



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 39 263 T2** 2009.04.30

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 979 279 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 39 263.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/08861**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 920 113.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/050430**

(86) PCT-Anmeldetag: **01.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.11.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.02.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **19.03.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.04.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12 (2006.01)**

C07K 14/805 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

45364 P **02.05.1997** **US**

57986 P **05.09.1997** **US**

(73) Patentinhaber:

**Baxter Biotech Technology S.A.R.L., Neuchâtel,
CH; William Marsh Rice University, Houston, Tex.,
US**

(74) Vertreter:

**Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European
Patent Attorneys, 81671 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, NL

(72) Erfinder:

**WEICKERT, Michael J., San Diego, CA 92122, US;
GLASCOCK, Christopher B., Louisville, CO 80027,
US; MATHEWS, Antony J., Boulder, CO 80302, US;
LEMON, Douglas D., Louisville, CO 80027, US;
DOHERTY, Daniel H., Boulder, CO 80303, US;
OLSON, John S., Houston, TX 77096-4418, US**

(54) Bezeichnung: **Hämoglobin-Mutanten mit verringertem Stickstoff(mon)oxid-Entfernungsvermögen**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf neue Hämoglobin-Mutanten mit einer oder mehreren gewünschten Funktion(en), einschließlich verringerter Stickstoff(mon)oxid-Aufnahme.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Hämoglobin (Hb) ist die sauerstofftragende Komponente des Blutes, das in kleinen entkernten Zellen, bekannt als Erythrozyten oder rote Blutzellen, durch den Blutstrom zirkuliert. Es ist ein Protein, bestehend aus vier assoziierten Polypeptidketten, die prosthetische Gruppen, bekannt als Häme, tragen. Die Struktur von Hämoglobin ist allgemein bekannt und wird in Bunn & Forget, Hrsg., Hämoglobin: Molecular Genetic and Clinical Aspects (W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA: 1986) und Fermi & Perutz „Hämoglobin and Myoglobin,“ in Phillips and Richards, Atlas of Molecular Structures in Biology (Clarendon Press: 1981) beschrieben.

[0003] Die Expression verschiedener rekombinanter Hämoglobine, die natürlich vorkommende und nicht natürlich vorkommende Globin-Mutanten enthalten, ist erreicht worden. Solche Expressionsverfahren umfassen die individuelle Globin-Expression, wie beispielsweise in US-Patent Nr. 5,028,588 beschrieben, und die Di-alpha-Globin-Expression, erzeugt durch Verbinden zweier alpha-Globine mit einem Glycin-Linker mittels genetischer Fusion, verbunden mit der Expression eines einzelnen beta-Globin-Gens zur Produktion eines pseudotetrameren Hämoglobin-Moleküls, wie in WO 90/13645 und Looker et al., Nature 356: 258–260 (1992) beschrieben. Andere modifizierte rekombinante Hämoglobine werden in der PCT-Veröffentlichung WO 96/40920 offenbart. Ähnlich wie die anderen in E. coli exprimierten heterologen Proteine verfügen rekombinante Hämoglobine über N-terminale Methionine, die in einigen rekombinanten Hämoglobinen die nativen N-terminalen Valine ersetzen.

[0004] Die Verfahrenskosten zur Herstellung rekombinanten Hämoglobins werden von der Ausbeute an löslichem Protein beeinflusst. Die ökonomische Herstellung von heterologem Protein in E. coli ist im Hinblick auf rekombinantes Hämoglobin besonders schwierig, wenn das Protein nicht nur löslich und funktional sein muß, sondern auch aus mehreren Untereinheiten besteht. Überdies erfordern rekombinante Hämoglobine die verstärkte Gegenwart essentieller Co-Faktoren (prosthetischer Gruppen) wie Häm und Flavine durch Ergänzung oder erhöhte Endogenproduktion. In E. coli wird die lösliche Akkumulation rekombinanten Hämoglobins durch die Häm-Verfügbarkeit eingeschränkt, was sich durch die Tatsache zeigt, daß sich ohne Häm-Ergänzung, der Zugabe von δ -ALA, einem Häm-Präkursor, die Häm- und Proteinakkumulation erhöht. Demzufolge sind Verfahren zur Erhöhung der löslichen Ausbeute überaus wünschenswert.

[0005] Es besteht der Bedarf an Verfahren zur Verringerung der Aufnahme von Stickstoff(mon)oxid („NO“) durch extrazelluläres Hämoglobin. Manchmal ist nach der Verabreichung bestimmter extrazellulärer Hämoglobinslösungen leichte Hypertonie beobachtet worden. Viele nehmen an, daß die Hypertonie der Auszehrung von Stickstoff(mon)oxid („NO“) in der Wand der Gefäßanordnung, die zum Teil auf der bekanntermaßen hohen Affinität von Desoxyhämoglobin für NO basiert, zuzuschreiben ist (Schultz et al., J. Lab. Clin. Med. 122: 301–308 (1993); Thompson et al., J. Appl. Physiol. 77: 2348–2354 (1994); Rooney et al., Anesthesiology 79: 60–72 (1993)). Die Extravasation des Hämoglobins in Endothelzellen oder interstitiale Räume kann zu einem signifikanten Verbrauch von NO führen (Gould et al., World J. Surg. 20: 1200–1207 (1996)). Eine neue Studie läßt zudem darauf schließen, daß die Oxidationsreaktion von NO mit dem gebundenen O₂ von Oxyhämoglobin in vivo von größerer Signifikanz sein kann als das einfache Binden an das Eisenatom, wie in Eich et. al., Biochemistry 35: 6976–6983 (1996) berichtet. Eich et. al. zeigten, daß sterische Hinderung, eingeführt durch Substitution von Aminosäuren neben gebundenem Sauerstoff, die Rate der NO-induzierten Oxidation merklich verringern kann.

[0006] Stickstoff(mon)oxid agiert als ein chemischer Messenger bei der Kontrolle vieler wichtiger Prozesse in vivo, einschließlich der Neurotransmission, Entzündung, Blutplättchenaggregation und Regulierung des gastrointestinalen und vaskulären Glattr Muskeltonus. Die biologischen Wirkungen von Stickstoff(mon)oxid werden durch das Binden an und die Aktivierung von löslicher Guanylylcyclase vermittelt, die eine biochemische Kaskade initiiert, was zu einer Vielzahl gewebespezifischer Reaktionen führt (Feldman et al., Chem. Eng. News Dec: 26–38 (1993)).

[0007] Die Erforschung der Funktionen von Stickstoff(mon)oxid war größtenteils von der Inhibierung des NO-erzeugenden Enzyms, Stickstoff(mon)oxid-Synthase, abhängig. Die meisten Schlußfolgerungen in bezug

auf die Wirkungen von zellfreiem Hämoglobin sind, basierend auf Experimenten, die NO-Synthaseinhibitoren und/oder NO-Donoren involvieren, gezogen worden.

[0008] Während das schnelle, hochaffine Binden von Stickstoff(mon)oxid an Desoxyhämoglobin allgemein bekannt ist, ist die Wichtigkeit der Oxidationsreaktion zwischen NO und Oxyhämoglobin noch nicht so verbreitet anerkannt. In dieser Reaktion bindet das NO-Molekül nicht das Häm, sondern reagiert direkt mit dem gebundenen Sauerstoff des HbO₂-Komplexes unter Bildung von Methämoglobin und Nitrat (Doyle et. al., J. Inorg. Biochem. 14: 351–358 (1981)). Die Chemie ist analog zu der schnellen Reaktion von NO mit freiem Superoxid in Lösung (Huie et al., Free Rad. Res. Comms. 18: 195–199 (1993)). Sowohl das Häm-Eisen als auch das Stickstoff(mon)oxid werden durch die gebundenen Sauerstoffatome oxidiert, und die Reaktion findet so schnell statt, daß kein Austausch von O₂ durch NO zu beobachten ist (Eich et. al., oben).

[0009] Da Stickstoff(mon)oxid kontinuierlich erzeugt und verbraucht wird, gibt es in vivo einen natürlichen Stoffumsatz von NO. Wenn zellfreies Hämoglobin verabreicht wird, wird das Gleichgewicht zwischen NO-Produktion und -Verbrauch durch Reaktionen mit Hämoglobin verändert. Der relevanteste Parameter für die NO-Aufnahme durch Oxyhämoglobin ist die Reaktionsgeschwindigkeit mit NO, nicht die Lage des allosterischen Hb-(R/T)-Gleichgewichts. Die Oxidationsreaktion ist irreversibel, und die NO-Bindung an Desoxyhämoglobin ist im physiologischen Zeitmaßstab tatsächlich irreversibel, da die Halbwertszeit für die Dissoziation von Nitrosylhämoglobin 5 bis 6 Stunden beträgt (Moore et. al., J. Biol. Chem. 251: 2788–2794 (1976)).

[0010] Reagiert ein NO-Molekül mit Oxyhämoglobin oder Desoxyhämoglobin, wird es aus dem Pool von Signalmolekülen eliminiert, was zu gewissen nachteiligen Zuständen führt. Beispielsweise kann Hämoglobin Stickstoff(mon)oxid binden, wodurch eine Gefäßrelaxation verhindert wird und was potentiell zu Hypertonie führt, die manchmal nach der Verabreichung bestimmter extrazellulärer Hämoglobininlösungen zu beobachten ist. Überdies kann die Fähigkeit von NO Oxyhämoglobin, das Peroxynitrit und Methämoglobin erzeugt, zu oxidieren, auch die freien Konzentrationen von NO verringern und zu Hypertonie führen.

[0011] Stickstoff(mon)oxid muß auch bestimmte Entzündungsreaktionen vermitteln. Beispielsweise inhibiert Stickstoff(mon)oxid, das vom Endothel produziert wurde, die Blutplättchenaggregation. So kann die Blutplättchenaggregation erhöht werden, wenn Stickstoff(mon)oxid von zellfreiem Hämoglobin gebunden wird. Bei der Aggregation von Blutplättchen setzen diese potente gefäßverengende Verbindungen wie Thromboxan A₂ und Serotonin frei. Diese Verbindungen können synergistisch mit den von Hämoglobin-Aufnahme verursachten verringerten Stickstoff(mon)oxid-Niveaus agieren, was zu einer signifikanten Gefäßverengung führt.

[0012] Neben der Inhibierung der Blutplättchenaggregation inhibiert Stickstoff(mon)oxid auch die Neutrophilen-Anhaftung an die Zellwände, was wiederum zu einer Zellwandschädigung führen kann. Eine Endothelzellschädigung ist bei der Infusion bestimmter Hämoglobininlösungen beobachtet worden (White et. al., J. Lab. Clin. Med. 108: 121–181 (1986)).

[0013] Demgemäß besteht der Bedarf an neuen Hämoglobin-Mutanten mit verringerter NO-Aufnahme, die trotzdem als ein wirksamer Sauerstoffträger fungieren. Die vorliegende Erfindung erfüllt dieses Bedürfnis.

Zusammenfassung der Erfindung

[0014] Die Erfindung bezieht sich auf die in den Ansprüchen 1 und 2 definierten Hämoglobin-Mutanten. Diese mutierten Hämoglobinmoleküle verleihen die gewünschte Funktion der verringerten NO-Aufnahme. Die Erfindung liefert ferner die in Anspruch 3 definierten rekombinanten DNA-Moleküle.

[0015] Die mutierten Hämoglobinmoleküle der Erfindung können durch die Einführung einer Mutation in eine oder mehrer beta- und/oder alpha-Untereinheiten von rekombinantem Hämoglobin geschaffen werden. Dies kann durch:

- (a) Einführen eines Vektors, enthaltend ein Gen, das ein Globin mit mindestens einer Mutation, wie in Anspruch 1 spezifiziert, kodiert, in eine Wirtszelle;
- (b) Induzieren der Expression löslichen rekombinanten Hämoglobins durch die Wirtszelle und
- (c) Reinigen des löslichen rekombinanten Hämoglobins

erreicht werden.

[0016] Mutationen in der alpha-Untereinheit mit den gewünschten Reaktionsgeschwindigkeiten werden nachstehend aufgelistet. Mit einem Stern gekennzeichnete Mutationen sind Teil der vorliegenden Erfindung. Die

verbleibenden Mutationen, die nicht Teil der Erfindung sind, wurden für Referenzzwecke einbezogen.

E11(Val → Leu)

*B10(Leu → Trp) + E7(His → Gln)

B10(Leu → Trp) + E11(Val → Phe)

B10(Leu → Trp) + E11(Val → Leu) + G8(Leu → Trp)

B10(Leu → Trp) + E11(Val → Phe) + G8(Leu → Trp)

B10(Leu → Trp) + E11(Val → Phe) + G8(Leu → Ile)

*B10(Leu → Trp) + E7(His → Gln) + E11(Val → Leu) + G8(Leu → Trp)

B10(Leu → Trp) + E11(Val → Trp) + G8(Leu → Trp)

E11(Val → Leu) + G8(Leu → Phe)

E11(Val → Leu) + G8(Leu → Trp)

B13(Met → Phe oder Trp)

G12(Leu → Phe oder Trp) und

B14(Phe → Trp)

[0017] Mutationen in der beta-Untereinheit mit den gewünschten Reaktionsgeschwindigkeiten werden nachstehend aufgelistet. Mit einem Stern gekennzeichnete Mutationen sind Teil der vorliegenden Erfindung. Die verbleibenden Mutationen, die nicht Teil der Erfindung sind, wurden für Referenzzwecke einbezogen.

E11(Val → Leu)

B13(Leu → Phe oder Trp)

G12(Leu → Phe oder Trp)

B14(Leu → Phe oder Trp)

*G8(Leu → Phe) + G12(Leu → Trp)

*E11(Val → Leu) + G8(Leu → Trp)

E11(Val → Trp) + G8(Leu → Met)

E11(Val → Leu) + G8(Leu → Phe)

E11(Val → Leu) + G8(Leu → Met)

E11(Val → Phe) + G8(Leu → Ile)

E11(Val → Phe) + G8(Leu → Phe)

E11(Val → Phe) + G8(Leu → Trp)

E11(Val → Phe) + G8(Leu → Met)

*E11(Val → Met) + G8(Leu → Trp)

*E11(Val → Met) + G8(Leu → Trp) + E7(His → Gln)

E11(Val → Trp) + G8(Leu → Ile)

E7(His → Gln)

*E7(His → Gln) + E11(Val → Trp)

E7(His → Gln) + E11(Val → Leu)

E7(His → Gln) + E11(Val → Phe)

E7(His → Gln) + E11(Val → Phe) + G8(Leu → Phe oder Trp)

*E7(His → Gln) + E11(Val → Trp) + G8(Leu → Phe oder Trp)

*E7(His → Gln) + E11(Val → Leu) + G8(Leu → Trp)

E7(His → Phe)

E7(His → Gln) + E11(Val → Leu) + G8(Leu → Phe)

E11(Val → Trp oder Phe) + G12(Leu → Trp oder Met)

E11(Val → Trp oder Phe) + B13(Leu → Trp oder Met)

B10(Leu → Trp) + B13(Leu → Trp oder Met)

B10(Leu → Phe) + B13(Leu → Trp)

B10(Leu → Trp oder Phe) + G12(Leu → Trp)

B10(Leu → Phe) + G12(Leu → Met)

E11(Val → Phe) + G8(Leu → Trp, Met oder Phe)

*G8(Leu → Phe) + G12(Leu → Met)

*G8(Leu → Phe) + E11(Val → Met)

G8(Leu → Trp) + G12(Leu → Trp oder Met) und

G8(Leu → Trp) + B13(Leu → Trp oder Met)

E11(Val → Met) + G8(Leu → Met)

E11(Val → Leu) + G8(Leu → Phe oder Met)

[0018] Bevorzugt weisen solche Mutationen Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin von weniger als $25 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, stärker bevorzugt zwischen 12 und $15 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und am stärksten bevorzugt weniger als $5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0019] **Fig. 1** zeigt das Plasmid pSGE728, das für bestimmte Mutagenese- und Expressionsexperimente verwendet wurde.

[0020] **Fig. 2** zeigt die Teilrestriktionskarte des alpha-Gens, eingeführt in pSGE728.

[0021] **Fig. 3** zeigt die Teilrestriktionskarte des beta-Gens, eingeführt in pSGE728.

[0022] **Fig. 4** zeigt den normalisierten Zeitverlauf der NO-induzierten Oxidation von rekombinantem Oxyhämoglobin. Die rekombinanten Hämoglobinkonstrukte rHb0.0, rHb0.1, rHb1.1 und rHb-Bethesda verfügen alle über Wildtyp-Aminosäuren in ihren Hämtaschen und eine NO-Oxidationsgeschwindigkeitskonstante von $60 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die distalen Hämtaschenmutanten rHb2, rHb3 und rHb4 weisen Geschwindigkeitskonstanten von 24, 15 bzw. $2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf. Die Bedingungen nach dem Mischen waren $0,2 \mu\text{M}$ Oxyhämoglobin (Häm), $1,0 \mu\text{M}$ NO, 20°C . Die Hämtaschensubstitutionen in rHb2 sind $\alpha\text{E11}(\text{Val} \rightarrow \text{Phe})$, $\beta\text{E11}(\text{Val} \rightarrow \text{Phe})$, $\beta\text{G8}(\text{Leu} \rightarrow \text{Ile})$. In rHb3 sind die Substitutionen $\alpha\text{E11}(\text{Val} \rightarrow \text{Leu})$, $\beta\text{E11}(\text{Val} \rightarrow \text{Phe})$ und in rHb4 $\alpha\text{B10}(\text{Leu} \rightarrow \text{Phe})$, $\beta\text{E11}(\text{Val} \rightarrow \text{Trp})$.

[0023] **Fig. 5** zeigt die pressorischen Wirkungen von rekombinanten Hämoglobinen und Humanserumalbumin (HSA). Veränderungen der Werte vor der Verabreichung in Bezug auf den mittleren arteriellen Blutdruck sind gegen die Zeit ab der Verabreichung dargestellt. Alle Hämoglobine enthielten zur Verhinderung der Dissoziation in $\alpha\beta$ -Dimere eine genetisch fusionierte Dialpha-Untereinheit. Die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion von Stickstoff(mon)oxid mit jedem rHb ist neben jeder Datengruppe notiert. HSA zeigt die pressorischen Daten an, die bei der Verabreichung von 5% HSA als Volumenkontrolle gesammelt wurden. Die Proteindosen betrugen 350 mg/kg für jedes rHb. rHb1.1 (●, $n = 6$), rHb2 (□, $n = 6$), rHb3 (■, $n = 6$), rHb4 (○, $n = 6$), 5% HSA (▲, $n = 9$).

[0024] **Fig. 6** zeigt die pressorischen Reaktionen auf rHb1.1 und rHb-Bethesda. Beide Moleküle enthielten zur Verhinderung der Dissoziation in alpha/beta-Dimere eine genetisch fusionierte Di-alpha-Untereinheit. Die Daten für den mittleren arteriellen Blutdruck sind gegen die Zeit ab der Verabreichung dargestellt. rHb1.1 hat einen P_{50} von 32 mmHg und rHb-Bethesda hat einen P_{50} von $2,7 \text{ mmHg}$. Beide Hämoglobine weisen einen Wert von etwa $60 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die Geschwindigkeit der NO-Oxidation, $k'_{\text{NO,ox}}$, auf. Kreise (●) stellen die Daten für rHb1.1 ($n = 6$) und Quadrate (■) die Daten für rHb-Bethesda ($n = 6$) dar. Die beiden Hämoglobine weisen identische Geschwindigkeiten der Reaktion mit NO aber einen signifikant unterschiedlichen P_{50} auf.

[0025] **Fig. 7** zeigt die direkte Beziehung zwischen dem Ausmaß der pressorischen Reaktion und der NO-Oxidationsgeschwindigkeit. Das Ausmaß der pressorischen Reaktion wurde durch Mitteln der Werte nach der Infusion für jeden in **Fig. 8** berechnet und gegen den gemessenen Wert $k'_{\text{NO,ox}}$ für das entsprechende Hämoglobin dargestellt. Der Datenpunkt am y-Achsenabschnitt wurde nach der Verabreichung eines äquivalenten Volumens von 5% HSA gesammelt.

