30 ug (= 50 nmol of ends) of the vector DNA pHRi148/EcoRI/BamHI (cf. Example 13aD) are added. The solution is extracted with phenol/chloroform and the DNA is precipitated with alcohol. The DNA precipitate is treated with T₄ DNA ligase (Biolabs) in the manner indicated in Example 10c). In this manner there is produced in the solution a recombinant plasmid (pML320) which contains the F₁-F₂-DNA (hirudin gene) as insert.

b. Transformation of E. coli HB101 with plasmid pML320

The transformation of the E. coli HB101 cells treated with calcium is carried out as described in Example 10d). 10 ul of the reaction mixture obtained

in Example 16a) are used. 173 ampicillin-resistant colonies are obtained.

c) Screening the colonies that contain F₁-F₂-DNA

11 transformed colonies (Example 16b)) are examined for their F₁-F₂-DNA content in the manner described in Example 10e). A mixture of the oligodeoxynucleotides described in Examples 5 and 6 is used as radioactive probe. 14 positive colonies are obtained in the autoradiogram. Five of these are designated pML320, pML321, pML322, pML323 and pML324.

Example 17: Characterisation of clones pML315 and pML320

The characterisation of the F₁-F₂ sequences in the plasmids pML315 and pML320 is carried out by sequencing the F₁-F₂-DNA according to Maxam and Gilbert (11) in the manner described in Example 12. The nucleotide sequences of the DNA inserts of both plasmids are identical to those of the synthetic hirudin gene.

Example 18: Synthesis of polypeptides with hirudin activity by means of E. coli cells that contain plasmids with recombinant hirudin genes

a. Synthesis of polypeptides with hirudin activity

Each of the 15 clones that contain the recombinant desulphatohirudin gene, namely

E. coli HB101 pML 310, E. coli HB101 pML 311, E. coli HB101 pML 312,
E. coli HB101 pML 313, E. coli HB101 pML 314, E. coli HB101 pML 315,
E. coli HB101 pML 316, E. coli HB101 pML 317, E. coli HB101 pML 318,
E. coli HB101 pML 319, E. coli HB101 pML 320, E. coli HB101 pML 321,
E. coli HB101 pML 322, E. coli HB101 pML 323, E. coli HB101 pML 324

is tested for the formation of hirudin activity.

For this purpose, the above-mentioned clones are cultivated in 5 ml of L-medium overnight (16 hours) at 37°C and 250 revs/min. L-medium is composed of the following:

Bacto tryptones	10 g
Bacto yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Glucose	5 g
Ampicillin	0.1 g

Next day, 1 ml of this overnight culture is transferred into 25 ml of M9-medium. M9-medium is composed of the following:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13.25 g
KH_2PO_4	3.0 g
NaCl	0.5 g
NH_4Cl	1.0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.015 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
casamino acids	2.5 g
vitamin B ₁	0.0099 g
glucose	5.0 g
ampicillin	0.1 g

Cultivation is carried out at 37°C and 250 revs/min until the bacterial suspension has reached an

optical density (OD₆₂₃) of approximately 0.9-1.0. The cells (5 ml of the growing culture) are then harvested and the bacteria are resuspended in 0.5 ml of a solution of 50 mM tris·HCl (pH 8) and 30 mM NaCl. Subsequently the suspension is adjusted to 1 mg/ml of lysozyme (Boehringer) and placed in ice for 30 minutes. By alternate freezing of the suspension in liquid nitrogen and thawing at 37°C the bacteria are destroyed. This operation is repeated five times, then the mixture is centrifuged for 30 minutes at 16000 revs/min at 4°C. The supernatants are examined for desulphatohirudin content by adding antibodies (cf. Example 18), testing the supernatants in HPLC or measuring the inhibition of thrombin (15).

The following results are obtained:

Bacteria extract	desulphatohirudin formation
<u>E. coli</u> HB101 pML 310	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 311	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 312	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 313	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 314	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 315	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 316	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 317	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 318	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 319	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 320	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 321	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 322	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 323	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 324	+
<u>E. coli</u> HB101 pHRI 148 (control)	-
<u>E. coli</u> HB101 pBR322 (control)	-
<u>E. coli</u> HB101 (control)	-

Example 19: Detection of the hirudin activity

Approximately 5-10 μ l of a sample that contains polypeptides with hirudin activity (cf. Example 18) are dripped onto 1 cm^2 of nitrocellulose paper (NZ) (BIORAD) and dried for 30 minutes at room temperature. Subsequently, the NZ is incubated for 1 hour at 37°C in a solution of 3 % serum albumin in 0.01M tris·HCl (pH 8) and 0.9 % NaCl.

The NZ is then washed in a solution of 0.01M tris·HCl (pH 8) and 0.9 % NaCl for 30 minutes, the solution being changed five times. Subsequently, the washed NZ is treated for 2 hours at 25°C in a solution of 3 % serum albumin in 0.01M tris·HCl (pH 8) and 0.9 % NaCl that contains 2 $\mu\text{g/ml}$ of antibodies (antibodies produced from rabbits or monoclonal antibodies) to hirudin. Then, the NZ is washed as described above.

The NZ is subsequently treated for 2-3 hours at 25°C with a solution of 3 % serum albumin in 0.01M tris·HCl (pH 8) and 0.9 % NaCl that contains 0.2 $\mu\text{Ci/ml}$ of ^{125}I -protein A (sp. activity 89.8 $\mu\text{Ci/mg}$) (NEN). The NZ is then again washed in the manner described above, dried and, in a γ -counter (Multi Gamma, 1260 gamma counter, LKB, Wallace), the bound radioactivity is measured, which is a measurement for the polypeptide with hirudin activity present on the NZ.

In an alternative process, the above sample is subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) [cf. (24)]. The PAGE electropherogram is transferred onto NZ by electro-blotting. Subsequently, the NZ is treated in the manner described above and/or autoradiographed overnight together with an X-ray film (Fuji). Areas on the NZ that contain polypeptides with hirudin activity appear on the film as black flecks.

Example 20: Isolation and purification of desulphato-
hirudin with the aid of a thrombin column

a. Manufacture of the polypeptide solution for the
thrombin column.

150 ml of culture liquor (obtained according to Example 18) are cooled to 4°C and the cells are removed by centrifugation (5000 revs/min., 15 minutes, Sorvall RC 3B). The clear supernatant has no hirudin activity.

The cells are then suspended in 12 ml of lysis buffer (50 mM tris·HCl pH 8, 30 mM NaCl). 15 mg of lysozyme (Boehringer) are added to this mixture and the whole is then kept at 4°C for 30 minutes. The cells are then destroyed by freezing in liquid nitrogen and then thawing at 37°C four times. Subsequently, the mixture is centrifuged for 30 minutes at 16000 revs/min and 4°C. The supernatant has hirudin activity. 7.7 g of solid ammonium sulphate are then dissolved in the supernatant (15 ml). The turbid mixture is left to stand at 4°C for 30 minutes and then centrifuged (see above). The wet sediment is dissolved in 1 ml of 0.05 mM tris·HCl pH 8 buffer and the desired polypeptide solution is obtained.

b. Purification of hirudin on a thrombin column

The thrombin column (bed volume 4 ml) is equilibrated with 0.05M tris·HCl pH 8. 5 ml portions of the polypeptide solution obtained above are applied to the column at 4°C with a flow rate of 7 ml/hour. Washing is then carried out with 25 ml of 0.05M tris·HCl (pH 8). The first fractions contain the non-adsorbed polypeptides, which are discarded. The column

is then washed with 10 ml of 1.5M benzamidine (Merck) [cf. (25)] in 0.05M tris·HCl (pH 8) and the resulting fractions are examined for hirudin activity using the thrombin test (15). The fractions that contain the polypeptides are ascertained by measuring the OD_{280nm}. Fractions 25 and 26 contain the hirudin activity; they are stored at -20°C or, until required for further processing, in an ice bath. The hirudin activity in fraction 25 is 20 µg/ml and in fraction 26 is 52 µg/ml. The fractions are then dialysed or desalinated on Sephadex-G25 (Pharmacia).

