



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **174934**

(13) **B**

(51) Int Cl⁵ C 12 N 15/12, 9/48

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	851563	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	18.04.85	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	18.04.85	(30) Prioritet	20.04.84, US, 602312
(41) Alm. tilgj.	21.10.85		
(44) Utlegningsdato	25.04.94		

(71) Patentsøker	Genentech Inc, 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, CA 94080, US
(72) Oppfinner	Daniel J. Capon, San Mateo, CA, US Richard Mark Lawn, San Francisco, CA, US Gordon Allen Vehar, San Carlos, CA, US William Irwin Wood, San Mateo, CA, US
(74) Fullmektig	Lars Brevig, Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av funksjonell human faktor VIII**

(56) Anførte publikasjoner **WO 85/01961**

(57) Sammendrag

Den fulle DNA-kodende sekvensen for human faktor VIII er identifisert heri. Videre beskrives det rekombinante middel som er egnet for isolering og uttrykking av denne kodende sekvens ved fremstilling av funksjonelt human faktor VIII-polypeptid og funksjonelle derivater derav. Særlig foretrukne utførelser gir bevis for utvetydig identifikasjon og funksjonalitet, samt spesifikke, opererbare, rekombinante ekspresjonsvektorer og kulturer.

Oppfinnelsen markerer den vellykkede anvendelse av rekombinant DNA-teknologi ved fremstilling av de største og vanskeligste humanproteiner, et mål med tekniske problemer som sannsynligvis er uoverstigelige for vanlige fagfolk som bare er i besittelse av f.eks. en partiell eller full klon som koder faktor VIII.

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremgangsmåte for fremstilling av human faktor VIII og vektorene pAML3P.8cl og pESVDA.

5

10

15

20

Foreliggende oppfinnelse er basert delvis på oppdagelsen av DNA-sekvensen og den avledete aminosekvensen av human faktor VIII samt tilknyttede deler av faktor VIII-molekylet som man har funnet er funksjonelle bioaktive delgrupper. Denne oppdagelse ble muliggjort ved fremstilling av faktor VIII i forskjellige former via anvendelsen av rekombinant DNA-teknologi, hvilket igjen muliggjorde fremstillingen av materialer av tilstrekkelig kvalitet og kvantitet, med hvilke det kunne utføres biologiske forsøk og bevis for biologisk funksjonalitet. Etter å ha bestemt dette er det mulig å skreddersy spesielle typer av faktor VIII via genetisk manipulasjon og in vitro-behandling, og på effektiv måte å komme frem til hittil uoppnåelige kommersielle praktiske mengder av aktive faktor VIII-produkter. Foreliggende oppfinnelse er rettet mot disse tilknyttede utførelsene.

25

Publikasjoner og andre materialer herav benyttet for å belyse oppfinnelsens bakgrunn, og i spesielle tilfeller for å tilveiebringe ytterligere detaljer vedrørende dens utførelse er vist til heri og oppsummert til slutt i foreliggende beskrivelse i form av en litteraturfortegnelse.

30

35

Vedlikeholdet av et intakt vaskulært system krever samvirke av en rekke forskjellige celler og proteiner. Ved skade på det vaskulære sjikt igangsettes en rekke reaksjoner for å hindre væsketap. Den innledende reaksjon er aktivering av blodplater som fester seg til såret og gjennomgår en rekke reaksjoner. Disse reaksjoner innbefatter tiltrekning av andre blodplater til stedet, frigjøring av en rekke organiske forbindelser og proteiner og dannelsen av en trombogen overflate for aktivering av blodkoaguleringskaskaden. Gjennom

denne kombinerte rekke av reaksjoner dannes en blodplateplugg som tetter såret. Blodplatepluggen stabiliseres ved dannelsen av fibrintråder rundt pluggen og hindrer uønsket væsketap. Blodplatepluggen og fibrinmatrisen oppløses deretter langsomt ettersom såret leges. For en generell oversikt vises det til (1).

En kritisk faktor når det gjelder å stoppe blødning, er aktiveringen av koaguleringskaskaden for å stabilisere den innledende blodplateplugg. Dette system består av over et dusin samvirkende proteiner som er til stede i plasma, samt frigjorte og/eller aktiverte cellulære proteiner (2, 3). Hvert trinn i kaskaden innebærer aktivering av en spesifikk inaktiv (zymogen) form av en protease til den katalytisk aktive formen. Ved en internasjonal overenskomst (4) har hvert protein i kaskaden blitt tildelt en romertallbetegnelse. Den zymogene formen for hver er representert ved romertallet, mens den aktiverte formen er representert ved romertallet fulgt av et indeks "a". Den aktiverte formen for proteasen ved hvert trinn i kaskaden aktiverer på katalytisk måte proteasen som er involvert i det etterfølgende trinn i kaskaden. På denne måte blir en liten innledende stimulus som resulterer i aktiveringen av et protein ved begynnelsen av kaskaden katalytisk forsterket ved hvert trinn slik at det endelige resultat er dannelsen av et utbrudd av trombin, med den resulterende trombinkatalyserte omdannelse av det oppløselige proteinfibrinogen til dens oppløselige form, fibrin. Fibrin har egenskapen av selv-aggregatdannelse til tråder eller fibre som virker slik at de stabiliserer blodplatepluggen slik at pluggen ikke lett løsner.

Fig. 1 oppsummerer den alminnelig utbredte forståelse av reaksjoner mellom proteinene som er involvert i blodkoagulering. Mangelen eller mangelfullheten på noen av proteinene som er involvert i kaskaden, ville resultere i

en blokkering av propageringen av den innledende stimulus for fremstillingen av fibrin. I midten av kaskaden representert på fig. 1 er det et trinn hvori faktor IXa initierer omdannelsen av faktor X til den aktiverte formen, faktor Xa. Faktor VIII (også synonymt referert til som faktor VIIIC) blir i dag antatt å virke ved dette trinnet, i nærvær av fosfolipid og kalsiumioner, som en kofaktor; dvs. den har ingen kjent funksjon i seg selv, og er nødvendig for å øke aktiviteten til faktor IXa. Dette trinnet i kaskaden er kritisk fordi de to mest vanlige hemofili-sykdommene har blitt bestemt til å forårsakes av den nedsatte funksjonering av enten faktor VIII (hemofili A eller klassisk hemofili) eller faktor IXa (hemofili B). Omkring 80% av hemofiliforstyrrelsene skyldes en mangel på faktor VIII. Kliniske manifestasjon i begge typer av sykdommer er den samme: en mangel på tilstrekkelig fibrindannelse som er nødvendig for blodplateplugg-stabilisering, hvilket resulterer i en plugg som lett løsner med etterfølgende ny blødning på stedet. Den relativt høye hyppighet av mangel på faktor VIII og faktor IX sammenlignet med de andre faktorene i koaguleringskaskaden skyldes deres genetiske binding til X-kromosomet. Et enkelt defekt arveanlegg i gener for faktor VIII eller faktor IX resulterer i hemofili hos hankjønn som bare har en kopi av X-kromosomer. De andre koaguleringsfaktorene er autosomalt bundet og krever vanligvis tilstedeværelsen av to defekte arveanlegg for å forårsake en blodkoaguleringssykdom, - et meget mindre vanlig tilfelle. Således er hemofili A og B langt de mest vanlige arvelige blodstørkningssykdommene, og de forekommer nesten utelukkende hos hankjønn.

For flere tiår siden var gjennomsnittsalderen for dødsfall hos personer med hemofili 20 år eller mindre. Mellom tidlig i 1950-årene og sent i 1960-årene ledet forskning omkring faktor VIII-sykdommen til behandling hemofili A til å begynne med hel plasma og senere med konsentrater av

faktor VIII. Den eneste kilden for human faktor VIII har vært humant plasma. En annen faktor som bidrar til omkostningene, er prisen som er forbundet med oppnåelse av store mengder brukbart plasma. Kommersielle firmaer må etablere donasjonssentere, gi godtgjørelse til donorer og opprettholde plasma i en frossen tilstand umiddelbart etter donasjonen og gjennom forsendelse til bearbeidelsesanlegget. Plasmaprøvene samles i partier på over 1000 donorer og behandles. P.g.a. ustabiliteten til faktor VIII-aktiviteten er store tap knyttet til noen få enkle rensemetoder som benyttes for fremstilling av konsentratene (som resulterer i omkring en 15% aktivitetsgjenvinning). De resulterende farmasøytiske produktene er meget urene og har en spesifikk aktivitet på 0,5-2 faktor VIII-enheter pr. mg protein (en enhet av faktor VIII-aktivitet er ved definisjon den aktivitet som er til stede i 1 ml plasma). Den bestemte renhet for faktor VIII-konsentrat er omkring 0,04% faktor VIII protein, beregnet på vekt. Dette høye urenhetsnivå er forbundet med en rekke alvorlige komplikasjoner inkl. utfelt protein, hepatitt, og muligens det materiale som er ansvarlig for ervervet immundefektsyndrom (AIDS). Disse ulemper med faktor VIII-konsentratene skyldes ustabiliteten til det plasma-avledede faktor VIII, og dets ervervelse fra en samling av flere donorer. Dette betyr at skulle et individ blant de 1000 donorene ha f.eks. hepatitt, ville hele partiet være infisert med viruset. Donorer undersøkes for hepatitt B, men det er kjent at konsentratene inneholder både hepatitt A og hepatitt ikke-A ikke-B. Forsøk på å fremstille et produkt med høyere renhet resulterer i uakseptable store tap av aktivitet, og derved økes omkostningene.

Historikken med rensing av faktor VIII illustrerer vanskeligheten ved å arbeide med dette proteinet. Denne vanskelighet skyldes for en stor del ustabiliteten og spormengdene av faktor VIII som inneholdes i helt blod. I de tidlige 1970-årene ble det karakterisert et protein som da ble antatt

å være faktor VIII (5, 6, 7). Dette proteinet ble bestemt for å være et aggregat av et underenhet-glykoprotein, idet underenheten viste en molekylvekt på omkring 240.000 dalton bestemt ved SDS-gelelektroforese. Denne underenheten aggregerte til en heterogen populasjon av enheter med høyere molekylvekt varierende fra mellom en million og 20 millioner dalton. Proteinene var til stede i hemofilisk plasma, men manglet i plasma hos pasienter med von Willebrand's sykdom, en autosomalt overført genetisk forstyrrelse kjennetegnet ved en forlenget blødningstid og lave nivåer av faktor VIII (8). Den teori som da ble fremsatt, var at dette høymolekylære protein, betegnet von Willebrand-faktor (vWF) eller faktor VIII-beslektet antigen (FVIIIIRAg), var ansvarlig for koaguleringsdefekten i begge sykdommer, idet proteinet var fraværende i von Willebrand's sykdom og på en viss måte ikke-funksjonelt i klassiske hemofilisykdomstilstander (9). Det ble imidlertid senere observert at under visse betingelser, særlig høye saltkonsentrasjoner, så kunne faktor VIII-aktiviteten separeres fra dette protein som var antatt å være ansvarlig for aktiviteten til faktor VIII (10-20). Under disse forhold viste faktor VIII koagulant aktivitet en molekylvekt på 100.000-300.000. Etter denne tid har store anstrengelser konsentrert seg om å identifisere og karakterisere proteinet (proteinene) som er ansvarlige for koagulantaktiviteten til faktor VIII. Tilgjengeligheten av bare spormengder av proteinet i helt blod koblet med dets ustabilitet har imidlertid vanskeliggjort slike studier.

Forsøk på å isolere faktor VIII protein(er) fra naturlige kilder, både humane og animalske, i varierende renhetstilstander, har blitt rapportert (21-27, 79). P.g.a. de ovennevnte problemer eksisterer muligheten for feilaktig identifikasjon og etterfølgende kloning og ekspresjon av et kontaminerende protein i et faktor VIII-preparat istedenfor det tilsiktede faktor VIII-protein. At denne mulighet er virkelig, understrekes ved den ovennevnte feilaktige identifikasjon av von Willebrand-protein til å være faktor

VIII-koaguleringsproteinet. Forvirring angående identifika-
sjonen av faktor VIII-lignende aktivitet er også en avgjort
mulighet. Enten faktor Xa eller trombin ville forårsake
en forkortning av levringsstiden for forskjellige plasmaer,
5 inkludert faktor VIII-mangelfullt plasma, og derved synes
å utvise faktor VIII-lignende aktivitet med mindre riktige
kontroller ble foretatt. Visse celler er også kjent for
å produsere aktiviteter som kan funksjonere på en måte meget
lik den som forventes av faktor VIII (28, 29, 30). Sist-
10 nevnte referanse (30) beviser at denne faktor VIII-
lignende aktivitet faktisk er en proteinbetegnet vevs-
faktor. Det samme eller lignende materiale har også blitt
renset fra human placenta (31). Dette protein virker, i
sammenheng med plasmaproteinfaktor VII, ved det samme trinnet
15 som faktor VIII og faktor IXa, hvilket resulterer av aktive-
ring av faktor X til faktor Xa.

Bevisbyrden for ekspresjon av en rekombinant faktor VIII
ville derfor ligge på beviset for funksjonell ekspresjon
20 av det som utvilsomt er en faktor VIII-aktivitet. Skulle
endog tidligere forskere vise at de oppnådde en full eller
partiell klon som koder all eller en del av faktor VIII,
kunne de tekniske problemer ved ekspresjonen av et rekombi-
nant protein som er fire ganger større enn noe annet rekombi-
25 nant protein som hittil er uttrykt, godt ha vist seg å være
uoverstigelig for forskere av vanlig dyktighet.

De potensielle artifakter og problemer som er beskrevet
ovenfor, antyder i kombinasjon behovet for grundig under-
30 søkelse av eventuelle påstander om vellykket kloning og
ekspresjon av human faktor VIII. Foreliggende oppfinnelses
vellykkethet fremgår ved:

1) Immunologisk kryssreaktivitet for antistoffer
35 satt opp mot klon-avledede faktor VIII-proteiner med plasma-
avledede faktor VIII-proteiner.

2) Kryssreaksjon av nøytraliserende monoklonale anti-stoffer satt opp mot human plasma faktor VIII med protein kodet av klonen.

5 3. Identifikasjon av genomisk DNA tilsvarende faktoren VIII-cDNA til å være lokalisert i X-kromosomet, hvor faktor VIII-genet er kjent for å være innkodet.

10 4. Ekspresjon av et funksjonelt protein som viser:
a) Korreksjon av faktor VIII-mangelfullt plasma.
b) Aktivisering av faktor X til faktor Xa i nærvær av faktor IXa, kalsium og fosfolipid.
c) Inaktivering av aktiviteten observert i a) og b)
15 ved antistoffer som er spesifikke for faktor VIII.
d) Binding av aktiviteten til en immobilisert monoklonal-antistoffkolonne som er spesifikk for faktor VIII.
e) Aktivisering av faktor VIII-aktiviteten med trombin.
20 f) Binding av aktiviteten til og etterfølgende eluering fra immobilisert von Willebrand-faktor.

Foreliggende oppfinnelse er således basert på den vellykkede bruk av rekombinant DNA-teknologi for fremstilling av funksjonell human faktor VIII, og i mengder som er tilstrekkelig
25 til å bevise identifikasjon og funksjonalitet og for å initiere og utføre animalsk og klinisk testing som vilkår for godkjennelse på markedet. Produktet, human faktor VIII, er egnet for bruk i alle sine funksjonelle former, ved
30 profylaktisk eller terapeutisk behandling av mennesker som ved diagnose er blitt funnet å mangle faktor VIII-koaguleringsaktivitet. Foreliggende oppfinnelse er således i et viktig aspekt rettet mot fremgangsmåter for diagnose og behandling av klassisk hemofili, hemofili
35 hos mennesker ved bruk av faktor VIII og mot egnede farmasøytiske preparater for dette.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig en fremgangsmåte for fremstilling av human faktor VIII, kjennetegnet ved at eukaryote vertsceller transformeres med ekspresjonsvektoren pAML3P. 8 cl, (fig. 12 III), cellene dyrkes og faktor VIII isoleres fra cellene.

Vektor pAML3P.8cl (fig. 12III) er også beskrevet. Den er kjennetegnet ved at den kan uttrykke i en pattedyrvertscelle DNA kodende for full-lengde humanfaktor VIII, og den inneholder en adenovirus tripartitt-leder spleiset i dennes tredje exon til den 5' utranslaterte regionen til humanfaktor VIII, etterfulgt av et strukturelt gen kodende for full-lengde humanfaktor VIII inkludert dets signalsekvens, den 3' utranslaterte regionen som er spleiset ved et HpaI sete til den 3' utranslaterte regionen til hepatitt B overflateantigenet, etterfulgt av et gen kodende for DHFR som har en SV40 tidlig promoter og en hepatitt 3' utranslatert region som utviser et funksjonelt polyadenyleringssignal.