[0026] **Fig. 8** zeigt die durchschnittliche periphere Gesamtwiderstandsreaktion (TPR-Reaktion) auf rekombinante Hämoglobine. Der durchschnittliche TPR wurde aus Daten berechnet, die von 20 Minuten bis 90 Minuten nach der Verabreichung gesammelt wurden. Die in jedem Fall verwendete Dosis betrug $350 \text{ mg Hb/kg Körpergewicht}$. „mono-Hb“ bezieht sich auf Einzel-Tetramer-Hb-Spezies (MW etwa 64.000), und „di-Hb“ zeigt zwei Hb-Tetramere an, die genetisch fusioniert sind (MW etwa 128.000). Die Geschwindigkeitskonstante für die NO-Oxidation von jedem rHb ist auf der Abszisse notiert.

[0027] **Fig. 9** zeigt die TPR-Reaktionen auf drei rekombinante Hämoglobine. Veränderungen des TPR sind als Prozentsatz von Werten vor der Verabreichung gegen die Zeit ab der Verabreichung dargestellt. Alle Hämoglobine enthielten zur Verhinderung der Dissoziation in $\alpha\beta$ -Dimere eine genetisch fusionierte Dialpha-Untereinheit. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion von Stickstoff(mon)oxid mit jedem rHb ist neben jeder Datengruppe notiert. Die Hämoglobindosen betrugen immer 350 mg/kg .

[0028] **Fig. 10** zeigt die Ergebnisse des GI-Motilitäts-Darmentleerungsmodells. Eine größere Aufnahme von Stickstoff(mon)oxid oder die Inhibierung der Synthese von Stickstoff(mon)oxid verringert die Entleerung des Magens. Die für jedes Protein verwendete Dosis betrug $750 \text{ mg Hb/kg Körpergewicht}$ (10%ige Lösung) und die Dosis für L-NAME betrug 10 mg/kg .

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0029] Die Erfindung bezieht sich im allgemeinen auf Hämoglobin-Mutationen, die eine verringerte NO-Aufnahme bereitstellen.

[0030] Die in bezug auf eine bestimmte Mutation verwendete Nomenklatur identifiziert zunächst die Wildtyp-Aminosäure, gefolgt von der Restzahl und schließlich der Ersatz-Aminosäure. Beispielsweise bedeutet D73I, daß Aspartat an der Restzahl 73 durch Isoleucin substituiert ist.

[0031] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf neue mutierte Hämoglobine, die signifikant verringerte Reaktionsgeschwindigkeiten bezüglich der Stickstoff(mon)oxid- oder NO-Aufnahme aufweisen, wie in den Ansprüchen 1 und 2 definiert. Als solche werden die mutierten Hämoglobine der vorliegenden Erfindung hierin auch als „NO-Mutanten“ bezeichnet. Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf rekombinante DNA-Moleküle, die NO-Mutanten kodieren, wie in Anspruch 3 definiert.

[0032] Die NO-Mutanten weisen eine oder mehrere Mutationen in oder um die Hämtasche auf. Häm ist ein Eisen-enthaltendes Porphyrin, das als eine prosthetische Gruppe in Proteinen wie Hämoglobin, Myoglobin und den Cytochromen dient. In Hämoglobin erscheint das Häm in einem Spalt zwischen den E- und F-Helizes in den Globin-Untereinheiten. Das Häm-Eisen ist kovalent an den Imidazol-Stickstoff des „proximalen“ F8-Histidins gebunden, während das distale E7-Histidin und E11-Valin nahe dem Sauerstoffzugang der Hämtasche erscheinen. Die Reste der Hämtasche umfassen die Reste, die sich auf einer Nächstes-Atom-zu-nächstes-Atom-Basis innerhalb 6 Angström und bevorzugt innerhalb 4 Angström der Hämkomponente befinden (Fermi, et. al. (1984) J. Mol. Biol. 175: 159–174). Für alpha-Globin umfassen die Hämtaschenreste:

Distale Reste:

Erste Hülle
B10 Leu
CE1 Phe
E7 His
E11 Val
G8 Leu

Zweite Hülle
B13 Met
CE3 His
CE4 Phe
E10 Lys
E14 Ala
G12 Leu
B14 Phe

Proximale Reste:

Erste Hülle
F8 His

Zweite Hülle
C7 Tyr
F4 Leu
F7 Leu
FG3 Leu
FG5 Val
G4 Asn
G5 Phe
H15 Val
H19 Leu

und für beta-Globin:

Distale Reste:

Erste Hülle
B10 Leu
CD1 Phe
E7 His
E11 Val
G8 Leu

Zweite Hülle
B13 Leu
CD3 Ser
B14 Leu
CD4 Phe
E10 Lys
E14 Ala
G12 Leu

Proximale Reste:

Erste Hülle
F8 His

Zweite Hülle
C7 Phe
F4 Leu
F7 Leu
FG3 Leu
FG5 Val
G4 Asn
G5 Phe
G12 Leu
H15 Val
H19 Leu

[0033] Die Reste der ersten Hülle sind die Reste in engem oder direktem Kontakt mit dem Häm-Eisenatom und/oder dem gebundenen Liganden, während die Reste der zweiten Hülle die Aminosäuren sind, die nicht in direktem Kontakt mit dem Häm oder dem gebundenen Liganden, aber in direktem Kontakt mit den Resten der ersten Hülle stehen. Der Ausdruck „Hämtaschenreste“ umfaßt die Reste der ersten und der zweiten Hülle.

[0034] Zur Beschreibung dieses Aspektes der vorliegenden Erfindung werden hierin verschiedene Ausdrücke verwendet. Sofern nicht anders definiert, haben alle technischen und wissenschaftlichen Ausdrücke hierin dieselbe Bedeutung, wie sie einem Fachmann geläufig sind.

[0035] Für die Zwecke dieser Erfindung beziehen sich „natürlich vorkommendes humanes Hämoglobin,“ „natürliches Hämoglobin,“ „Wildtyp-Hämoglobin“ oder „herkömmliches Hämoglobin“ auf humanes Hämoglobin A₀, dessen alpha- und beta-Globin-Aminosäuresequenzen in [Fig. 1](#) von US-Patent Nr. 5,028,588 angegeben sind. Es ist zu beachten, daß herkömmlicherweise die Helixsegmente der Globin-Untereinheiten mit Buchstaben gekennzeichnet sind, beispielsweise wird das proximale Histidin der alpha-Kette oder der beta-Kette mit F8 bezeichnet (Rest 8 von Helix F). Die Nicht-Helixsegmente sind mit Buchstabenpaaren gekennzeichnet, die anzeigen, welche Helixsegmente sie verbinden, beispielsweise verbindet das Nicht-Helixsegment BC Helix B und Helix C. Die Helixbezeichnung und die entsprechenden Aminosäuren für alpha- und beta-Globin sind in Tabelle 4 von US-Patent Nr. 5,028,588 gezeigt.

[0036] „Rekombinantes Hämoglobin“ ist Hämoglobin, ob nativ oder mutiert, das alpha-Globinproteine und/oder beta-Globinproteine umfaßt, von denen mindestens eines durch Expression eines Globingens, getragen von einem rekombinanten DNA-Molekül in einer anderen Zelle als der Zelle, in der das Hämoglobingen und/oder Hämoglobinprotein natürlich zu finden ist, erhalten wurde. Mit anderen Worten ist das Hämoglobingen heterolog zu dem Wirt, in dem es exprimiert wird. Beispielsweise wird die Expression irgendeines humanen Hämoglobingens in irgendeiner anderen Zelle als einer humanen Blutzelle als ein rekombinantes Hämoglobin betrachtet.

[0037] Wie hierin verwendet, verfügt ein „alpha-Globin“ über eine mindestens etwa 75%ige Sequenzidentität mit nativem humanem alpha-Globin. Ein Polypeptid mit einer geringeren Sequenzidentität kann jedoch noch immer als im wesentlichen homolog mit nativem humanem alpha-Globin betrachtet werden und kann daher ein alpha-Globin sein, wenn es eine größere Sequenzidentität hat, als überhaupt zu erwarten gewesen wäre, und weist zudem die charakteristische höhere Struktur von nativem humanem alpha-Globin und ähnliche biologische Aktivität auf. Dem ähnlich verfügt ein „beta-Globin“ über eine mindestens etwa 75%ige Sequenzidentität

mit nativem humanem beta-Globin. Ein Polypeptid mit einer geringeren Sequenzidentität kann jedoch noch immer als im wesentlichen homolog mit nativem humanem beta-Globin betrachtet werden und kann daher ein beta-Globin sein, wenn es eine größere Sequenzidentität hat, als überhaupt zu erwarten gewesen wäre, und weist zudem die charakteristische höhere Struktur von nativem humanem beta-Globin und ähnliche biologische Aktivität auf.

[0038] „Ligandiertes Hämoglobin“ ist Hämoglobin, an das ein Ligand an den Hämgruppen gebunden ist. Die üblichen bevorzugten Liganden umfassen, sind aber nicht beschränkt auf O₂, CO, NO und dergleichen.

[0039] „Oxyhämoglobin“ ist Hämoglobin, in dem ein Sauerstoffmolekül an die funktionalen Sauerstoff-Bindungsstellen in jeder Untereinheit gebunden ist.

[0040] „Desoxyhämoglobin“ oder „unligandiertes Hämoglobin“ ist irgendein Hämoglobin, bei dem kein Ligand an das alpha-Globin, das beta-Globin und/oder eine funktionale prosthetische Häm-Gruppe gebunden ist.

[0041] „Methämoglobin“ oder „oxidiertes Hämoglobin“ ist Hämoglobin, in dem das Eisen in den Eisen(III)-Zustand oxidiert worden ist.

[0042] „Hämoglobin im R-Zustand“ ist Hämoglobin im hochaffinen Zustand und ist die dominierende Form von Hämoglobin, wenn ein Ligand an die Hämtaschen gebunden ist. Der Ligand ist typischerweise Sauerstoff, daher ist dieser Zustand als der „Oxy-“ oder „R-“ (für entspannt) Zustand bekannt. Im R-Zustand sind die Abstände der Interuntereinheiten bezogen auf die Abstände bei Hämoglobin im T-Zustand größer.

[0043] „Hämoglobin im T-Zustand“ ist Hämoglobin im niedrigaffinen Zustand und ist die dominierende Form von Hämoglobin, wenn es desoxidiert ist („Desoxy“ oder „T“ für „gespannt“).

[0044] Die „Hämtasche“ ist die Tasche, die um das Häm jeder Globin-Untereinheit, beschrieben von den umgebenden Resten, gebildet ist und umfaßt Reste innerhalb etwa 6 Å der Häm-Komponente, wie oben beschrieben.

[0045] Die „distale Hämtasche“ ist der Teil der Hämtasche über der Ebene des Häms, das die freie Koordinationsstelle des Eisens, wo sich Ligandenmoleküle reversibel mit dem Eisenatom vereinigen können, und Reste wie Histidin E7 und Valin E11 enthält. Dem ähnlich wird die proximale Stelle der Hämtasche durch die Reste unter der Ebene des Häms beschrieben und enthält Reste wie das proximale Histidin an Position F8.

[0046] „Oxidation“ ist die Oxidation des Eisens im Häm irgendeiner oder aller Untereinheiten, die das Hämoglobin-Tetramer bilden, von der Eisen(II)-Form (Fe⁺²) in die Eisen(III)-Form (Fe⁺³). Hutoxidation findet spontan ohne die Zugabe exogener Oxidationsmittel statt, die Oxidation kann jedoch auch durch die Gegenwart exogener Oxidationsmittel, am stärksten bevorzugt NO und Wasserstoffperoxid, induziert werden.

[0047] „Mutationen“ sind Substitutionen, Deletionen oder Additionen einer oder mehrerer Aminosäuren an die Aminosäuresequenz, die natürlich vorkommendes humanes Hämoglobin bildet.

[0048] „Affinität“ bezieht sich auf die Gleichgewichtsbindung eines Liganden an Hämoglobin und wird von der thermodynamischen Gleichgewichtskonstante K_{eq} beschrieben. Affinität ist das Verhältnis der Ligandenassoziationsrate und der Hämoglobin-Ligand-Dissoziationsrate, und daher können Veränderungen der Assoziationsrate, Dissoziationsrate oder beider zu Veränderungen der Ligandenaffinität führen.

[0049] „Veränderte Affinität“ ist die Affinität eines rekombinanten Hämoglobins für einen gasförmigen Liganden, die sich unter denselben Meßbedingungen um mindestens 10% von der Affinität natürlich vorkommenden humanen Hämoglobins für denselben gasförmigen Liganden unterscheidet.

[0050] Bei der Schaffung der NO-Mutanten der vorliegenden Erfindung wurden zwei unabhängige Protein-Engineering-Strategien zur Variierung der Sauerstoffaffinitäten und der Reaktionsgeschwindigkeit mit Salpetersäure verwendet: (1) Manipulation der intrinsischen Kinetiken und Affinitäten von NO bzw. O₂ durch die Schaffung neuer Substitutionen in den distalen Taschen der Untereinheiten und (2) Einstellen der Position des allosterischen R/T-Gleichgewichts mit Mutationen bei Schlüsselpunkten abseits der Hämgruppen, wie in Olson et. al., Art. Cells. Blond Subs. and Immob. Biotech. 25: 227–241 (1997) beschrieben. Veränderungen der Hämoglobinallosterie sind spezifisch für Sauerstoffbindungskinetiken und -affinität, während das R/T-Gleichgewicht keinen Einfluß auf die NO-Aufnahme hat. Die Substitutionen der distalen Tasche beeinflussen die Ein-

tritts- und Austrittsraten von NO und O₂ durch Variierung der sterischen Hinderung und der Wasserstoffbindung (Olson et. al. oben).

[0051] Daher wird die allgemeine Strategie zur Identifizierung von NO-Mutanten wie folgt festgelegt:

- a) Schaffen von Mutationen, die eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen in den distalen Häm Taschen des α - und β -Globinuntereinheiten hervorrufen;
- b) Einführen von DNA-Fragmenten, die diese Mutationen enthalten, in einen geeigneten Expressionsvektor, dann Einführen dieses Vektors in eine geeignete Wirtszelle;
- c) Kultivieren der Wirtszelle, gefolgt von einem Screeningassay (z. B. ELISA) mit Antikörpern gegen Hämoglobin zur Identifizierung der Wirtszellen, die lösliches Hämoglobin exprimieren;
- d) Kultivieren der Wirtszelle zur Expression löslichen Hämoglobins, gefolgt von der Reinigung des Hämoglobins;
- e) Durchführen eines In-vitro-Tests zur Verifizierung der Verringerung der NO-Aufnahmeaktivität und Retention der Sauerstoffzufuhr, wenn erforderlich;
- f) Auswählen der richtigen α -Mutationen zur Paarung mit den richtigen β -Mutationen;
- g) nach Bedarf Auswählen anderer Mutationen zum Einstellen des P₅₀ oder der Rate der O₂-Dissoziation und
- h) In-vivo-Testen der O₂-Zufuhr- und hämodynamischen Daten.

[0052] Nach dieser Strategie wurden zunächst mutierte alpha-Untereinheiten mit Wildtypbeta-Untereinheiten gepaart und umgekehrt. Es wurden auch zusätzliche Mutanten, die durch Kombination von Mutationen in den alpha- und beta-Globinen gebildet wurden, konstruiert.

[0053] Jede der hierin beschriebenen Mutationen kann durch eine Vielzahl von Verfahren, die in der Technik bekannt sind, herbeigeführt werden. Mutationen können am Codon-Level durch Veränderung der Nukleotidsequenz, die für eine gegebene Aminosäure kodiert, geschaffen werden. Die Substitution einer Aminosäure an einer gegebenen Position in einem Protein kann durch die Veränderung des Codons für diese bestimmte Aminosäure erreicht werden. Diese Substitution kann durch ortsgerichtete Mutagenese beispielsweise unter Verwendung von: (1) der Amersham-Technik (Amersham mutagenesis kit, Amersham, Inc., Cleveland, Ohio), basierend auf den Verfahren von Taylor et. al., Nucl. Acids Res. (1985) 13: 8749–8764; Taylor et al., (1985) Nucl. Acids Res. 13: 8764–8785; Nakamaye und Eckstein, (1986) Nucl. Acids Res. 14: 9679–9698 und Dente et. al., in DNA Cloning Glover, Hrsg., IRL Press (1985), Seiten 791–802, (2) des Promega-Kits (Promega Inc., Madison, Wisconsin) oder (3) des Biorad-Kits (Biorad Inc., Richmond, Kalifornien), basierend auf den Verfahren von Kunkel, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488; Kunkel et. al., (1987) Meth. Enzymol. 154: 367; Kunkel, US-Patent 4,873,192 herbeigeführt werden. Sie kann auch durch andere kommerziell verfügbare oder nicht-kommerzielle Mittel, die die Technik der ortsgerichteten Mutagenese einbeziehen, unter Verwendung mutierter Oligonukleotide, um so die Mutagenese zu erreichen, oder wie in den nachstehend beschriebenen Beispielen herbeigeführt werden.

[0054] Die ortsgerichtete Mutagenese kann auch unter Verwendung von PCR-basierender Mutagenese, wie der in Zhengbin et. al., Seiten 205–207 in PCR Methods and Applications Cold Spring Harbor Laboratory Press New York (1992); Jones and Howard, (1990) BioTechniques 8(2): 178 (1990); Jones and Howard, BioTechniques 10: 62–66 (1991) oder wie in den nachstehenden Beispielen beschrieben herbeigeführt werden. Die ortsgerichtete Mutagenese kann auch unter Verwendung der Kassettenmutagenese mit Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, hergeführt werden.

[0055] Durch Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, oder wie in den nachstehenden Beispielen beschrieben, kann irgendeine geeignete Wirtszelle mit einem Plasmid, das die gewünschte(n) Mutation(en) enthält, transformiert werden. Geeignete Wirtszellen umfassen zum Beispiel bakterielle, Hefe-, Pflanzen-, Säuger- und Insektenzellen. E. coli-Zellen sind zur Expression der neuen mutierten Hämoglobine besonders geeignet. Insbesondere werden bei der Expression mehrerer Untereinheiten in Bakterien die Untereinheiten wünschenswerterweise, jedoch nicht notwendigerweise, in derselben Zelle polycistronisch co-exprimiert, wie in WO 93/09143 beschrieben. Bevorzugt wird in E. coli ein einzelner Promotor verwendet, um die Expression der Gene, die die gewünschten Proteine kodieren, zu beschleunigen.

[0056] Die Reaktion von NO mit Oxyhämoglobinformen der Mutanten ergab aufgrund der unterschiedlichen Reaktivitäten der beiden Arten von Untereinheiten in dem Hämoglobin-Tetramer oftmals biphasische Reaktionszeitverläufe. Die Anpassung dieser Reaktionszeitverläufe an eine Zwei-Exponentialfunktion ergab die Reaktionsgeschwindigkeiten sowohl des Wildtyps als auch der mutierten Untereinheiten. Durch die Wiederholung dieser Verfahren für eine Vielzahl von Mutantenkonstrukten wurden in jeder Art von Untereinheit viele Mutan-

ten erhalten, von denen nachgewiesen wurde, daß sie einen breiten Bereich an Geschwindigkeitskonstanten für die NO-Reaktivität ($k'_{\text{NO,ox}}$) zeigen. Nach der Reinigung und dem Screenen der vielen Mutanten wurde festgestellt, daß die folgenden alpha- und beta-Globin-Mutanten und Kombinationen davon im Vergleich zu herkömmlichem Hämoglobin verringerte NO-Reaktivität aufweisen: Die mit einem Stern markierten Mutanten sind Teil der vorliegenden Erfindung. Die restlichen Mutanten, die nicht Teil der Erfindung sind, wurden für Referenzzwecke aufgelistet.