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (24) of the product indicates a molecular weight of approximately 7000-8000 Daltons and whole number multiples thereof (oligomers).

c. Manufacture of the thrombin column

Affi gel 10 (Bio Rad) is, in accordance with the manufacturer's directions, washed with cold distilled water and coupling buffer pH 8.5 (0.1M NaHCO₃/Na₂CO₃ solution). A 50 % suspension of the gel in coupling buffer (4 ml) is transferred into a plastics tube, mixed with the same amount of thrombin solution (120 mg in 4 ml of coupling buffer) (Calbiochem) and rotated overnight at 4°C. The gel is then washed with coupling buffer. To block the active sites that are still free, the gel is treated for 3 hours at 4°C with 0.1 ml of 1M ethanolamine-HCl (pH 8.0) per gel, then washed with phosphate-buffered sodium chloride solution containing 10 mM sodium azide per ml of gel, and maintained at 4°C in this solution. The degree of coupling is ascertained by measuring the extinction at 280 nm and amounts to from 15 to 30 mg of hirudin per ml of gel.

4 ml of the resulting thrombin gel are used to produce the affinity column.

Example 21: Transformation of various E. coli strains with plasmid pML310 and cultivation of the transformed host cells

In a manner analogous to that described in Example 10d), the strains E. coli JA221, E. coli LM1035 and E. coli W3110Δ102 are transformed with the plasmid pML310. Transformed colonies are examined for the presence of F₁-F₂-DNA in the manner described in Example 10e). 5, 3 and 5 positive colonies, respectively, are obtained which are designated as follows:

E. coli JA221/pML310/1
E. coli JA221/pML310/2
E. coli JA221/pML310/3
E. coli JA221/pML310/4
E. coli JA221/pML310/5
E. coli LM 1035/pML310/1
E. coli LM 1035/pML310/2
E. coli LM 1035/pML310/3
E. coli W3110Δ102/pML310/1
E. coli W3110Δ102/pML310/2
E. coli W3110Δ102/pML310/3
E. coli W3110Δ102/pML310/4
E. coli W3110Δ102/pML310/5

The clones mentioned are cultivated in a modified M9-medium, which has the following composition:

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	9.0 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
NaCl	0.5 g

NH ₄ Cl	3.5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.015 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
casamino acids	7.0 g
yeast extract	5.0 g
vitamin B ₁	0.0099 g
iron(III) citrate	0.006 g
MOPS (3-morpholinopropane-1-	
sulphonic acid)	34.0 g
glucose	20.0 g
ampicillin	0.1 g

Cultivation is carried out at 37°C and 180 revs/min until the bacterial suspension has reached an optical density (OD₆₂₃) of approximately 1. Then, the cells (5 ml of the growing culture) are harvested and the bacteria are resuspended in 0.5 ml of a solution of 50 mM tris.HCl (pH 8) and 30 mM NaCl. Subsequently, the suspension is adjusted to 1 mg/ml lysozyme (Boehringer) and placed in ice for 30 min. The bacteria are disintegrated by alternately freezing the suspension in liquid nitrogen and thawing at 37°C. This operation is repeated 5 times. Subsequently, the mixture is centrifuged for 30 min. at 16000 revs/min at 4°C.

All clones are examined for the formation of polypeptides with hirudin activity by measuring the inhibition of thrombin (15). Hirudin activity (300-600 ng/ml culture solution) is detected in all bacterial extracts. For example, the following hirudin activities are ascertained:

Strain	hirudin activity (µg/l culture solution)
<u>E. coli</u> LM1035/pML310/1	300
<u>E. coli</u> JA 221/pML310/1	500
<u>E. coli</u> W3110Δ102/pML310/1	600

Example 22: Fermentation of the transformed strain
 E. coli W3110Δ102/pML310/1 in a 5000
 litre fermenter, and working up of the
 culture broth

In a manner analogous to that described in Example 21, E. coli W3110Δ102/pML310/1 cells in 3000 litres of modified M9-medium are cultivated in a 5000 litre fermenter until the suspension has reached an optical density (OD₆₂₃) of approximately 10-13.

The culture broth (pH 7.4) is cooled to 10°C, and the cells are treated with an Alfa-Laval BRPX-207 desliming apparatus. The clear supernatant contains no hirudin activity and is discarded. During desliming the slime chamber is continuously partially deslimed with lysis buffer A (50 mM tris.HCl, 30 mM NaCl, adjusted with HCl to pH 8.0) and when desliming is complete the contents of the centrifuging vessel (7 l) are discharged with complete desliming with lysis buffer A. The resulting cell mass is adjusted with buffer A to 375 l and has a pH value of 7.6. After being cooled to 5-10°C, the suspension is conveyed through a Dyno mill (type KD5) which is provided with 4.2 l of glass beads of 0.5-0.75 mm diameter. There the cells are disintegrated. The resulting suspension is adjusted with acetic acid to an acetic acid content of around 2 % (v/v) and stirred overnight at 10°C. The suspension with a pH of 3.9 is deslimed by the above-

described method. The clear supernatant of 300 l is concentrated to 35 l in a falling film evaporator (hourly capacity 60 l of water). The slightly turbid concentrate is centrifuged and the resulting clear supernatant is diafiltered on an ultrafiltration unit DDS = Lab 35, which is fitted with GR 81 PP membranes (surface area 2.5 m^2), against 2 % acetic acid or 0.02M tris.HCl pH 7.5 buffer. The final volume is 31 l.

An aliquot portion of 2 l of this clear protein solution is applied to a Sephadex G-50 F-column (KS 370 Pharmacia) with a bed volume of 96 l, the column being equilibrated with 2 % acetic acid. The main fraction contained in 15 l of eluate is concentrated by means of ultrafiltration and then diafiltered against water. The resulting clear aqueous solution is lyophilised. The working up can be carried out as described in the following Examples.

Example 23: Cultivation of the strain E. coli
 W3110Δ102/pML310/1 on a laboratory scale

The strain E. coli W3110Δ102/pML310/1 is incubated in shaken flasks at 37°C and 200 revs/min for 24 hours. The medium has the following composition (g/l):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9.0 g
KH_2PO_4	3.0
NaCl	0.5
CaCl_2	0.015
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25
iron(III) citrate	0.006
MOPS	40

NH ₄ Cl	3.5
casamino acids	7.0
yeast extract	5.0
cerelose (glucose)	20
ampicillin	0.1

The medium has a pH value of 6.54. During cultivation an optical density (OD_{605nm}) of 14.9 is reached.