Foreliggende oppfinnelse vedrører også vektor pESVDA, kjennetegnet ved at den kan tilveiebringe den korresponderende RNA-segmentet av et innskutt faktor VIII DNA-fragment fri for intron ved transkripsjon i en transfektert eukaryot cellekultur, og den inneholder 342 bp PvuII-HindIII-fragmentet til SV40 virus, som dekker SV40 replikasjonsorigo omgitt av EcoRI seter, og den inneholder polyadenyleringssetet til hepatitt B virus overflateantigen, innbefattet på et 580-bp BamHI-BglII-fragment, der det mellom EcoRI-setet etter SV40 til promoteren og BamHI-setet til hepatitt B virusoverflateantigenet er skutt inn PvuII-HindIII-fragmentet, inneholdende donorspleisesetet til den første sene ledere, øyeblikkelig etterfulgt av 840-bp HindIII-SacI-fragmentet til Adenovirus 2, inneholdende Elb akseptorspleisesetet, og hvor det mellom donor og akseptorsetene ligger unike BglII og HindIII-seter for innskudd av genomiske (f.eks. faktor VIII) DNA-fragmenter, som vist i figur 6.

Faktor VIII DNA-isolatene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse, som koder for funksjonell enhet(er) av human faktor VIII, finner anvendelse innen genterapien idet de gjenoppretter faktor VIII-aktivitet hos individer som mangler denne ved inkorporering av slikt DNA, f.eks. via hematopoetiske stamceller.

Særlig foretrukken utførelse

Human faktor VIII fremstilles i funksjonell form i et spesielt egnet vertcellesystem. Dette system innbefatter nyreceller fra babyhamster (BHK-21 (C-13), ATCC Nr. CCL 10) som har blitt transformert med en ekspresjonsvektor omfattende DNA som koder for human faktor VIII, inkludert 3'- og 5'-utranslatert DNA derav og sammenføyet ved det 3'-utranslaterte området med 3'-utranslatert terminator DNA-sekvens, f.eks. slik som fra hepatitt B-overflateantigen-gen. Ekspresjonen av genet drives av transkripsjonshoved/senpromoter sammen med dens 5'-spleisede leder samt elementer avledet fra SV40-replikasjonsonsopprinnelsesområde inkludert transkripsjonsfremmende sekvenser og promotersekvenser. I tillegg kan ekspresjonsvektoren også inneholde et gen kodende for DHFR drevet av en SV40 tidlig promoter som gir genamplifikasjonsevne, og et utvelgbart markørgen, f.eks. neomycinbestandighet (som kan tilveiebringes vis kotransfeksjon med et separat vektorbærende neomycinbestandighetspotensial).

Beskrivelse av tegningene

Fig. 1. Skjematisk representasjon av koaguleringskaskaden (2).

Fig. 2. Smelting av DNA i TMAC1 og 6x SSC. A: For hvert punkt ble ti duplikataliquoter av γ DNA først bundet til nitrocellulosefilteret. Disse filtre ble deretter hybridisert uten formamid ved 37°C som beskrevet i nedenfor an-

gitte metoder. Par av flekker ble deretter vasket i 6xSSC, 0,1% SDS () eller 3,0 M TMACl, 50 mM Tris HCl, pH 8,0, 0,1% SDS, 2mM EDTA (0) i 2°C-forøkkelser fra 38 til 56°C. Smeltetemperaturen er det punkt hvor 50% av hybridiseringsintensiteten ble beholdt. B: Et smelteforsøk som panel A ble foretatt ved binding av aliquoter av pBR322 DNA til nitrocellulosefiltere. Probe-fragmenter av forskjellige lengder ble utviklet ved nedbrytning av pBR322 med MspI, ende-merking av fragmentene med ³²P og isolering på polyakrylamidgeler. Probe-fragmentene fra 18 til 75 b ble hybridisert uten formamid ved 37°C og de fra 46 til 1374 b i 40% formamid ved 37°C som beskrevet i metodene. Filtrene ble vasket i 3,0 M tetrametylammoniumklorid (TMACl), 50 mM Tris HCl, pH 8,0, 0,1% SDS, 2 mM EDTA i 3°C- økninger for å bestemme smeltetemperaturen. (0) smeltetemperatur bestemt for pBR322 MspI-probe-fragmenter (Δ) smelte-temperaturer i 3,0 M TMACl for panel A for 11-17 b prober.

Fig. 3. Deteksjon av faktor VIII-genet med probe: 8,3. De tre panelene til venstre: Southern-flekke av 46, XY (1X, hankjønn) DNA og 49,XXXXY (4X) human DNA nedbrutt med EcoRI og BamHI ble hybridisert i 6xSSC, 50 mM natrium fosfat (pH 6,8), 5x Denhardt's oppløsning, 0,1 g/l kokt, sonikert laksesperm av DNA, 20% formamid ved 42°C som beskrevet i metodene. De tre flekkene ble vasket i 1xSSC, 0,1% SDS ved den angitte temperatur. Spor 1, EcoRI 1X; spor 2, EcoRI 4X; spor 3, BamHI 1X; og spor 4, BamHI 4X. Spor M, ende-merket λHindIII og φX174 HaeIII nedbrutte markør-fragmenter. Høyre panel: Et nitrocellulosefilter fra λ/4X biblioteket hybridisert med probe 8,3. Piler indikerer to av de uavhengige faktor VIII-positive klonene. Hybridisering og vasking for arkivutvalget var som beskrevet ovenfor for Southern-flekkene, med en vaske-temperatur på 37°C.

Fig. 4. Kart av human faktor VIII gen.

Topplinjen viser stillingene og de relative lengdene av de 26 proteinkodende områdene (eksoner A til Z) i faktor

VIII-genet. Transkripsjonsretningen er fra venstre mot høyre. Den andre linjen viser kartets skala i kilobasepar (kb). Plasseringen av gjenkjenningssesetene for de 10 restriksjonsemzymene som ble benyttet for å kartlegge faktor VIII-genet er gitt i neste serie av linjer. De åpne rektanglene representerer utstrekningen av human genomisk DNA som inneholdes i hvert av λ fag (λ 114, λ 120, λ 222, λ 482, λ 599 og λ 605)- og kosmid (p541, p542, p543, p612, p613, p624)-klonene. Bunnlinjen viser plasseringene av prober benyttet i de genomiske avspøkningene og referert til i teksten: 1) 0,9 kb EcoRI/BamHI fragment fra p543; 2) 2,4 kb EcoRI/BamHI fragment fra λ 222; 3) 1,0 kb NdeI/BamHI triplet av fragmenter fra γ 120; 4/ oligonikleotid-probe 8,3; 5) 2,5 kb StuI/EcoRI fragment fra λ 114; 6) 1,1 kb EcoRI/BamHI fragment fra λ 482; 7) 1,1 kb BamHI/EcoRI fragment fra p542. Southern-flekkanalyse av 46,XY og 49,XXXXY genomisk DNA viste ingen skjelnelige forskjeller i organisasjonen av faktor VIII genet.

Fig. 5. Kosmid-vektor pGcos4. Det 403 b-fusjonerte HincII-fragment i λ cl857S7 (Bethesda Research Lab.) inneheldende cos-setet, ble klonet i pBR322 fra AvaI til PvuII for å utvikle plasmidet pGcos1. Separat ble 1624 b PvuII til NaeI fragmentet av pFR400 (49n) inneheldende SV40 opphav og promoter et mutant dihydrofolat-reduktasegen og hepatitt B overflateantigen-termineringssekvenser, klonet inn i pBR322 AhaIII-sete for å utvikle plasmidet mp33dhfr. En tre-del ligering og kloning ble deretter foretatt med 1497 b SphI til NdeI fragmentet av pGcos1, 3163 b NdeI til EcoRV fragmentet i mp33dhfr, og 376 b EcoRV til SphI fragmentet i pKT19 for å utvikle kosmidvektoren pGcos3. pKT19 er et derivat av pBR322 hvori BamHI-setet i tetra-cyklin-resistensgenet har den muterte nitroguanocin-behandling. pGcos4 ble utviklet ved kloning av den syntetiske 20mer, 5' AATTCGATCGGATCCGATCG, i EcoRI til pGcos3.

Figur 6. Kart av pESVDA. 342 b PvuII-HindIII fragmentet i SV40 virus som spenner over SV40 replikasjonsopphavet og modifisert til å bli bundet av EcoRI-seter (73), poly-adenyleringssete til hepatitt B virus (HBV)-overflateantigen (49n), som befinner seg på et 580 bp BamHI-BglII fragment, og pBR322 derivatet pML (75) har tidligere blitt beskrevet. Mellom EcoRI-setet etter SV40-tidlig promotoren, og BamHI-setet i HBV ble innført PvuII-HindIII-fragmentet (kartkoordinater 16.63-17.06 i adenovirus 2) inneholdende donor-spleisesetet i den første sene lederen (stilling 16.65) umiddelbart fulgt av 840 bp HindIII-SacI fragmentet i adenovirus 2 (stilling 7.67-9.97) (49j), inneholdende Elb-akseptorspleisesete ved kartstilling 9.83. Mellom donor- og akseptorsetene ligger unike BglII og HindIII-seter for innføring av genomiske DNA-fragmenter.

Fig. 7. Analyse av RNA-transkripter fra pESVDA-vektorer. Sammenløpende 10 cm skåler med COS-7-celler (77) ble transfisert med 2 µg plasmid DNA ved bruk av den modifiserte DEAE-dekstranmetoden (84) som beskrevet (73). RNA ble fremstilt fire dager post-transfeksjon fra cytoplasmiske ekstrakter (49n) og elektroforesebehandlet i denaturerende formaldehyd-agarose-geler. Etter overføring til nitro-cellulose ble filteret hybridisert med passende ³²P-merket DNA som beskrevet senere under metoder. Filteret ble vasket i 2X SSC, 0,2% SDS ved 42° og eksponert for "Kodak XR5"-film. Stillingen de 28S og 18S ribosomale RNA'er er angitt med pil i hvert panel.

9,4 kb BamHI-fragmentet i λ114 inneholdende ekson A (se fig. 4) ble klonet i BglII-setet i pESVDA (fig. 6). Plasmid pESVDA111.6 inneholdt det innførte fragment i orienteringen slik at SV40-tidligpromotoren ville transkribere det genomiske fragment i den riktige (dvs. "sense") retning. pESVDA111.7 inneholder 9,4 kb Bam-fragmentet i den motsatte orientering. Plasmid pESVDA.S127 inneholder 12,7 kb SacI-fragmentet til λ 114 innført (ved butt ende-ligering) i BglII-setet i pESVDA i den samme oriente-

ringen som pESVDA111.6.

- A. Hybridisering av filtere inneholdende totalt cytoplasmisk RNA fra celler transfisert med pESVDA, pESVDA111.7 og pESVDA111.6. pESVDA RNA (spor 1), pESVDA111.7 (spor 2), pESVDA111.6 (spor 3-5). Probet med faktor 8 ekson A-holdig fragment (spor 1-4) eller 1800 b StuI/Bam-fragment (spor 5). Svak kryss-hybridisering sees til 18S RNA.
- B. Hybridisering av RNA med StuI/BamHI probe ("intron-probe"). RNA fra: 1) pESVDA, polyA⁻; 2) pESVDA, polyA⁺; 3) pESVDA111.7; polyA⁻; 4) pESVDA111.7, polyA⁺; 5) pESVDA111.6, polyA⁻; 6) pESVDA111.6, polyA⁺. Et lite, mørkt hybridiseringsbånd som sees i spor A5, B1, B3 og B5 representerer sannsynligvis hybridisering til tRNA eller til en Alu-gjentagelsessekvens som finnes i dette område.
- C. Sammenligning av cytoplasmisk RNA fra pESVDA111.6 (spor 1) og pESVDA.S127 (spor 2) probet med ekson A-holdig fragment. Merk den svake størrelsesøkning i spor 2, hvilket representerer ytterligere ekson-sekvenser som inneholdes i det større genomiske fragmentet.

Fig. 8. Sekvens av pESVDA.S127 cDNA klon S36. DNA-sekvensen i det humane DNA-innskudd er vist for cDNA-klon S36 oppnådd fra ekson-ekspresjonsplasmidet pESVDA.S127 (se infra. for detaljer). Vertikale linjer markerer ekson-grenser som bestemt ved analyse av genomiske og cDNA-kloner i faktor VIII, og eksoner er bokstavbetegnet som på fig. 4. Valgte restriksjon-endonukleaseseter er indikert.

Fig. 9. cDNA-kloning. Faktor VIII mRNA er angitt på den tredje linjen idet det åpne rektangelet representerer det modne proteinkodende området, det skraverte arealet representerer det signalpeptid-kodende område, og tilstøtende linjer representerer utranslaterte områder i meddeler-elementet. 5'-enden i mRNA befinner seg på venstre side.

Over denne linjen er vist utstrekningen av ekson B-området i den genomiske klon λ 222, og under mRNA-linjen er representert de seks cDNA-klonene ut fra hvilke den fulle mengden av faktor VIII-klonen er sammensatt (se tekst for detaljer). cDNA-synteseprimere 1, 3, 4 og oligo(dT) er vist med piler som illustrerer synteseretningen for hvilken de primet. Valgte restriksjon-endonukleaseseter og en størrelsesskala i kilobaser er inkludert.

Fig. 10. Sekvens av human faktor VIII gen. Den fullstendige nukleotidsekvensen til kompositt faktor VIII cDNA klonen er vist med nukleotider nummerert fra til venstre for hver linje. Nr. 1 representerer A i translasjon-initieringskodonet ATG. Negative tall refererer til 5'-utranslatert sekvens. (mRNA-kartleggingseksperimenter foreslår at faktor VIII mRNA strekker seg omtrent 60 nukleotider lengre enn 5'-stillingen minus 109 som er vist her. Den predikerte proteinsekvens er vist over DNA. Tall over aminosyrene er 1-19 for det predikerte signalpeptid, og 1-2332 for det predikerte modne protein. "Op" betegner opal-translasjonsstoppkodonet TAG. 3'-polyadenyleringssignalet AATAAA er understreket og åtte rester av poly(A)-halen (funnet i klon λ cl0.3) er vist. Sekvenshomologene til den syntetiske oligonukleotidproben 8.3 har også blitt understreket (nukleotider 5557-5592). Valgte restriksjon-endonukleasespaltningssteder er vist over den riktige sekvens. Nukleotider 2671-3217 representerer sekvens avledet fra genomiske kloner mens resten representerer cDNA-sekvens.

Den komplette DNA-sekvens for det proteinkodende området i human faktor VIII-genet ble også bestemt fra de genomiske kloner som er beskrevet. Bare to nukleotider adskilte seg fra sekvensen vist på denne figur avledet fra cDNA-kloner (unntatt nukleotider 2671-3217). Nukleotid 3780 (understreket) er G i cDNA-klonen, hvilket endrer aminosyre-

kodonen 1241 fra asp til glu. Nukleotid 8728 (understreket) i det 3'-utranslaterte området er A i den genomiske klon.

Fig. 11. Sammensetning av den fulle lengde av rekombinant faktor VIII plasmid. Se teksten i seksjon 8a for detaljer ved sammensetningen av plasmid pSVEFVIII inneholdende den fulle lengde av humanfaktor VIII cDNA. Nummereringen av stillinger adskiller seg fra dem i teksten og fig. 10 ved 72bp.

Fig. 12. Sammensetning av faktor VIII ekspresjonsplasmidet. Se teksten i seksjon 8b for detaljer vedrørende sammensetningen av plasmidet pAML3p.8cl som dirigerer ekspresjonen av funksjonelle humanfaktor VIII i BHK-celler.

Fig. 13. Western-analyse av faktor VIII ved anvendelse av fusjonsprotein-antisera. Human faktor VIII ble separert på en 5-10% polyakrylamidgradient-SDS-gel ifølge metoden i (81). Et spor for faktor VIII ble farget med sølv (80). De resterende spor for faktor VIII ble elektroforetisk overført til nitrocellulose for western-flekkanalyse. Radioaktivt merkede standarder ble anbragt i spor tilstøtende faktor VIII for å bestemme molekylvekten til observerte bånd. Som antydnet ble nitrocellulosestrimlene inkubert med hensiktsmessig antisera, vasket og probet med ^{125}I protein A. Nitrocellulosearkene ble underkastet autoradiografi.

Fig. 14. Analyse av fusjonsproteiner under anvendelse av C8 monoklonalt antistoff. Fusjonsproteiner 1, 3 og 4 ble analysert ved Western-flekkanalyse med henblikk på reaktivitet med faktor VIII spesifikt monoklonalt antistoff C8.

Fig. 15. Elueringsprofil for høytrykk-væsekromatografi (HPLC) av faktor VIII på en "Toya Soda TSK 4000 SW"-kolonne. Kolonnen ble ekvilibrert og utviklet ved rom-

temperatur med 0,1% SDS i 0,1 M natriumfosfat, pH 7,0.