α-Globinmutationen:

E11(Val → Leu)
 E11(Val → Leu) + E7(His → Gln)
 E11(Val → Phe oder Trp) + E7(His → Gln),
 E11(Val → Phe oder Trp oder Leu) + E7(His → Gln) + G8(Leu → Phe oder Trp)
 *B10(Leu → Trp) + E7(His → Gln)
 B10(Leu → Trp) + E11(Val → Phe)
 B10(Leu → Trp) + E11(Val → Trp)
 B10(Leu → Trp) + E11(Val → Leu) + G8(Leu → Trp)
 B10(Leu → Trp) + E11(Val → Leu) + G8(Leu → Phe)
 B10(Leu → Trp) + E11(Val → Phe) + G8(Leu → Trp)
 B10(Leu → Trp) + E11(Val → Phe) + G8(Leu → Ile)
 *B10(Leu → Trp) + E7(His → Gln) + E11(Val → Leu) + G8(Leu → Trp)
 B10(Leu → Trp) + E11(Val → Trp) + G8(Leu → Trp)
 E11(Val → Leu) + G8(Leu → Phe)
 E11(Val → Leu) + G8(Leu → Trp)
 B13(Met → Phe oder Trp)
 G12(Leu → Phe oder Trp)
 B14(Phe → Trp)

β-Globinmutationen:

E11(Val → Leu)
 B13(Leu → Phe oder Trp)
 G12(Leu → Phe oder Trp)
 B14(Leu → Phe oder Trp)
 *G8(Leu → Phe) + G12(Leu → Trp)
 *E11(Val → Leu) + G8(Leu → Trp)
 E11(Val → Trp) + G8(Leu → Met)
 E11(Val → Leu) + G8(Leu → Phe)
 E11(Val → Leu) + G8(Leu → Met)
 E11(Val → Phe) + G8(Leu → Ile)
 E11(Val → Phe) + G8(Leu → Phe)
 E11(Val → Phe) + G8(Leu → Trp)
 E11(Val → Phe) + G8(Leu → Met)
 *E11(Val → Met) + G8(Leu → Trp)
 *E11(Val → Met) + G8(Leu → Trp) + E7(His → Gln)
 E11(Val → Trp) + G8(Leu → Ile)
 E7(His → Gln)
 *E7(His → Gln) + E11(Val → Trp)
 E7(His → Gln) + E11(Val → Leu)
 E7(His → Gln) + E11(Val → Leu) + G8(Leu → Phe)
 E7(His → Gln) + E11(Val → Phe)
 E7(His → Gln) + E11(Val → Phe) + G8(Leu → Phe oder Trp)
 *E7(His → Gln) + E11(Val → Trp) + G8(Leu → Phe oder Trp)
 *E7(His → Gln) + E11(Val → Leu) + G8(Leu → Trp)
 E7(His → Phe)
 E11(Val → Trp oder Phe) + G12(Leu → Trp oder Met)
 E11(Val → Trp oder Phe) + B13(Leu → Trp oder Met)
 B10(Leu → Trp) + B13(Leu → Trp oder Met)
 B10(Leu → Phe) + B13(Leu → Trp)
 B10(Leu → Trp oder Phe) + G12(Leu → Trp)

B10(Leu → Phe) + G12(Leu → Met)
 G8(Leu → Trp) + G12(Leu → Trp oder Met)
 G8(Leu → Trp) + B13(Leu → Trp oder Met)
 *E11(Val → Met) + G8(Leu → Phe)
 *G8(Leu → Phe) + G12(Leu → Met)
 E11(Val → Phe) + G8(Leu → Trp, Met oder Phe)
 E11(Val → Met) + G8(Leu → Met)
 E11(Val → Leu) + G8(Leu → Met oder Phe)

[0057] Die zur Bestimmung der Mutationen verwendeten Bezeichnungen identifizieren zunächst die Helix, dann die Restzahl in der Helix, gefolgt von der Wildtyp-Aminosäure und der substituierten Aminosäure. Beispielsweise bezieht sich B11(Val → Leu) auf den elften Rest der Helix, in dem Wildtyp-Valin durch Leucin substituiert ist.

[0058] Nach Bedarf kann jede der obigen alpha-Globinmutationen mit irgendeiner der obigen beta-Globinmutationen oder jedes der obigen alpha-Globine mit einem bekannten beta-Globin kombiniert werden und umgekehrt, um so die gewünschten Eigenschaften zu erhalten. Überdies können andere Mutationen zugefügt werden, um so die Sauerstoffaffinität einzustellen. Die folgenden Kombinationen weisen die gewünschten NO-Reaktionskinetiken auf.

[0059] Die Mutanten Nr. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 17 sind Teil der vorliegenden Erfindung. Die restlichen Mutanten, die nicht Teil der vorliegenden Erfindung sind, wurden zu Referenzzwecken aufgelistet.

1. α B10(Leu → Phe) + β E11(Val → Trp) + β Presbyterian (pres)
2. α E11(Val → Leu) + β E11(Val → Phe) + St. Mande
3. α B10(Leu → Phe) + α E7(His → Gln) + β G8(Leu → Trp) + St. Mande + β Providence (prov)
4. α B10(Leu → Phe) + α E7(His → Gln) + β G8(Leu → Trp) β prov + β pres
5. α B10(Leu → Trp) + α E7(His → Gln) + β E11(Val → Trp)
6. α B10(Leu → Trp) + α E7(His → Gln) + α E11(Val → Leu) + α G8(Leu → Trp) + β E7(His → Gln) + β E11(Val → Met) + β G8(Leu → Trp)
7. α B10(Leu → Trp) + α E11(Val → Leu) + α G8(Leu → Trp) + β E7(His → Gln) + β E11(Val → Met) + G8(Leu → Trp)
8. α B10(Leu → Trp) + α E11(Val → Phe) + α G8(Leu → Trp) + β E11(Val → Leu) + β G8(Leu → Trp)
9. α B10(Leu → Trp) + α E11(Val → Phe) + β E11(Val → Met) + β G8(Leu → Trp)
10. α B10(Leu → Trp) + α E11(Val → Phe) + β E7(His → Gln) + β E11(Val → Met) + β G8(Leu → Trp)
11. α B10(Leu → Trp) + α E11(Val → Phe) + α G8(Leu → Ile) + β E11(Val → Leu) + β G8(Leu → Trp)
12. α B10(Leu → Trp) + α E11(Val → Phe) + α G8(Leu → Ile) + β E11(Val → Met) + β G8(Leu → Trp)
13. α B10(Leu → Phe) + α E7(His → Gln) + β G8(Leu → Trp)
14. α B10(Leu → Phe) + α E7(His → Gln) + β E11(Val → Trp)
15. α B10(Leu → Phe) + α E7(His → Gln) + α G8(Leu → Trp) + β E11(Val → Trp)
16. α B10(Leu → Phe) + α E7(His → Gln) + β G8(Leu → Trp)
17. α B10(Leu → Trp) + α E7(His → Gln) + β E11(Val → Trp) + β prov

[0060] Obgleich die folgenden Mutationen in di-alpha-Konstrukte eingeführt wurden, können die beschriebenen Kombinationen auch in mono-alpha-Konstrukten plaziert werden:

di-Konstrukte (Substitutionen in beiden α -Untereinheiten)

[0061] Die Mutanten Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 sind Teil der vorliegenden Erfindung. Die restlichen Mutanten, die nicht Teil der Erfindung sind, wurden für Referenzzwecke aufgelistet.

1. α B10(Leu → Trp) + α E7(His → Gln) + β E7(His → Tyr) + β G8(Leu → Trp)
2. α B10(Leu → Trp) + α E7(His → Gln) + β E7(His → Phe) + β G8(Leu → Trp)
3. α B10(Leu → Trp) + α E7(His → Gln) + β E7(His → Tyr) + β E11(Val → Trp)
4. α B10(Leu → Trp) + α E7(His → Gln) + β E7(His → Phe) + β E11(Val → Trp)
5. α B10(Leu → Trp) + α E7(His → Gln) + β E11(Val → Trp) [3011]
6. α B10(Leu → Trp) + α E7(His → Gln) + β G8(Leu → Trp) [3012]
7. α B10(Leu → Trp) + α E7(His → Gln) + β E11(Val → Met) + β G8(Leu → Trp) [3017]
8. α B10(Leu → Trp) + α E7(His → Gln) + β E7(His → Gln) + β E11(Val → Met) + β G8(Leu → Trp) [3019]
9. α B10(Leu → Trp) + β E11(Val → Trp)
10. α B10(Leu → Phe) + α E7(His → Gln) + β G8(Leu → Trp) [2821]
11. α B10(Leu → Phe) + α E7(His → Gln) + β E11(Val → Trp)

12. α B10(Leu \rightarrow Phe) + β E11(Val \rightarrow Trp) [3001]
13. α E11(Val \rightarrow Phe) + β E11(Val \rightarrow Phe) + β G8(Leu \rightarrow Ile) [3002]
14. α E11(Val \rightarrow Leu) + β E11(Val \rightarrow Phe) [3004]

di- α -Konstrukte, die die folgenden β -Globinsubstitutionen enthalten:

[0062] Die mit einem Stern markierten Mutanten sind Teil der vorliegenden Erfindung. Die restlichen Mutanten, die nicht Teil der Erfindung sind, wurden für Referenzzwecke aufgelistet.

B10(Leu \rightarrow Phe) + B13(Leu \rightarrow Trp)
 B10(Leu \rightarrow Phe) + B13(Leu \rightarrow Met)
 B10(Leu \rightarrow Phe) + G12(Leu \rightarrow Trp)
 B10(Leu \rightarrow Phe) + G12(Leu \rightarrow Met)
 B13(Leu \rightarrow Trp) + E11(Val \rightarrow Phe)
 B13(Leu \rightarrow Trp) + E11(Val \rightarrow Trp)
 B13(Leu \rightarrow Met) + E11(Val \rightarrow Phe)
 B13(Leu \rightarrow Met) + E11(Val \rightarrow Trp)
 *E11(Val \rightarrow Leu) + G8(Leu \rightarrow Trp)
 *E11(Val \rightarrow Met) + G8(Leu \rightarrow Trp oder Phe)
 G8(Leu \rightarrow Phe) + B13(Leu \rightarrow Met)
 G8(Leu \rightarrow Phe) + B13(Leu \rightarrow Trp)
 *G8(Leu \rightarrow Phe) + G12(Leu \rightarrow Met)
 *G8(Leu \rightarrow Phe) + G12(Leu \rightarrow Trp)
 E11(Val \rightarrow Leu) + G8(Leu \rightarrow Met oder Phe)
 E11(Val \rightarrow Met) + G8(Leu \rightarrow Met)
 E11(Val \rightarrow Phe) + G8(Leu \rightarrow Trp, Met oder Phe)
 G8(Leu \rightarrow Trp) + B13(Leu \rightarrow Met)
 G8(Leu \rightarrow Trp) + B13(Leu \rightarrow Trp)
 G8(Leu \rightarrow Trp) + G12(Leu \rightarrow Met)
 G8(Leu \rightarrow Trp) + G12(Leu \rightarrow Trp)
 E11(Val \rightarrow Phe oder Trp) + G12(Leu \rightarrow Met oder Trp)

[0063] Eine Kombination dieser Mutationen kann auch in größeren Hämoglobinen mit mehr als einem Tetramer wie beispielsweise di-Hämoglobinen (di-di- α -Konstrukten) plaziert werden.

[0064] Im allgemeinen kann die Substitution großer hydrophober Reste an Schlüsselpositionen in den distalen Hämtaschen von α - und β -Globinen die Rate der NO-katalysierten Oxidation (NO-Aufnahme) wesentlich verringern. Für diese allgemeine Beobachtung gibt es jedoch Ausnahmen. Beispielsweise verringerten Substitutionen von Trp und Phe an Leu-B10 in α -Untereinheiten die NO-Aufnahme-Rate sehr stark (etwa 20 Mal langsamer), Trp- und Phe-Substitutionen an Leu-B10 in β veränderten die NO-Aufnahme-Rate jedoch nicht merklich.

[0065] Umgekehrt verringerten Trp- und Phe-Substitutionen an Leu-G8 signifikant die NO-Aufnahme-Rate in β (6 Mal langsamer für Trp), hatten jedoch keinen nachweisbaren Einfluß auf die NO-Aufnahme-Rate in α . Überdies stimmten, während Substitutionen an Val-E11 verringerte NO-Aufnahme-Raten sowohl für α - als auch β -Untereinheiten ergaben, die Ergebnisse nicht genau mit der Größe der substituierten Aminosäure überein (Tabelle 1).

Tabelle 1

Mutante	Untereinheit	$k'_{\text{NO,ox}} (\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$
Val-E11 (Wildtyp)	α	70
Trp an Val-E11	α	22
Phe an Val-E11	α	26
Leu an Val-E11	α	16
Val-E11 (Wildtyp)	β	60
Trp an Val-E11	β	5
Phe an Val-E11	β	12
Leu an Val-E11	β	16

[0066] In alpha-Untereinheiten erzeugt die kleinste Aminosäure (Leucin) die größte Verringerung der NO-Aufnahme-Rate. In beta-Untereinheiten stimmen die Ergebnisse mehr mit der Vorhersage überein, daß eine Erhöhung der Masse und Hydrophobie die NO-Aufnahme-Rate verringern wird.

[0067] Aminosäuresubstitutionen, die von Mutantenbibliotheken erhalten wurden, stimmten im allgemeinen auch mit denen großer hydrophober Reste, die verringerte Raten der NO-Aufnahme fördern, überein. Unter den Mutanten, denen in diesem Screen signifikant verringerte Raten NO-katalysierter Oxidation nachgewiesen wurden, gab es eine Überzahl von Substitutionen wie Trp, Phe, Leu, Met, Val und Ile. Jedoch wurden auch bei einigen mutierten Hämtaschen, die ungewöhnliche hydrophile Reste wie Thr, Ser, Tyr und His enthalten, wesentlich verringerte NO-Aufnahme-Raten festgestellt. Während solche Substitutionen aufgrund einer schnellen Hutoxidation erwartungsgemäß zu instabilen Molekülen führen können, können einige dieser Moleküle neue und nützliche Eigenschaften zeigen.

[0068] Die NO-Mutanten der vorliegenden Erfindung sollten eine Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin ($k'_{\text{No,ox}}$) kleiner als herkömmliches Hämoglobin, bevorzugt im Bereich von etwa $0,1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bis weniger als etwa $60 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aufweisen. Bevorzugt ist die Geschwindigkeitskonstante kleiner als $25 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, stärker bevorzugt liegt sie zwischen 12 und $15 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und ist am stärksten bevorzugt kleiner als $5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

[0069] Die Ergebnisse für die in vivo getesteten erzeugten NO-Mutanten demonstrieren eine lineare Korrelation zwischen dem Ausmaß der pressorischen Wirkung in vivo und der In-vitro-Rate der NO-Aufnahme. Beispielsweise führte die Verringerung der NO-Reaktivität der Hämgruppen zu einer signifikanten Verringerung des Ausmaßes der pressorischen Reaktion in Ratten bei Bewußtsein.

[0070] Folglich stützen die Daten die Hypothese, daß die pressorische Reaktion auf extrazelluläre Hämoglobine einer Verringerung der Fließgleichgewichtslevel von NO in der Region der Endothel- und Glattmuskelzellen, die die Gefäßanordnung auskleiden, zuzuschreiben ist. Eine Verringerung der NO-Konzentration führt zu einer geringeren Aktivierung von Guanylylcyclase, was schließlich den Tonus des vaskulären glatten Muskels erhöht. Es wird angenommen, daß es nach der Verabreichung von zellfreiem Hämoglobin zu einem Wettstreit um das verfügbare NO zwischen Guanylylcyclase und Eisen(II)-oxy- und -desoxyhämoglobin kommt (eine Extravasation des Hämoglobins in oder durch das Endothel kann erforderlich sein). Rekombinante Hämoglobine, die niedrigere Reaktionsgeschwindigkeiten mit NO aufweisen, sind weniger starke Konkurrenten für Stickstoff(mon)oxid. Folglich sind die NO-Mutanten der vorliegenden Erfindung für eine Vielzahl von Anwendungen verwendbar, da sie aufgrund ihrer intrinsischen niedrigeren Reaktivitäten nur eine kleine oder keine Störung im natürlichen Stoffumsatz von Stickstoff(mon)oxid erzeugen, Sauerstoff jedoch noch immer binden und abgeben können.

[0071] Die Ergebnisse demonstrieren auch, daß, wenn die zur Verringerung der NO-Aufnahme verwendeten Aminosäuresubstitutionen eine unerwünschte Wirkung auf die Sauerstoffabgabe haben, der P_{50} und die O_2 -Dissoziationsrate durch andere strategisch platzierte Aminosäuresubstitutionen „korrigiert“ werden können. Die O_2 -Kinetiken und -Gleichgewichte können durch Verändern der Position des allosterischen Gleichgewichts oder durch Verändern der intrinsischen Bindungskinetiken und -affinität der Untereinheiten manipuliert werden. Von den distalen Hämtaschen entfernte Mutationen können dazu verwendet werden, die relativen Stabilitäten der allosterischen hochaffinen „R-“ und niedrigaffinen „T“-Zustände zu verändern. Die Hämoglobinallosterie hat eine signifikante Wirkung auf die Sauerstoffbindung, aber keine Wirkung auf die Oxidation durch NO.

[0072] Die intrinsischen O₂-Bindungseigenschaften jeder Untereinheit können durch Variierung des Grades der sterischen Hinderung nahe dem Eisenatom oder durch Variierung der Stärke der Wasserstoffbindung zwischen dem E7-Rest und dem gebundenen Sauerstoff modifiziert werden. Eine sterische Hinderung beeinflusst die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten durch Veränderung des Eintritts und Austritts von Sauerstoff in die und aus der Hämtasche. Dem ähnlich beeinflusst eine sterische Hinderung auch die Oxi-dationsrate durch NO. Das E7-Histidin stabilisiert gebundenen Sauerstoff durch Wasserstoffbindungswechselwirkungen. Die Substitution des E7-Histidins kann den Stabilisierungsgrad von gebundenem Sauerstoff verringern und die Sauerstoffdissoziationskinetiken verstärken. E7-Substitutionen können auch die Reaktivität von NO mit Hb beeinflussen.

[0073] Die Ergebnisse demonstrieren ferner die nützlichen Wirkungen bezüglich der Vergrößerung des Hämoglobinmoleküls, was zu den Wirkungen der Aminosäuresubstitutionen, die zur Verringerung der NO-Aufnahme verwendet wurden, wie in [Fig. 8](#) gezeigt, hinzukommt.

[0074] Die rekombinanten Hämoglobine der vorliegenden Erfindung können für eine Vielzahl von In-vitro- oder In-vivo-Anwendungen verwendet werden. Solche In-vitro-Anwendungen umfassen beispielsweise die Abgabe von Sauerstoff durch Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung zur Verstärkung des Zellwachstums in Zellkultur durch Aufrechterhaltung der Sauerstoffkonzentrationen in vitro (DiSorbo and Reeves, PCT-Veröffentlichung WO 94/22482). Überdies können die Hämoglobine der vorliegenden Erfindung zur Entfernung von Sauerstoff aus Lösungen, aus denen Sauerstoff entfernt werden muß (Bonaventura und Bonaventura, US-Patent 4,343,715) und als Referenzstandards für analytische Assays und Meßgeräte (Chiang, US-Patent 5,320,965) und andere solche In-vitro-Anwendungen, die einem Fachmann bekannt sind, verwendet werden.

[0075] Des weiteren können rekombinante Hämoglobine zur Verwendung in verschiedenen therapeutischen Anwendungen formuliert werden. Beispielformulierungen, die für das rekombinante Hämoglobin der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, werden in Milne, et. al., WO 95/14038 und Gerber et. al., WO 96/27388 beschrieben. Pharmazeutische Zusammensetzungen können beispielsweise durch subkutane, intravenöse oder intramuskuläre Injektion, topische oder orale Verabreichung, großvolumige parenterale Lösungen, als Aerosol, durch transdermale oder Mukusmembranadsorption und dergleichen verabreicht werden.

[0076] Beispielsweise können die rekombinanten Hämoglobine der vorliegenden Erfindung in Zusammensetzungen, die als Ersatzstoffe für rote Blutzellen verwendbar sind, in jeder Anwendung, in der rote Blutzellen verwendet werden, oder für jede Anwendung, in der die Sauerstoffabgabe gewünscht ist, verwendet werden. Die rekombinanten Hämoglobine können auch als Sauerstoff-tragende Therapeutika formuliert und zur Behandlung von Hämorrhagien, Traumata und chirurgischen Eingriffen, wo Blutvolumen verloren geht und entweder das Flüssigkeitsvolumen oder die Sauerstofftransportkapazität oder beides erneuert werden muß, verwendet werden. Überdies können die rekombinanten Hämoglobine der vorliegenden Erfindung, da sie pharmazeutisch akzeptabel gefertigt werden können, nicht nur als Blutersatzstoffe, die Sauerstoff abgeben, sondern auch als einfache Volumenexpander, die aufgrund der Gegenwart des großen Hämoglobinproteinmoleküls onkotischen Druck liefern, verwendet werden.