The cells (50 ml of the growing culture) are harvested and resuspended in 5 ml of a solution of 50 mM tris.HCl (pH 8.0) and 30 mM NaCl. Subsequently, the suspension is shaken with 5 g of cooled glass beads (diameter 0.5 mm), or by the addition of lysozyme (Boehringer), final concentration 1 mg/ml, at intervals during 30 to 45 minutes on a Multi-Tube Vortexer at high intensity. 0.5 ml of 2 % acetic acid are added to 0.5 ml of the mixture which is then centrifuged at 12,000 revs/min for 20 minutes at 4°C. The supernatant solution is examined for hirudin activity (inhibition of thrombin). The thrombin-inhibition test is carried out as follows:

The test is based on the determination of the enzymatic removal of p-nitroaniline from the substrate Chromozym TH (tosyl-glycyl-prolyl-arginine-4-nitroanilide-acetate). The p-nitroaniline formed is measured colorimetrically at 405 nm (Micro-Elisa Auto Reader, Dynatech, Kloten). The test is carried out in microtitre plates with flat bases (Costar, Serocluster, catalogue No. 3590). The reaction time is 2 hours at 37°C in the incubation chamber. For the test, 20 µl of the solution to be determined are diluted with 30 µl of filling buffer (0.2M tris.HCl pH 7.5, 1M NaCl, 100 µg/ml bovine serum albumin), and 20 µl of enzyme solution [10 mg of lyophilised thrombin from human plasma (Boehringer) dissolved in 1 ml of bidistilled

water and diluted approximately 1:400 with the above filling buffer] and 150 μ l of substrate solution [20 ng chromozym TH (Boehringer) dissolved in 4 ml of bidistilled water and diluted 1:15 with the above filling buffer] are added. All solutions are measured against a blank solution consisting of 70 μ l of filling buffer (see above) and 150 μ l of substrate solution and against an enzyme control solution consisting of 50 μ l of filling buffer, 20 μ l of enzyme solution and 150 μ l of substrate solution. The OD_{405nm} value of the enzyme control solution after 2 hours at 37° shows 100 % activity and should amount to approximately 0.8 ± 0.2 . The thrombin inhibition (as a %) of the samples is calculated in accordance with the following formula:

$$\% \text{ thrombin inhibition} = 100 - \frac{100 \times \text{OD}_{405\text{nm}} \text{ of sample}}{\text{OD}_{405\text{nm}} \text{ of enzyme control solution}}$$

The supernatant solution has a thrombin inhibition of 49.7 %/20 μ l.

Example 24: Purification process for enriching hirudin compounds from culture broths

In a manner analogous to that described in Example 22, the strain E. coli W3110 Δ 102/pML310/1 is cultivated in a fermenter. The cells are then disintegrated, centrifuged off, and the concentrated supernatant is treated with acetic acid and then ultrafiltered or dialysed. Solutions obtained in such a manner can be purified, for example, by means of ion exchange chromatography.

a) Anion exchange chromatography on a MONO Q column (Pharmacia) for obtaining thrombin inhibiting fractions

8.5 ml of protein solution (20 mM tris.HCl pH 7.5/150 mM NaCl) are applied to the Mono Q column by means of a chromatography system produced by Pharmacia (fast protein liquid chromatography FPLC) and eluted under the following conditions:

Experimental conditions: column: Mono Q, 4.6 mm x 150 mm. Buffer A: 20 mM tris.HCl pH 7.5; buffer B: 20 mM tris.HCl/1M NaCl. Linear salt gradient: A: elution in the course of 9 ml with 15 % buffer B, increase in the course of 10.7 ml to 70 % buffer B. AUFS 1.0 at 280 nm, 1 ml fractions.

In the exclusion volume (fractions 1-10) a large protein peak is separated off from the subsequently eluted hirudin compounds. In the thrombin test, fractions 17-23 exhibit a thrombin inhibition of between 20 and 100 %, the main fraction (fractions 20 and 21) with 92 % inhibition being eluted at a concentration of approximately 500 mM NaCl.

b) Anion exchange chromatography on a DEAE cellulose column for enriching hirudin compounds

10 ml of a dialysate is subjected to anion exchange chromatography on DE 53 (Whatman) at pH 7.5 (chromatography conditions: column 1 x 5 cm (10 ml). Elution buffer A: 20 mM ammonium acetate, 100 mM NaCl, pH 7.5. Elution buffer B: 20 mM ammonium acetate, 1M NaCl, pH 4.0. Linear salt gradient using 4 column volumes of each of buffer A and buffer B respectively). Hirudin compounds elute from 0.4M NaCl. This is

detected by the thrombin inhibition test.

c) Desalination on P-6 DG "Desalting Gel" (Bio-Rad)

110 ml of dialysate (20 mM tris.HCl, pH 7.5, concentrated protein solution from 2.6 l of supernatant) were separated on DE 53 in a manner analogous to that described in Example 24b. Hirudin compounds elute between fractions 46 and 52 (150 ml) separately from various more quickly eluting non-active protein peaks, and are concentrated to approximately 12 ml using a rotary evaporator. The resulting clear protein solution is applied to a Biogel P-6 DG column and eluted with water.

Experimental conditions: Column 2.5 x 9 cm, stationary phase 45 ml Biogel P-6 DG Desalting Gel, flow rate 1.15 ml/min, 4.6 ml fractions. The salt content can be checked by measuring conductivity or by testing by means of silver nitrate (AgCl precipitation). The main activity elutes between fractions 7 and 10, this being ascertained by means of the thrombin inhibition test. Fractions 8-10 (13.5 ml) are combined, concentrated to 1 ml using a rotary evaporator, and the clear solution is applied to a Sephadex G 50 fine column (Pharmacia) with a bed volume of 160 ml, the column being equilibrated with 1 % acetic acid.

d) Gel filtration on Sephadex G50 fine (Pharmacia)

Experimental conditions: column: Sephadex G50 fine (31 g), 2.5 cm x 64 cm, volume 310 ml; solvent: 1 % acetic acid; flow rate 43 ml/h, 3.8 ml fraction size. AUFS: 0.1 at 282 nm. Paper feed 3.0 cm/h. Detection

of the eluted activity is effected by the thrombin inhibition test. The main fraction contained in 50 ml of eluate (fractions 39-52) elutes more quickly than non-active secondary components (fractions 53 to 80). The thrombin inhibition of the active fractions is between 80 and 100 %.

e) Cation exchange chromatography on CM cellulose for preliminary enrichment of active lysates

10 ml of dialysate [20 mM tris.HCl, concentrate (1:20) from 200 ml of supernatant, pH 2.0 adjusted with 3 ml of 4N HCl] were separated on a cation exchanger (CM-cellulose). Hirudin compounds elute in the exclusion volume between fractions 4 and 8. Detection is effected by means of the thrombin inhibition test. Fractions 5 and 6 inhibit by 89 % and 88 % respectively per 20 µl eluate.

Experimental conditions: Column: 1.5 x 8 cm, stationary phase: 19 ml CM-cellulose (Ios MZ-3146). Flow rate: 43 ml/h, 3.8 ml fractions. Linear salt gradient buffer A: 20 mM NH₄OAc, pH 2 adjusted with 4N HCl, buffer B: 200 mM NH₄OAc pH 6.5, using 5 column volumes of each, AUFS 1.0 at 282 nm.

Example 25: Fermentation of the transformed strain
 E. coli W3110Δ102/pML310/1 and working
 up of the culture broth

In a manner analogous to that described in Example 22, E. coli W3110Δ102/pML310/1 cells in 8 l of medium L are cultivated for 5 hours in a fermenter, the suspension reaching an optical density (OD₆₂₃) of approximately 5.