Fig. 16. Elueringsprofil for reversert fase HPLC-separering av faktor VIII tryptiske peptider. Separeringen ble foretatt på en "Synchropak RP-P C-18"-kolonne (0,46 cm x 25 cm x 10 µm) under anvendelse av en gradienteluering av acetonitril (1% til 70% i 200 min.) i 0,1% trifluoreddiksyre. Pilene indikerer toppen inneholdende peptidet med sekvensen AWAYFSDVDLEK.

Fig. 17. Trombinaktivering av rensert faktor VIII aktivitet. Celle-supernatanten ble kromatografert på C8 monoklonal-harpiksen, og dialysert for å fjerne elueringsbuffer. Trombin (25ng) ble tilsatt ved tid 0. Aliquoter ble for-
tynnet 1:3 ved de angitte tider og analysert med henblikk på koaguleringsaktivitet. Enheter pr. ml ble beregnet fra en standard-kurve for normal humanplasma.

A. Definisjoner

Den heri benyttede betegnelse "human faktor VIII" betegner et funksjonelt protein som in vivo eller in vitro kan korrigere human faktor VIII mangler, kjennetegnet f.eks. ved hemofili A. Proteinet og tilknyttede aktiviteter er også referert til som faktor VIIIC (FVIIIC) og faktor VIII koagulantantigen (FVIIICAg) (31a). Slik faktor VIII fremstilles ved hjelp av rekombinante cellekultur-systemer i aktiv form(er) tilsvarende faktor VIII-aktivitet som er nativt til humanplasma. (En "enhet" av human faktor VIII aktivitet har blitt definert som den aktivitet som er til stede i 1 ml normalt humanplasma.) Faktor VIII protein fremstilt heri er definert ved hjelp av DNA-gen- og aminosyre-sekvensangivelse, ved fysiske egenskaper og ved biologisk aktivitet.

Faktor VIII har flere nedbrytningsformer eller behandlede former i naturlig tilstand. Disse er proteolytisk avledet fra en forløper, et kjedeprotein, som demonstrert heri. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et slikt enkelt kjedeprotein og tilveiebringer også fremstilling per se Slike produkter inneholder en funksjonell aktiv del eller deler tilsvarende nativt materiale.

Det er sannsynlig at alleliske variasjoner eksisterer. Disse variasjoner kan demonstreres ved en eller flere aminosyreforskjeller i den totale sekvensen eller ved utelatelser, substitusjoner, innskudd eller inversjoner av en eller flere aminosyrer i den totale sekvensen. I tillegg kan plasseringen og graden av glykosylering avhenge av naturen av det cellulære vertmiljø. Ved bruk av rekombinat DNA-teknologi eksisterer også potensiale for fremstilling av forskjellige human faktor VIII-derivater, forskjellig modifisert ved resulterende enkle eller multiple aminosyreutelatelser-substitusjoner-innskudd eller -inversjoner, f.eks. ved hjelp av seterettet mutagenese av underliggende DNA. I tillegg kan fragmenter av human faktor VIII, enten fremstilt in vivo eller in vitro, være i besittelse av den nødvendige nyttige aktivitet, som omtalt ovenfor. Alle slike alleliske variasjoner, glykosylerte versjoner, modifikasjoner og fragmenter resulterende i derivater av faktor VIII, innbefattes i foreliggende oppfinnelse så lenge som de inneholder det funksjonelle segment av human faktor VIII og den vesentlige, karakteristiske human faktor VIII funksjonelle aktivitet forblir upåvirket i type. Slike funksjonelle varianter eller modifiserte derivater er betegnet "human faktor VIII-derivater" heri. De derivater

av faktor VIII som er i besittelse av den nødvendige funksjonelle aktivitet kan lett identifiseres ved enkle in vitro forsøk som beskrevet heri. Fra angivelsen av sekvensen av human faktor VIII DNA heri og aminosyresekvensen for human faktor VIII, vil de fragmenter som kan avledes via restriksjonsenzym-avspalting av DNA eller proteolytisk nedbrytning eller annen nedbrytning av human faktor VIII-protein, være åpenbare for fagmannen.

Således er human faktor VIII i funksjonell form, dvs. "funksjonell human faktor VIII", i stand til å katalysere omdannelsen av faktor X til Xa i nærvær av faktor IXa, kalsium og fosfolipid, samt å korrigere koaguleringsdefekten i plasma avledet fra hemofili A-angrepne individer, og klassifiseres ytterligere som "funksjonell human faktor VIII" basert på immunologiske egenskaper som demonstrerer identitet eller vesentlig identitet med human plasma VIII.

Benyttet for å beskrive tilstanden til "human faktor VIII" fremstilt ifølge oppfinnelsen betyr "vesentlig ren form" vesentlig fri for protein eller andre materialer som vanligvis er forbundet med faktor VIII når denne er isolert fra ikke-rekombinante kilder, dvs. fra dets "native" plasmaholdige miljø.

"DHFR protein" refererer til et protein som kan utvise aktivitet forbundet med dihydrofolatreduktase (DHFR) og som derfor må fremstilles av celler som kan overleve på medium som mangler hypoxantin, glycin og tymidin (-HGT medium). Generelt er celler som mangler DHFR protein ute av stand til å vokse på dette mediet, celler som inneholder DHFR-protein lykkes i dette.

"Ekspresjonsvektor" innbefatter vektorer som kan uttrykke DNA-sekvenser inneholdt deri når slike sekvenser er opererbart forbundet med andre sekvensen som kan bevirke deres ekspresjon. Disse ekspresjonsvektorer replikerer

i vertcellen enten ved hjelp av et intakt, opererbart replikasjonsopphav eller ved hjelp av funksjonell integrering til cellekromosomet. Igjen er "ekspresjonsvektor" gitt en funksjonell definisjon, og enhver DNA-sekvens som kan bevirke ekspresjon av en spesifisert DNA-kode beliggende deri, er inkludert i denne betegnelsen når den benyttes på den spesifiserte sekvens. Generelt er ekspresjonsvektorer med nyttevirkning innen rekombinante DNA-teknikker ofte i form av "plasmider" som referer til sirkulære, dobbeltkjedede DNA-sløyfer. Oppfinnelsen skal imidlertid også innbefatte slike andre former for ekspresjonsvektorer som tjener ekvivalente funksjoner.

"DNA-isolat" betyr DNA-sekvensen innbefattende sekvensen som koder for human faktor VIII, enten alene eller som inkorporert i en kloningsvektor.

"Rekombinant vertcelle" refererer til celler/celler som har blitt transformert med konstruerte vektorer ved anvendelse av rekombinante DNA-teknikker. Som definert heri, fremstilles faktor VIII eller funksjonelle segmenter derav i de mengder som oppnås i kraft av denne transformasjon i stedet for i slike mindre mengder og renheter som ville kunne fremstilles av en utransformert, naturlig vertskilde. Faktor VIII fremstilt av slike "rekombinante vertceller" kan betegnes som "rekombinant human faktor VIII".

Størrelsesenheter for DNA og RNA er ofte forkortet som følger: b=base eller basepar; kb = kilo (ett tusen) base eller kilobasepar. For proteiner forkortes: D = Dalton; kD = kiloDalton. Temperaturer er alltid gitt i grader Celcius.

B. Vertcellekulturer og vektorer

Nyttig rekombinant human faktor VIII kan fremstilles ifølge foreliggende oppfinnelse i en rekke forskjellige rekombinante vertceller. Et spesielt foretrukket system er beskrevet heri.

Generelt er prokaryoter foretrukket for kloning av DNA-sekvenser ved konstruksjon av vektorer som er nyttige i oppfinnelsen. F.eks. er *E. coli* K12 stamme 294 (ATCC nr. 31446) særlig nyttig. Andre mikrobielle stammer som kan anvendes, innbefatter *E. coli*-stammer, slik som *E. coli* B, og *E. coli* X1776 (ATTC No. 31537), og *E. coli* c600 og c600hfl, *E. coli* W3110 (F^- , λ^- , prototrofisk, ATTC nr. 27325), basiller slik som *Bacillus subtilis*, og andre enterobacteriaceae slik *Salmonella typhimurium* eller *Serratia marcesans*, og forskjellige pseudomonas-arter. Disse eksempler er naturligvis bare ment å være illustrerende istedenfor begrensede.

Generelt blir plasmidvektorer inneholdende replikon og kontrollsekvenser som er avledet fra arter forenlige med vertcellen benyttet i forbindelse med disse verter. Vektoren bærer i alminnelighet replikasjonssete samt markeringssekvenser som kan tilveiebringe fenotypisk utvalg i transformerte celler. F.eks. blir *E. coli* typisk transformert ved bruk av pBR322, et plasmid avledet fra en *E. coli* art (32). pBR322 inneholder gener for ampicillin- og tetracyklinresistens og gir således lett midler for identifikasjon og valgt av transformerte celler. pBR322-plasmidet eller et annet mikrobielt plasmid må også inneholde, eller være modifisert til å inneholde, promotere som kan benyttes av den mikrobielle organismen for ekspresjon av dens egne proteiner. Disse promoterene som vanligvis benyttes i rekombinant DNA-konstruksjon innbefatter β -laktamase (penicillinase)- og laktose-promotersystemer (33-35) og tryptofan (trp) promoter-

system (36, 37). Mens disse er de mest vanlig benyttede, har andre mikrobielle promotere blitt oppdaget og benyttet, og detaljer angående deres nukleotid-sekvenser har blitt publisert, hvilket gjør det mulig for fagmannen å ligere dem funksjonelt med plasmidvektorer (38).

I tillegg til prokaryoter kan eukaryotiske mikrober, slik som gjærkulturer, også benyttes. *Saccharomyces cerevisiae* eller vanlig bakegjær er mest vanlig benyttet blant eukaryote mikroorganismer, skjønt en rekke andre stammer er vanlig tilgjengelige. For ekspresjon i *Saccharomyces* blir plasmidet YRp7, f.eks., (39 - 41) vanligvis benyttet. Dette plasmidet inneholder allerede *trp1*-genet som gir en seleksjonsmarkør for en mutant gjærstamme som mangler evne til å vokse i tryptofan, f.eks. ATCC nr. 44076 eller PEP-1 (42). Tilstedeværelsen av *trp1*-lesjonen som et karakteristisk trekk i gjær-vertcellefenomenet gir da et effektivt miljø for detektering av transformasjon ved vekst i fravær av tryptofan.

Egnede promoterende sekvenser i gjærvektorer innbefatter promoterene for 3-fosfoglyceratkinase (43) eller andre glykolytiske enzymer (44, 45), slik som enolase, glyceraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase, heksokinase, pyruvat-dekarboksylase, fosfofruktokinase, glukose-6-fosfat-isomerase, 3-fosfoglycerat-mutase, pyruvat-kinase, triose-fosfat-isomerase, fosfoglukose-isomerase og glukokinase. Ved konstruksjon av egnede ekspresjonsplasmider blir også termineringssekvensene forbundet med disse gener ligert i ekspresjonsvektoren 3' i sekvensen som er ønsket uttrykt for tilveiebringelse av polyadenylering av mRNA og terminering. Andre promotere som har den ytterligere fordel av transkripsjon regulert av vekstbetingelser er promoterområdene for alkoholdehydrogenase 2, isocytokrom C, syrefosfatase, nedbrytbare enzymer forbundet med nitrogenmetabolisme, og ovennevnte glyceraldehyd-3-

fosfat-dehydrogenase, og enzymer som er ansvarlig for maltose- og galaktoseutnyttelse. Enhver plasmidvektor inneholdende gjær-kompatibel promoter, replikasjonsopphav og termineringssekvenser er egnet.

5 Bruk av kulturer av celler avledet fra multicellulære organismer som celleverter er foretrukne, spesielt for ekspresjon av underliggende DNA for fremstilling av den funksjonelle humane faktor VIII herav, og det vises
10 særlig til den foretrukne utførelse herav. I prinsippet er hvirveldyrceller av spesiell interesse, slik som VERO- og HeLa-celler, cellelinjer fra eggstokker hos kinesisk hamster (CHO), og W138-, BHK-, COS-7- og MDCK-cellelinjer. Ekspresjonsvektorer for slike celler inn-
15 befatter vanligvis (om nødvendig) (en) opprinnelse(r) for replikasjon, en promoter som befinner seg foran genet som skal uttrykkes sammen med eventuelle nødvendige ribosom-bindende seter, RNA-spleiseseter, polyadenyleringssete, og transkripsjonelle terminatorsekvenser.

20 For bruk i pattedyrceller kan kontrollfunksjonene og ekspresjonsvektorene tilveiebringes av viralt materiale. F.eks. er vanlig benyttede promotere avledet fra polyoma, Simian Virus 40 (SV40) og mest spesielt Adenovirus 2. De tidlige og sene promoterene i SV40-virus er nyttige,
25 hvilket også er tilfelle for den sene hovedpromotere i adenovirus som beskrevet ovenfor. Videre, det er også mulig, og ofte ønskelig, å benytte promoter eller kontrollsekvenser som normalt er forbundet med den ønskede gen-
30 sekvens, forutsatt at slike kontrollsekvenser er kompatible med vertcellesystemene.

35 En replikasjonsopprinnelse kan tilveiebringes enten ved konstruksjon av vektoren til å innbefatte en eksogen opprinnelse, slik som man kan avlede fra adenovirus eller annen viral (f.eks. polyoma, SV40, SVV, BPV, osv.) kilde, eller kan tilveiebringes av den kromosomale replikasjons-

mekanismen til vertcellen, dersom vektoren er integrert i vertcellekromosomet.

5 Ved lagt av en foretrukken vertcelle for transfeksjon av vektorene ifølge oppfinnelsen som omfatter DNA-sekvenser som koder både faktor VIII og DHFR-protein, er det hensiktsmessig å velge verten i overensstemmelse med typen av benyttet DHFR-protein. Dersom villtype-DHFR-proteinet benyttes, er det foretrukket å velge en vertcelle som mangler DHFR, hvorved man kan benytte den DHFR-kodende 10 sekvens som en markør for vellykket transfeksjon i selektivt medium som mangler hypoxantin glycin og tymidin.

15 På den annen side, dersom DHFR-protein med lav bindingsaffinitet for MTX anvendes som kontrollsekvens, er det ikke nødvendig å benytte DHFR-resistente celler. P.g.a. at den mutante DHFR er resistent overfor metotreksat, kan MTX-holdige media anvendes som et middel for seleksjon forutsatt at vertcellene i seg selv er metotreksat-sensitive. De fleste eukaryote celler som kan absorbere 20 MTX, synes å være metotreksat-sensitive.

25 Alternativt kan et villtype-DHFR-gen anvendes som en forsterkningsmarkør i en vertcelle som ikke mangler DHFR forutsatt at en annen legemiddel-selekterbar markør anvendes, slik som neomycinresistens.

30 Eksempler som er angitt i det nedenstående, beskriver bruk av BHK-celler som vertceller og ekspresjonsvektorer som innbefatter den sene hoved-adenoviruspromoter.

C. Generelle metoder

35 Dersom celler uten formidable celleveggbarrierer benyttes som vertceller, utføres transfeksjon ved hjelp av kalsiumfosfat-utfellingsmetoden (46). Andre metoder for

innføring av DNA i celler slik som nukleær injeksjon eller ved protoplastfusjon kan imidlertid også benyttes.

5 Dersom prokaryote celler eller celler som inneholder vesentlige celleveggkonstruksjoner benyttes, er den foretrukne transfeksjonsmetoden kalsiumbehandling ved bruk av kalsiumklorid (47).

10 Konstruksjon av egnede vektorer inneholdende de ønskede kode- og kontrollsekvenser benytter standard ligerings-teknikker. Isolerte plasmider eller DNA-fragmenter spaltes, tilpasses og religeres i den ønskede form for dannelsen av de nødvendige plasmidene.

15 Spalting foretas ved behandling med restriksjonsenzym (eller enzymer) i egnet buffer. Generelt blir ca. 1 µg plasmid eller DNA-fragmenter benyttet med ca. en enzymerhet i ca. 20 µl bufferopløsning i en time. (Hensiktsmessige buffere og substratmengder for spesielle restriksjonsenzymer er spesifisert av produsenten. Likeledes blir standard-
20 betingelser for bruk av T4-ligase, T4-polynukleotid-kinase og bakteriell alkalisk fosfatase gitt av produsenten. Etter inkubasjoner blir protein fjernet ved ekstraksjon med fenol og kloroform og nukleinsyren utvinnes fra den
25 vandige fraksjonen ved utfelling med etanol. Standard laboratorieteknikker er tilgjengelige (48).

Restriksjonsenzymfragmenter med klebrige ender (overhengende) gis butte ender, f.eks. ved enten:

30 Ifyllingsreparasjon: 2-15 µg DNA ble inkubert 50 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotreititol med 250 µM hver av fire deoksynukleosidtrifosfater og åtte enheter DNA-polymerase Klenow-fragment ved 24°C i 30 min.
35 Reaksjonen ble terminert ved fenol- og kloroformekstraksjon og etanolutfelling, eller

S1-nedbrytning: 2-15 μ g DNA ble inkubert i 25 mM NaOAc (pH 4,5), 1 mM ZnCl_2 , 300 mM NaCl med 600 enheter S_1 -nuklease ved 37°C i 30 min., fulgt av fenol-, kloroform- og etanol-utfelling.