[0077] In einer weiteren Ausführungsform können die rekombinanten Hämoglobine der vorliegenden Erfindung durch Verfahren, die in der Technik bekannt sind, vernetzt und in Fällen verwendet werden, in denen wünschenswerterweise die Extravasation eingeschränkt oder der kolloidosmotische Druck des Hämoglobin-basierenden Blutersatzstoffes verringert werden soll. So können die rekombinanten Hämoglobine Sauerstoff als einen Ersatzstoff für rote Blutzellen transportieren, während sie die Nebenwirkungen, die mit einer übermäßigen Extravasation verbunden sein können, verringern.

[0078] Eine typische Dosis an rekombinantem Hämoglobin als ein Sauerstoffabgabemittel kann 2 mg bis 5 Gramm Hämoglobin pro Kilogramm Körpergewicht des Patienten betragen. So kann eine typische Dosis für einen menschlichen Patienten einige wenige Gramm bis über 350 Gramm betragen. Es ist davon auszugehen, daß der Einheitsgehalt der Wirkstoffe, die in einer einzelnen Dosis jeder Dosierform enthalten sind, nicht selbst eine wirksame Menge bildet, da die notwendige wirksame Menge durch mehrfache Verabreichungen erreicht werden kann. Die Wahl der Dosierung hängt von der genutzten Dosierform, des zu behandelnden Zustandes und dem jeweils gemäß der Bestimmung des Fachmanns zu erfüllenden Zweck ab.

[0079] Die Verabreichung rekombinanten Hämoglobins kann für einen Zeitraum von Sekunden bis Stunden stattfinden, was vom Zweck der Hämoglobinverwendung abhängt. Beispielsweise geschieht die Verabreichung als Sauerstoffträger so schnell wie möglich. Typische Infusionsraten für Hämoglobinlösungen als Sau-

erstofftherapeutika können etwa 100 ml bis 3000 ml/Stunde betragen.

[0080] In einer weiteren Ausführungsform können die Hämoglobine der vorliegenden Erfindung zur Behandlung von Anämie verwendet werden, sowohl durch Bereitstellen zusätzlicher Sauerstofftransportkapazität in einem Patienten, der unter Anämie leidet, als auch/oder durch Stimulierung der Hämatopoese, wie in der PCT-Veröffentlichung WO 95/24213 beschrieben, hierin durch Verweis aufgenommen. Bei der Verwendung zur Stimulierung der Hämatopoese können die Verabreichungsgeschwindigkeiten langsam sein, da die Dosierung des Hämoglobins viel geringer ist als Dosierungen, die zur Behandlung von Hämorrhagie erforderlich sind. Daher können die rekombinanten Hämoglobine der vorliegenden Erfindung für Anwendungen genutzt werden, bei denen die Verabreichung hoher Volumen an Hämoglobin erforderlich ist, sowie in Situationen, in denen nur ein kleines Volumen des Hämoglobins der vorliegenden Erfindung verabreicht wird.

[0081] Da die Verteilung extrazellulärer Hämoglobine in der Gefäßanordnung nicht durch die Größe der roten Blutzellen eingeschränkt ist, können die Hämoglobine der vorliegenden Erfindung zum Zuführen von Sauerstoff in Bereiche, in die rote Blutzellen nicht eindringen können, verwendet werden. Diese Bereiche können alle Gewebereiche umfassen, die sich downstream der Obstruktion des Flusses roter Blutzellen befinden, wie Bereiche hinter Thromben, Sichelzellokklusionen, Arterienokklusionen, Angioplastieballons, chirurgischen Instrumenten, alle Gewebe, die an Sauerstoffmangel leiden oder hypoxisch sind und dergleichen. Überdies können unter Verwendung der Hämoglobine der vorliegenden Erfindung alle Arten von Gewebeischämie behandelt werden. Solche Gewebeischämien umfassen beispielsweise Schlaganfall, aufkommenden Schlaganfall, vorübergehende ischämische Anfälle, Myokardbetäubung und Hibernation, akute oder instabile Angina, aufkommende Angina, Infarkt und dergleichen. Rekombinantes Hämoglobin kann auch begleitend zur Bestrahlung oder Chemotherapie zur Behandlung von Krebs verwendet werden:

Aufgrund der breiten Verteilung im Körper können die rekombinanten Hämoglobine der vorliegenden Erfindung auch zur Abgabe von Arzneimitteln und zur In-vivo-Bildgebung verwendet werden, wie in WO 93/08842 beschrieben.

[0082] Rekombinante Hämoglobine können auch als Ersatz für Blut, das während chirurgischer Verfahren, wo das Blut des Patienten entfernt und zur Reinfusion am Ende des chirurgischen Eingriffes oder während der Erholung (akute normovolämische Hämodilution oder Hämoaugmentation) aufbewahrt wird, entfernt wurde, verwendet werden. Überdies können die rekombinanten Hämoglobine der vorliegenden Erfindung zur Erhöhung der Menge an Blut, das vor einem chirurgischen Eingriff gespendet werden kann, verwendet werden, indem sie etwas von der Sauerstofftransportkapazität ersetzen, die abgegeben wird.

[0083] Die folgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung veranschaulichen, aber nicht einschränken. Die Beispiele 1–4 sind Studien, die sich auf die Expression rekombinanter Hämoglobine in *E. coli* beziehen, während die Beispiele 5–10 Studien sind, die sich auf Hämoglobinmutanten mit verringerter NO-Aufnahme beziehen.

BEISPIEL 1

Genetische Konstruktion

[0084] PCR-basierende Kassettenmutagenese wurde zum Einführen der gewünschten Aminosäuresubstitutionen durchgeführt. Die DNA-Sequenz für variante Codons basierte auf Codons, die in Proteinen verwendet werden, die stark in *E. coli* exprimiert werden, wie in Sharp et. al., J., Nucl Acids Res. 16: 8207–8211 (1988). Im allgemeinen wurden die Stämme unter Verwendung des Verfahrens von Chung, et al. Proc Natl Acad. Sci USA 86: 2172–2175 (1989) oder Hanahan, DNA Cloning: A Practical Approach Bd. 1, S. 109–135 (IRL Press, 1985) durch Transformation der Plasmid-DNAs in *E. coli*-Stämme, denen Plasmid fehlt, konstruiert.

[0085] Es wurde eine Vielzahl von *E. coli*-Stämmen verwendet, einschließlich der in den Tabellen 2 und 3 aufgelisteten. Die Konstruktion dieser Stämme, insbesondere derer, die unterschiedliche oligomerisierende Mutanten oder Domänen enthalten, wird in WO 97/04110 beschrieben, hierin durch Verweis aufgenommen. Die Tabellen 4 und 5 fassen den Stammhintergrund und die Plasmidhauptkette, die zur Expression dieser Moleküle verwendet wurden, zusammen. Es ist gezeigt worden, daß die Plasmidkopiezahl auch die Ausbeuten der löslichen Expression beeinflusst. Das Plasmid mit mittlerer Kopiezahl pSGE705 diente als eine Plattform für einige der getesteten Moleküle. Die Plasmide pSGE715 und pSGE720 sind Plasmide mit hoher Kopiezahl, und die Expression aus diesen Plasmiden sollte die, die bei den pSGE705-basierenden Plasmiden zu beobachten war, übersteigen. pSGE720 enthält ein synthetisches Operon, bestehend aus den di- α -Globin- und β -Presbyterian-Globin-Genen, transkribiert aus dem tac-Promotor auf einem Tetracyclin-resistenten Plasmid mit dem

pUC-Replikationsstartpunkt mit hoher Kopiezahl (Weickert & Curry, Arch Biochem. Biophys 348: 337–346 (1997)).

Tabelle 2

SGE	Plasmid	Hintergr.-Stamm	alpha	beta
1464	pSGE720	1675	di-	presby
2784	pSGE720	1675	di-	prov
2706	pSGE720	1675	di-	wt
2782	pSGE720	1675	di-	presby + prov
939	pSGE705	1661	di-di-1	presby
2791	pSGE705	1661	di-di-1	wt
946	pSGE720	1675	di-di-1	presby
3085	pSGE720	1675	di-di-1	prov
948	pSGE705	1661	di-di-2	presby
2951	pSGE720	1675	di-di-2	prov
953	pSGE715	1661	di-di-3	presby
2952	pSGE720	1675	di-di-3	prov
955	pSGE715	1661	di-GCN4-di	presby
2792	pSGE715	1675	di-GCN4-di	wt
2795	pSGE720	1675	di-GCN4-di	presby + prov
2796	pSGE720	1675	di-GCN4-di	prov
2802	pSGE720	1675	di-P53	presby
2948	pSGE720	1675	di-P53	prov
2944	pSGE720	1675	di-COMP	presby
2813	pSGE720	1675	di-COMP	prov
3083	pSGE720	2761	di-K158C	presby
3172	pSGE720	2761	di-K158C	presby + prov
3084	pSGE720	2761	di-K158C	prov

Tabelle 3

Stamm	Plasmid	rHb	Wirt-Beschreibung
SGE1675	keins	keins	gyrA96(Na1 ^R), lacI ^{Q1} , endA, hsdR17, relA1, supE44, recJ (ein Derivat von JM107)
SGE1464	pSGE720	1,1	SGE1675
SGE1480	pSGE726	1,0	SGE1675
SGE1483	pSGE728	0,0	SGE1675
SGE2706	pSGE733	0,1	SGE1675
SGE2761	keins	keins	SGE1675 + rpsL (strR) durch P1-Transduktion
SGE2782	pSGE767	9 + 1,1	SGE1675
SGE2784	pSGE768	9,1	SGE1675
SGE3083	pSGE1001	mut.	SGE2761 mit rHb di-αK158C/βK82D
SGE3084	pSGE1222	mut.	SGE2761 mit rHb di-αK158C/βK82D
SGE3138	pMON7124K	keins	gyrA96(Na1 ^R), lacI ^{Q1} , endA, relA1, supE44, recJ (ein Derivat von SGE1675)
SGE3172	pSGE1237	mut.	SGE2761 mit rHb di-αK158C/βN108K, K82D
SGE3261	pSGE768	9,1	SGE3138

BEISPIEL 2

Konstruktion von beta-Mutationen

[0086] pSGE728 wurde durch XhoI-Digestion und Deletion aus pSGE720 einer alpha-Untereinheit und des di-alpha-Glycin-Linkers konstruiert. Das resultierende Plasmid pSGE726 enthielt ein einzelnes alpha-Gen und kein di-alpha-Gen (rHb1.0). Die Presbyterian-Mutation in beta wurde durch Digestion mit BglII und HindIII und Ligation zur Einführung von Wildtyp-beta und Erzeugung von pSGE728 (rHb0.0) ersetzt.

[0087] Die Presbyterian-Mutation im beta-Gen von pSGE720 wurde durch Digestion und Ligation wie bei pSGE728 ersetzt, um so Wildtyp-beta einzuführen und pSGE733 zu erzeugen (di-alpha und Wildtyp-beta; rHb0.1).

[0088] Die Providence-Mutation (β Lys82 \rightarrow Asp) wurde in den rHb1.1-Hintergrund eingeführt, um rHb9+1.1 zu erzeugen. Die Lys82 \rightarrow Asp-Mutation wurde durch PCR-Amplifikation eines Teils des β -Globin-Gens unter Verwendung eines Oligonukleotids, das ein Asp-Codon anstelle von Lys82 enthält, erzeugt. CBG124 (5'-Primer der kodierenden Sequenz des Wildtyps beta nahe der BspEI-Stelle) und CBG119 (3'-Primer, der die β K82D-Mutation nach der Asp18-Stelle enthält) wurden zur Amplifikation eines kleinen DNA-Fragments aus pSGE761 als Matrize verwendet.

CBG119 5'AGC GAA GGT ACC GTC CAG GTT (SEQ. ID-Nr.: 1)

CBG124 5'CCT GAC TCC GGA AGA AAA ATC C (SEQ. ID-Nr.: 2)

[0089] Das PCR-Produkt und der Vektor wurden mit BspEI und Asp718 digeriert und ligiert. Die DNA-Sequenzierung des aus Transformanten isolierten Plasmids wurde mit Sequenase[®]-Kit-Reagenzien und -Protokollen durchgeführt (United States Biochemical, ³³P (Amersham, Inc.)) und die Primer auf einem Applied Biosystems 380B-DNA-Synthesautomat synthetisiert. Die Sequenzierung bestätigte die Providence- und Presbyterian-Mutationen und das Plasmid (pSGE767) wurde unter Erzeugung von SGE2782 in SGE1675 transformiert.

[0090] Die Providence-Mutation wurde in den rHb0.1-Hintergrund eingeführt, um so rHb9.1 zu erzeugen. Ein BamHI/Asp718-Fragment aus pSGE767 wurde isoliert und in digeriertes pSGE733 ligiert (rHb0.1). Die Sequenzierung bestätigte die Mutation, und das Plasmid (pSGE768) wurde unter Erzeugung von SGE2784 in SGE1675 oder von SGE3261 in SGE3138 transformiert. Zur Einführung von Providence_(asp) und der Kombination von Providence_(asp) und Presbyterian in ein Plasmid mit einer di-alpha-Lys158 \rightarrow Cys-Mutation wurden ähnliche Schritte genutzt (Tabelle 5: SGE3083, SGE3084 und SGE3172).

BEISPIEL 3

A. Bakteriellles Wachstum und Leseverfahren

[0091] Jedes getestete Isolat wurde über Nacht bei 37°C als ein Fleck auf einer LB-Platte, angereichert mit Tetracyclin, herangezogen. Impfkulturen wurden über sterile Zahnstocher auf 0,75-ml-Aliquote frischer DM-1-Medien, wie in Looker et. al., (1992), oben, beschrieben, mit 15 μ g/ml Tetracyclin, 0,1 M IPTG (Sigma) und 0,05 mg/ml Hemin (Ameresco) in sterilen 12-mm-(ID) Borsilicat-Röhrchen übertragen. Die Kulturen wurden bei 30°C 18 Stunden unter Schütteln bei 350 U/min in einem Inkubationsschüttler der Reihe New Brunswick 25 inkubiert. Die 0,2-ml-Aliquote wurden auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit flachem Boden (Immunlon 4 von Dynatech) übertragen. Die optische Dichte jedes Loches wurde bei 650 nm unter Verwendung des Spectral Dynamics-Mikroplatten-Lesegeräts und des Softmax-Software-Paketes aufgezeichnet. Die Zellen wurden am Boden der Mikroplatten bei 3000 U/min bei 4°C für 10 Minuten unter Verwendung der Beckman-RK6-Zentrifuge, 3.7 Rotor und Mikroplatten-Adapterbehälter pelletiert. Die verbrauchten Medien wurden entfernt, und die Zellen wurden in 0,1 ml 25 mM Borax unter leichter Verwirbelung der Mikroplatte resuspendiert. Die Mikroplatten wurden mit Parafilm abgedeckt und bei -80°C über Nacht gelagert und dann bei 30°C in einem Wasserinkubator aufgetaut. Aus 1-mg/ml-Stammlösung, enthaltend 0,05 M NaCl, wurde Lysozyme (Ameresco, ultrarein) auf ein Endvolumen von 0,17 mg/ml zugegeben. Die Proben wurden durch leichte Verwirbelung der Mikroplatte gemischt, abgedeckt und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. DNAase I (Boehringer Mannheim, Sorte II aus Rinderpankreas) wurde auf 0,02 mg/ml aus einer 0,1-mg/ml-DNAase-Stammlösung, enthaltend 7,5 mM CaCl₂ und 75 mM MgCl₂, zugegeben. Die Proben wurden durch leichte Verwirbelung der Mikroplatte gemischt, abgedeckt und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Die Mikroplatten wurden mit Parafilm abgedeckt und bei -80°C 90 min bis 20 Stunden gelagert und dann bei 30°C in einem Wasserinkubator plaziert, bis sie aufgetaut waren. Die Zelltrümmer wurden am Boden der Mikroplatten bei 3000 U/min bei 4°C

10 Minuten unter Verwendung der Beckman RK6-Zentrifuge, 3.7 Rotor und Mikroplatte-Adapterbehältern pelletiert. Das gesäuberte Lysat wurde in die Löcher einer frischen Mikroplatte übertragen und bei 4°C ungefähr 12 Stunden gelagert.

B. ELISA

[0092] Die gesäuberten Lysate wurden 1:800 oder 1:1600 in PBS mit 0,1% (Gew./Vol.) Kasein und 1,08% (Gew./Vol.) Tween 80 verdünnt. Rekombinante di-alpha-Hämoglobin-(rHb-)Standards wurden seriell in diesem Puffer verdünnt und zur Erstellung einer Standardkurve in diesem Verfahren verwendet. Für das folgende Verfahren wurden alle Reagenzien in 0,1-ml-Aliquoten zugegeben, sofern nicht etwas anderes angezeigt ist. Aliquote von 5 µg/ml affinitätsgereinigten Ziege-anti-rHb1.1-Antikörpern in Borat-gepufferter Salzlösung wurden zum Beschichten der Löcher der Immulon-4-Mikroplatten (Dynatech) für 18 Stunden bei 4°C verwendet. Die Löcher wurden dann für einen kurzen Zeitraum vollständig mit Kasein-Blocker (Pierce) gefüllt, um so nicht-spezifische Bindung zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit ELISA-Waschpuffer wurden dann verdünnte Proben und Standards zugegeben und die Platten bei 37°C 60 Minuten inkubiert. Die Platten wurden wie oben gewaschen, und ein Biotin-markierter Ziege-anti-rHb1.1-Antikörper bei 50 ng/ml in PBS mit 1% Kasein wurde in jedes Loch gegeben.

[0093] Die Platten wurden abgedeckt und bei 37°C 60 Minuten inkubiert und wie oben gewaschen. Eine 1:10.000-Verdünnung von Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Southern Biotechnology Associates) in 0,1% Kasein in PBS wurde hergestellt und verteilt, und die Platten wurden abgedeckt und bei 37°C 20 Minuten inkubiert und wie oben gewaschen. Die TMB-Peroxidase-Substrat-Arbeitslösung B wurde gemäß den Vorgaben des Herstellers (Kieckegaard) hergestellt und schnell zugegeben. Nach 10 Minuten wurde 1 M Phosphorsäure in jedes Loch gegeben, um die Reaktion zu löschen. Das Absorptionsvermögen bei λ 450–650 nm wurde für jede Platte abgelesen. Die Werte wurden dann gegen die Standard-Kurve normalisiert und zur Verdünnung und hinsichtlich der optischen Dichte der Originalkultur bei 650 nm eingestellt.

BEISPIEL 4

Fermentationen

[0094] Fermentationen wurden in einem definierten Medium in 15-l-Biolaffite-Fermentatoren im allgemeinen wie in Looker et. al., „Expression of Recombinant Human Hemoglobin in Escherichia coli.“ Meth. Enzymol. 231: 364–374, (1994) beschrieben, unter Verwendung des DM59(60)-Mediums unter Glucoseüberschußbedingungen (BAR-Bedingungen) mit Induktion für 16 Stunden bei 28°C durchgeführt, außer, es ist etwas anderes angegeben. Zur Minimierung des Beitrags der Tag-zu-Tag- und Fermenter-zu-Fermenter-Variabilität zu den Ausbeuteergebnissen verteilten einige Experimente Stämme unter den Fermentern und Gruppen von Fermentationen, so daß jede Gruppe von Fermentationen nebeneinander liegende Kontrollen enthielt und wenn möglich die Stämme nicht mehr als einmal demselben Fermenter zugeordnet wurden. Die Induktion der Expression wurde durch die Zugabe von IPTG zwischen 10 und 200 µM unter Erhalt einer Zelldichte mit einer OD₆₀₀ von ungefähr 30 erreicht. Die Inkubation wurde für 16 Stunden nach der Induktion fortgeführt und Hämin wurde in fünf Schüssen von 10, 13, 17, 17 und 17 ml 0, 3, 6, 9 bzw. 12 Stunden nach der Induktion zugegeben, wobei eine Gesamtkonzentration von 0,37 g/l an Hämin abgegeben wurde. 1-ml-Fermentationsproben wurden 4, 8, 12, 14 und 16 Stunden nach der Induktion abgezogen und auf lösliches rHb1.1 untersucht. In anderen Studien wurde Hämin in fünf Schüssen von je 25 ml zugegeben und nach 12, 14 und 16 Stunden gesammelt.