The cells centrifuged from the culture broth (pH 7.2) are cooled to 10°C and disintegrated by lysozyme treatment and by repeatedly (4x) alternately freezing in liquid nitrogen and thawing to approximately 30°C. The resulting suspension (2.5 l) is diluted with 1.5 % acetic acid (2.4 l) and stirred for 30 minutes at 4°C. The precipitated bacterial proteins and other cell constituents are centrifuged off for 30 minutes at 9000 revs/min at 4°C. The clear supernatant of 3.2 l is concentrated to 320 ml using a rotary evaporator (Buchi). The concentrate is dialysed overnight against 20 mM tris.HCl pH 7.5 at 4°C and the slightly turbid dialysate is centrifuged again. The final volume is 300 ml. The clear protein solution (0.02M tris.HCl pH 7.0) is applied to a diethylaminoethylcellulose (DE53, Whatman) (20 g) column with a bed volume of 20 ml, the column being equilibrated with buffer A (buffer A: 20 mM ammonium acetate/100 mM NaCl, pH 7.5). First, washing is carried out with 1 column volume (45 ml) at constant flow (43 ml/h) and then elution is carried out with a linear salt gradient using 5 column volumes of each of buffer A and buffer B respectively (buffer B: 20 mM ammonium acetate/4M NaCl, pH 5.0). The main fraction (fractions 24-26) contained in 100 ml of eluate and active in the thrombin inhibition test is dialysed overnight at 4°C against 20 mM tris.HCl pH 7.5 and then concentrated using a rotary evaporator at 35°C to a final volume of 5 ml.

The resulting clear aqueous solution is applied to a Sephadex G-50 fine column (Pharmacia) with a bed volume of 160 ml, the column (2.5 x 64 cm Biorad) being equilibrated with 5 % acetic acid. The main activity contained in 50 ml of eluate (fractions 5-7, flow 50 ml/h, 25 min./fraction) is concentrated using a rotary evaporator and then subjected to a reverse phase HPLC

separation. An aliquot (500 µl) of the individual fractions is concentrated 1:10 using a "speed vac" concentrator (Savant) and examined by means of reverse phase HPLC analysis for its content of desulphato-hirudin compounds. The solutions contain desulphato-hirudin compounds. Fraction 6 (18 ml) contains the smallest percentage proportion of secondary components and is further purified by means of semipreparative reverse phase HPLC.

Experimental conditions: Vydac 218 TP 510 RP-HPLC column, 10 x 250 mm; aliquot portions of fraction 6 (200 µl concentrated 1:10) per separation; AUFS 0.5 at 220 nm; flow rate: 2 ml/min. Eluant: A: 0.1 % trifluoroacetic acid, B: acetonitrile/water 8:2 + 0.07 % trifluoroacetic acid, 1 min. 16 % B, then increase in the course of 40 min. to 64 % B. The resulting fractions are diluted 1:1 with water and lyophilised. The residue consists of pure desulphatohirudin compounds.

Example 26: Analysis of the product mixture from
 the fermentation of E. coli
 W3110Δ102/pML310/1

The fractions active in the thrombin inhibition test obtained according to Example 25 are subjected to HPLC analysis under two different sets of conditions.

a) Experimental conditions No. 1: Nucleosil (MN) C18, 5 µm RP-HPLC column, 4.6 x 120 mm; 50 µl hirudin compounds per separation, att. 6 at 214 nm; flow rate 1.2 ml/min.; eluant: A: 0.1 % trifluoroacetic acid, B: acetonitrile/water 8:2 with 0.07 % trifluoroacetic acid, 2 min. 16 % B, then increase in the course of 30 min. to 64 % B. Counterpressure: 107 bars.

Fractions are taken at one minute intervals (a total of 30) and subjected to the thrombin inhibition test and the antibody test (cf. Example 19). Fractions 12-15 prove active. Furthermore, the amino acid composition, the N-terminus and the C-terminus are determined for the active hirudin compound of fraction 14. This fraction (No. 14) is in addition compared with desulphatohirudin, which is obtained in a manner analogous to that described in Example 28 by reacting natural hirudin from leeches with the enzyme arylsulphatase. The results are compiled in the following table 1:

Table 1:

Fraction	Retention time (min.)	Thrombin inhibition (%)	Antibody test Δ (cpm)
Fr 12	11.75	+ 35	+
Fr 13	12.50	++	+
Fr 14	12.80	++ 79	+ 13850
Fr 15	13.14	+ 27	+ 12440
Control	-	- 9	- 250
desulphato- hirudin	12.8	++ 86	+

Fractions of the control strain E. coli W3110Δ102 (control) are not active either in the thrombin inhibition test or in the antibody test. Such fractions are obtained by cultivating the non-transformed strain E. coli W3110Δ102 under the same conditions as those described in Example 22 and by

working up the culture broth in accordance with Example 25.

b) Experimental conditions No. 2: RP-HPLC column, Vydac 218 TP 5415 4.6 x 150 mm; 100 µl (1:10 conc.) fraction 6 (cf. Example 25) per separation; AUFS 0.1 at 214 nm; flow rate 1.2 ml/min.; eluant: A: 0.1 % trifluoroacetic acid, B: acetonitrile/water 8:2 + 0.07 % trifluoroacetic acid. Gradient: 2 min. 16 % B, then increase in the course of 3 min. to 20 % B, then increase in the course of 15 min. to 25 % B, then increase in the course of 27 min. to 64 % B. Counter-pressure 160 bar.

Fractions active in the thrombin inhibition test and in the antibody test are listed in the following Table 2. The table also contains the concentrations of NaCl in mM that are necessary for eluting the fractions from a Mono Q-column (anion exchange chromatography) (cf. Example 24a), as well as the longest wave UV absorption bands of some fractions. All fractions exhibit, in addition, a positive reaction with anti-hirudin antibodies (cf. Example 30).

Table 2

Fraction No.	Retention time (min.) RP-HPLC	Thrombin-inhibition %	Anti-body test Δ /cpm	FPLC	UV($\lambda_{\max}$) mM NaCl	Yield μ g
1	15.63	97.8 ± 2	16,196	350	223s,274	4
2	16.83	91.9 ± 2	14,157	390	275	1.6
3	18.43	79.9 ± 2	9,257			1
4	19.6	81.7 ± 5	11,877	420		1.5
5	20.6	50.4 ± 5	7,647	460		1.5
6	21.53	66.1 ± 5	9,584	500	273	1.5
Control	-	0	508			-
PBS-buffer	-	-	66			-
desulphato-hirudin	15.45	97.3 ± 2	15,400	350	274	c. 4

Example 27: Characterisation of desulphatohirudin compounds from the fermentation of the strain E. coli W3110 Δ 102/pML310/1

I. The hirudin compound from fraction 14 (cf. Example 26 under "Experimental conditions No. 1", Table 1) or fraction 1 (cf. Example 26 "Experimental conditions No.2", Table 2) is characterised as follows:

a) Determination of the amino acid composition

Approximately 2.5 μ g of hirudin compound are hydrolysed for 24 hours with 6N HCl at 110°C and then

analysed in accordance with Chang et al. (DABS-Cl method) (reference 31). The hydrolysate has the following composition

Amino acid	Hydrolysate		Amino acid	Hydrolysate	
Asp	9.8	(9)	Ile	1.8	(2)
Thr	4.2	(4)	Leu	3.9	(4)
Ser	4.4	(4)	Tyr	1.5	(2)
Glu	12.6	(13)	Phe	1	(1)
Pro	3.7	(3)	His	1.1	(1)
Gly	9.3	(9)	Lys	3.4	(3)
Val	3.5	(4)	Met	0	(0)
Cystine	2.2	(3)	Total		(65)

b) Partial sequence analysis

5 µg (750 pmol) of the hirudin compound is subjected to a conventional sequence analysis according to Edman and the N-terminal phenylthiohydantoin (PTH)-amino acids are determined by means of RP-HPLC.