5

Syntetiske DNA-fragmenter ble fremstilt ved kjente fosfortriester (47a)- eller fosforamiditt (47b)-metoder. DNA utsettes for elektroforese i agarose- eller polyakrylamidgeler i plateform ved standard metoder (48) og fragmenter ble renset fra geler ved elektroeluering (48a). DNA

10

"Southern"-flekkybridisering fulgte (49a)-metoden.

RNA "Northern"-flekkybridiseringer fulgte elektroforese i agarosegeler i plateform inneholdende 6% formaldehyd.

15

(48, 49b) radiomerkede hybridiseringsprober fremstilles ved vilkårlig kalvetymus-DNA-primet syntese (49c) ved anvendelse av ^{32}P -merkede nukleotidtrifosfater av høy spesifikk aktivitet (^{32}P : Amersham; Klenow DNA-polymerase: BRL, NEB eller Boehringer-Mannheim). Korte oligonukleotidprober kan ende-merkes med T4-polynukleotidkinase. "Standard salt"-Southern-hybridiseringsbetingelser varierte fra: Hybridisering i 5x SSC (1x SSC = 0,15 M NaCl 0,015 M Na_3citrat , 50 mM Na fosfat, pH 7, 10% dekstransulfat, 5x Denhardt's oppløsning (1x Denhardt's = 0,02% ficoll, 0,02% polyvinylpyrrolidon, 0,02% storfe-serumalbumin), 20-100 μ g/ml denatureert laksesperm-DNA, 0-50% formamid ved temperaturer varierende fra 24 til 42°C, fulgt av vaskinger i 0,2-1x SSC pluss 0,1% SDS ved temperaturer varierende fra 24 til 65°C. Tørkede filtere ble eksponert for "Kodak XAR"-film ved bruk av DuPont "Lightning-Plus" intensiverende filtere ved -80°C. Se generelt (48).

20

25

30

For Northern-flekk-screening av celle- og vev-RNA, ble hybridisering foretatt i 5x SSC, 5x Denhardt's oppløsning, 10% dekstransulfat, 50% formamid, 0,1% SDS, 0,1% natriumpyrofosfat, 0,1 mg/ml E. coli tRNA ved 42°C natten over med

35

32 P-merket probe fremstilt fra 189 bp StuI/HincI-fragment i λ 120-holdig ekson A sekvens. Vaskebetingelser var 0,2x SSC, 0,1% SDS ved 42°C.

5 Human DNA ble fremstilt fra perifere blodlymfocytter (46,XY) eller lymfoblastceller (49,XXXXY, N.I.G.M.S. Human Genetic Mutant Cell Repository, Camden, N.J. No. GM1202A) (48). E. coli plasmid DNA ble fremstilt som i (48) og bakteriofag λ DNA (48). Vev-RNA ble fremstilt ved enten guanidinium-tiocyanat-metoden (48, 49f) eller ved metoden ifølge (49b).
10 Polyadenylert RNA ble isolert på oligo(dT)cellulose (49h).

DNA-sekvensanalyse ble foretatt ved metoden ifølge (49i).

15 For γ /4X biblioteket ble 50 μ g aliquoter av 49,XXXXY DNA fordøyd i et 1 ml volum med Sau3AI konsentrasjoner på 3,12, 1,56, 0,782, 0,39 og 0,195 U/ml i en time ved 37°C. Testnedbrytning og gelanalyse hadde vist at under disse
20 betingelsene ved 0,782 U/ml Sau3AI, var vektgjennomsnittsstørrelsen for DNA omkring 30 kb; således utvikler disse spaltninger en antallsmidlere fordeling sentrert ved 15 kb. DNA fra 5 spaltninger ble oppsamlet, fenol- og kloroform-ekstrahert, etanolutfelt og elektroforesebehandlet på en
25 6 g/l horisontal lavt smeltepunkts-agarosegel (48) (Seaplaque-agarose, FMC Corporation), i to 5,6 x 0,6 x 0,15 cm spalter. 12-18 kb-området av gelen ble utskåret, og DNA-materialet renses ved smelting av gel-stykket som beskrevet i (48).

30

35

Charon 30-fragmenter ble fremstilt ved nedbrytning av 50 μ g av vektoren med BamHI og isolering av det fusjonerte 31,9 kb-fragmentet fra en 6 g/l lavtsmeltepunktets-agarosegel gel som beskrevet ovenfor. For konstruksjon av λ /4X-biblioteket ble den optimale konsentrasjon av Charon 30 BamHI-fragmenter og 12-18 kb Sau3A partial 49,XXXXY DNA bestemt som beskrevet (48). Den ligerte DNA ble emballert med et in vitro ekstrakt "packagene" (Promega Biotec, Inc., Madison, WI). I en typisk reaksjon ble ca. 1,3 μ g Charon 30 BamHI-fragmenter ligert til 0,187 μ g av 12-18 kb Sau3A innskudds-DNA i et 10 μ l volum. Emballering av utplatingen av DNA-materialet ga ca. $1,3 \times 10^6$ fag-plaquer. For å utvikle λ 4X-biblioteket ble $1,7 \times 10^6$ fag utplatet ved 17.000 fag pr. 150 cm plate. Disse plater ble dyrket natten over, skrapet i 10 mM Tris HCl, pH 7,5, 0,1 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 g/l gelatin og sentrifugert kort, for å forsterke fagen. Generelt ble et egnet antall ($0,5 - 2 \times 10^6$) av disse fag utplatet og sortert (48). I noen tilfeller ble den ligerte og in vitro pakke fag sortert direkte uten forsterkning.

For isolering av λ 482 ble en klon inneholdende et 22 kb BclI fragment av faktor VIII-genomet, BamHI-fragmentene av vektoren λ 1059 (49), isolert ved gelelektroforese. Separat ble 100 μ g DNA fra 49,XXXXY-cellelinjen nedbrutt med BclI og 20-24 kb-fraksjonen isolert ved gelelektroforese. Ca. 0,8 μ g av λ 1059-fragmenter og 5% av den isolerte BclI DNA ble ligert i et volum av 10 μ l (48) for å utvikle 712.000 plaquer. 400.000 av disse ble sortert i duplikat med 2,2 kb StuI/EcoRI probe av λ 114.

Kosmid/4X-biblioteket ble utviklet fra 49,XXXXY DNA benyttet for å utvikle λ /4x-biblioteket, med unntagelse for at det ble utvist stor nøyaktighet ved DNA-isoleringen for å unngå skjæring eller annen bryting. DNA-materialet ble delvis spaltet med fire konsentrasjoner av Sau3AI og det oppsamlede DNA målt på en 100-400 g/l sukrosegradient (49). Fraksjonene inneholdende 35-45 kb DNA ble oppsamlet, dia-

lysert og etanolutfelt. Fragmenter av kosmid-vektoren pGcos4 ble fremstilt ved å følge prinsippene som beskrevet annetsteds (50). I korthet ble to separate, like aliquoter av pGcos4 spaltet med SstI (en isoschizomer av SacI) eller SalI og deretter behandlet med bakterieell alkalisk fosfatase. Disse aliquoter ble deretter fenol- og kloroformekstrahert, oppsamlet, etanolutfelt og kuttet med BamHI. Fra dette nedbrytningsprodukt ble to fragmenter av 4394 og 4002 b isolert fra en lavtsmeltepunkt-agarosegel. Disse fragmentene ble deretter ligert til det isolerte, 40 kb Sau3AI partialdigest DNA. I en typisk reaksjon ble 0,7 µg pGcos4 armfragmenter ligert til 1 µg av 40 kb human 4X DNA i et volum på 10 µl (48). Denne reaksjonen ble deretter pakket in vitro og benyttet for å infisere E. coli HB101, en recA⁻ stamme (48). Denne reaksjon utviklet ca. 120.000 kolonier ved utplating på tetracyklinholdige plater. Ca. 150.000 kosmider ble sortert på 20 150 mm plater i duplikat som beskrevet med amplifikasjon natten over på kloramfenikolholdige plater (48).

Dobbelttrådet cDNA ble fremstilt som tidligere beskrevet (36, 67) under anvendelse av enten oligo(dT)₁₂₋₁₈ eller syntetiske deoksyoligonukleotid 16-merer som primere for første tråd-syntese ved reversert transkriptase. Etter isolering med polyakrylamidgeler, ble cDNA med den hensiktsmessige størrelsen (vanligvis 600 bp) eller større enten C-haleforsynt med terminal-transferase, fusjonert sammen med G-haleforsynt PstI-nedbrutt pBR322 og transformert til E. coli stamme DH1 (76), eller ligert med et 100 ganger molar overskudd av syntetiske DNAEcoRI-adaptorer, reisolert på en polyakrylamidgel, innført ved ligering i EcoRI-nedbrutt λ GT10, pakket i fagpartikler og propagert på E. coli stamme C600hfl (68). Som en modifikasjon av eksisterende metoder ble en adaptor bestående av en komplementær syntetisk DNA 18-mer og 22-mer (5'-CCTTGACCGTAAGACATG og 5'-AATTCATGTCTTACGGTCAAGG) ble

fosforylert ved den butte terminusen, men ikke ved den EcoRI kohesive terminus for å tillate effektiv ligering av adaptoren til dobbelttrådet cDNA i fravær av utstrakt selvlisering ved EcoRI-setet. Dette gjorde på effektiv måte tjeneste istedenfor den mer tungvinte metode med ligering av selvkomplementære EcoRI-bindere til EcoRI-metylasebehandlet dobbelttrådet cDNA, og etterfølgende fjerning av overskudd binder-oligomerer fra cDNA-termini ved EcoRI-nedbrytning. For å forbedre effektiviteten av oppnåelse av cDNA-kloner >3500 bp ragende fra poly(A) til de nærmest eksisterende 3'-faktor VIII probesekvenser gjort tilgjengelig ved genomisk kloning, (dvs. ekson A), ble annen-tråd cDNA-syntese spesifikt primet ved inkludering i reaksjonen av en syntetisk DNA 16-mer tilsvarende til en sekvens innen ekson B på mRNA-"sense" tråden.

D. Adenovirus-subkloning

Adenovirus 2 DNA ble innkjøpt fra Bethesda Research Laboratories (BRL). Den virale DNA ble spaltet med HindIII og elektroforesebehandlet gjennom en 5% polyakrylamidgel (TBE-buffer). Området av gelen inneholdende HindIII B-fragmentet (49j) ble utskåret, og DNA-materialet elektroeluert fra gelen. Etter fenol-kloroform-ekstraksjon ble DNA-materialet konsentrert ved etanolutfelling og klonet inn i HindIII-spaltet -pUC13 (49k) for å utvikle plasmidet pAdHindB. Denne HindIII-subklon ble nedbrutt med HindIII og SalI, og det ble isolert et fragment som spente over adenovirale koordinater 17,1 - 25,9 (49j). Dette fragmentet ble klonet inn i HindIII, SalI spaltet pUC13 for å utviklet plasmidet pUCHS. Fra pAdHindB ble SalI til XhoI-fragmentet, koordinater 25,9 - 26,5, isolert og klonet inn i pUCHS ved det unike SalI-setet for å danne pUCHSX. Dette plasmidet rekonstruerer de adenovirale sekvensene fra stilling 17,1 i den første sene

leder-mellomliggende sekvens til XhoI-setet ved stilling 26,5 innen den tredje sene leder-ekson.

Den sene hoved-adenoviruspromoteren ble klonet ved utskjæring av HindIII C, D og E fragmentene (som komigrerer) fra akrylamidgelen, de ble klonet inn i pUC13 og HindIII-setet, og det ble foretatt undersøkelse med henblikk på rekombinanter inneholdende HindIII C fragmentet ved restriksjonsanalyse. Denne subklon ble nedbrutt med SacI som spaltet ved stilling 15,4, 5' i den sene hovedpromotoren (49j) samt i polylinkeren til pUC13. DNA-materialet ble resirkulert for dannelsen av pMLP2, inneholdende SacI til HindIII fragmentet (stillinger 15,4 17,1) klonet i SacI og HindIII-setene i pUC13.

E. Konstruksjon av neomycin-resistensvektor

Neomycin-resistensmarkøren som befinner seg i E. coli transposon 5 ble isolert fra et Tn5-holdig plasmid (49l). Sekvensen i neomycin-resistensgenet har tidligere blitt publisert (49m). Neofragmentet ble nedbrutt med BglII, som spalter ved et punkt 36 bp 5' fra det translasjonale initieringskodonet i neomycin-fosfotransferasegenet, og behandlet med eksonuklease Bal31. Fosfotransferasegenet ble utskåret med BamHI, som spalter DNA 342 bp etter det translasjonale termineringskodonet, og innført i pBR322 mellom et ifyllt HindIII-sete og BamHI-setet. En klon (pNeoBal6, hadde det translasjonale initieringskodonet plassert 3 bp 3' fra det ifylte HindIII-setet (TCATCGATAAGCTCGCATG...). Dette plasmid ble nedbrutt med ClaI og BamHI hvorved 1145 bp-fragmentet som spente over fosfotransferasegenet ble isolert og innført i pattedyr-ekspresjonsvektoren pCVSVEHBS (se infra.). Det resulterende plasmid, pSVENeoBal6, har neomycin-fosfotransferasegenet beliggende 3' fra SV40-tidligpromoteren og 5' fra polyadenyleringssetet i HBV-overflateantigen-genet (49n). Når

Når det er innført i pattedyrvev-kulturceller, kan dette plasmid uttrykke fosfotransferasegenet og gi resistens til aminoglukosidet G418 (49o).

5

F. Transfeksjon av vevskulturceller

10

BHK-21 celler (ATCC) er hvirveldyrceller dyrket i vevskultur. Disse cellene kan som kjent innen teknikken holdes som permanente cellelinjer fremstilt ved suksessive serieoverføringer fra isolerte normale celler. Disse cellelinjene holdes enten på en fast bærer i flytende medium, eller ved vekst i suspensjoner inneholdende bærer-næringsmidler.

15

Cellene transformeres med 5 µg av ønsket vektor (4 µg pAML3P.8cl og 1 µg pSVEneoBal6) under anvendelse av metoden ifølge (49p).

20

Metoden sikrer reaksjonen av en korreksjon av plasmider med en spesiell vertcelle og øker derved sannsynligheten for at dersom et plasmid absorberes av en celle, så vil ytterligere plasmider også bli absorbert (49q). Følgelig er det praktisk å innføre både de primære og sekundære kodesekvensene under anvendelse av separate vektorer for hver samt ved å benytte en enkelt vektor inneholdende begge sekvenser.

25

30

G. Vekst av transformerte celler og ekspresjon av peptider

35

BHK-cellene som ble underkastet transfeksjon ble først dyrket i to dager i ikke-selektivt medium, deretter ble cellene overført i medium inneholdende G418 (400 µg/ml), hvorved det således ble valgt celler som kunne uttrykke fosfotransferase. Etter 7-10 dager i nærvær av G418 ble kolonier synlige

for det blotte øye. Trypsinering av flere hundre kolonier og nyutplating ga hurtig vekst av en sammenløpende 10 cm skål av G418 resistente celler.

5 Denne cellepopulasjonen består av celler som representerer en rekke forskjellige initial-integranter. For å oppnå celler som hadde det største antall kopier av FVIII-ekspressjonsplasmidet, ble cellene deretter inkubert med en inhibitor for DHFR-proteinet.

10

H. Behandling med metotreksat

De G418-resistente cellene inhiberes med metotreksat (MTX), en spesifikk inhibitor for DHFR ved konsentrasjoner på over 50 nM. I overensstemmelse med tidligere studier på effektene av MTX på vevskulturceller, blir celler som er resistente overfor MTX i kraft av ekspresjon av de multiple kopier av DHFR-genet som inneholdes i FVIII-ekspressjonsvektoren utvalgt, og en samtidig økning i ekspresjon av de FVIII-kodende sekvensene kan observeres. Ved trinnvis økning av mengden av MTX påvirkes amplifikasjon av plasmidet pAML3P.8cl hvilket således øker kopiantallet. Den øvre grense for amplifikasjonen er avhengig av mange faktorer, men celler som er resistente overfor millimolare konsentrasjoner av MTX som har flere hundre eller tusen kopier av DHFR-ekspressjons (og således FVIII ekspressjons)-plasmidet kan selekteres på denne måten.

30

For faktor VIII ekspresjon ble G418-resistente BHK-celler som ble oppnådd etter transfeksjon med pAML3P.8cl og pSVNeoBal6, inkubert med media inneholdende 100 nM og 250 nM MTX som beskrevet (49r). Etter 7-10 dager ble celler som var resistente overfor 250 nM MTX analysert med henblikk på faktor VIII-ekspressjon ved aktivitets-,
35

radioimmunoanalyse- og mRNA Northern-analyse.