BEISPIEL 5

Genetische Konstruktion von NO-Mutanten

[0095] Mutationen wurden in geklonte humane alpha- und beta-Gene mittels ortsgerichteter PCR-basierender Mutagenese eingeführt, wie allgemein von Innis et. al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (1990) beschrieben. Im allgemeinen wurden die gewünschten Mutationen in synthetische DNA-Oligonukleotide eingeführt, die gemäß den Vorgaben des Herstellers auf einem Applied Biosystems 392-DNA-Syntheseseautomat synthetisiert wurden. Dem Standard-Entblockungsverfahren folgend, wurden die Oligonukleotide durch Vakuumzentrifugation getrocknet, in dem gewünschten Puffer resuspendiert und in sterilem Wasser auf 10–50 pmol/µl verdünnt.

[0096] Diese Oligonukleotide wurden als Primer in PCR-Reaktionen verwendet, wo ein rekombinantes Plasmid, das geklonte Wildtyp-alpha- und -beta-Gene trägt, wie pSGE728 ([Fig. 1](#)), als Matrizen-DNA verwendet

wurde.

[0097] Diese mutagenen Oligonukleotid-Primer sollten die Stelle, an der die Mutation(en) eingeführt werden soll(en), und eine in der Nähe liegende Restriktionsendonuklease-Erkennungsstelle umfassen, um so das Klonen der resultierenden PCR-Produkte, die die in Frage stehenden Mutationen tragen, zu erleichtern. Um die DNA-Amplifikation in der PCR-Reaktion zu ermöglichen, ist auch ein zweiter Oligonukleotid-Primer erforderlich. Dieser Primer kann auch so gestaltet sein, daß er Globin-Gen-Mutation(en) enthält oder alternativ aus einer Wildtyp-Globin-Gensequenz aus einer Nachbarregion des alpha- oder beta-Globin-Gens bestehen kann. Dieser zweite Primer sollte auch eine Restriktionsendonuklease-Erkennungsstelle enthalten, so daß das resultierende PCR-Produkt für die anschließende Expression des mutierten alpha- oder beta-Globins in geeignet digerierte pSGE728 geklont werden kann. Teilrestriktionskarten der alpha- und beta-Gene aus pSGE728 sind in den [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) gezeigt.

[0098] Die Längen der mutagenen Oligonukleotide wurden durch den Abstand zwischen der zu mutierenden Stelle und der am nächstliegenden Restriktionsstelle, die in das mutagene Oligonukleotid an einer Position zwischen dem 5-Prime-Ende des Oligos und der zu mutierenden Stelle eingeführt werden kann, bestimmt. Die mutagenen Oligos waren typischerweise 30 bis 45 Nukleotide lang und enthielten Mutationen, die ein oder zwei Codons affizieren, obgleich nach Bedarf potentiell auch noch mehr Positionen verändert werden können. Allgemein ist es wünschenswert, die mutierten DNA-Sequenzen soweit weg wie möglich vom 3-Prime-Ende des Oligos zu platzieren, um so mögliche Probleme während des Primer-Annealing-Schrittes der PCR-Reaktion zu vermeiden oder zu minimieren. Die mutierten Nukleotide wurden im allgemeinen 5–10 Nukleotide stromaufwärts des 3-Prime-Endes des mutagenen Primers plaziert. Die Globin-Gen-Restriktionsstelle, die nahe dem 5-Prime-Ende des mutagenen Oligonukleotids eingeführt wurde, wurde im allgemeinen 5–12 Nukleotide stromabwärts des 5-Prime-Endes plaziert, um die anschließende Digestion der PCR-Produkte zu erleichtern. Oligonukleotide, die einzig als Primer in der PCR eingesetzt wurden (d. h., keine Mutationen enthielten), waren typischerweise 24–36 Nukleotide lang und enthielten Globin-Gen-Restriktionsstellen, die sich im allgemeinen 6–12 Nukleotide stromabwärts des 5-Prime-Endes des Oligonukleotids befanden.

[0099] Die PCR-Reaktionen wurden im allgemeinen in einem Applied Biosystems Gene-Amp 9600 durchgeführt. Die PCR-Reaktionsbedingungen wurden empirisch bestimmt: die Denaturierung fand typischerweise bei 95°C für 15–60 Sekunden statt, die allgemeinen Annealingtemperaturen lagen im Bereich von 45–60°C für 15–30 Sekunden, wobei viele Reaktionen beim Annealing in einem Bereich von 50–55°C verliefen und die Verlängerungen wurden bei 72°C für 15–120 Sekunden durchgeführt.

[0100] In einigen Beispielen wurde die Annealingtemperatur im Verlauf der Reaktion erhöht: z. B. kann eine Reaktion aus 5 Runden mit einer Annealingtemperatur von 45°C, gefolgt von 20 Runden bei einer Annealingtemperatur von 60°C bestehen. Typische Reaktionen bestanden aus insgesamt 25–30 Zyklen. Die Reaktionen wurden typischerweise in 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Pharmacia) und 0,001% Gelatine durchgeführt. Die Oligonukleotid-Primer wurden für gewöhnlich in Konzentrationen von 0,5–1,0 µM zugegeben. Die gereinigte Plasmid-DNA (etwa 0,1–10 ng pro Reaktion), wie pSGE728, wurde im allgemeinen als Matrize verwendet. AmpliTaq®-DNA-Polymerase (Perkin Elmer) wurde typischerweise in 1–10 Einheiten pro Reaktion verwendet, und die Reaktionsvolumen lagen im Bereich von 20–100 µl.

[0101] Nach der PCR-Reaktion wurden die Reaktionsprodukte unter Verwendung des QIA-quick-PCR-Reinigungs-Kits (QIAGEN Inc. Santa Clarita, CA) gereinigt. Die gereinigten Produkte wurden dann der Restriktionsendonuklease-Digestion mit den geeigneten Enzymen unterzogen, um so DNA-Fragmente zu erzeugen, die zum Klonen in ähnlich geschnittenen pSGE728 geeignet sind. Die Restriktionsdigests wurden gemäß den Protokollen des Lieferanten durchgeführt.

[0102] Die digerierten PCR-Fragmente können direkt geklont oder zunächst der Agarose-Gelelektrophorese unterzogen und aus den Agarosegelen gereinigt werden. Die Gelzusammensetzung und die Elektrophoresebedingungen wurden basierend auf der Größe des DNA-Fragments ausgewählt. Viele Fragmente waren etwa 60–250 Basenpaare lang und für diese Fragmente ist die Auflösung in Gelelektrophorese optimal mit Gelen wie 3%iger NuSeive-Agarose oder 4%iger Metaphor-Agarose, beide erhalten von FMC BioProducts (Rockland, ME) und gemäß den Protokollen des Lieferanten verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente unter Verwendung des QIAEX II-Gel-Extraktionskits (QIAGEN Inc. Santa Clarita, CA) gemäß den Protokollen des Lieferanten aus den Agarosegel-Scheiben gereinigt. Auch der Vektor pSGE728 wurde mit den zum Klonen des/der in Frage stehenden mutierten PCR-Fragments/Fragmente geeigneten Enzymen digeriert und gemäß herkömmlicher Elektrophorese ähnlich gel-gereinigt.

[0103] Die digerierten und gereinigten mutagenisierten PCR-Fragmente wurden mit einem digerierten und gereinigten pSGE728-Vektorfragment unter Verwendung von T4-DNA-Ligase (New England BioLabs Beverly, MA) gemäß den Protokollen des Lieferanten ligiert, und die Ligationsprodukte wurden zum Transformieren von *E. coli* verwendet. Für diesen Zweck wurde oftmals der *E. coli*-Stamm JM109, erhalten als kompetente Zellen von Promega (Madison, WI), verwendet, obgleich andere Stämme von *E. coli* sowie andere verschiedene Verfahren zur Herstellung kompetenter Zellen auch eingesetzt werden können (Sambrook et. al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, 1989)). Die Transformanten wurden hinsichtlich der Tetracyclin-Resistenz ausgewählt, und konnten anschließend zur Identifizierung der in Frage stehenden Mutationen und zur Bestätigung der Sequenz des mutagenisierten geklonten PCR-Segments sequenziert werden. Die Plasmid-Matrizes wurden unter Verwendung des QIAprep-Spin-Miniprep-Kits (QIAGEN) hergestellt und unter Verwendung des AmpliCycle™-Sequenzierungs-Kits (Perkin Elmer, Foster City, CA) gemäß dem Protokoll des Lieferanten sequenziert. Ein Teil der Sequenzierung wurde manuell unter Verwendung von Sequenase durchgeführt (United States Biochemical, Cleveland, OH), das bevorzugte Verfahren ist jedoch das automatisierte Sequenzieren unter Verwendung des AmpliCycle™-Sequenzierungs-Kits (Perkin Elmer, Foster City, CA) zur Durchführung von Sequenzreaktionen gemäß dem Protokoll des Lieferanten und Analyse auf einem ABI Prism 377-DNA-Sequenzierungsautomaten (Applied Biosystems Division von Perkin Elmer, Foster City, CA).

[0104] Manchmal wurden Variationen dieses Verfahrens verwendet, wenn sich eine zu mutierende Stelle ausreichend nahe an der Restriktionsstelle, die in pSGE728 einmal vorhanden war, befand. In diesem Fall kann ein sogenanntes „Helfer“-DNA-Fragment zur Erleichterung der Klonierungsschritte eingesetzt werden. Beispielsweise ist in dem alpha-Gen ([Fig. 5](#)) das Codon für die V62-Position dieses Proteins ziemlich weit entfernt von einmalig vorhandenen Restriktionsstellen, so daß die in dieser Figur gezeigte MaeIII-Stelle, die für das Plasmid nicht nur einmalig vorhanden ist, für das Segment aus der BamHI-Stelle bis zum V62-Codon jedoch nur einmalig vorhanden ist. Daher wurde das V62-Codon an ein PCR-Fragment, das das MaeIII- bis MluI-Segment des alpha-Gens umfaßt, mutiert, und dieses Fragment wurde nach der MaeIII-Digestion an das gel-gereinigte BamHI-MaeIII-Fragment von pSGE728 ligiert. Dieses Ligationsprodukt wurde mit BamHI und MluI digeriert (die beide einmalig vorhandene Cutter in pSGE728 sind), und das BamHI-MluI-Fragment wurde gel-gereinigt und an das BamHI-MluI- und gel-gereinigte Vektorfragment von pSGE728 ligiert. Alternativ hätten V62-Mutationen in längere Oligonukleotide, die einmalig vorhandene Stellen wie MluI umfassen, eingeführt werden können.

[0105] Zur Konstruktion großer Bibliotheken mutierter Hämoglobine, in denen zwei bis vier Aminosäuren im wesentlichen willkürlich gleichzeitig mutiert wurden, wurden ähnliche Verfahren für die Gestaltung mutagener Oligonukleotide, PCR-Reaktionen und Klonierungsschritte verfolgt. Manchmal war es jedoch wünschenswert, Restriktionsstellen aus bestimmten mutagenen Oligos wegzulassen und statt dessen die Restriktionsstellen, die zum Klonen in pSGE728 über eine anschließende PCR-Amplifikation mit einem Primer, der dieses bestimmte mutagene Oligo teilweise überlappt und sich über eine nützliche Restriktionsstelle erstreckt, notwendig sind, einzuführen. Diese Amplifikationen mußten unter Bedingungen durchgeführt werden, die so gestaltet sind, daß sie Umgebungskontaminanten von Wildtyp-Globinsequenzen wie pSGE728 und andere rekombinante Plasmide, die Globinsequenzen tragen, rigoros ausschließen. Diese Arten von Umgebungskontaminanten könnten möglicherweise bevorzugt in der letzteren Amplifikationsart immunologisch aktiviert werden, da sie an die volle Länge dieser Oligo-Primer reassoziert werden können, wohingegen sich die PCR-Fragmente, die die Zielmatrizes sind, nur an einen kleineren Teil solcher Primer reassoziieren lassen.

[0106] In einigen Fällen wurden zwei oder mehr mutagenisierte PCR-Segmente unter Erzeugung von Segmenten, die vor dem Klonen in den geeignet digerierten pSGE728-Vektor nicht weniger als vier mutagenisierte Stellen enthielten, zusammen ligiert. Die Ligationsprodukte mit der geeigneten Größe wurden identifiziert und anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. In einigen Fällen ging dem Reinigungsschritt die PCR-Amplifikation unter Verwendung von Primern, die spezifisch das in Frage stehende Ligationsprodukt amplifizieren, voraus oder folgte diesem.

[0107] Zur Erzeugung eines breiten Spektrums an Aminosäuresubstitutionen an den in Frage stehenden Positionen wurden mutagene Oligos mit Degeneriertheiten an den in Frage stehenden Positionen synthetisiert. Zur „Randomisierung“ einer gegebenen Position wurden zwei degenerierte Oligos synthetisiert, von denen eines die Sequenz N(T/A/C)T an dem zu randomisierenden Codon enthielt, während das andere die Sequenz (A/T)(T/G)(T/G) an derselben Position enthielt. Diese beiden Oligos konnten vor der PCR zusammengefaßt werden, für gewöhnlich wurden jedoch zwei unabhängige PCR-Reaktionen mit solchen Paaren verwendet und die PCR-Produkte (unter Verwendung eines Alphamager™2000 Documentation & Analysis System von Alpha Innotech Corp San Leandro, CA) durch Visualisierung grob quantifiziert, gefolgt von Gelelektrophorese. Nach der Quantifizierung konnten die groben Äquivalentmengen von jedem Fragment für die anschließenden Klo-

nierungsschritte zusammengefaßt werden. Diese „Randomisierung“ führte zu 20 unterschiedlichen Codons, die 16 unterschiedliche Aminosäuresubstitutionen erzeugen: es gibt zwei Codons jeweils für F, I, L und S; 1 Codon für jeweils D, R, N, A, T, P, C, V, M, H, W und Y. Die Aminosäuren E, K, Q und G sind in diesen Bibliotheken an den „randomisierten“ Positionen nicht vorhanden.

[0108] Nach der Ligation in den pSGE728-Vektor und der Transformation in *E. coli* wurde eine gewisse Anzahl (typischerweise 24–28) unabhängiger Transformanten ausgewählt, und das mutagenisierte PCR-Segment, das in jeder geklont war, wurde sequenziert. Die Plasmid-Matrizes wurden unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep-Kits (QIAGEN) hergestellt und unter Verwendung des AmpliCycle™-Sequenzierungs-Kits (Perkin Elmer, Foster City, CA) gemäß dem Protokoll des Lieferanten sequenziert. Die Sequenzen wurden auf einem ABI-Prism 377-DNA-Sequenzierungsautomaten (Applied Biosystems Division von Perkin Elmer, Foster City, CA) laufen gelassen und analysiert. Die Sequenzen wurden zur Bewertung der Verteilung der Aminosäuresubstitutionen in einer gegebenen Bibliothek und der Häufigkeiten PCR-induzierter und von synthetischem Oligo induzierten Fehlern in einer DNA-Sequenz analysiert. Anschließend wurden Klone aus den Bibliotheken ausgewählt und wie nachstehend beschrieben analysiert.

Beispiel 6

Konstruktion von α - und β -Mutanten (di-alpha und di-di-alpha)

[0109] Für einige Studien wurden wünschenswerterweise rekombinante Hämoglobine erzeugt, die sowohl in den α - als auch den β -Untereinheiten mutiert wurden. Zum Ende hin können α - und β -Mutationen in Derivaten von pSGE728 kombiniert werden. Typischerweise können solche Kombinationen durch Schneiden mutierter Derivate von pSGE728 mit geeigneten Restriktionsendonukleasen, die die α - und β -Sequenzen trennen, Gelreinigung des Restriktionsfragments, das das β -Gen des mutierten β -Derivats von pSGE728 enthält, Gelreinigung des Restriktionsfragments, das das α -Gen des mutierten α -Derivats enthält, Zusammenligieren dieser beiden Fragmente, Transformieren von *E. coli* und Analysieren der resultierenden Transformanten zur Verifizierung der Gegenwart sowohl von α - als auch β -Mutationen erreicht werden.

[0110] Für α - und β -Mutationen an den Resten B10, E11, G8 und E7 können solche Kombinationen durch Digerieren der mutierten Derivate von pSGE728 mit BspHI, das in dem Tetracyclinresistenzgen schneidet, und SacII, das in dem β -Gen schneidet, etwa 28 Basenpaare vom Start der β -kodierenden Sequenz geschaffen werden. Die Digestion mit SacII und BspHI (New England BioLabs, Beverly MA) gemäß den Protokollen des Lieferanten führt zu zwei DNA-Fragmenten: eines 937 bp lang, das einen Teil des Tetracyclinresistenzgens und nahezu das gesamte β -Gen enthält und die Codons für die Aminosäurereste B10, E11, G8 und E7 umfaßt, und das zweite 2318 bp lang, das einen Teil des Tetracyclinresistenzgens und das gesamte α -Gen enthält. Diese Digestionsprodukte können ohne weiteres durch Elektrophorese auf Agarosegelen von (0,6–1,0)% unter Verwendung von SeaKem®-GTG®-Agarose (FMC BioProducts, Rockland, ME) gemäß den Protokollen des Lieferanten abgetrennt werden. Anschließend kann das 937-bp-Fragment, abgeleitet aus dem mutierten β -Derivat von pSGE728, aus dem Agarosegel exzidiert und unter Verwendung des QIAEX II-Gel-Extraktions-Kits (QIAGEN Inc. Santa Clarita, CA) gemäß den Protokollen des Lieferanten gereinigt werden.

[0111] Dem ähnlich kann auch das 2318-bp-Fragment aus dem pSGE728-Derivat, das die α -Mutation trägt, aus dem Gel exzidiert und gereinigt werden. Diese beiden gereinigten Fragmente können unter Verwendung von T4-DNA-Ligase (New England BioLabs Beverly, MA) gemäß den Protokollen des Lieferanten ligiert werden, und die Ligationsprodukte wurden zum Transformieren von *E. coli* verwendet. Für diese Zwecke kann der *E. coli*-Stamm Jm109, erhalten als kompetente Zellen von Promega (Madison, WI), verwendet werden, obgleich auch andere Stämme von *E. coli* sowie andere verschiedene Verfahren zur Herstellung kompetenter Zellen eingesetzt werden können (Sambrook et. al., oben). Die Auswahl Tetracyclin-resistenter Transformanten rekrutiert die Rekonstitution des Tetracyclinresistenzgens, und dies ist fast immer mit der Rekonstitution des β -Gens an der SacII-Stelle verbunden. Bei der Analyse der einzelnen so erhaltenen Transformanten durch Bestimmung der DNA-Sequenz für α - und β -Gene und der groben Plasmidstruktur sind mehr als 90% die gewünschten Rekombinanten, die sowohl die α - als auch die β -Mutationen aufweisen. Für die Sequenzanalyse können Plasmid-Matrizes unter Verwendung des QIAprep-Spin-Miniprep-Kits (QIAGEN) hergestellt und unter Verwendung des AmpliCycle™-Sequenzierungs-Kits (Perkin Elmer, Foster City, CA) gemäß dem Protokoll des Lieferanten sequenziert werden. Die Sequenzen wurden auf einem ABI Prism 377-DNA-Sequenzierungsautomaten (Applied Biosystems Division von Perkin Elmer, Foster City, CA) laufen gelassen und analysiert.

[0112] Für einige Studien wurden wunschgemäß rekombinante Hämoglobine erzeugt, die Aminosäuresubstitutionen sowohl in alpha als auch in beta tragen und in denen die alpha-Untereinheiten durch einen Glycin-Linker (oder einen anderen Aminosäure-Linker) genetisch fusioniert sind. Verfahren zur Konstruktion solcher „di-alpha“-Fusionen sind in Looker et al., Nature 356: 258–260 (1992) beschrieben worden, und diese Verfahren können zur Konstruktion von di-alpha-Versionen irgendeines mutierten alpha-Gens angewendet werden. Solche di-alpha-Mutanten können ohne weiteres mit irgendeinem in Frage stehenden beta-Mutanten wie oben beschrieben kombiniert werden.

[0113] Für einige Studien wurden wunschgemäß rekombinante Hämoglobine erzeugt, die Aminosäuresubstitutionen sowohl in di-alpha als auch beta aufweisen und in denen die di-alpha-Untereinheiten durch einen Peptid-Linker genetisch fusioniert sind, um so ein „di-Hämoglobin-“ oder „di-di-alpha“-Molekül zu erzeugen. Verfahren zur Konstruktion solcher „di-di-alpha“-Fusionen zur Erzeugung von di-Hämoglobinen werden in WO 96/40920 beschrieben, hierin durch Verweis aufgenommen, und diese Verfahren können zur Konstruktion von di-di-alpha-Versionen irgendeines mutierten alpha-Gens angewendet werden. Solche di-di-alpha-Mutanten können ohne weiteres mit irgendeiner in Frage stehenden beta-Mutante wie oben beschrieben kombiniert werden.