Result:

Cycle	1		5		10
Amino acid	Val	Val	Tyr	Thr	Asp n.d. Thr Glu Ser Gly

Cycle	11		15
Amino acid	Gln	Asn	Leu n.d. Leu n.d. Glu

(n.d. = not determined).

The N-terminal sequence of the biosynthetic hirudin compound examined is thus identical to that of natural hirudin (reference 1).

c) Determination of the C-terminal amino acids by means of carboxypeptidase Y degradation

The time-dependent degradation of C-terminal amino acids with carboxypeptidase Y indicates as C-terminus

60 65
- Ile - Pro - Glu - Glu - Tyr - Leu - Gln

The determination of the amino acids was effected with the amino acid analyser. It is shown that Tyr⁶³ is not sulphated (desulphatohirudin!).

The main product from the fermentation of the transformed strain E. coli W3110Δ102/pML310/1 is, as the structural data and the comparison with desulphatohirudin obtained from natural hirudin show, desulphatohirudin.

II. The structure of the remaining fermentation products is not yet completely determined. The fractions 2-6 (cf. Table 2) are defined compounds which are adequately defined by way of HPLC and FPLC data and by the UV-absorption maximum. These compounds are certainly desulphatohirudin-like compounds which differ from desulphatohirudin by a structural micro-heterogeneity (for example different linked S-S bridges) or by modification at the N- or C-terminus (for example N-terminal methionyl residue or N-terminally acylated, such as formylated or acetylated).

In the case of fermentation of the strains E. coli LM1035/pML310/1, E. coli JA221/pML310/1 and E. coli HB101/pML310 too, desulphatohirudin can be identified as the main product.

Example 28: Manufacture of desulphatohirudin from
natural hirudin for comparison purposes

Natural hirudin is dissolved at 2 mg/ml of buffer (0.1M ammonium acetate, pH 5.5). 100 µl of a desalinated arylsulphatase (Boehringer) solution that contains 16 µg of arylsulphatase are added to 20 µg of hirudin (10 µl solution). The whole is incubated at 25°C and the reaction is followed by means of HPLC analysis. After 6 hours' incubation more than 90 % of the hirudin is desulphated. The retention time of the desulphatohirudin formed is, under the conditions described in Example 26 ("Experimental conditions a"), 12.8 min. and, under the conditions described in Example 26 ("Experimental conditions b"), 15.45 min.

The amino acid composition, the sequence analysis by means of Edman degradation and the determination of the C-terminal amino acids by carboxypeptidase Y degradation yield the result expected for desulphatohirudin.

Example 29: Expression of desulphatohirudin
compounds in yeast (*S. cerevisiae*)

The expression of foreign proteins in yeast requires a defined expression system. It should contain a strong yeast-promoter, preferably an inducible yeast-promoter, and suitable transcription stop signals on a plasmid vector with which yeast cells can be transformed. The vector also contains DNA sequences, preferably yeast 2µ sequences, that guarantee extra-chromosomal replication with high copy number. It should furthermore contain a selection marker for yeast, preferably the yeast LEU2 gene, and pBR322 DNA sequences with replication origin and selection marker,

preferably the ampicillin resistance gene, for use in E. coli. Such vectors are suitable as so-called shuttle vectors for multiplication in E. coli and yeast.

An expression system that meets these pre-requisites is described in European Patent Application No. 100,561 and illustrated with examples for efficient expression in yeast. Foreign genes are expressed from yeast under the control of the inducible PH05 promoter of acidic phosphatase. PH05 promoter, foreign gene and PH05 transcription stop are integrated in series in the yeast vector pJDB207, which also contains DNA sequences of the yeast 2 μ plasmid, the yeast LEU2 gene, the ampicillin resistance gene and the E. coli replication origin.

The expression plasmid pJDB207R/PH05-HIR is manufactured as follows:

a) Isolation of the pJDB207 vector fragment;

6 μ g of the plasmid pJDB207R/IF(α -3) (EP 100,561) are completely digested with the restriction endonuclease BamHI. The resulting DNA fragments (6.85 kb and 1.15 kb) are precipitated with ethanol and taken up in 400 μ l of 50 mM tris.HCl pH 8.0. 4.5 units of calf intestinal phosphatase (Boehringer, Mannheim) are added. The mixture is incubated for 1 hour at 37°C, then the phosphatase is inactivated at 65°C for 1.5 hours. The solution is adjusted to 150 mM NaCl and then applied to a DE52 (Whatman) anion exchange column (100 μ l volume) which has been equilibrated beforehand with 10 mM tris.HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA. After a washing operation with the same buffer, the DNA is eluted with 400 μ l of 1.5M NaCl, 10 mM tris.HCl pH 7.5, 1 mM EDTA and precipitated with ethanol. The large

6.85 kb BamHI fragment is separated from the small fragment on a 1.2 % agarose gel in tris-borate-EDTA buffer pH 8.3.

b) Isolation of the 534 bp PH05 promoter fragment

6 ug of the plasmid p31/R (EP 100,561) are digested with the restriction endonucleases EcoRI and BamHI. The resulting 3 DNA fragments are separated on a 1.2 % agarose gel in tris-borate-EDTA buffer pH 8.3. The 534 bp BamHI-EcoRI fragment is isolated. It contains the PH05 promoter including the transcription start sites.

c) Isolation of a 206 bp DNA fragment with the sequence coding for hirudin

9 ug of the plasmid pML310 (cf. Example 13c) are completely digested with the restriction enzymes BamHI and EcoRI. The resulting two DNA fragments are separated on a 1.2 % agarose gel in tris-borate-EDTA buffer pH 8.3. The 206 bp EcoRI-BamHI fragment is isolated.

d) Ligation of the DNA fragments

The three DNA fragments mentioned in section a-c (see above) are obtained from agarose gel blocks by electroelution, purified over DE52 (Whatman) anion exchangers, precipitated with ethanol and resuspended in H₂O.

0.1 pmol (0.45 ug) of the 6.85 kb BamHI vector fragment, 0.3 pmol (0.1 ug) of the 534 bp BamHI-EcoRI PH05 promoter fragment and 0.25 pmol (34 ng) of the 206 bp EcoRI-BamHI fragment of pML310 are ligated in 15 ul of 60 mM tris.HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT,

1 mM ATP with 600 units of T₄ DNA ligase (Biolabs) at 15°C for 16 hours.