I. Faktor VIII antistoffer

5

En rekke forskjellige polyklonale og monoklonale antistoffer til faktor VIII ble benyttet gjennom dette arbeidet.

CC er et polyklonalt antistoff avledet fra plasmaet fra hardt angrepne hemofilipasienter (49s). C8 er et nøy-

10

traliserende monoklonalt antistoff som binder til 210 kD-delen i faktor VIII (49t). C10 er et monoklonalt antistoff med egenskaper lik dem til C8 og ble isolert vesentlig som beskrevet i (49t). Et kommersielt nøytraliserende

15

monoklonalt antistoff som binder 80 kD-delen i faktor VIII ble oppnådd fra Synbiotic Corp., San Diego, CA., Product No. 10004. C7F7 er et nøytraliserende monoklonalt antistoff som binder til 80 kD-delen i faktor VIII. C7F7 ble indusert og renset som følger: Seks uker gamle BALB/c

20

hunnmus ble multippel-inokulert med omkring 10⁶ ug renset faktor VIII og splenocytter sammensmeltet myd X63-Ag.8.653 muse-myelomaceller (49u) tre dager etter den sluttlige inokuleringen. Hybridiseringsmetoden og isoleringen av hybridceller ved kloningsmetoder fulgte tidligere beskrevne protokoller (49r). Spesifikke antistoff-produserende kloner

25

ble detektert ved fast fase RIA-metoder (49w). Positive kloner ble deretter analysert for koagulasjon-forlengelses-kapasitet ved APTT-analyse som beskrevet ovenfor. Monoklonalt C7F7 ble ekspandert ved vekst i syngenetiske dyr; antistoff ble renset fra ascites-væsker ved protein A-sefarose CL-4B-kromatografi. (49x).

30

J. Radioimmunanalyse for faktor VIII

35

To radioimmunanalyser (RIA) ble utviklet for å analysere faktor VIII fremstilt fra BHK og andre cellelinjer. Begge

er tottrinnsanalyser hvori CC antistoffet bundet til en fast bærer anvendes for å binde faktor VIII (49t). Dette immunkompleks detekteres deretter med I^{125} -merket C10-antistoff (210 kD spesifikt) eller I^{125} -merket C7F7-antistoff (80 kD spesifikt).

I korthet foretas de tottrinns RIA-metodene som følger:

De 96 brønnene i en mikrotiter skål belegges natten over med 100 μ l 50 mM NaHCO_3 -buffer, pH 9,6 inneholdende 2,5 mg/l CC-antistoff som har blitt rensset ved protein A-sefarose-kromatografi (49x). Brønnene vaskes tre ganger med 200 μ l PBS inneholdende 0,05% "Tween 20" og blokkeres med 200 μ l PBS inneholdende 0,1% gelatin og 0,01% mertiolat i 1-2 timer. Brønnene vaskes som før og 100 μ l prøve tilsettes og inkuberes natten over. Brønnene vaskes, og 100 μ l av I^{125} -merket (82) C10- eller C7F7-antistoff (1000 cpm/ μ l) tilsettes og inkuberes i 6-8 timer. Brønnene vaskes igjen og telles. Standardkurven oppnås fra prøver av normalplasma fortynnet 1:10 til 1:320.

K. Faktor VIII monoklonalantistoff-kolonne

En human faktor VIII monoklonalantistoff-kolonne ble fremstilt ved inkubering av 1,0 mg C8-antistoff (i 0,1M NaHCO_3 , pH 8,5) med 1,0 ml "Affi-Gel 10" (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) i 4 timer ved 4°C. Mer enn 95% av antistoffet ble koblet til gelen, som bestemt ved Bio-Rad proteinanalysen (Bio-Rad Laboratories). Gelen ble vasket med 50 volumdeler vann og 10 volumdeler 0,05M imidazol, pH 6,9, inneholdende 0,15 M NaCl.

L. Kromatografi av media på monoklonalkolonne

Media ble påført på monoklonalantistoff-kolonnen (1 ml harpiks) og vasket med 0,05 imidazolbuffer, pH 6,4, inneholdende 0,15 M NaCl inntil materialet som absorberte ved

280 nm var vasket bort. Kolonnen ble eluert med 0,05 M imidazol, pH 6,4, inneholdende 1,0 M KI og 20% etylen-glykol. Prøver ble fortynnet for analyse og dialysert for etterfølgende analyse.

5
M. Fremstilling av faktor VIII fusjonsproteiner og
fusjonsprotein-antisera

10 E. coli inneholdende plasmidene konstruert for fusjons-protein-ekspresjon ble dyrket i M-9 media ved 37°C. Fusjons-protein-ekspresjon ble indusert ved tilsetning av indol akryleddiksyre ved en sluttlig konsentrasjon på 50 µg/ml i tidsperioder på 2,5-4 timer. Cellene ble høstet ved sentrifugering og frosset inntil bruk.

15 Cellepelletene for fusjon 3 ble suspendert i 20 ml 20 mM natriumfosfat, pH 7,2, inneholdende 10 µg/ml lysozym og 1 µg/ml hver av RNase og DNase. Suspensjonen ble omrørt i 30 min. ved romtemperatur for grundig å dispergere celle-
20 pelleten. Suspensjonen ble deretter sonikert i 4 min. (pulset ved 60% effekt). Oppløsningen ble sentrifugert ved 8000 omdr./min. i en Sorvall RC-2B-sentrifuge i en GSA-rotor. Pelleten ble resuspendert i 10 mL 0,02M natriumfosfat, pH 7,2. Suspensjonen ble fordelt som et lag over 300 ml
25 60% glycerol. Prøven ble sentrifugert ved 4000 omdr./min. i 20 min. i en RC-3B-sentrifuge. To lag resulterte i glycerolen. Både pellet- og bunnglycerollaget viste et enkelt proteinbånd for den forventede molekylvekt på 25.000 dalton ved analyse på SDS-polyakrylamidgeler.
30 Pelleten ble oppløst i 0,02 M natriumfosfatbuffer inneholdende 0,1% SDS. Den resuspenderte pelleten og det nedre glycerollaget ble dialysert mot 0,02 M ammonium-bikarbonat, pH 8,0, for å fjerne glycerol. Oppløsningen ble lyofilisert og gjenoppløst i 0,01 M natriumfosfat-
35 buffer inneholdende 0,1% SDS, og frosset inntil bruk.

Cellepelletene for fusjonsproteiner 1 og 4 ble suspendert.

i 0,05 M Tris, pH 7,2, inneholdende 0,3M natriumklorid og 5 mM EDTA. Lysozym ble tilsatt til en konsentrasjon på 10 µg/ml. Prøver ble inkubert i 5 min. ved romtemperatur. NP-40 ble tilsatt til 0,2%, og suspensjonen inkubert i is i 30 min. Natriumklorid ble tilsatt for oppnåelse av en sluttkonsentrasjon på 3M og DNase tilsatt (1 µg/ml). Suspensjonen ble inkubert i 5 min. ved romtemperatur. Prøven ble sentrifugert og supernatanten kassert. Pelleten ble resuspendert i et volum vann og sentrifugert. Cellepelletene ble oppløst i oppløsninger inneholdende 0,1-1% SDS og rensset ved enten preparativ SDS-polyakrylamid-gelelektroforese fulgt av elektroeluering av fusjonsproteinbåndet, eller ved HPLC på en TSK 3000-kolonne ekvilibrert med 0,1M natriumfosfat inneholdende 0,1% SDS.

Kanin-antisera ble produsert ved injisering av hvite kaniner fra New Zealand med en prøve av fusjonsprotein suspendert i Freund's komplette hjelpemiddel (første injeksjon) fulgt av stigende mengder ved to ukers intervaller under anvendelse av prøven suspendert i Freund's ukomplette hjelpemiddel. Etter 6 uker ble det oppnådd sera, og disse ble analysert ved Western-flekkanalyse med henblikk på reaktivitet med humanplasma-avledede faktor VIII-proteiner.

N. Analyse for detektering av ekspresjon av faktor VIII-aktivitetskorreksjon i hemofili A plasma. Teori -

Faktor VIII aktivitet er definert som den aktivitet som vil korrigere koagulasjonsdefekten til faktor VIII-mangelfullt plasma. En enhet av faktor VIII-aktivitet har blitt definert som den aktivitet som er til stede i 1 ml normalt humanplasma. Analysen er basert på observasjon av den tid som skal til for dannelsen av en synlig fibrinklump i plasma avledet fra en pasient som ved diagnose er funnet å ha hemofili A (klassisk hemofili). I denne analysen: jo kortere tid som er nødvendig for klumpdannelse, jo større er faktor VIII-aktiviteten i prøven som testes.

Denne analysetype refereres til som aktivert partiell tromboplastintid (APTT). Kommersielle reagenser er tilgjengelige for slike bestemmelser (f.eks. General Diagnostics Platelin Plus Activator; produkt nr. 35503).

5

10

Metode - Alle koagulasjonsanalyser ble utført i 10 x 75 mm reagensrør av borsilikatglass. Silikonisering ble foretatt under anvendelse av "SurfaSil" (produkt fra Pierce Chemical Company, Rockford, IL) som hadde blitt fortynnet 1 til 10 med petroleumenheter. Reagensrørene ble fylt med denne oppløsningen, inkubert i 15 sek., og oppløsningen ble fjernet. Alle rørene ble vasket tre ganger med ledningsvann og tre ganger med destillert vann.

15

20

25

30

35

"Platelin Plus"-aktivator (General Diagnostics, Morris Plains, NJ) ble oppløst i 2,5 ml destillert vann ifølge retningslinjene på pakningen. For å fremstille prøven for koaguleringsanalyser, ble "Platelin Plus"-aktivator-oppløsningen inkubert ved 37°C i 10 min. og lagret på is inntil bruk. Til et zirkonisert reagensrør ble det tilsatt 50 mikroliter "Platelin Plus"-aktivator og 50 mikroliter faktor VIII-mangelfullt plasma (George King Biomedical Inc., Overland Park, KA). Denne oppløsningen ble inkubert med 37°C i totalt 9 min. Like før slutten på ni minutter-inkuberingen av den ovenfor angitte oppløsning, ble prøven som skulle testes, fortynnet i 0,05 M Tris-HCl, pH 7,3, inneholdende 0,02% storfeserumalbumin. Til plasma/-aktivator-suspensjonen ble det tilsatt 50 µl av den fortynnete prøven, og nøyaktig ni minutter inn i inkubasjonen av suspensjonen ble koagulasjonskaskaden initiert ved tilsetning av 50 mikroliter kalsiumklorid (0,033 M). Reaksjonsblandingen ble hurtig blandet og under forsiktig agitasjon av reagensrøret, ble den tid som skulle til for dannelsen av en synlig fibrinklump, overvåket. En standard kurve for faktor VIII-aktivitet kan oppnås ved fortynning av normalplasma (George King Biomedical, Inc., Overland Park, KA) 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, og 1:200. Størkningstiden plottes mot plasmafortynning på

semilog-grafisk papir. Denne kan deretter anvendes for å omdanne en størkningstid til enheter for faktor VIII-aktivitet.

5

O. Kromogen Peptidbestemmelse

10

15

20

25

30

Teori - Faktor VIII-funksjoner i aktiveringen av faktor X til faktor Xa i nærvær av faktor IXa, fosfolipid, og kalsiumioner. En høyspesifikk analyse har blitt satt opp, hvori faktor IXa, faktor X, fosfolipid og kalsiumioner tilføres. Utviklingen av faktor Xa i denne analysen er derfor avhengig av tilsetningen av en kilde for faktor VIII-aktivitet. Jo mer faktor VIII som tilsettes til analysen, jo mer faktor Xa utvikles. Etter man har latt faktor Xa utvikle seg, tilsettes et kromogent peptidsubstrat til reaksjonsblandingen. Dette peptidet spaltes spesifikt av faktor Xa, mens dette ikke bevirkes av faktor X, og bare langsom spalting forårsakes av andre proteaser. Spalting av peptidsubstratet frigjør en para-nitroanilid-gruppe som har absorbans ved 405 nm, mens det uspalte peptidsubstratet har liten eller ingen absorbans ved denne bølgelengden. Utvikling av absorbans p.g.a. spalting av det kromogene substratet er avhengig av mengden av faktor Xa i testblandingen etter inkuberingsperioden, mengden av hvilket igjen er avhengig av mengden av funksjonell faktor VIII i testprøven tilsatt til reaksjonsblandingen. Denne analysen er meget spesifikk for faktor VIII-aktivitet, og bør være mindre utsatt for potensielle falske positive sammenlignet med faktor VIII-mangelfullt plasma-analyse.

35

Metode - Coatest faktor VIII ble innkjøpt fra Helena Laboratories, Beaumont, TX (Cat. No. 5293). Den grunnleggende metode som ble benyttet, var vesentlig den som ble gitt av produsenten av "endepunktmetoden" for prøver.

inneholdende mindre enn 5% faktor VIII. Der det er indikert, ble inkubasjonstidene forlenget for å gjøre analysen mer sensitiv. For visse analyser ble de reagensvolumer som er anbefalt av produsenten, endret. Denne endring i protokollen forstyrrer ikke analysens totale resultater.

Det kromogene substratet (S-2222 + I-2581) for faktor Xa ble oppløst i 10 ml vann hvilket resulterte i en substratkonsentrasjon på 2,7 millimol pr. l. Denne substratoppløsningen ble aliquotert, og lagret i frossen tilstand ved -20°C . FIXa + FX-reagensen inneholdt faktor IXa og faktor X, og ble oppløst i 10 ml vann. Oppløsningen ble aliquotert og lagret i frossen tilstand ved -70°C inntil bruk. Også levert med utstyret var følgende oppløsninger: 0,025 molar kalsiumklorid; fosfolipid (svinehjerne); og buffer-lageroppløsning (fortynnet en del lageroppløsning til 9 deler vann for analysen, hvilket resulterte i en sluttkonsentrasjon på 0,05 M Tris-HCl, pH 7,3, inneholdende 0,02% storfealbumin). Disse oppløsningene ble lagret ved 4°C inntil bruk.

Fosfolipid + FIXa + FX-reagensen fremstilles ved blanding av en volumdel fosfolipid med fem volumdeler FIXa +FX-reagens.

Følgende metode ble benyttet:

	Reagens	Prøve- reagensrør	Reagens- blindprøve
5			
	Fosfolipid + FIXa + FX	200 μ l	200 μ l
	Testprøve	100	--
	Buffer-arbeidsoppløsning	--	100
10	Bland godt og inkuber ved 37°C i 4 min.		
	Kalsiumklorid	100	100
15	Bland godt og inkuber ved 37°C i nøyaktig 10 min.		
	S-2222 + I-2581	200	200
20	Bland godt og inkuber ved 37°C i nøyaktig 10 min.		
	Eddiksyre (50%)	100	100
25	Bland godt.		
30	Absorbansen til prøven ved 405 nm ble bestemt mot reagens- blindprøven i et spektrofotometer i løpet av 30 min.		
35	Absorbansen ved 405 ble relatert til faktor VIII-enheter ved kalibrering av analysen ved anvendelse av standard normal humanplasma (George King Biomedical, Overland Park, KS).		

Eksempel på foretrukken utførelse1. Generell strategi for oppnåelse av faktor VIII-genet

5 Den vanligste prosess for oppnåelse av et rekombinant DNA-genprodukt er å undersøke bibliotek eller utvalg av cDNA-kloner oppnådd fra mRNA i det hensiktsmessige vev eller celletype. Flere faktorer bidro til også å benytte en alternativ metode for sortering av genomisk DNA for faktor VIII-

10 genet. For det første var setet for syntese av faktor VIII ukjent. Selv om leveren ofte anses som den mest sannsynlige kilde for syntese, er beviset tvetydig. Syntese i lever og eventuelt milt har blitt foreslått ved organperfusjon og transplantasjonsstudier (56). Faktor VIII-aktivitet blir

15 imidlertid ofte forøket hos pasienter med alvorlig lever-svikt (56a). Nylige motstridende studier hvor det er benyttet monoklonal antistoff-binding til celler detekterer høyeste nivåer av proteinet i enten leversinusoid-

20 endotelceller (51), hepatocytter (52) eller lymfeknuteceller (fulgt i mengde av lunge, lever og milt; (53)). I motsetning til dette blir faktor VIII-relatert antigen (von Willebrand-faktor) omtrent helt sikkert syntetisert av endotelceller (54). Ikke bare er vevskilden usikker, mengden av faktor VIII i plasma er meget lav. Den sirkulerende

25 konsentrasjon på ca. 100-200 ng/ml (55) er ca. 1/2.000.000 molarkonsentrasjonen av serumalbumin, f.eks. Det var således ikke klart av cDNA-bibliotek fremstilt fra RNA i et gitt vev ville gi faktor VIII-kloner.