BEISPIEL 7

Kleinproduktion für kinetische In-vitro-Assays

[0114] Für kinetische Messungen an einer großen Anzahl von Hämoglobinvarianten wurden E. coli-Stämme, die rekombinante Plasmide enthalten, wie Derivate von pSGE728, die Hämoglobinvarianten kodieren, auf typische Art und Weise in Schüttelkolben für gewöhnlich in Volumen von etwa 50 ml herangezogen. Allgemein definierte Medien, angereichert mit etwa 0,2% Hefeextrakt, wurden für das Zellwachstum verwendet und Tetracyclin wurde zugegeben, im allgemeinen bei 15 µg/ml, um das rekombinante Plasmid aufrechtzuerhalten. Die Expression der Hämoglobingene wurde durch die Zugabe von IPTG, für gewöhnlich in einer Konzentration von 100 µM, induziert, und Hämin wurde auf eine Endkonzentration von 50 µg/ml, im allgemeinen zum Zeitpunkt der Induktion, zugegeben. Die Zellen wurden im allgemeinen bei 28°C herangezogen und induziert. Die zur stationären Phase herangewachsenen Zellen, wie typische gesättigte Über-Nacht-Kulturen, konnten (im allgemeinen mit einer Verdünnung im Bereich von 1/50 bis 1/1000) direkt in Medien, die IPTG und Hämin enthielten, eingeimpft werden, oder solche Kulturen konnten in Medien eingeimpft werden, denen es an IPTG und Hämin fehlte, herangezogen zur log-Phase, z. B. 0,4–0,7 OD bei A_{600} , und dann durch die Zugabe von IPTG induziert werden, wobei Hämin den Kulturen typischerweise zum Zeitpunkt der Induktion zugegeben wurde. Die Kulturen wurden im allgemeinen unter Induktionsbedingungen über Nacht (~ 14–20 Stunden) herangezogen, obgleich kürzere Zeiten, z. B. etwa 6 Stunden, auch eingesetzt werden können. Am Ende dieses Zeitraumes wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und die pelletierten Zellen wurden entweder bei –80°C eingefroren und gelagert oder unmittelbar verarbeitet.

[0115] Die rekombinanten Hämoglobine wurden durch kleinmaßstäbliche Säulenchromatographie unter Verwendung von Fast Flow Zn-Chelating Sepharose (Pharmacia) gereinigt. Während der Reinigung wurden Zellen, Lysate, alle Puffer und eluierten Hämoglobine so stark wie möglich auf Eis kalt gehalten. Typischerweise wurde ein Pellet einer 50-ml-Kultur mit 1,0 ml eiskaltem 25 mM Natriumtetraborat resuspendiert und in ein 1,7-ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden für gewöhnlich durch Ultraschallbehandlung lysiert, obgleich enzymatische Lyse durch Lysozym auch eingesetzt werden kann. Die ultraschallbehandelten Lysate wurden durch Zentrifugation (im allgemeinen etwa $14.000 \times g$ für 15–20 Minuten bei 4°C) geklärt, gefolgt von der Zugabe von 20 µl 20 mM Zn-Acetat.

[0116] Die Überstände wurden auf eine ~ 150–200-µl-Säule geladen, die zuvor wie folgt äquilibriert worden ist:

2–10 Säulenvolumen 0,5 M NaOH

6–10 Säulenvolumen 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,1 bei 0°C

3–10 Säulenvolumen 20 mM Zn-Acetat

6–10 Säulenvolumen 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,1 bei 0°C

[0117] Nach dem Beladen wurde die Säule mit mindestens 9 Säulenvolumen 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,1, bei 0°C, gefolgt von mindestens 3 Säulenvolumen 0,05 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,1, bei 0°C gewaschen und dann mit ~ 1,0 ml des gewünschten Puffers (z. B. 0,1 M Na-Phosphat, pH 7,0), enthaltend 30 mM EDTA, eluiert. Das Hämoglobin wurde typischerweise in einem Volumen von ~ 200–400 µl gewonnen. Diese Proben wurden in kinetischen Assays wie NO-Oxidation und O₂-Dissoziation verwendet. Sofern nicht un-

mittelbar verwendet, wurden die Proben bei -80°C eingefroren und gelagert.

BEISPIEL 8

Reinigung von Hämtaschen-Mutanten

[0118] Alle Moleküle, sowohl monomer als auch dimer, wurden zunächst durch immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) eingefangen und wie in WO 96/15151 beschrieben weiter verarbeitet. Dann wurde die Hämoglobinlösung zur weiteren Reinigung in den geeigneten Ladungspuffer diafiltriert. Für monomere Hämoglobine war der geeignete Ladungspuffer 20 mM Tris (pH 9,0) zum Laden auf eine Anionenaustauschsäule (Q Sepharose FF, Pharmacia, Uppsala, Schweden). Das Protein, das mit 15 g/l auf die Säule geladen wurde, wurde mit drei Säulenvolumen 12,5 mM Tris (pH 7,8) gewaschen. Das Protein wurde dann in zwei bis drei Volumen von 12,3 mM Tris (pH 7,6) eluiert, oder wenn der pI des Proteins unter 7,5 lag, wurde es in einem Bis-Tris-Puffer bei dem geeigneten pH eluiert. Der pI wurde zur Bestimmung der richtigen Wasch- und Elutionsbedingungen für jedes Protein, sowohl monomer als auch dimer, verwendet. Es wurde herausgefunden, daß bestimmte Mutationen auf der Oberfläche einiger Hämtaschen-Mutanten diesen Wert beeinflussen. Für dimere Hämoglobine war der geeignete Ladungspuffer 10 mM KPi (pH 7,0) zum Laden auf eine keramische Hydroxyapatitsäule (CHT-Säule) (BioRad) oder 20 mM Tris (pH 8,0) zum Laden auf eine Säule zur hydrophoben Chromatographie (HIC-Säule) (BioRad). Das Protein wurde mit 20 g/l auf die CHT-Säule geladen, und die Säule wurde dann mit acht Säulenvolumen von 30–40 mM KPi (7,0) gewaschen. Fünf Säulenvolumen von 85–90 mM KPi (pH 7,0) wurden zur Elution des Proteins aus der Säule verwendet. Bei der Verwendung der HIC-Säule wurde das Protein mit 15 g/l beladen, und die Säule wurde dann mit fünf Säulenvolumen von 1,2 M Ammoniumsulfat/20 mM Tris (pH 8,0) gewaschen. Das Protein wurde unter Verwendung von 3 Säulenvolumen von 1 M Ammoniumsulfat/20 mM Tris (pH 8,0) eluiert. Die Waschschrte sowohl für die CHT- als auch die HIC-Säule wurden so entwickelt, daß das monomere Hämoglobin eluiert wurde, während die Di-Hämoglobine und größere Moleküle an die Säule gebunden blieben. Pools aus beiden Säulen wurden zur Vorbereitung des Ladens auf eine Anionenaustauschsäule diafiltriert. Der Anionenaustauschschritt war so eingerichtet, daß verbleibendes monomeres Hämoglobin aus dem Di-Hämoglobin ausgewaschen wurde, was einen Di-Hämoglobinpool ergab, der auf Grundlage der Größe zu 98% rein war. Die Anionenaustauschsäule war eine Super Q 650M (Toso-Hass). Die Säule war äquilibriert mit 20 mM Tris (pH 9,0), und 15 g/l Protein wurden auf die Säule geladen. Dann wurde die Säule mit drei Säulenvolumen von 10–15 mM Tris (pH 7,6–7,8) gewaschen, und das Protein wurde in drei Säulenvolumen von 15–30 mM Tris (pH 7,6–7,8) eluiert, oder wenn der pH zwischen 7,3 und 7,6 lag, dann wurde ein Bis-Tris-Puffer verwendet. Von nun an wurde das Protein, wie in WO 96/15151 beschrieben, behandelt.

BEISPIEL 9

Messung der Reaktion zwischen oxyHb und NO

[0119] Stickstoff(mon)oxidgas wurde durch eine Säule von NaOH-Pellets geleitet und zum gründlichen Spülen eines Tonometers verwendet. Anaerober Puffer (0,1 M Natriumphosphat, pH 7,4) wurde in das Tonometer injiziert und mit dem NO äquilibriert, um so eine Stammlösung herzustellen. Verdünnungen der Stammlösung wurden in Glasspritzen, die anaeroben Puffer enthielten, hergestellt. Zeitverläufe der Reaktion von Oxyhämoglobin mit NO wurden bei 420 und 402 nm unter Verwendung einer Applied Photophysics-Stopped-Flow-Vorrichtung gesammelt. Die Temperatur betrug 20°C . Die Daten wurden unter Verwendung des Softwareprogramms !SX.17MV, geliefert von Applied Photophysics, gesammelt und analysiert.

[0120] Substituierte alpha- und beta-Untereinheiten mit ungefähr gleichen $k'_{\text{NO,ox}}$ -Werten wurden in tetrameren Hämoglobinkonstrukten zur Verwendung in Tiermodellen kombiniert. Diese „gepaart-mutanten“ rHbs (z. B. rHb2, rHb3 und rHb4; Tabelle 4) wurden mit einer genetisch fusionierten, mutierten di-alpha-Untereinheit konstruiert, um so die Dissoziation der Hämoglobine in alpha/beta-Dimere wie oben beschrieben zu verhindern. In Tabelle 2 werden die Mutationen beispielsweise als βN108K bezeichnet, was die native humane beta-Globinsequenz-Restzahl 108, in der Wildtyp-Asn (N) durch Lys (K) ersetzt ist, kennzeichnet.

TABELLE 4

rHb	Beschreibung	ΔMAP (mm Hg)	$k'_{\text{NO,ox}}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	P_{50} (mm Hg)	k_{autox} (h^{-1})
rHb1.1	rHb0.1 + βN108K	$25,8 \pm 2,0$	58	32	0,051
rHb0.1	Wildtyp + di-alpha-Fusion	$28,4 \pm 5,7$	58	10	0,042
rHb-Bethesda	rHb0.1 + βY145H	$24,1 \pm 2,7$	56	2,7	0,041
rHb2	rHb0.1 + $\alpha\text{V62F}/\beta\text{V67F}/\beta\text{L106I}$	$19,3 \pm 3,4$	24	4,0	0,089
rHb3	rHb0.1 + $\alpha\text{V62L}/\beta\text{V67F}$	$13,0 \pm 1,6$	15	3,4	0,10
rHb4	rHb0.1 + $\alpha\text{L29F}/\beta\text{V67W}$	$7,6 \pm 1,0$	2	5,2	0,072

[0121] Die resultierenden rekombinanten Oxyhämoglobine reagieren monophasisch mit Stickstoff(mon)oxid ([Fig. 7](#)), was die Interpretation von In-vivo-Experimenten vereinfacht, da nur eine Geschwindigkeitskonstante in Betracht gezogen werden muß. Die $k'_{\text{NO,ox}}$ -Werte für rHb2, rHb3 und rHb4 betragen 24, 15 bzw. 2 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die rekombinanten Hämoglobine rHb1.1, rHb0.1 (des val, di- α), rHb0.0 (des val, Wildtyp) und rHb-Bethesda verfügen aufgrund der unterschiedlichen Tendenzen, die niedrigaffine T-Zustand-Quartärstruktur zu bilden, über einen breiten Bereich an P_{50} -Werten (32, 10, 15 bzw. 2,7 mmHg). Die letzteren vier Proteine weisen jedoch Wildtyp-Aminosäuren in den Hämtaschen und identische hohe Werte hinsichtlich der Geschwindigkeit der NO-induzierten Oxidation ($\sim 60 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) auf. Die Daten lassen darauf schließen, daß ungeachtet der Position des allosterischen Gleichgewichts (R/T-Gleichgewichts) nur Substitutionen in der Hämtasche die NO-Reaktivität von Oxyhämoglobin beeinflussen.

[0122] Alle drei gepaart-mutanten Hämoglobine weisen Sauerstoffdissoziationskurven auf, die im Vergleich zu rHb1.1 signifikant Zinks-verschoben sind (Tabelle 4). Die niedrigen P_{50} -Werte vereinfachen die Interpretation von Blutdruckexperimenten durch Minimierung der Bildung von Desoxyhämoglobin. In Experimenten mit Top-Load-Verabreichung und einem normalen Komplement roter Blutzellen werden diese hochaffinen Hämoglobine während der Zirkulation beinahe zu 100% sauerstoffgesättigt bleiben. Daher müssen nur die Reaktionen von Oxyhämoglobin mit NO in Betracht gezogen werden. Für rHb1.1 ist die NO-Bindungsrate an Desoxyhämoglobin ähnlich der NO-Reaktionsgeschwindigkeit mit Oxyhämoglobin, so daß die beiden Formen von rHb1.1 eine ähnliche NO-Aufnahmefähigkeit aufweisen. Im allgemeinen ähnelt die Rate der NO-induzierten Oxidation stark der für die NO-Bindung an Desoxyformen von Myoglobinen und Hämoglobinen, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in beiden Verfahren der Ligandeneintritt in die distalen Taschen ist (Eich et. al., oben.).

[0123] Die Tabellen 5 und 6 liefern weitere NO-Bindungsdaten für verschiedene mutierte Hämoglobine.

Tabelle 5

Stamm	Beschreibung	$k'_{\text{NO,ox}}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{O_2} (s^{-1})	P_{50} (mmHg)	n_{max}
SGE3004	diaV62L/ β V67F	15	2/6	4,5	1,85
SGE3005	3004 + St. Mande	15	6/43	8,6	1,38
SGE3263	3004 + Prov. + Presby.	15		13,4	1,64
SGE3173	di-di 3004	13			
SGE2821	diaL29F, H58Q/ β L106W	12	12/30	42	1,7
SGE3006	2821 + Prov + St. Mande	13		~ 100	1,83
SGE3007	2821 + Prov + Pres	13	8/25/80	~ 100	1,7
SGE2822	di-di 2821	11	13/32		
SGE1738	2822 + Pres				
SGE3001	diaL29F/ β V67W	1,5/4	0,3/4	6	1,63
SGE1728	3001 + Pres	1,2/5,5	0,3/2/21		
SGE1729	3001 + Prov	1/4	0,3/2/10		
SGE3011	diaL29W, H58Q/ β v67W	1,5/5	4/15	46	1,3
SGE3010	3011 + Prov	1,5/5	6/20	52	1,43
SGE2966	3011 + Pres				
SGE2968	3011 + Prov + Pres	1,6/5,5		114	1,89
SGE2967	3011 + St. Mande	2,5/10		75	1,60
SGE2963	di-di 3011			37	1,13
SGE2971	di-di 3011 + Prov	1,5/5	6/20	42,8	1,23
SGE2969	di-di 3011 + Pres				
SGE2972	di-di 3011 + Prov + Pres				
SGE2970	di-di 3011 + St. Mande				
SGE3012	diaL29W, H58Q/ β L106W	2/9		87	1,57

[0124] In Tabelle 5 werden die Werte für $k'_{\text{NO,ox}}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und k_{O_2} (s^{-1}) in einigen Fällen als zwei Werte ausgedrückt (z. B. 2/6), was den Bereich von Ergebnissen, die manchmal während der Analyse dieser Mutantenkombinationen erhalten wurden, reflektiert.

Tabelle 6

Untereinheit	Name	$k'_{\text{NO,ox}}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei 20°C)	k_{O_2} (s^{-1} bei 20°C)
α Wildtyp	1483 (rHb0.0)	60	10
α (B10)L29F	A51	3	0,2
α L29F/ α H58Q	1733 (3341 di*)	14	9
α (B10)L29W	A57	3	~2
α L29W/ α H58Q	(3350dia)	2,7	8
α (B10)L29A	3159	~ w. t.	8
α (E11)V62F	α E11 #10	26	4
α (E11)V62W	α E11 #6	22	4
α (E11)V62L	α E11 #7	16	4
α (G8)L101I			
α (G8)L101F	HB9, HB12	w. t.	
α (G8)L101W	HB1, HB5	w. t.	
β Wildtyp	1483 (rHb0.0)	60	35
β (B10)L28F	AS4	w. t.	
β (B10)L28W	AS6	w. t.	
β (E11)V67F	1725 (JD16 $\alpha\beta$)	12	3
β (E11)V67W	3313 (NS2)	6–5	3
β V67W/ β H63Q(β K82D)	1735	3/3	2/20
β V67W/ β H63A(β K82D)	1734		
β (E11)V67L	1724(JD15 sm)	16	24
β (G8)L106I	1727(JD18 sm)	60	45
β (G8)L106F(β N108K)	1723(JD4 sm)	30	60
β (G8)L106W	3267	30	60
β V67W/ β L106M	JD1	12	
β V67L/ β L106F	JD7	17	
β V67F/ β L106I	JD9	24	3
β V67L/ β L106M	JD11	24	
β V67F/ β L106W	JD16	w. t.	~5
β V67W/ β L106I	JD18	10	~5
β V67F/ β L106M	EV1	25,5	2
β V67M/ β L106F	EV2	0,8/3	40/1,4

„w. t.“ zeigt an, daß die Mutante nicht von THb0.0 unterscheidbar war.

BEISPIEL 10

Hämodynamische Daten

[0125] Hämodynamische Reaktionen auf die Hämoglobinverabreichung wurden von bewußtseinsklaren, unbehinderten Ratten erhalten. Männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden chronisch mit arteriellen und venösen Dauerkathetern mindestens 48 Stunden vor dem Experiment instrumentiert. Top-Load-Dosen von 350 mg/kg der rHb-Lösungen (5 g/dl) wurden an separate Gruppen von Ratten über intravenöse Infusion bei einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min verabreicht. An eine andere Gruppe von Ratten wurde Humanserumalbumin (HSA, 5 g/dl) als Volumenkontrolle verabreicht. Der Arteriendruck wurde kontinuierlich für 30 Minuten vor und 90 Minuten nach der Verabreichung aufgezeichnet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Statistische Vergleiche zwischen rHb1.1 und den anderen Hämoglobinen oder HSA wurden durch wiederholte

Meßanalyse der Varianz vorgenommen, p-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

[0126] Die Reaktionen des mittleren Arteriendrucks (MAP), ausgelöst durch rHb1.1 und alle drei gepaart-mutanten rHbs, wurden bei bewußtseinsklaren Ratten bestimmt ([Fig. 5](#)). Das Ausmaß der pressorischen Reaktion verringerte sich, wenn die Geschwindigkeitskonstante für die NO-Aufnahme verringert wurde. Bei der langsamsten NO-Oxidationsrate, war die pressorische Reaktion fast so gering wie die, die nach der Verabreichung eines äquivalenten Volumens von 5%igem Humanserumalbumin (HSA) zu beobachten war. Diese Wirkungen waren nicht einfach den niedrigen P_{50} -Werten für die distalen Taschenmutanten zuzuschreiben, wie in [Fig. 6](#) gezeigt. Die pressorische Wirkung von rHb1.1 ($P_{50} = 32$ mmHg) war mit der von rHb-Bethesda, das einen niedrigeren P_{50} -Wert (2,7 mm g) als alle anderen Hämoglobine in dieser Studie aufwies, identisch.

[0127] Diese Ergebnisse (Tabelle 4, [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#)) zeigen, daß die O_2 -Abgabe an den Arteriolenglattmuskel oder Parenchymgewebe wahrscheinlich nicht der Mechanismus der beobachteten pressorischen Wirkung ist. Der P_{50} von rHb-Bethesda ist niedrig genug, daß dieses Hämoglobin im wesentlichen unfähig ist, in Top-Load-Experimenten, in denen ein normales Komplement von Erythrozythämoglobin vorliegt, Sauerstoff an normale Gewebe abzugeben, und normale Gewebe- pO_2 -Spiegel aufrechterhält. rHb-Bethesda löst jedoch eine pressorische Reaktion aus, die mit der von rHb1.1, das einen hohen P_{50} hat und Sauerstoff abgeben kann, identisch ist. rHb0.1 hat eine ähnliche pressorische Wirkung und einen intermediären P_{50} (Tabelle 4). Die Ergebnisse zeigen, daß der Mechanismus der pressorischen Reaktion die Ausschöpfung von Stickstoff(mon)oxid und nicht die übermäßige Sauerstoffabgabe an Arteriolen ist. Veränderungen des Blutdrucks korrelieren mit den Raten der NO-induzierten Oxidation, jedoch nicht mit der Sauerstoffaffinität (Tabelle 4).