24 transformed amp^R colonies are separately cultivated in LB medium with 100 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA is isolated in accordance with the method of Holmes et al. (32) and analysed by a HindIII/-EcoRI double digestion. The appearance of an approximately 600 bp large EcoRI-HindIII fragment indicates that in the clone concerned the PH05 promoter-hirudin DNA fragment is in the correct orientation to the transcription stop signals on the vector. As expected, approximately 50 % of the clones have the correct orientation of the insert. One of these clones is designated pJDB207R/PH05-HIR.

e) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* GRF18:

Saccharomyces cerevisiae strain GRF18 (α , his3-11, his3-15, leu2-3, leu2-112, can^R) is transformed with the plasmid pJDB207R/PH05-HIR in accordance with the protocol of Hinnen et al. (12). Selection for transformed yeast cells is carried out on agar plates with yeast minimal medium without leucine. A transformed yeast colony is isolated and designated *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207R/PH05-HIR.

f) Cultivation of *S. cerevisiae* GRF18/pJDB207R/-
PH05-HIR:

Cells of *S. cerevisiae* GRF18/pJDB207R/PH05-HIR are agitated in 20 ml of yeast minimal medium (Difco Yeast Nitrogen Base without amino acids with the addition of 2 % glucose and 20 mg/l L-histidine) at 30°C and cultivated to a cell density of 3×10^7 cells/ml. The cells are washed in 0.9 % NaCl and then

used for inoculating 50 ml cultures in low P_i -minimal medium. Low P_i -minimal medium is prepared corresponding to the composition of Difco Yeast Nitrogen Base medium (without amino acids), but contains 0.03 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l KCl, and 10 g/l L-asparagine instead of $(NH_4)_2SO_4$, 2 % glucose and 1 g/l L-histidine. The cultures are inoculated up to a cell density of 4×10^6 cells/ml and agitated at 30°C for 24 hours at 200 revs/min.

g) Analysis of the product mixture from the fermentation of *S. cerevisiae* GRF18/pJDB207R/PH05-HIR

The cells (cf. Example 29f) are disintegrated as usual (cf., for example, European Patent Application No. 100,561). The supernatant treated with 1.5 % acetic acid is centrifuged and each 2 ml of the clear solution is dried on a "Speed Vac" concentrator and in high vacuum. The samples are dissolved individually in 100 μ l of water and subjected to HPLC analysis (conditions as in Example 26a). The thrombin inhibition of the individual fractions is tested. The fraction with a retention time of 12.8 min has a thrombin inhibition of 89.6 %. According to amino acid composition this fraction is desulphatohirudin.

Example 30: Test kit with monoclonal anti-hirudin
 antibodies for the determination of
 hirudin by competitive radioimmunoassay

a. Manufacture of the monoclonal anti-hirudin anti-
 bodies

A) Immunisation of mice

Pure hirudin (3 mg) in lyophilised form is dissolved in a small amount of 0.1 % acetic acid and then made up to 3 ml with phosphate-buffered sodium chloride solution. The pH is adjusted to 7.2. Portions of this antigen solution are mixed with identical amounts of complete Freund's adjuvant or phosphate-buffered sodium chloride solution.

Female Balb/c mice (8 weeks old, obtained from the animal farm at Sisseln, Switzerland) are injected intravenously with 100 µg of hirudin solution in buffered sodium chloride solution. Four days later the spleen is removed for fusion.

B) Manufacture of the hybridoma and antibody test

The manufacture of the hybridoma cells is carried out by fusing the obtained spleen cells with the myeloma cell line X 63-Ag.8.6.5.3 (26). 10^8 spleen cells and 10^7 myeloma cells are used. The fusion is carried out in the manner described in (27).

The determination of the anti-hirudin activity in the hybridoma supernatants is carried out by means of a radioimmunoassay [RIA, (28)].

C) Isolation and purification of the anti-hirudin antibodies from ascites

Balb/c mice are pretreated intraperitoneally with 0.4 ml of pristane (Carl Roth). After one week, 2 to 5×10^6 cloned hybridoma cells are injected intraperitoneally. Ascitic fluid is repeatedly taken from each mouse and frozen at -80°C . The accumulated fluid is thawed and centrifuged for 30 minutes at 4°C and 16,000 revs/min. The fat is filtered off with suction and 0.9 volume equivalents of a saturated ammonium sulphate solution is slowly added dropwise, while stirring at 0°C , to the remaining debris-free supernatant. The resulting crude immunoglobulin fraction is passed through Sephacryl G 2000 (Pharmacia) using 0.1 mM tris·HCl (pH 8.2), in accordance with the instructions of the manufacturer. Active fractions are combined and concentrated with Amicon XM50 filter (Amicon).

b. Test kit for competitive radioimmunoassay

A solution of anti-hirudin antibodies produced according to Example 30aC) is diluted with phosphate-buffered sodium chloride solution (PBS solution) to a concentration of 1 μg per 100 μl . 100 μl of this solution are incubated for 2 hours at 37°C in small plastics tubes or on plastics microtitre plates, antibodies being non-specifically adsorbed on the plastics surface. To saturate the active sites still free on the plastics surface, aftertreatment with a bovine serum albumin solution (BSA solution) is carried out.

There are added to a series of dilutions of a sample solution or of the standard solution in BSA

solution in each case 50 μ l of a solution of hirudin radioactively labelled with ^{125} iodine in known manner (29) and having an activity of 10,000 cpm per 50 μ l, and incubation is then carried out on the plastics surface for 2 hours at 37°C and subsequently for 12 hours at 4°C. The small tubes or microtitre plates are washed with phosphate-buffered sodium chloride solution and the radioactivity is measured. The concentration of hirudin in the sample solution is determined by a calibration curve determined with the standard solution.

A test kit for the described radioimmunoassay contains:

- 2 ml of a solution of anti-hirudin antibodies from Example 30aC) with a concentration of from 1 to 10 mg per ml.
- 100 ml of phosphate-buffered sodium chloride solution (PBS solution)
- 100 ml of 0.3 % bovine serum albumin and 0.1 % sodium azide in PBS solution (BSA solution),
- 2 ml of a solution of radioactive hirudin having an activity of 200,000 cpm/ml,
- 2 ml of standard solution containing 100 ng/ml of hirudin,
- 1 ml small tubes or microtitres plates of plastics material.

Example 31: Pharmaceutical preparation containing a desulphatohirudin compound for parenteral administration

A solution containing a desulphatohirudin compound according to Example 27 is dialysed against a 0.9 % NaCl solution. The concentration of the solution is then adjusted by diluting with the same NaCl solution

to 0.2 mg/ml or 2 mg/ml. These solutions are sterilised by ultrafiltration (membranes with 0.22 μ m pores).

The sterilised solutions can be used directly, for example for intravenous administration. Parenterally administrable solutions that contain mixtures of desulphatohirudin compounds according to Example 27 are manufactured in an analogous manner.