30 Basert på disse betraktninger ble det avgjort først å undersøke rekombinante bibliotek av det humane genom i bakteriofag lambda (i det følgende referert til som genomiske forråd). Selv om genomiske bibliotek skulle inneholde faktor VIII-genet, kan den sannsynlige tilstedeværelsen av introner

35 representere hindringer for den endelige ekspresjon av det rekombinante protein.

Den generelle strategi var å:

1. Identifisere en genomisk klon tilsvarende en sekvensert del av human faktor VIII-proteinet.

2. Utføre en "genomisk spasertur" for oppnåelse av overlappende genomiske kloner som ville innbefatte hele det mRNA-kodende området.

3. Anvende fragmenter av de genomiske klonene for å indentifisere ved hybridisering til RNA-flekke, vev- eller cellekilder for faktor VIII mRNA og deretter gå videre og oppnå cDNA-kloner fra slike celler.

4. I parallell med nr. 3, uttrykke deler av genomiske kloner i SV40-rekombinante "eksonekspresjons" - plasmider. RNA transkribert fra disse plasmidene etter transfeksjon av vevskultur (cos) celler bør spleises in vivo og ville være en alternativ kilde for cDNA-kloner egnet for ekspresjon av rekombinant faktor VIII-protein.

Det aktuelle forløp for denne bestrebelse involverte samtidig mellomspill av informasjon avledet fra cDNA-kloner, genomiske kloner av flere typer, og SV40-rekombinante "eksonekspresjons"-kloner, som, av nødvendighet er beskrevet separat nedenfor.

2. Undersøkelsesmetoder for genomisk bibliotek

Faktor VII-genet er kjent for å befinne seg på det humane X-kromosomet (56). For å øke andelen av positive kloner, ble det konstruert genomiske bibliotek fra DNA opnådd fra et individ inneholdende 4X kromosomer. (Lymfoblastcellelinjen er kariotypet 49,XXXXY: bibliotek konstruert fra denne DNA er referert til heri som "4X bibliotek"). 49,XXXXY DNA ble partielt nedbrutt med Sau3AI og hensiktsmessige størrelsesfraksjoner ble ligert til λ fag- eller kosmidvektorer. Detaljer ved konstruksjonen av disse $\lambda/4X$ - og

kosmid/4X- bibliotekene er gitt nedenfor. Den forventede frekvens for faktor VIII-genet i λ /4X-forrådet er omkring en i 110.000 kloner og i kosmid-biblioteket ca. en i 40.000.

5 Disse bibliotekene ble undersøkt med henblikk på faktor VIII-genet med syntetiske oligonukleotid-prober basert på deler av faktor VIII-proteinsekvensen. Disse oligonukleotid-probene faller i to typer, en enkel sekvens på 30-100 nukleotider basert på kodonvalg-anvendelsesanalyse (lange
10 prober) og en ansamling av prober med en lengde på 14-20 nukleotider som spesifiserer alle mulige degenerasjons-kombinasjoner for hvert kodonvalg (korte prober).

Hovedfordelen med lange prober er at de kan syntetiseres basert på enhver 10-30 aminosyresekvens i proteinet. Ingen
15 spesielle områder med lav kodon-dominans behøver å bli funnet. En annen fordel er at siden en nøyaktig tilpasning med genesekvensen ikke er nødvendig (bare strekninger av komplementaritet på 10-14 nukleotider er nødvendig), avbrudd av komplementariteten p.g.a. tilstedeværelsen av et
20 intron, eller forårsaket av gen-polymorfisme eller protein-sekvensfeil ville nødvendigvis ikke hindre brukbar hybridisering. Ulempen med lange prober er at bare et kodon velges for hver aminosyre. Man har basert sitt valg av
25 kodoner på en tabell over kodonfrekvens hos pattedyr (57), og når dette ikke ga noen klar preferanse, på kodon-behandlingen av faktor IX-genet (58). Siden den forventede sekvens-avstemning for de lange probene er ukjent, må hybridiseringsstringensen bestemmes empirisk for hver
30 probe. Dette ble foretatt ved hybridisering til genomiske DNA-flekker ("blot") og vaskinger ved forskjellige stringenser.

Fordelen med korte prober er at hvert mulig kodon syntetiseres som en en ansamling av oligonukleotider. Således,
35 dersom aminosyresekvensen er korrekt, skulle en kort probe alltid hybridisere til det gen som er av interesse.

Hovedbegrensningen er kompleksiteten til ansamlingen av sekvenser som kan syntetiseres. Operasjonelt kan en ansamling av 32 forskjellige sekvenser anses som en maksimum ansamlingsstørrelse gitt signalet til "noise"-begrensninger for hybridisering til genomiske bibliotek. Dette betyr at bare proteinsekvenser i områder med lav kodon-overflødigheit kan benyttes. En typisk probe ville være en ansamling av 16 17-merer som spesifiserer alle mulige sekvenser over et 6-aminosyre-fragment i protein-sekvens.

Som med lange prober har hybridiseringsstringensen benyttet for korte prober blitt bestemt empirisk. Dette er fordi under vanlig benyttede hybridiseringsbetingelser (6xSSC), avhenger stabiliteten til hybridene av de to faktorene--lengden og G-C-innholdet; stringente betingelser for probene med det lave G-C-innholdet er i det hele tatt ikke stringent for de som har høyt G-C-innhold. En typisk ansamling av 16 17-merer kan ha et område av 41-65% G-C, og disse prober vil smelte i 6xSSC over et 10°C temperaturområde (fra 48 til 58°C). Siden den korrekte sekvensen i ansamlingen av 16 ikke er kjent på forhånd, anvendes en hybridiseringsstringens like under 48°C for å tillate hybridisering av sekvensen med det laveste G-C-innhold. Ved undersøkelse av et stort antall kloner vil dette imidlertid gi mange falske positive av kortere lengde og høyere G-C-innhold. Siden endringen i smeltetemperatur er 1-2°C pr. basepar-tilsvarlighet, vil probesekvenser så korte som 12 eller 13 av de 17 også bindes dersom de har et høyt G-C-innhold. Vilkårleg i det humane genom vil en ansamlet probe av 16 17-merer hybridisere med 1200 ganger så mange 13-basesekvenser som 17-basesekvenser.

En hybridiseringsteknikk ble utviklet for korte prober som ekvaliserer stabiliteten til G-C- og A-T-basepar og sterkt fremmer nyttevirkningen for bruk av korte prober

for å undersøke forråd av høy DNA-sekvenskompleksitet.

På fig. 2A har man plottet smeltetemperaturen for 4 korte prober under ordinære (6xSSC) og 3,0 M TMACl-vaskebetingelser.

5 I 3,0 M TMACl smelter probene som en nærmest lineær funksjon av lengde, mens i 6xSSC påvirkes smeltingen sterkt av G-C-innholdet. Den høye smeltetemperaturen i 6xSSC til 13-meren som er 65% G-C, demonstrerer klart denne konklusjon. Fig. 2B viser smeltetemperaturen i 3,0 M TMACl som
10 en funksjon av lengde for 11 til flere tusen baser. Denne figur gir anledning for hurtig valg av hybridiseringsbetingelser for en probe med en eksakt tilpasning ("match") av enhver ønsket lengde.

15 TMACl-hybridiseringsmetoden har stor nyttevirkning når en eksakt sekvensavpasning av en viss kjent lengde er ønsket. Eksempler på denne teknikk innbefatter: 1. Undersøkelse av et humant genomisk forråd med en ansamling av 16 17-merer. Man har benyttet en 3,0 M TMACl-vask ved 50°C, hvilket
20 gir hybridisering av bare 17, 16, og noen 15 basesekvenser. Det store antall av prober med høyt G-C-innhold av lavere homologi blir dermed ekskludert. 2. Dersom en kortprobeundersøkelse gir for mange positive for lett sekvensering, kan de mest sannsynlige kandidatene finnes ved en TMACl-smeltemetode. Replikaer av positive hybridiseres og
25 vaskes ved 2°C-intervaller (for 17-merer, (som smelter ved 45°C) ville 46, 48, 50, 52, 54, og 56°C bli benyttet). De positive som smelter ved den høyeste temperaturen, vil passe best til proben. Med en standard av kjent sekvens kan homologien forutsis ± 1 base eller bedre for en 17-mer.
30 3. Likeledes, dersom en langprobe-undersøkelse gir for mange positive, kan ansamlede korte prober basert på den samme proteinsekvensen syntetiseres. Siden et medlem av denne ansamling ville inneholde en perfekt tilpasning, kunne TMACl-smelteforsøk raffinere valget av
35 de beste kandidatpositive. 4. I sete-rettet mutagenese blir et oligonukleotid som typisk er 20 langt med en eller flere endringer i sentrum, syntetisert. TMACl-

vaskemetoden kan lett skjelne de parenterale og mutante derivatene selv for en base-mistilpasning i midten av en 20-mer. Dette er fordi den ønskede mutasjon passer eksakt til proben. Vaskebetingelsene kan ganske enkelt bestemmes ut fra fig. 2B. 5. Valg av et spesielt gen fra en familie av nær beslektede gener. Et smelteforsøk lik det som beskrevet ovenfor har blitt benyttet for å velge et spesielt gen ut fra en samling av 100 meget like sekvenser.

3. Første isolasjon av faktor VIII genomisk klon

Faktor VIII-anrikede preparater ble fremstilt fra humant kryobunnfall ved polyelektrolytt-kromatografi og immuno-adsorpsjon som beskrevet tidligere (79). Dette materiale ble dialysert i 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS) og 1% ammoniumbikarbonat, lyofilisert og lagret ved -20°C inntil bruk.

P.g.a. kontaminering av faktor VIII-preparatene med andre plasmaproteiner, var ytterligere fraksjonering nødvendig for å rense faktor VIII samt separere de forskjellige polypeptidkjedene som antas å skrive seg fra faktor VIII. Dette ble oppnådd ved kromatografi av proteinet på Toya Soda TSK 4000 SM-kolonner under anvendelse av høytrykk-væskerkromatografi i nærvær av SDS. Slik kromatografi separerer proteinene etter molekylstørrelse.

Det lyofiliserte proteinet ble rekonstituert i destillert vann og tilsatt 1% SDS og 0,1 M natriumfosfat, pH 7,5. TSK-kolonnen (0,75 x 50 cm; Alltech, Deerfield, IL) ble ekvilibrert ved romtemperatur med 0,1% SDS i 0,1 M natriumfosfat, pH 7,0. Prøver av omkring 0,15-0,25 ml ble injisert og kolonnen utviklet isokratisk ved en strømningshastighet på 0,5 ml pr. min. Absorbansen ble overvåket ved 280 nm og fraksjoner på 0,2 ml ble oppsamlet. En

representativ elueringsprofil er vist på fig. 15. Ali-
quoter ble analysert ved hjelp av natriumdodecylsulfat-
gelelektroforese på gradientgeler av 5-10% polyakryl-
amid og analysert ved sølvflekking (80). Materialet som
5 eluerte etter 25 min. tilsvarte en dublett av proteiner
ved 80.000 og 78.000 D. Fraksjonene inneholdende disse
proteiner ble oppsamlet som angitt ved den avkortede
streken på fig. 15, fra tre separate preparative TSK-
forsøk, og lagret ved -20°C inntil bruk.

10 Det rensede 80.000 dalton proteinet fra TSK-fraksjoneringen
(0,8 nmoles) ble dialysert natten over mot 8 M urea, 0,36 M
Tris-HCl, pH 8,6, og 3,3 mM etylendiamintetraeddiksyre under
en nitrogenatmosfære. Disulfidbindinger ble redusert
15 ved tilførsel av 10 mM ditiotreitol i den ovenfor angitte
dialysebuffer. Sluttvolumet var 1,5 ml. Cysteinene ble
alkylert med 15 mikroliter 5 M iodeddiksyre (oppløst i
1M NaOH). Reaksjonen fikk forløpe ved 35 min. ved romtempera-
tur i mørket, og alkyleringsreaksjonen ble stoppet ved
20 tilsetning av ditiotreitol til en sluttkonsentrasjon på
100 mM. Proteinoppløsningen ble dialysert mot 8 M urea
i 0,1 M ammoniumbikarbonat i fire timer. Dialyseoppløsningen
ble endret for gradvis å fortynne ureakonsentrasjonen (8 M,
4 M, 2 M, 1 M, og til slutt 0,5 M urea) i løpet av en
25 periode på 24 timer. Tryptisk nedbrytning ble foretatt på
det reduserte, alkylerte 80.000 dalton proteinet ved til-
setning av TPCK-behandlet trypsin (Sigma Chem. Co.) ved
et vektforhold av 1 del trypsin til 30 deler faktor VIII
protein. Nedbrytningen fikk fortsette i 12 timer ved 37°C .
30 Reaksjonsblandingen ble frosset inntil bruk. HPLC-separering
av de tryptiske peptidene ble foretatt på en Synchropak
RP-P C-18 kolonne (0,46 x 25 cm, $10\text{ }\mu\text{m}$) med høy opp-
løsning ved romtemperatur med en Spektra-Physics 8000
kromatograf. Prøver på omtrent 0,8 ml ble injisert og
35 kolonnen utviklet med en gradient av acetonitril (1% til
70% i 200 min.) i 0,1% trifluoreddiksyre. Absorbansen
ble overvåket ved 210 nm og 280 nm (fig. 16). Hver topp

ble oppsamlet og lagret ved 4°C inntil den ble underkastet sekvensanalyse i en Beckman-spin cup-sekvenser med samtidig PTH-aminosyreidentifikasjon. Pilen på fig. 16, eluering ved omtrent 23% acetonitril, indikerer toppen som inneholder peptidet med sekvensen AWAYFSDVDLEK. Denne sekvensen ble benyttet for å utvikle oligonukleotidproben 8,3 for human genomisk forrådsundersøkelse.

Lange og korte prober ble syntetisert basert på de nettopp omtalte betraktninger. Den andre lange proben som ble benyttet, var basert på sekvensen i et 12 aminosyrefaktor VIII-tryptisk fragment, AWAYFSDVDLEK. DNA-sekvensen som ble valgt for å syntetisere for proben, var 5'-CTTTTCCAGGTCAACGTCGGAGAAATAAGCCCAAGC. Denne proben (kalt 8,3) ble først testet i genomiske "blot"-hybridiseringer. Fig. 3A viser genomiske Southern-blot til normalt hankjønn (1X) og 49,XXXXY (4X) DNA hybridisert med merket 8,3-probe og vasket ved forskjellige stringenser. Selv ved den høyeste stringens (1xSSC, 46°C) ble et enkelt bånd på 3,8 kb (EcoRI) og 9,4 kb (BamHI) observert. Intensiteten til dette bånd hadde et forhold på ca. 1:4 i en X- og 4X-sporene slik det ville forventes for det X-bundede faktor VIII-genet. Kontrollforsøk hadde demonstrert av en kjent X-bundet genprobe (faktor IX) ga det forventede 1:4-hybridiseringsforhold, mens et autosomalt gen (albumin) ga et 1:1-forhold.

Basert på disse genomiske blot-resultater, ble 8,3-proben benyttet for å undersøke λ /4X- biblioteket. 500.000 fag ble dyrket på femti 150 mm plater og duplikat-nitrocellulose-filtre ble hybridisert med ³²P-merket 8,3 probe ved en vaskestringens på 1xSSC, 37°C (fig. 3). Ved ny testing ble 15 sterkt hybridiserende og 15 mer svakt hybridiserende kloner oppnådd. DNA ble fremstilt fra disse isolerte plateelementer, spaltet med restriksjonsendonuklease, og blot-hybridisert med probe 8,3. Mange av de sterkt hybridiserende klonene ga et hybridiserende EcoRI-fragment på 3,8 kb, den samme størrelsen ble detektert i

den genomiske blot eller flekk. I tillegg viste alle sterkt hybridiserende kloner et identisk 262 basepar Sau3AI-fragment ved hybridisering med 8,3 proben. Sau3AI-fragmentene ble klonet inn i den enkeltkjedede fag-vektoren M13mp8 (86) undersøkt ved hybridisering, og sekvensert ved dideoxymetoden. DNA-sekvensen til 262 bp-fragmentet viste betydelig homologi med 8,3-proben. Homologien inkluderte områder av kontinuerlige tilpassetheter av 14 og 10 bp med en total homologi på 83%. De første ti restene i peptidfragmentet var i overensstemmelse med det som ble utledet fra DNA-sekvensen i rekombinant-klonene, og de ble forutgått av et lysin-kodon som forventet for produktet av en tryptisk nedbrytning. De to forutsagte rester passet ikke DNA-sekvensen. DNA-materialet ved denne stilling inneholdt en god konsensus RNA-spleisedonorsekvens (60, 61) som like etter var fulgt av stoppkodoner i alle tre mulige leserammer. Dette foreslo tilstedeværelsen av en intron som begynte ved denne stillingen. (Dette forslag ble bekreftet ved cDNA-kloner beskrevet nedenfor). En åpen leseramme utgikk nesten 400 b 5' fra homologiområdet. I dette området ble flere konsense spleise-akseptorsekvenser identifisert. Inspeksjon av den DNA-forutsagte proteinsekvens for dette området viste tilpasninger med proteinsekvens for flere ytterligere tryptiske peptidfragmenter i faktor VIII. Dette demonstrerte at et ekson for en genomisk klon for human faktor VIII var blitt oppnådd.