[0128] Die Autoxidationsrate von jedem Hämoglobin wurde zur Überprüfung der Hypothese, daß die NO-Aufnahme durch Methämoglobin vermittelt wird, bestimmt (Alayash et. al., Mol. Med. Today 1: 122–127 (1995); Alayash et. al., Arch. Biochem. Biophys. 303: 332–338 (1993)). Es gibt keine Korrelation zwischen den Autoxidationsraten und pressorischen Reaktionen (Tabelle 4), was es unwahrscheinlich macht, daß die Produktion von Methämoglobin (oder die begleitende Erzeugung eines Superoxidradikals) für die Erhöhung des Blutdrucks verantwortlich ist. Alle Autoxidationsraten fallen in einen engen Bereich, wobei der größte Wert nur etwa zweimal größer als der kleinste ist. rHb4 hat die geringste Wirkung auf den Blutdruck, verfügt jedoch über eine mittelschnelle Autoxidationsrate. Ferner ist das Verfahren der Hutoxidation mit In-vitro-Halbwertszeiten von mehr als 6 Stunden bei 37°C ziemlich langsam, während die pressorische Reaktion ein Maximum in nur 5–10 Minuten erreicht.

[0129] Für jeden Zeitverlauf in [Fig. 5](#) wurden die Blutdruckdaten nach der Infusion gemittelt und die Ergebnisse gegen den Wert der NO-induzierten Oxidation geplottet. Wie in [Fig. 7](#) gezeigt, gibt es eine direkte Beziehung zwischen dem Ausmaß der pressorischen Reaktion und der Rate der Stickstoff(mon)oxidoxidation. Der Graph zeigt, daß die Aktivität hinsichtlich der Stickstoff(mon)oxid-Aufnahme für nahezu die gesamte pressorische Reaktion von extrazellulärem Hämoglobin nachgewiesen werden kann. Wird der für die Albumin-Volumenkontrolle erhaltene Wert als die untere Grenze genommen, verbleibt nur eine sehr geringe pressorische Reaktion, wenn die Rate der NO-induzierten Oxidation auf null extrapoliert wird. Diese Ergebnisse lassen stark darauf schließen, daß der grundlegende Mechanismus der pressorischen Reaktion die Reaktion von Stickstoff(mon)oxid in den distalen Hämtaschen von Oxy- und Desoxyhämoglobin ist.

[0130] Daher ist gezeigt worden, daß die Geschwindigkeit der Reaktion von Hämoglobin mit Stickstoff(mon)oxid durch den Austausch nativer distaler Hämtaschenreste durch größere, hydrophobe Aminosäuren signifikant verringert werden kann. Die Reaktivität von NO sowohl zu alpha- als auch beta-Untereinheiten kann durch diese Strategie kontrolliert werden. Im Gegensatz dazu scheinen sich Aminosäuresubstitutionen außerhalb der Region der Hämtaschen, von denen einige die Sauerstoffaffinität beeinflussen, nicht auf die Oxidationsreaktion mit NO auszuwirken. Dem ähnlich hat die Fusion der alpha-Untereinheiten zur Stabilisierung der tetrameren Form von Hämoglobin keine Wirkung auf die NO-Reaktivität, da der Wert der NO-induzierten Oxidation für rHb0.0 derselbe wie der für rHb0.1 und rHb1.1 ist.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) Allgemeine Informationen

- (i) Anmelder: Weickert, Michael J.
Glascock, Christopher B.
Mathews, Antony J.
Lemon, Douglas D.
Doherty, Daniel H.
Olson, John S.
- (ii) Titel der Erfindung: Hämoglobin-Mutanten mit erhöhter löslicher Expression und/oder verringertem Stickstoff(mon)oxid-Entfernungsvermögen
- (iii) Anzahl der Sequenzen: 2
- (iv) Korrespondenzadresse:
- (A) Adressat: Somatogen, Inc.
(B) Straße: 2545 Central Avenue, Suite FD1
(C) Stadt: Boulder
(D) Staat: Colorado
(E) ZIP: 80301
- (v) Computerlesbare Form:
- (A) Art des Mediums: Diskette, 3,50 Inch, 1,4 Mb Speicher
(B) Computer: Apple Macintosh
(C) Betriebssystem: System 7.5
(D) Software: Microsoft Word 5.1a
- (vi) Aktuelle Anmeldungsdaten
- (A) Anmeldenummer: unbekannt
(B) Anmeldedatum: 01. Mai 1998
(C) Klassifikation: nicht bekannt
- (vii) Frühere Anmeldungsdaten:
- (A) Anmeldenummer: 60/045,364
(B) Anmeldedatum: 02. Mai 1997

- (A) Anmeldenummer: 60/057,986
 (B) Anmeldedatum: 05. September 1997
- (viii) Informationen zum Anwalt/Vertreter
- (A) Name: Brown, Therese A.
 (B) Registriernummer: 32,547
 (C) Sach-/Prozeßlistennummer: 351 PCT
- (ix) Informationen zur Telekommunikation
- (A) Telefon: 303-541-3356
 (B) Telefax: 303-444-3013

(2) Informationen zu SEQ ID-Nr.: 1:

- (i) Sequenzmerkmale:
- (A) Länge: 11
 (B) Art: Nukleinsäure
 (C) Strangart: einzel
 (D) Topologie: dem Anmelder unbekannt

(ii) Molekülart: andere Nukleinsäure

(iii) hypothetisch: nein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID-Nr.: 1:

AGCGAAGGTA CCGTCCAGGT T

11

(2) Informationen zu SEQ ID-Nr.: 2:

- (i) Sequenzmerkmale
- (A) Länge: 12
 (B) Art: Nukleinsäure
 (C) Strangart: einzel
 (D) Topologie: dem Anmelder unbekannt

- (ii) Molekülart: andere Nukleinsäure
- (iii) hypothetisch: nein
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID-Nr.: 2:

CCTGACTCCG GAAGAAAAAT CC

12

Patentansprüche

1. Hämoglobin-Mutante, ausgewählt aus:
einem Hämoglobin, umfassend die α -Globin-Mutationen:
B10(Leu \rightarrow Trp) und E7(His \rightarrow Gln); und
einem Hämoglobin, umfassend die β -Globin-Mutationen:
G8(Leu \rightarrow Phe) und G12(Leu \rightarrow Trp),
G8(Leu \rightarrow Phe) und G12(Leu \rightarrow Met),
E11(Val \rightarrow Trp) und E7(His \rightarrow Gln),
E11(Val \rightarrow Leu) und G8(Leu \rightarrow Trp),
E11(Val \rightarrow Met) und G8(Leu \rightarrow Trp), oder
E11(Val \rightarrow Met) und G8(Leu \rightarrow Phe).
2. Hämoglobin-Mutante nach Anspruch 1, umfassend die Globin-Mutationen: α B10(Leu \rightarrow Trp), α E7(His \rightarrow Gln) und β E11(Val \rightarrow Trp).
3. Rekombinantes DNA-Molekül, ausgewählt aus:
einem rekombinanten DNA-Molekül, welches ein α -Globin, umfassend die Mutationen:
B10(Leu \rightarrow Trp) und E7(His \rightarrow Gln), kodiert; und
einem rekombinanten DNA-Molekül, welches ein β -Globin, umfassend die Mutationen:
G8(Leu \rightarrow Phe) und G12(Leu \rightarrow Trp),
G8(Leu \rightarrow Phe) und G12(Leu \rightarrow Met),
E11(Val \rightarrow Trp) und E7(His \rightarrow Gln),
E11(Val \rightarrow Leu) und G8(Leu \rightarrow Trp),
E11(Val \rightarrow Met) und G8(Leu \rightarrow Trp), oder
E11(Val \rightarrow Met) und G8(Leu \rightarrow Phe), kodiert.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

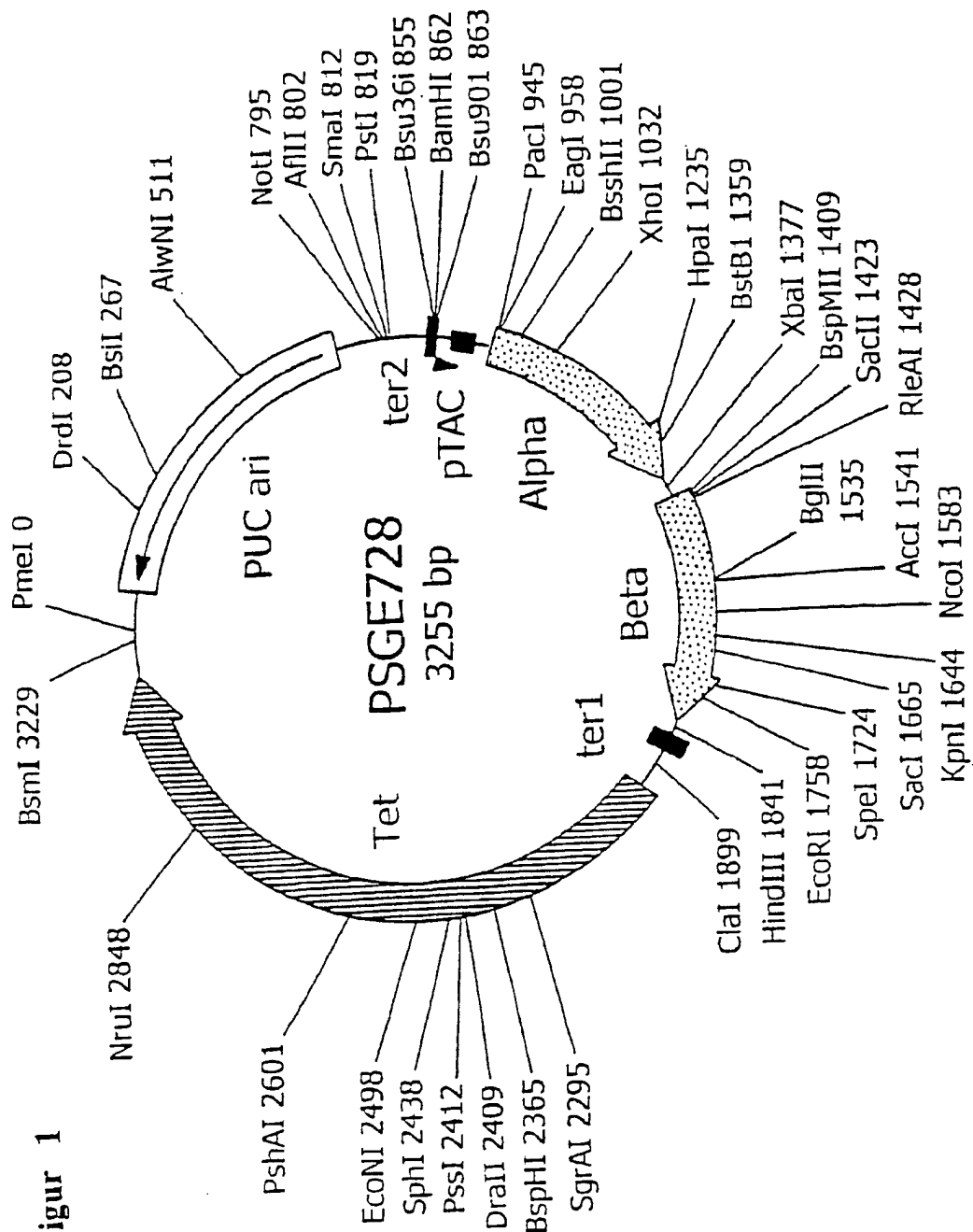
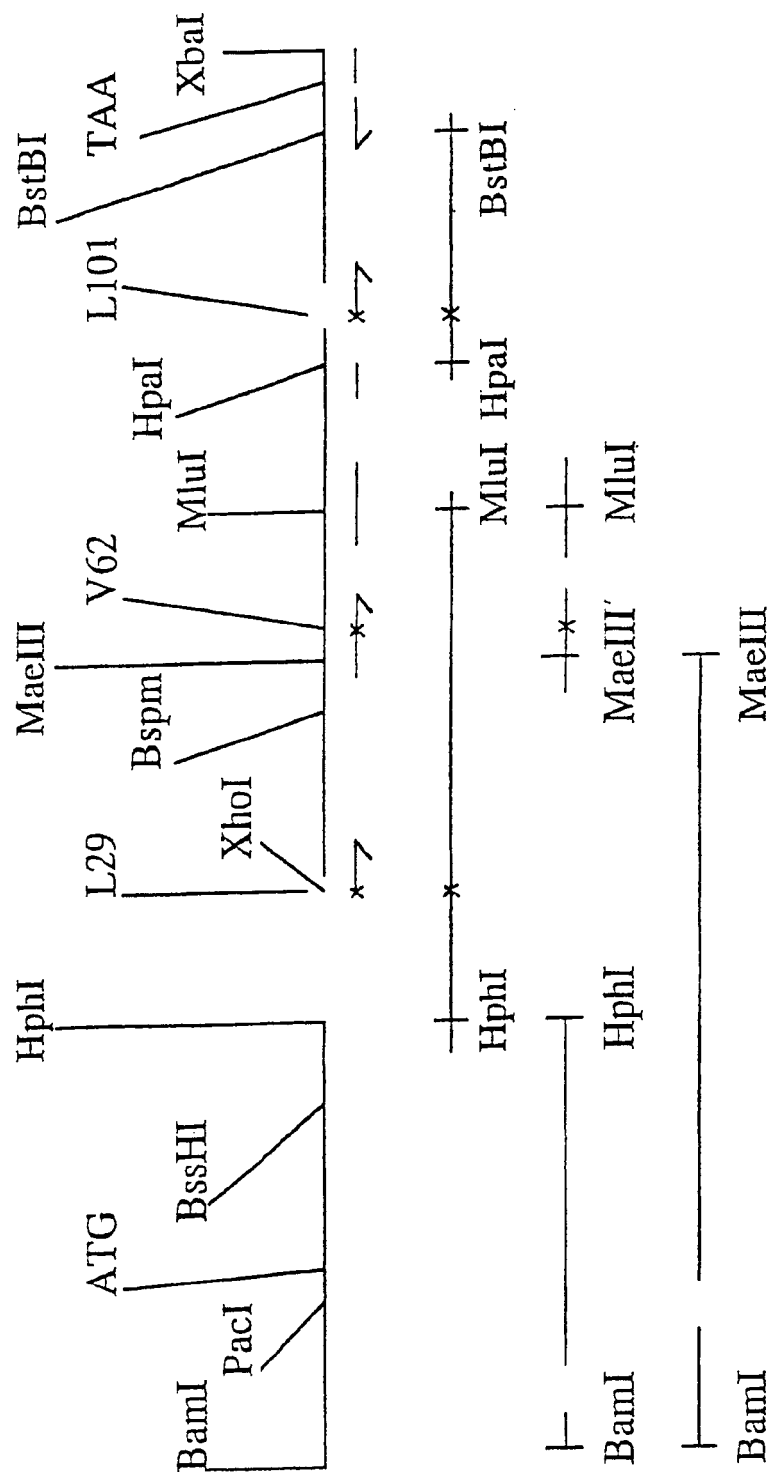
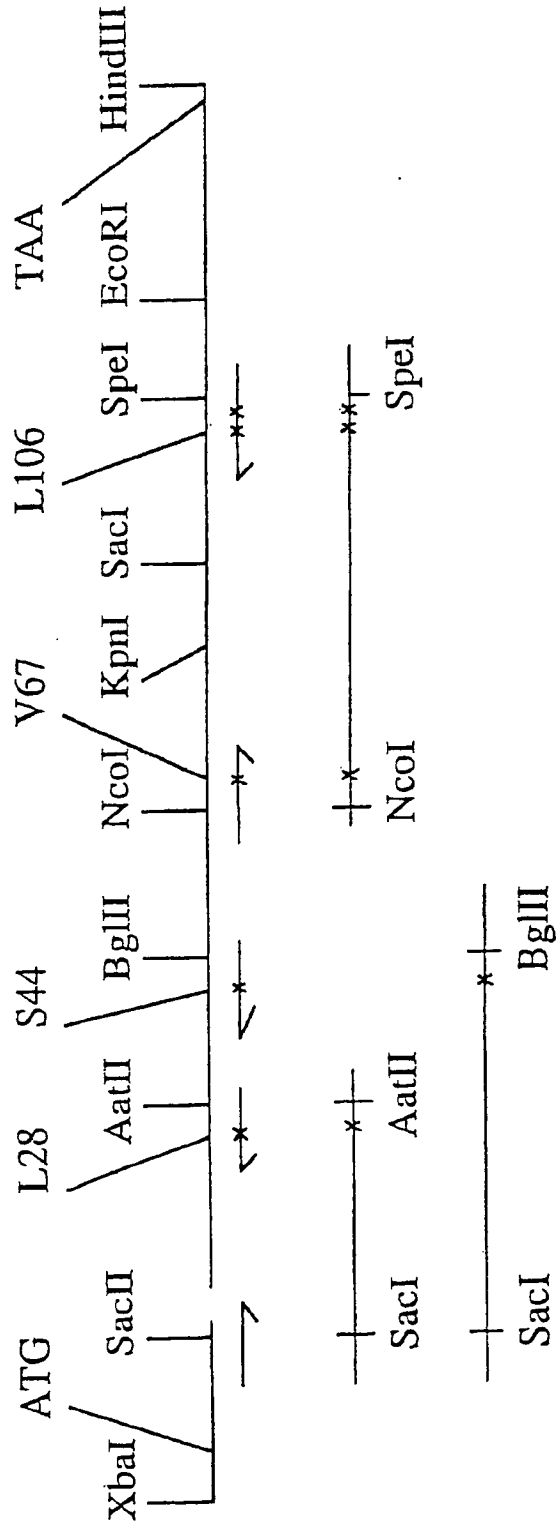
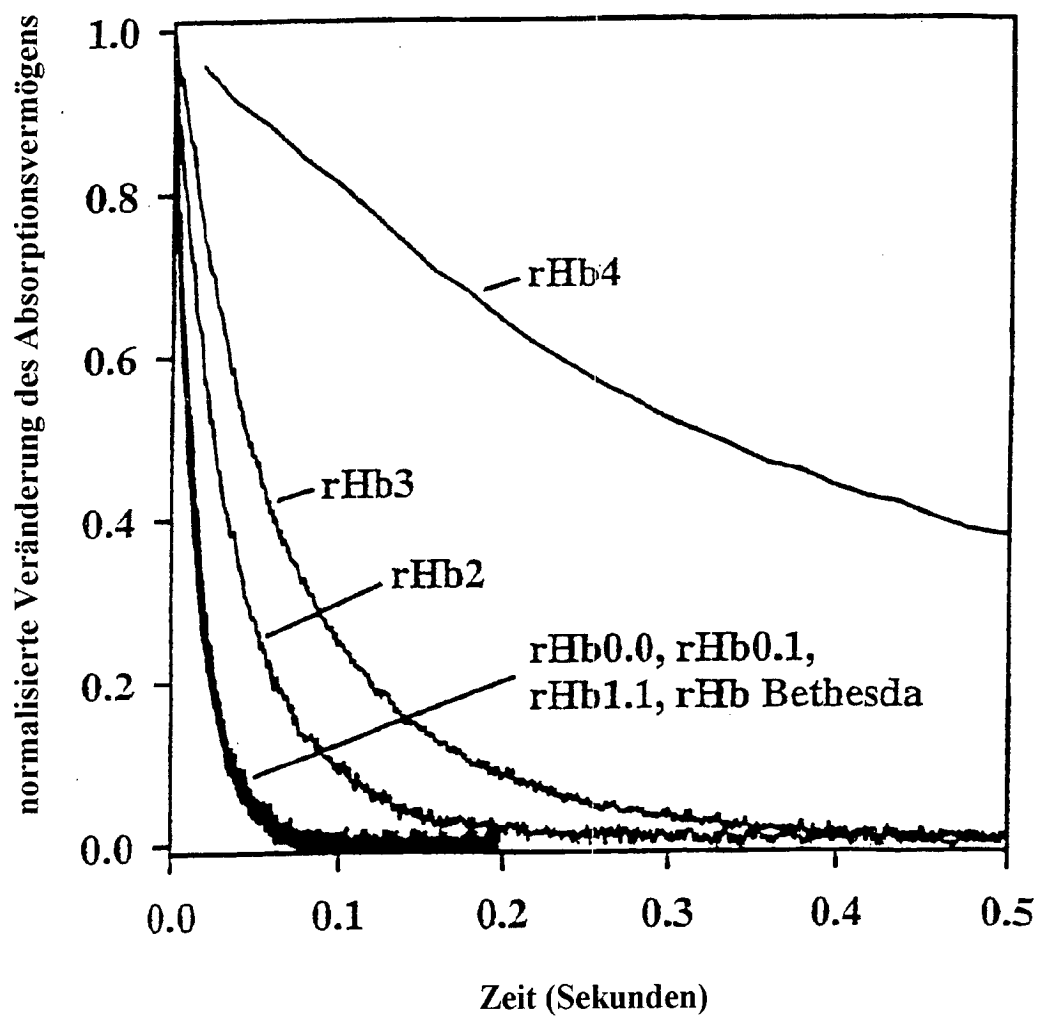