References

1. J. Dodt et al., FEBS Letters 165, 180 (1984)
2. P. Walsmann et al., Pharmazie 36, 653 (1981)
3. S.A. Narang, Tetrahedron 39, 3 (1983)
4. K.L. Agarwal et al., Angew. Chem. 84, 489 (1972)
5. C.B. Reese, Tetrahedron 34, 3143 (1972)
6. R.L. Letsinger and W.B. Lunsford, J. Am. Chem. Soc. 98, 3655 (1976)
7. K. Itakura et al., J. Am. Chem. Soc. 103, 706 (1981)
8. H.G. Khorana et al., J. Biol. Chem. 251, 565 (1976)
9. S.A. Narang et al., Anal. Biochem. 121, 356 (1982)
10. K. Itakura et al., J. Biol. Chem. 257, 9226 (1982)
11. A.M. Maxam and W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560 (1977); see also Meth. Enzym. 65, 499 (1980)
12. A. Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978)
13. Anagnostopoulos et al., J. Bacteriol. 81, 741 (1961)
14. M. Mandel et al., J. Mol. Biol. 53, 159 (1970)
15. H.U. Bergmeyer (ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. II, 3rd edition, p. 314-316, Verlag Chemie, Weinheim 1983.
16. F. Markwardt et al., Thromb. Haemostasis 47, 226 (1982)
17. Kohler and Milstein, Nature 256, 495 (1975)
18. Molecular Cloning, A laboratory Manual (ed. T. Maniatis et al.), Cold Spring Harbor Lab., 1982, p. 125
19. W. Muller et al., J. Mol. Biol. 124, 343 (1978)
20. M. Grunstein and D.S. Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961 (1979)
21. Ish-Horowitz, in loc. cit. 18), p. 368

22. DE-OS 3 111 405 (Genentech)
23. A.C. Peacock et al., Biochemistry 6, 1818 (1967)
24. U.K. Laemmli, Nature 227, 680 (1970)
25. P. Walsmann, Pharmazie 36, 860 (1981)
26. J.F. Kearney et al., J. Immunol. 123, 1548 (1979)
27. S. Alkan et al., Mol. Immunol. 20, 203 (1983)
28. T. Chard, An Introduction to Radioimmunoassay and related Techniques, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1978
29. A.E. Bolton and W.M. Hunter, Biochem. J. 133, 529 (1973)
30. J. Clarke and J. Carbon, J. Mol. Biol. 120, 517 (1978)
31. J.Y. Chang et al., Methods in Enzymology, 91, 41 (1983).
32. D.S. Holmes et al., Anal. Biochem. 114, 193 (1981).

Patent Claims for the Contracting States BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. An expression vector that contains a DNA sequence coding for desulphatohirudin of the formula
ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln ,
which sequence is regulated by an expression control sequence in such a manner that the said desulphatohirudin is expressed in a microorganism transformed with that expression vector.
2. An expression vector according to claim 1, in which the expression control sequence is that of the E. coli tryptophan operon.
3. An expression vector according to claim 1, in which the expression control sequence is that of the yeast-PH05 gene.
4. A process for the manufacture of an expression vector according to any one of claims 1 to 3, characterised in that a DNA sequence coding for desulphatohirudin of the formula
ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln
is inserted in such a manner into a vector DNA that contains an expression control sequence that the expression control sequence regulates the said DNA sequence.
5. A microorganism that is transformed with an expression vector according to any one of claims 1 to 3.
6. A transformed microorganism according to claim 5,

wherein the microorganism is selected from a strain of Escherichia coli, Bacillus subtilis or Saccharomyces cerevisiae.

7. A transformed Escherichia coli strain according to claim 5.

8. A transformed Saccharomyces cerevisiae strain according to claim 5.

9. A process for the manufacture of a transformed microorganism according to any one of claims 5-8, characterised in that a microorganism is transformed with an expression vector according to any one of claims 1-3.

10. A process for the manufacture of biologically active desulfatohirudin of the formula

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

(I)

and salts thereof, characterised in that microorganisms transformed with an expression vector that contains a DNA sequence coding for the said hirudin compound and regulated by an expression control sequence are cultivated in a liquid nutrient medium that contains assimilable carbon and nitrogen sources, and the said desulphatohirudin is freed from the host cells and isolated.

11. A process according to claim 10, characterised in that a free desulphatohirudin obtained is converted into a salt thereof or a desulphatohirudin salt obtained is converted into the free compound.

Patent Claims for the Contracting State AT

1. A process for the manufacture of an expression vector that contains a DNA sequence coding for desulphatohirudin of the formula

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln,

which sequence is regulated by an expression control sequence in such a manner that the said desulphatohirudin is expressed in a microorganism transformed with that expression vector, characterised in that a DNA sequence coding for the said desulphatohirudin is inserted in such a manner into a vector DNA that contains an expression control sequence that the expression control sequence regulates the said DNA sequence.

2. A process according to claim 1, characterised in that the expression control sequence is that of the E. coli tryptophan operon.

3. A process according to claim 1, characterised in that the expression control sequence is that of the yeast-PH05 gene.

4. A process for the manufacture of a transformed microorganism that contains an expression vector that can be manufactured according to any one of claims 1-3, characterised in that a microorganism is transformed with an expression vector that contains a DNA sequence coding for desulphatohirudin of the formula

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

and regulated by an expression control sequence.

5. A process according to claim 4, characterised in that the microorganism is a strain of Escherichia coli, Bacillus subtilis or Saccharomyces cerevisiae.

6. A process according to claim 4, characterised in that the microorganism is an Escherichia coli strain.

7. A process according to claim 4, characterised in that the microorganism is a Saccharomyces cerevisiae strain.

8. A process for the manufacture of biologically active desulphatohirudin of the formula

ValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGln

(I)

and salts thereof, characterised in that microorganisms transformed with an expression vector that contains a DNA sequence coding for the said hirudin compound and regulated by an expression control sequence are cultivated in a liquid nutrient medium that contains assimilable carbon and nitrogen sources, and the said desulphatohirudin is freed from the host cells and isolated.

9. A process according to claim 8, characterised in that a free desulphatohirudin obtained is converted into a salt thereof or a desulphatohirudin salt obtained is converted into the free compound.