4. Forlengelse av genomiske kloner: λ bibliotek-genomwalking

Til å begynne med ble 8 uavhengige faktor VIII genomiske kloner oppnådd fra λ /4X biblioteket. Disse inneholdt overlappende segmenter av humangenomet som spente over ca. 28 kb. Fra den estimerte størrelsen av faktor VIII-proteinet ble det antatt at det fullstendige gen ville omfatte

100200 kb, avhengig av lengden på introner. Deretter ble kolleksjonen av overlappende kloner utvidet ved "genom-walking".

5 Det første trinnet i denne prosessen var kartlegging av restriksjonsendonuklease-spaltningsseter i de eksisterende genomiske kloner (fig. 4). DNA fra klonene ble nedbrutt med restriksjonsenzymmer alene eller i kombinasjoner, og karakterisert ved gelelektroforese (fulgt av Southern-blot hybridisering i noen tilfeller). DNA-fragmenter utviklet
10 ved EcoRI- og BamHI-nedbrytning ble subklonet inn i pUC-plasmidvektorer (59) for hensiktsmessighetens skyld. Restriksjonskartlegging, DNA-sekvensanalyse og blot-hybridiseringer med 8,3-proben bestemte genorienteringen.

15 Deretter ble enkeltkopifragmenter nær endene av 28 kb-området identifisert som "walking"-prober. Nedbrytingsprodukter av klonet DNA ble blot-hybridisert med total ³²P-merket human DNA. Med denne teknikken ville bare fragmenter inneholdende sekvenser gjentatt mer enn ca.
20 50 ganger i genomet, hybridisere (87, 88). Ikke-hybridiserende walkingprobe-kandidatfragmenter ble testet på nytt for gjentatte sekvenser ved hybridisering til 50.000 fag fra λ/4X-biblioteket.

25 I 5'-retningen ble en triplet av 1 kb probefragmenter isolert fra λ120 DNA nedbrutt med NdeI og BamHI (se fig. 4). En million λ/4X bakteriofag ble undersøkt med denne proben. En resulterende klon, λ222, ble vist å rage ca.
30 13 kb 5' fra λ120 (se fig. 4).

I 3'-retningen ble et 2,5 kb StuI/EcoRI-restriksjonsfragment av λ114 identifisert som en enkel kopi-walkingprobe. Uttømmende undersøkelse av λ/4X biblioteket og deretter
35 andre λ/humane genomiske bibliotek, ga ikke forlengede kloner. Underrepresentasjon av genomiske områder i λ-bibliotek har blitt observert før (62). Det ble bestemt spesifikt å anrike genomisk DNA for de ønskede sekvensene og fra denne

konstruere et begrenset bakteriofag-bibliotek

Southern-blot hybridisering av human genomisk DNA med 2,5 kb StuI/EcoRI-probe viste et 22 kb hybridiserende BclI-restriksjonsfragment. Restriksjonskartlegging viste at kloning og utvinning av dette fragmentet ville resultere i en stor 3'-utvidelse av genomiske kloner. Human 49,XXXXY DNA ble nedbrutt med BclI, og en størrelsesfraksjon på ca. 22 kb ble renset ved gelelektroforese. Denne DNA ble ligert inn i BamHI-setet i bakteriofagvektoren λ 1059 og et bibliotek ble fremstilt. (Den tidligere benyttede vektoren, Charon 30, kunne ikke romme et slikt stort innskudd). Seks hybridiserende kloner ble oppnådd fra 400.000 fag undersøkt fra dette anrikede bibliotek. Den ønskede klon, betegnet γ 482, raget 17 kb utover 3' enn det opprinnelige sett man hadde av overlappende genomiske kloner (fig. 4).

5. Genom-walking: Kosmidkloner

Et nytt genomisk bibliotek ble konstruert med kosmidvektorer. Kosmider (63), et plasmid og bakteriofaghybrid, kan romme omkring 45 kb innskudd, omtrent en tre gangers økning over den gjennomsnittlige innsuddsstørrelse for λ /4X DNA-forrådet. En nykonstruert kosmidvektor, pGcos4, har følgende ønskelige attributer:

1. Et derivat av tetracyklinresistensgene av pBR322 ble benyttet, og som ikke inneholdt et BamHI-sete. Dette tillot at et BamHI-sete kunne innføres et annet sted i plasmidet og bli benyttet som kloningssete. Tetracyklinresistensen er noe lettere å arbeide med enn den mer vanlig benyttede ampisillinresistens p.g.a. den større stabiliteten til legemiddelet.
2. 403 b HincII-fragmentet av λ inneholdende cos-setet ble erstattet med 641 b AvaI/PvuII-fragmentet i pBR322 slik at kopiantallet i plasmidet ville bli forøket og for å fjerne pBR322-sekvenser som forstyrrer

transformasjonen av eukaryotceller (75). 3. Et mutant dihydrofolat-reduktasegen med en SV40 replikasjons-opprinnelse og -promoter ble inkludert i pGcos4-vektoren. På denne måten kunne ethvert fragment klonet i denne vektoren deretter propageres i et bredt område av eukaryot-
5 celler. Det var forventet at dette kunne vise seg å være nyttig når man skulle uttrykke store fragmenter av genomisk DNA med deres naturlige promotorer. 4. For kloningssetet ble en syntetisk 20-mer med restriksjons-
10 setene EcoRI, PvuI, BamHI, PvuI, og EcoRI klonet inn i EcoRI-setet fra pBR322. Det unike BamHI-setet anvendes for å klonе 35-45 b Sau3AI-fragmenter i genomisk DNA. De flankerende EcoRI-setene kan benyttes for subkloning av EcoRI-fragmentene i innskuddet. PvuI-setene kan anvendes
15 for å skjære ut hele innskuddet i det fleste tilfellene. PvuI-setene er meget sjeldne i eukaryotisk DNA og er forventet bare å forekomme en gang hver 134.000 b basert på de nukleotidsekvenser i human DNA.

Fig. 5 gir skjema for konstruksjon av kosmidvektoren, pGcos4. 35-45 kb Sau3AI-fragmenter i 49,XXXXY DNA ble klonet i denne vektoren. Ca. k50.000 rekombinanter ble undersøkt i duplikat med et 5' 2,4 kb EcoRI/BamHI-fragment i λ222 og et 3' 1 kb EcoRI/BamHI-fragment i λ482 som var
20 enkle kopiprober identifisert nær endene av det eksisterende genomiske området. Fire positive kosmidkloner ble isolert og kartlagt. Fig. 4 innbefatter kosmider p541, p542 og p543. Fra denne sortering forlenget disse kosmidklonene det genomiske område for faktor VIII til et totale på 114 kbp. Etterfølgende probing med cDNA-kloner identifiserte flere
25 eksoner i det eksisterende sett av overlappende genomiske kloner, men indikerte at den genomiske skritting enda ikke var fullstendig. Ytterligere trinn ble tatt i hver retning.

35 En 3'-skrittprobe ble fremstilt fra 1,1 kb BamHI/EcoRI-fragment av p542 (fig. 4). Denne proben detekterte den overlappende kosmidklonen p613 som raget ca. 35 kb utover 3'.

Ved et senere tidspunkt ble den fulle faktor VIII-meddeler-sekvens oppnådd ved cDNA-kloning (se nedenfor). Når et 1,9 kb EcoRI cDNA-fragment inneholdende 3'-terminaldelen av cDNA-materialet ble hybridisert til Southern-blot i human genomisk og kosmidklonet DNA, identifiserte det seg som et enkelt 4,9 kb EcoRI-bånd og 5,7, 3,2 og 0,2 kb BamHI-bånd i både ikke-klonet (genomisk) og p613 DNA. Dette innebar at 3'-enden til genet nå var nådd, hvilket senere ble bekreftet ved DNA-sekvensanalyse.

En 5'-walkingprobe ble fremstilt fra et 0,9 kb EcoRI/BamHI-fragment av p543. Den detekterte en overlappende kosmidklon p612, som raget noe utover det overlappende område. Klonene nærmest 5'-ende ble til slutt oppnådd ved screening av kosmid/4X og λ /4X-forråd med cDNA-avledede prober. Som vist på fig. 4 kompletterer λ 599, λ 605 og p624 settet av rekombinante kloner som spenner over faktor VIII. (Disse klonene overlapper og inneholder alt DNA-materialet i dette området av det humane genom med unntagelse for en 8,4 kb-åpning mellom p624 og λ 599 bestående utelukkende av intron DNA.) Tilsammen spenner genet over 200 kb av human X-kromosom. Dette er langt det største gen som hittil er rapportert. Grovt regnet omfatter 95% av genet introner som må behandles på riktig måte for å fremstille templat mRNA for syntese av faktor VIII-protein.

Isoleringen av faktor VIII-genområdet i λ - og kosmid-rekombinante kloner er ikke tilstrekkelig til å gi et nyttig produkt, faktor VIII-proteinet. Flere metoder ble fulgt for å identifisere og karakterisere de proteinkodende (ekson) delene i genet for til slutt å konstruere et rekombinant ekspresjonsplasmid som kan dirigere syntesen av aktiv faktor VIII-protein i transfekterte mikroorganismer eller vevskulturceller. To strategier ville ikke gi vesentlig nyttige resultater: ytterligere screening av genomiske kloner med nye oligonukleotidprober basert på proteinsekvensering, og bruk av utvalgte fragmenter av genomiske kloner som prober til RNA-blot-hybridiseringer.

Kodingsområder for faktor VIII-proteinet ble imidlertid isolert ved bruk av SV40 "ekson-ekspresjons"-vektorer og til slutt ved cDNA-kloning.

5 6. SV40 ekson-ekspresjonsvektorer

Det er meget usannsynlig at et genomisk område på flere hundre kb ville kunne bli fullstendig karakterisert ved DNA-frekvensanalyse eller direkte benyttet for å syntetisere
10 nyttige mengder av faktor VIII-protein. Grovt regnet omfatter 95% av human faktor VIII-genet introner (mellomliggende sekvenser) som må fjernes på kunstig måte eller ved eukaryotisk RNA-spleising før proteinet kan uttrykkes.
15 Det ble skapt en metode for å fjerne introner fra ufullstendig karakteriserte restriksjonsfragmenter i genomiske kloner under anvendelse av det man kaller SV40-ekspresjonsvektorer. Den generelle konsept innebærer innføring av fragmenter av genomisk DNA inn i plasmider inneholdende
20 en SV40-promotor og produsere signifikante mengder rekombinant DNA, hvilket ville bli behandlet i transfekterte cos-celler hos ape. Den resulterende spleisete RNA kan analyseres direkte eller tilveiebringe materialer for cDNA-kloning. I det minste i teorien kunne denne teknikk
25 anvendes for å sammensette en hel spleiset versjon av faktor VIII-genet.

Ved de første ekson-ekspresjonskonstruksjoner benyttet man eksisterende SV40 cDNA vektorer som uttrykte hepatitt-overflateantigen-genet (73). De genomiske faktor VIII-fragmentene klonet inn i disse vektorene ga imidlertid
30 ingen observerbar faktor VIII RNA ved analyse med blot-hybridisering. Det ble antatt at vanskeligheten kunne være at i løpet av disse konstruksjoner så hadde eksonområdene i cDNA-vektorene blitt sammenføyet til intronområder i faktor VIII-genet. For å omgå disse vanskelighetene ble ekson-ekspresjonsvektoren pESVDA konstruert
35 som vist på fig. 6. Denne vektor inneholder SV40-tidlig-

promoteren, det større sene/første spleise-donorsete i adenovirus II, intronsekvenser hvori de genomiske faktor VIII-fragmentene kunne klones, fulgt av adenovirus II Elb-spleise-akseptorsete og hepatitt B overflateaktigen-3'-utranslaterte og polyadenyleringssekvenser (49j).

Til å begynne med ble 9,4 kb BamHI-fragmentet og 12,7 kb SstI-fragmentet i λ 114 klonet i intronområdet av pESVDA (se fig. 6). Northern-blot-analyse av RNA-materialet syntetisert ved disse to konstruksjonene etter transfeksjon av cos-celler, er vist på fig. 7. Med 9,4 kb BamHI-konstruksjonen, finnes et bånd for hybridiserende RNA på ca. 1,8 kb med prober for ekson A, og hepatitt 3'-utranslatert sekvens. For å undersøke RNA-materialet for eventuelle nye faktor VIII-eksoner, ble et 2,0 kbp StuI/BamHI-fragment av λ 114, 3' i ekson A, hybridisert i et parallelt spor. Denne proben viste også et RNA-bånd på 1,8 kb hvilket demonstrerer tilstedeværelsen av ytterligere nye faktor VIII-eksoner i dette område. Hver av disse tre probene hybridiserte også til et RNA-bånd fra en konstruksjon inneholdende det 12,7 kb SstI genomiske fragment. Dette RNA-bånd var omkring 2,1 kb. Denne observasjon foreslo at ytterligere 200-300 bp av eksonsekvenser befant seg i denne konstruksjonen 3' fra BamHI-setet som lå i grenseområdet for 9,4 kb BamHI-fragmentet.

Kontrolleksperimenter viste at dette systemet er i stand til korrekt spleising av kjente ekson-områder. Et 3,2 kb genomisk HindIII-fragment av eksoner III og IV fra mus og som spente over dhfr, ble klonet i pESVDA. Et RNA-bånd på 1 kb ble funnet med en dhfr-probe fra mus. Dette er den størrelse som forventes dersom eksonene spleises korrekt. Konstruksjoner med 9,4 kb BamHI faktor VIII eller 3,2 kb dhfr genomiske fraksjoner i den motsatte orientering, ga ingen observerbare RNA-bånd med noen av probene (fig. 7).

En cDNA-kopi av RNA-materialet fra 12,7 kb SstI-konstruk-

sjonen ble klonet i pBR322 og kontrollert. En nesten full lengde (1700 bp) cDNA-klon (S36) ble funnet. Sekvensen til 950 bp SstI-fragmentet inneholdende hele faktor VIII-innskuddet og en del av pESVDA-vektoren på hver side, er vist på fig. 8. Sekvensen begynner og slutter med adeno-virus-spleisedonor- og akseptor-sekvenser som forventet. Imellom er det 888 bp av faktor VIII-sekvens innbefattende ekson A. De 154 bp som går forut for og de 568 bp som følger ekson A, inneholder flere faktor VIII 80K tryptiske fragmenter, hvilket bekrefter at disse er nye, identifiserte eksoner.

Sekvenser av det genomiske området eller region tilsvarende disse eksoner viste at 154 bp 5' av ekson A inneholdes i en ekson, C, og at området 3' i ekson A består av 3 eksoner, D, E og I med 229, 183 og 156 bp. Hver av disse eksoner er bundet ved hjelp av en rimelig spleisedonor og akseptor-sete (60, 61).

Etterfølgende sammenligning av S36 ekson-ekspresjons-cDNA med faktor VIII-cellelinje ved DNA-klonene viste at hele den spleisede faktor VIII-sekvensen i S36 er fra faktor VIII-eksoner. Dette inkluderte som forventet eksoner C, A, D, E og I. 47 bp i ekson A manglet imidlertid ved C-, A-forbindelsen og eksoner F, G og H var fullstendig utelatt. Forflytningene i leserammen som resulterer fra slik avvikende RNA-behandling viste at den ikke kunne tilsvare nøyaktig til faktor VIII-sekvensen. Ved C, A-forbindelsen ble et godt konsens-spleisesete benyttet istedenfor det autentiske. Den forskjellige spleising av S36-klonen sammenlignet med det autentiske faktor VIII-transkriptet, kan være fordi bare en del av RNA-primærtranskriptet ble uttrykt i cos-cellekonstruksjonen. Celletype- eller artvariabilitet kan alternativt være grunnen til denne forskjell.