Figure 2

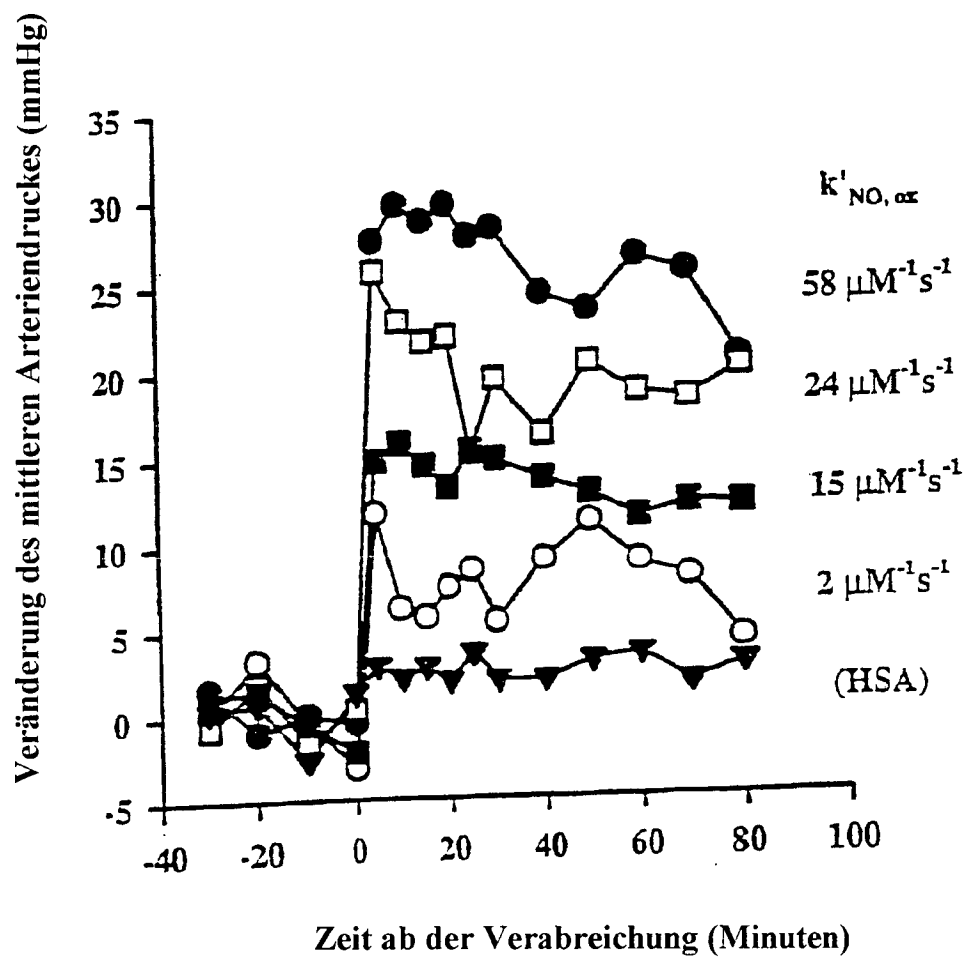


Figur 3

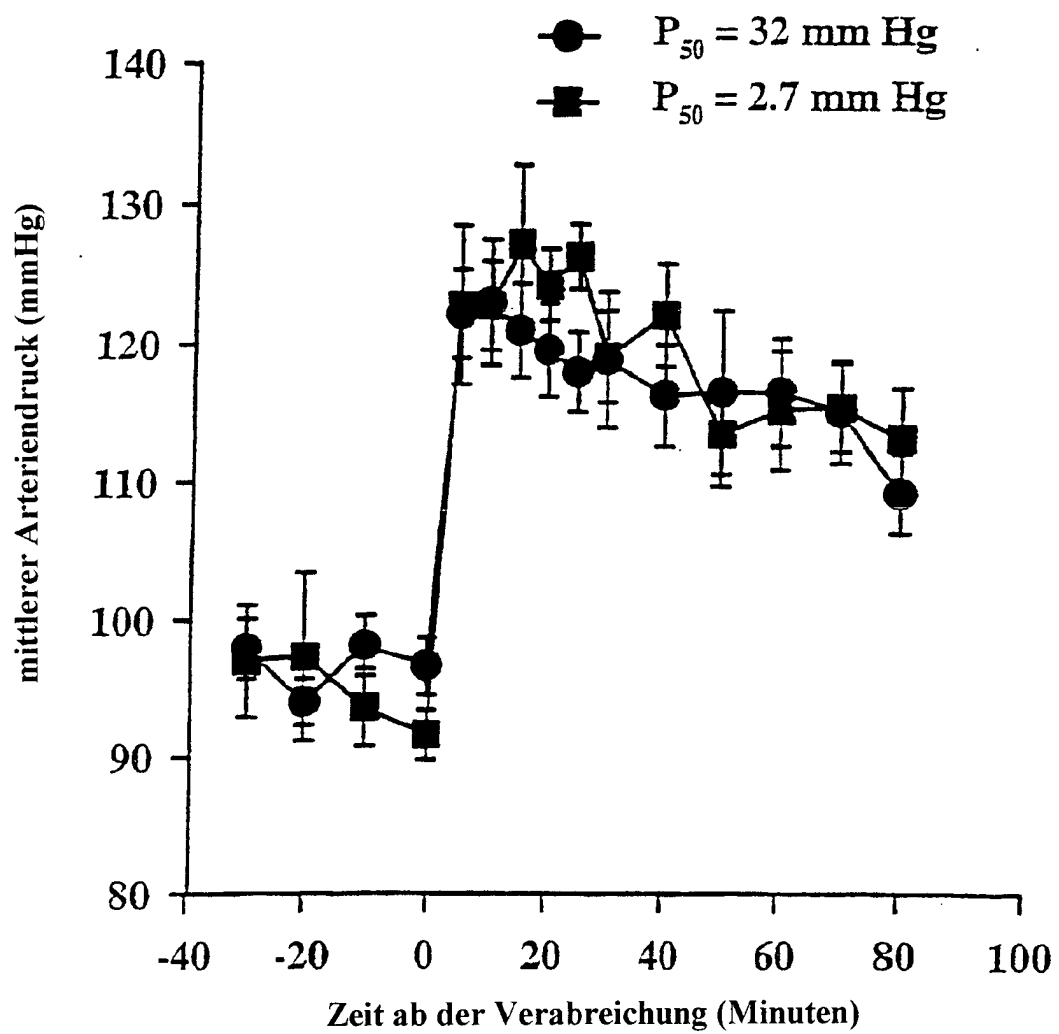




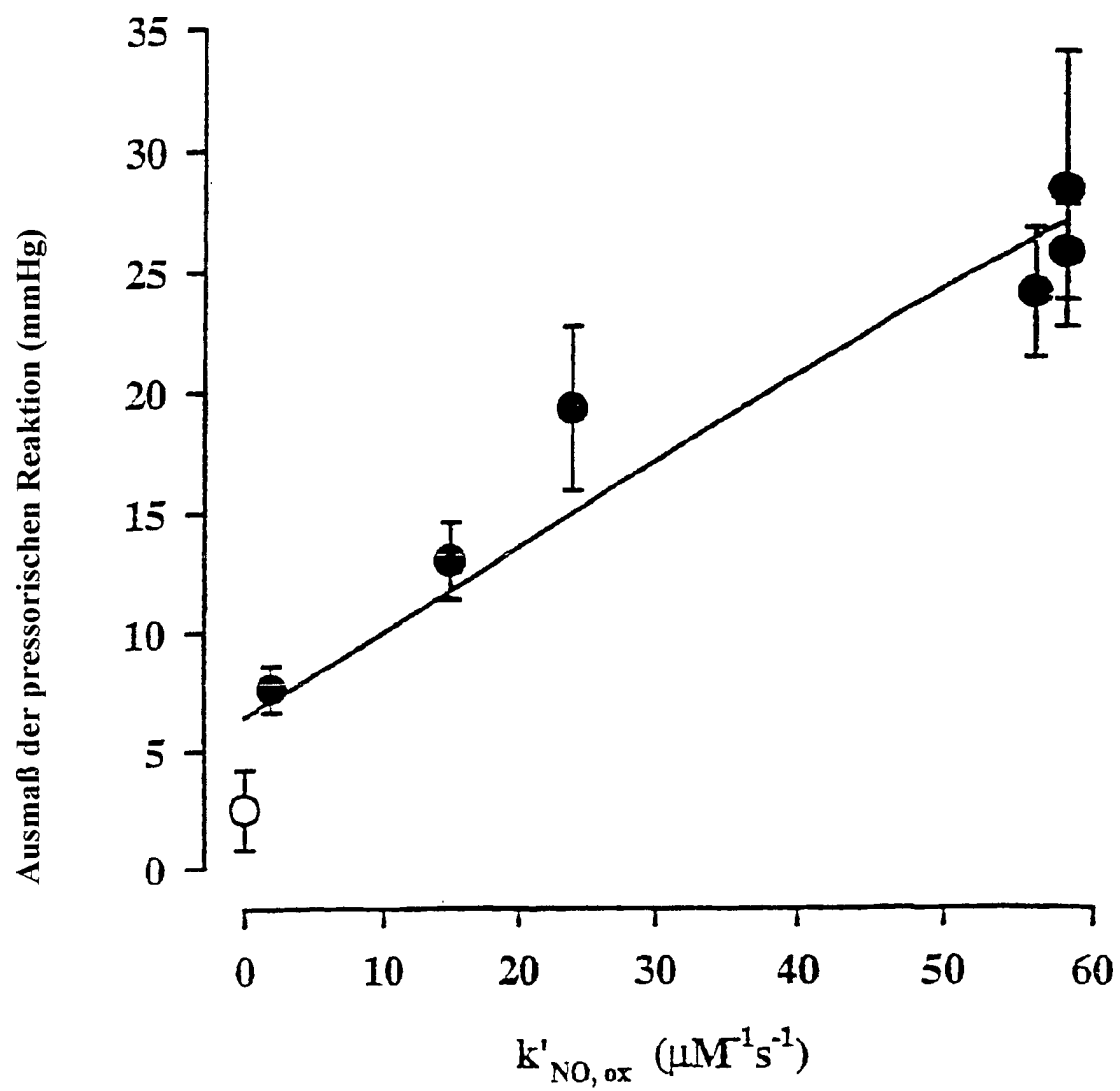
Figur 4



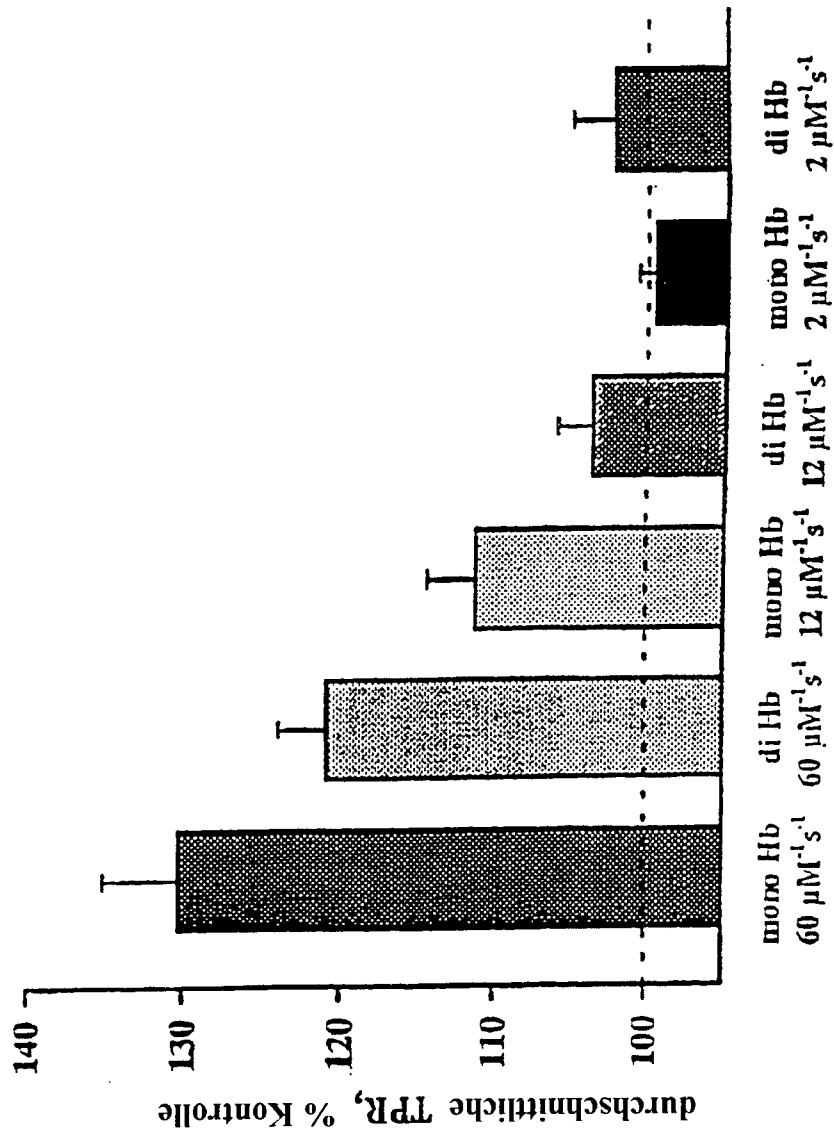
Figur 5



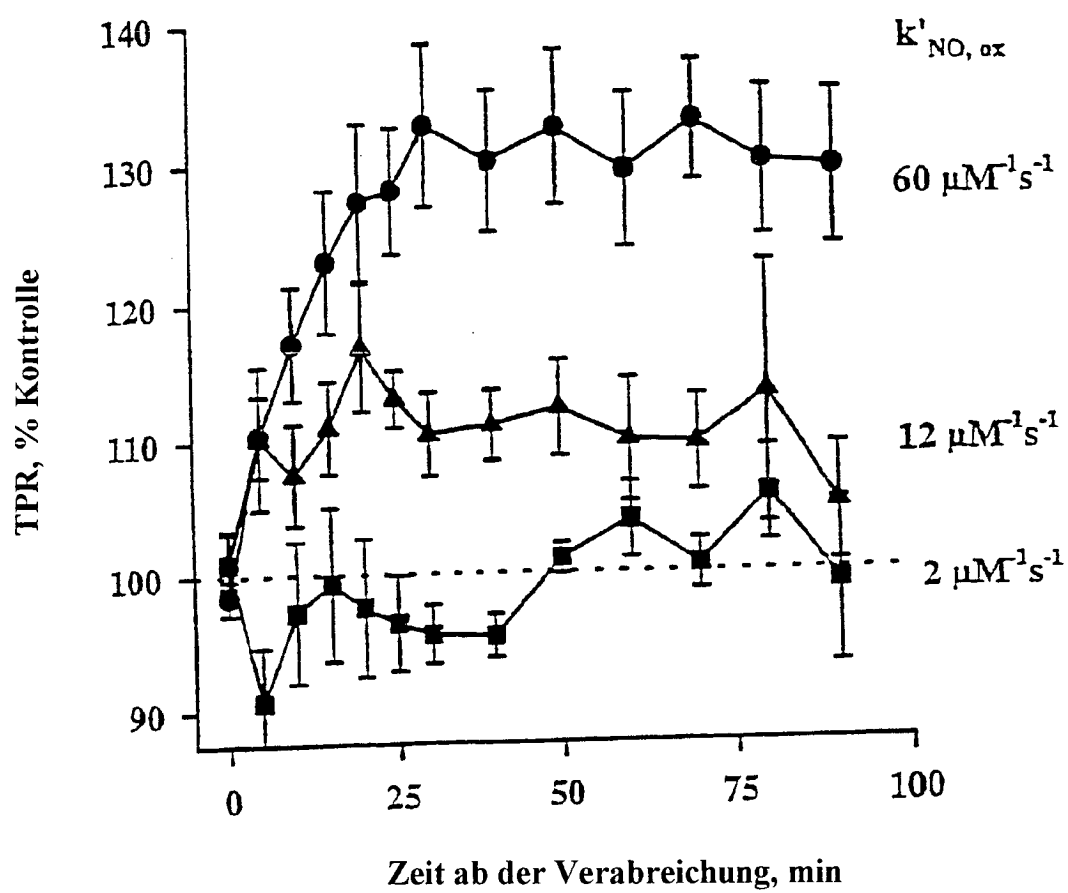
Figur 6



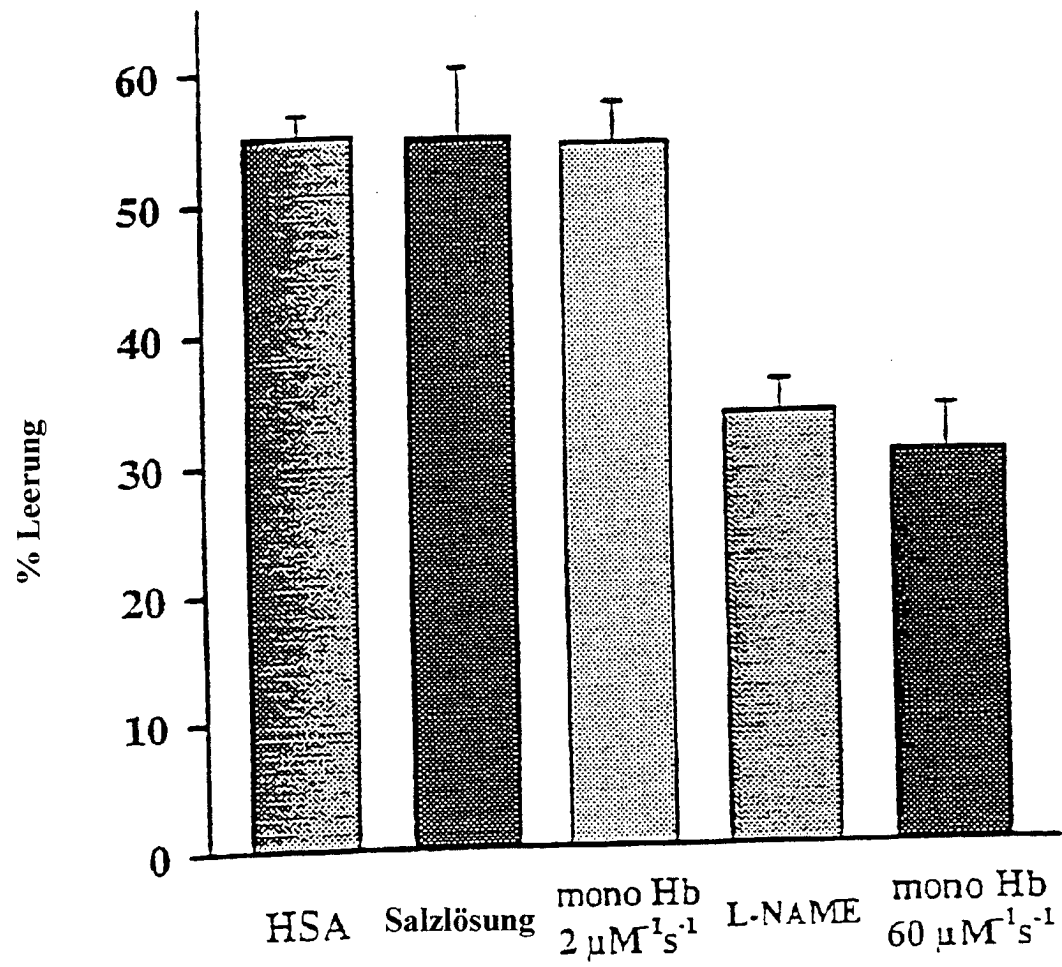
Figur 7



Figur 8



Figur 9



Figur 10