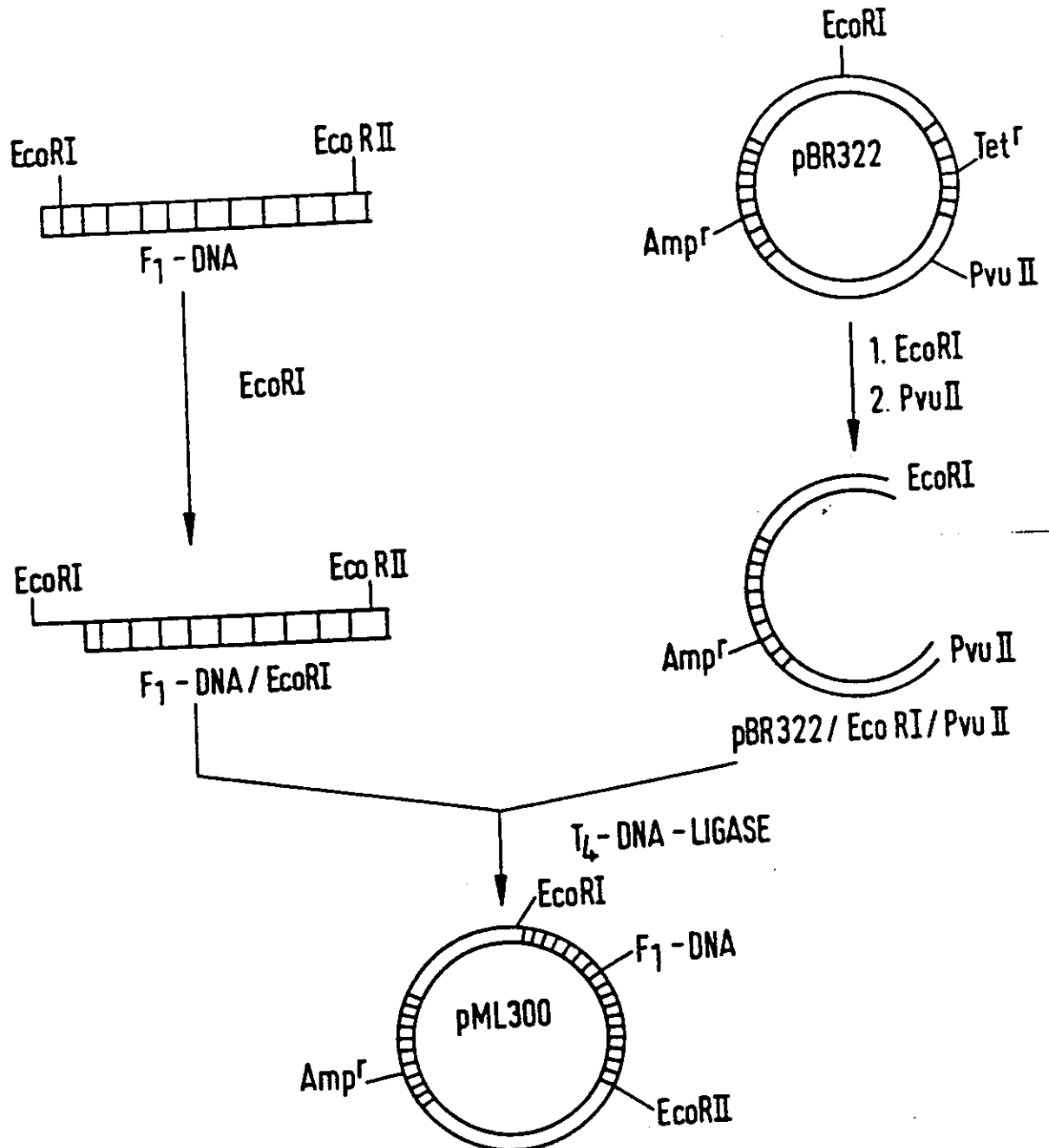
Fig. 1CONSTRUCTION OF PLASMID pML300

Fig. 2 CONSTRUCTION OF PLASMID pML305

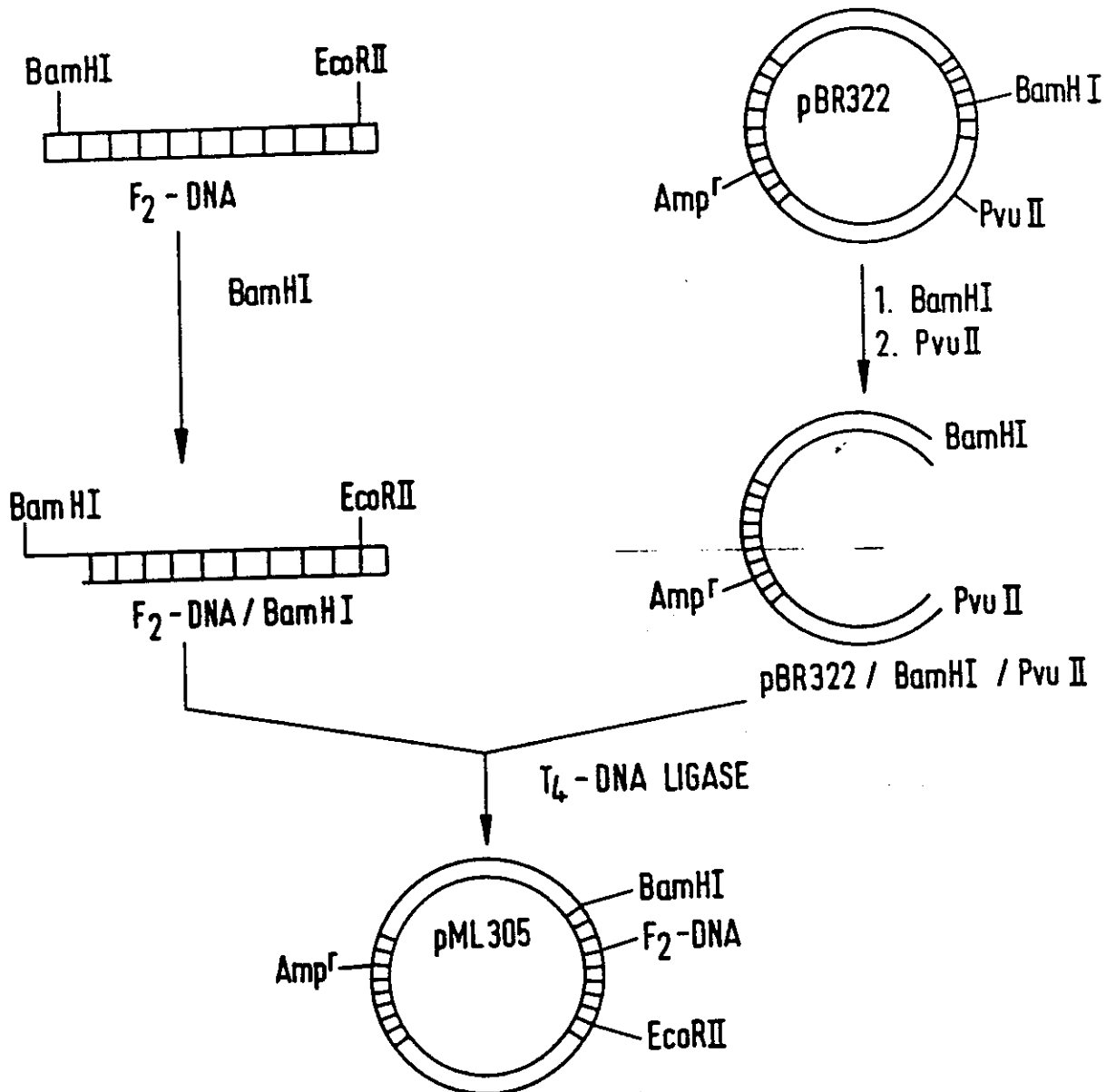


Diagram illustrating the construction of the pHRI148 and pHRI145 plasmids:

- Initial Plasmid:** pBRH_{trp} (containing trp po, EcoRI, Bgl II, LE', O', EcoRI, Tet^r, Amp^r).
- Step 1:** Digestion with 1. EcoRI, 2. Bgl II.
- Intermediate Fragment:** trp po, EcoRI, Taq I, Bgl II.
- Step 2:** Digestion with Taq I.
- Fragment L:** trp po, EcoRI, Taq I.
- Step 3:** Digestion with 1. Cla I, 2. EcoRI.
- Fragment:** EcoRI, Cla I, BamHI.
- Step 4:** Ligation with T4 DNA-LIGASE.
- Plasmid p159:** Contains trp po, EcoRI, Hpa I, Cla I, BamHI, Amp^r.
- Step 5:** Digestion with 1. EcoRI, 2. DNA-POLYMERASE I (KLENOW-FRAGMENT), 3. T4 DNA-LIGASE.
- Fragment:** EcoRI, Hpa I, Cla I, BamHI.
- Step 6:** Ligation with T4 DNA-LIGASE.
- Plasmid pHRI148:** Contains trp po, EcoRI, BamHI, Amp^r.
- Step 7:** Digestion with 1. Cla I, 2. DNA-POLYMERASE I (KLENOW).
- Final Plasmid:** pHRI145 (Contains trp po, EcoRI, Hpa I, Cla I, BamHI, Amp^r).

Fig. 4CONSTRUCTION OF EXPRESSION PLASMID pML310