7. cDNA-kloning

a. Identifikasjon av en cellelinjeproduserende faktor VIII mRNA

5 For å identifisere en kilde for RNA for isolasjon av
faktor VIII cDNA-kloner, ble polyadenylert RNA isolert fra
flere humane cellelinjer og et vev og undersøkt ved Northern-
10 blot-hybridisering med 189 bp StuI-Hinc II-fragmentet fra
ekson A-området i λ 120. Poly(A)⁺ RNA fra CH-2 human T-celle-
hybridoma viste en hybridiserende RNA-type. Størrelsen av
det hybridiserende RNA ble bestemt til å være ca. 10 kb.
Dette er den mRNA-størrelse som er forventet å kode for et
protein på ca. 300 kD. Ved sammenligning med kontroll
15 DNA "dot-blot"-hybridiseringer (66), ble mengden av denne
RNA bestemt til å være 0,0001-0,001% av den totale cellu-
lære poly(A)⁺ RNA i CH-2 cellelinjen. Dette resultat tydet
på at isolering av faktor VIII cDNA-sekvenser fra denne
kilden ville kreve ytterligere anrikning av spesifikke
20 sekvenser eller ellers medføre screening av ekstremt store
antall cDNA-kloner.

b. Spesifikt primede cDNA-kloner

25 DNA-sekvensanalysen av faktor VIII genomiske kloner ga
syntesen av 16 base-syntetiske oligonukleotider anledning
til spesielt å prime første kjede-syntese av cDNA. Normalt
anvendes oligo(dT) for å prime cDNA-syntese ved poly(A)-
30 halene til mRNA. Spesifikk priming har to fordeler i for-
hold til oligo(dT). For det første tjener det til å
anrike cDNA-klonpopulasjonen for faktor VIII. For det
annet posisjonerer det cDNA-klonene i områder i genet
for hvilket man var i besittelse av hybridiseringsprober.
35 Dette er spesielt viktig ved kloning av et slikt stort
gen. Siden cDNA-kloner sjelden er lengre enn 1000-2000
basepar, ville oligo(dT) primede kloner vanligvis være

ikke-detekterbare med en probe fremstilt fra de fleste områder i faktor VIII-genet. Den benyttede strategi var å anvende DNA-fragmenter og sekvensinformasjon fra det innledende ekson A-området for å oppnå spesifikt primede cDNA-kloner. Man fortsatte ved å oppnå et sett av overlappende cDNA-kloner i 5'-retningen basert på karakteriseringen av den tidligere generasjon av cDNA-kloner. For å utlede det mer 3'-området i cDNA, benyttet man cDNA og genomiske klonfragmenter fra 3'-eksoner for å detektere oligo(dT) primet cDNA-kloner. Flere typer av cDNA-kloningsmetoder ble benyttet i denne sammenheng og vil bli beskrevet nedenfor.

Den innledende spesifikke cDNA-primer, 5'-CAGGTCAACATCAGAG ("primer 1"; se fig. 9) ble syntetisert som det reverse komplement til de 16 3'-terminalrestene i ekson A-sekvensen. cDNA med C-hale ble syntetisert fra 5 µg CH-2 celle-poly(A)⁺ RNA med primer 1, og smeltet inn i pBR322 med G-hale som beskrevet generelt i (67). Omkring 100.000 resulterende E. coli-transformanter ble utplettert på 100 150 mm skåler og kontrollert ved hybridisering (48) med 189 bp StuI/HincIII-fragmentet fra ekson A-området i den genomiske klon λ120 (fig. 4). En ekte hybridiserende klon ("pl.11" ble utvunnet (se fig. 9). DNA-sekvensanalyse av pl.11 demonstrerte identiteten med foreliggende faktor VIII genomiske kloner. 447 bp cDNA-innskuddet i pl.11 inneholdt de første 104 b i genomisk ekson A (annen trådsyntese strakk seg tydeligvis ikke tilbake til primeren) og fortsatte ytterligere inn i det som senere skulle vise seg å være eksoner B og C. 5'-divergenspunktet med ekson A-sekvens grenset til et typisk RNA-spleiseakseptorsete (61).

Selv om muligheten for oppnåelse av faktor VIII cDNA-kloner fra CH-2-cellelinje nå var demonstrert, ble ytterligere forbedringer foretatt. Forsøk av forskjellige typer ble foretatt for ytterligere å anrike CH-2 RNA for faktor VIII-

meddelelse ("message"). En vellykket strategi var å kombinere spesifikt primet første tråd-cDNA-syntese med hybridseleksjon av den resulterende enkelttrådede cDNA. Primer 1 ble benyttet med 200 µg poly(A)⁺ CH-2 RNA for å syntetisere enkelttrådet cDNA. Istedenfor å bruke DNA-polymerase for umiddelbart å omdanne denne til dobbelttrådet DNA, ble enkelttrådet DNA hybridisert til 2 µg av 189 bp StuI/HincII genomisk fragment DNA som hadde blitt immobilisert på aktivert ABM-cellulosepapir (Schleicher og Schuell "Transa-Bind"; se (48)). Selvom RNA vanligvis er utsatt for hybrid seleksjon, ble metoden anvendt etter cDNA-syntese for å unngå ytterligere manipulering av de sjeldne, store og relativt labile faktor VIII RNA-molekylene. Etter eluering ble materialet omdannet til dobbelttrådet cDNA, størrelsesselektert og 0,5 ng av utvunnet DNA ble forsynt med C-hale og klonet inn i pBR322 som før. Omkring 12.000 rekombinante kloner ble oppnådd og kontrollert ved hybridisering med et 364 bp Sau3A/StuI-fragment avledet fra den tidligere cDNA-klon pl.11. Probefragmentet ble valgt med hensikt for ikke å overlappe med det DNA-materialet som var benyttet for hybridseleksjon. Man unngikk således identifikasjonen av uekte rekombinanter inneholdende noe av StuI/HincII-DNA fragmentet som uvegerlig frigjøres fra DBM-cellulosen. 29 hybridiserende kolonier ble oppnådd. Dette representerer en grovt regnet 250-gangers anrikning av ønskede kloner i forhold til den tidligere metoden.

Hver av de 29 nye rekombinantene ble karakterisert ved restriksjonskartlegging og de lengste (p3.12 og p3.48; fig. 9) ble sekvensert. Disse cDNA-klonene strakk seg ca. 1500 bp utover 5' enn pl.11. Samtidig kartlegging og sekvensanalyse av cDNA og genomiske kloner avslørte tilstedeværelsen av et uvandig stort ekson (ekson B, fig. 4) som omfattet p3.12 og p3.48. Basert på denne observasjon ble DNA-sekvensanalysen av den genomiske klon λ222 utvidet til å definere omfanget av dette ekson. Ekson B-området inneholdt en åpen leseramme på ca. 3 kb. 16 mer-

primere 2 og 3 ble syntetisert til å passe til sekvensen innen dette store ekson i det håp å oppnå en betydelig forlengelse i cDNA-kloning.

5 Ved dette punkt ble det demonstrert at et bakteriofag-basert cDNA-kloningssystem kunne anvendes, hvilket muliggjorde produksjon og screening av store antall cDNA-kloner uten forutgående anrikning ved hybridseleksjon. λ GT10 (68) er et fag λ -derivat med et enkelt EcoRI-restriksjonssete i dets repressor-gen. Dersom dobbelttrådede cDNA-fragmenter 10 flankeres av EcoRI-seter, kan de ligeres inn i dette unike setet. Innføring av fremmed DNA i dette setet gjør fagen repressor-minus, hvorved det dannes et klart plaque-element. λ GT10 uten innskudd danner uklare plaque-elementer som således kan skjernes fra rekombinanter. I tillegg 15 til den store transformasjonseffektiviteten som er uløselig knyttet til fag-pakking, er λ cDNA-plaque-elementer mer hensiktsmessig å undersøke ved høy densitet enn tilfellet er for bakteriekolonier.

20 Dobbelttrådet cDNA ble fremstilt som før ved bruk av primer 3, 5'-AACTCTGTTGCTGCAG (beliggende ca. 550 bp nedstrøms fra den postulerte 5'-enden i ekson B. EcoRI "adaptorer" ble ligert til cDNA-materiale med butt ende. 25 Adaptorene besto av en komplementær syntetisk 18-mer og 22-mer av sekvens 5'-CCTTGACCGTAAGACATG og 5'-AATTCATGTCTTACGGTCAAGG. 5'-enden til 18-meren ble fosforylert, mens 5'-enden til 22-meren beholdt 5'-OH med hvilket den var syntetisert. Således, når adaptorene 30 er sammensmeltet og ligert med cDNA-materialet, danner de overhengende EcoRI-seter som ikke kan selvligere. Dette gjør at man kan unngå EcoRI-metylering av cDNA og etterfølgend3 EcoRI-nedbrytning som følger linker-ligering i andre publiserte metoder (83). Etter gelisolering for å 35 størrelsesselektare cDNA-materialet og fjerne ureagerte adaptorer, ble en ekvimolar mengde av dette cDNA ligert inn i EcoRI-utskåret λ GT10, pakket og utplatet på E. coli c600hfl.

Ca. 3.000.000 kloner fra 1 µg av poly(A)⁺ RNA ble ut-
plettert på 50 150 mm petriskåler og hybridiseringsundersøkt
med en 300 bp HinfI-fragment fra 5'-enden i ekson B.

46 duplikatpositiver ble identifisert og analysert ved
5 EcoRI-nedbrytning. Flere cDNA-innskudd viste seg å utrage
ca. 2.500 bp 5' i primer 3. Disse lange klonene ble analy-
sert ved DNA-sekvensering. Sekvensen i 5'-endene til λ13,2
og λ13.27 er vist på fig. 10. De var i besittelse av flere
trekk som indikerte at man hadde nådd 5'-enden til kodnings-
10 området for faktor VIII. De innledende 109 bp inneholdt
stoppkodoner i alle mulige leserammer. Deretter opptrådte
en ATG-triplet fulgt av en åpen leseramme for resten av
de 2724 bp i cDNA-innskuddet i λ13.2. Translasjon av
sekvensen etter initiatoren ATG gir en 19 aminosyresekvens
15 som er typisk for en utskilt protein-"leder"- eller
"pre"-sekvens (69). Dens fremspringende trekk er to ladde
rester som grenser til en hydrofob kjerne med 10-aminosyrer.
Etter denne antatte ledersekvens er et område tilsvarende
amino-terminalrester oppnådd fra proteinsekvensanalyse av
20 210 kD og 95 kD trombin-nedbrytningstyper av faktor VIII.

c. Oligo(dT)-primede cDNA-kloner

25 Flere tusen "flere"-3'-baser i faktor VIII mRNA var tilbake
for omdannelse til cDNA. Valget var å prime revers
transkripsjon med oligo(dT) og søke etter cDNA-kloner inne-
holdende 3'-poly(A)⁺-halene i mRNA. I en bestrebelse på
å anrike klonene og å øke effektiviteten til annentråd-
30 DNA-syntese, ble imidlertid etablerte metoder erstattet
med anvendelse av en spesifikk primer for annentråd-
cDNA-syntese. 16-mer primeren 4, 5'-TATTGCTGCAGTGGAG,
ble syntetisert for å representere meddeler-retnings-
sekvens ved et PstI-sete ca. 400 bp oppstrøms for 3'-
35 enden i ekson A (fig. 9). mRNA ble reverstranskribert med
oligo(dT) priming, primer 4 ble tilsatt med DNA-polymerase
for annentråd-syntese, og EcoRI-tilpasset cDNA ble deretter

ligert inn i λ GT10 som før. 3.000.000 plaque-elementer ble kontrollert med et 419 bp PstI/HincII-fragment inneholdt p3.12, liggende nedstrøms fra primer 4. DNA ble fremstilt fra de utvunnede fire klonene. Disse ble nedbrutt, kartlagt og blot-hybridisert med ytterligere genomiske nedstrømsfragmenter som nettopp var blitt identifisert som eksoner ved anvendelse av SV40-ekson-ekspresjonsplasmider som beskrevet ovenfor. Tre av de fire rekombinantene hybridiserte. Den lengste, λ 10.44, var omkring 1800 basepar. DNA-sekvensen i λ 10.44 viste at annentråd-syntese virkelig begynte ved primer 4. Den inneholdt alle eksonsekvenser funnet i SV40 ekson-ekspresjonsklonen S36 og mer. Den åpne leserammen til λ 10,44 fortsatte imidlertid til enden av cDNA. Intet 3'-utranslatert område og heller ikke poly(A)-hale ble funnet. Antageligvis hadde annentråd-syntese gått til fullførelse.

For å finne kloner inneholdende den komplette 3'-enden, ble de samme filtere underkastet ny screening med merket DNA fra λ 10,44. 24 ytterligere kloner ble utvunnet og kartlagt, og de to lengste (λ 10.3 og λ 10.9.2) ble sekvensert. De inneholdt vesentlig identiske sekvenser som overlappet λ 10.44 og tilføyet ca. 1900 flere 3'-basepar. 51 basepar utover enden til λ 10.44-terminusen, viste DNA-sekvensen et TGA-translasjonsstoppkodon fulgt av et tilsynelatende 3'-utranslatert område med 1805 basepar. Diagnostiske trekk i dette området er stoppkodoner spredt i alle tre leserammer og en poly(A)-signalsekvens, AATAAA (89), fulgte 15 baser nedstrøms med en poly(A)-lengde ved enden av cDNA-materialet (klon λ 10.3 inneholder 80 A'er fulgt av EcoRI-adaptor ved dette punkt, mens λ 10.9.2 inneholder over 100 A'er ved dens 3'-ende).

d. Komplett cDNA-sekvens

Den komplette sekvens for overlappende kloner er gitt på fig. 10. Den består av en kontinuerlig åpen leseramme som

koder for 2351 aminosyrer. Ved å anta et formodet terminal-signalpeptid på 19 aminosyrer, ville det "modne" protein derfor ha 2332 aminosyrer. Den beregnede molekylvekt for dette protein er ca. 267.000 dalton. Ved å ta hensyn til mulig glykosylering nærmer dette seg molekylvekten til nativt protein som bestemt ved SDS-polyakrylamid-gelelektroforese.

Den "komplette" cDNA-lengden på ca. 9000 basepar (avhengig av lengden av 3' poly(A)) er i overensstemmelse med den estimerte lengden til mRNA-materialet bestemt ved Northern-blot-hybridisering. 5' (aminoterminalkoding)området inneholder vesentlig tilsvarende til peptidsekvensen i 210 kD-avledet faktor VIII-materiale og 3' (karboksy-terminalkoding)-område inneholder vesentlig tilsvarende til peptidsekvensen i 80 kD-protein.

8. Ekspresjon av rekombinant faktor VIII

a. Sammensetning av klon med full lengde

For å uttrykke rekombinant faktor VIII ble hele det 7 kb proteinkodende område sammensatt ut fra flere separate cDNA og genomiske kloner. Det beskrives nedenfor og i fig. 11 konstruksjon av 3 intermediære plasmider inneholdende 5'- midtre, og 3'-områdene i genet. Intermediærelementene kombineres i et ekspresjonsplasmid fulgt av en SV40 tidligpromotor. Dette plasmid tjener igjen som utgangspunkt for forskjellige konstruksjoner med modifiserte terminalsekvenser og forskjellige promotorer og selekterbare markører for transformasjon av en rekke forskjellige pattedyr-celletyper.

5'-kodingsområdet ble sammensatt i et pBR322-derivat på en slik måte at et ClaI-restriksjonssete ble plassert før ATG-startkodonet i faktor VIII-signalsekvensen. Siden intet annet ClaI-sete finnes i genet, blir det et hensikts-

messig sete for raffineringer av ekspresjonsplasmidet. Det hensiktsmessige ClaI- og SacI-holdige plasmid pT24-10 (67a) ble spaltet med HindIII, ifyllt med DNA polymerase, og oppdelt med SacI. Et 77 b AluI/SacI ble oppnådd fra 5'-området i faktor VIII cDNA-klonen λ 13.2 og ligert inn i denne vektoren for dannelsen av intermediærproduktet betegnet pF8Cla-Sac. (AluI-setet er beliggende i det 5'-utranslaterte område i faktor VIII og SacI-setet 10 b utenfor initiator-ATG ved nukleotidstilling 10 på fig. 10; nukleotidposisjonen til alle restriksjonssetene som følger vil bli nummerert som på fig. 10 idet man begynner med A i initiator-kodonet ATG.) Et 85 b ClaI/SacI-fragment inneholdende 11 bp av adaptorsekvens (adaptorsekvensen 5' ATCGATAAGCT erfullstendig avledet fra pBR322), ble isolert fra pF8Cla-Sac og ligert sammen med et 1801 b SacI/KpnI (nukleotid 1811)-fragment fra λ 13.2 inn i ClaI/KpnI-vektor fremstilt fra en pBR322-subklon inneholdende et HindIII-fragment (nuc. 1019-2277) fra faktor VIII. Dette intermediærprodukt, betegnet pF8Cla-Kpn, inneholdt de innledende 2277 kodingsnukleotider til faktor VIII forutgått av 65 5'-utranslaterte basepar og 11 basepar-ClaI-adaptorsekvensen. pF8Cla-Kpn ble åpnet med KpnI og SphI (i pBR322-delen) for å tjene som vektorfragment i en ligering med et 466 b KpnI/HindIII-fragment oppnådd fra en EcoRI-subklon i λ 13.2 og et 1654 b HindIII/SphI (nuc. 4003)-fragment oppnådd fra den ekson B-holdige subklon p222.8. Dette ga pF8Cla-Sph inneholdende de første 3931 b i faktor VIII-kodingssekvens.

Den midtre delen av kodingsområdet ble oppnådd fra en tredelers ligering som kombinerte fragmenter av pBR322/cDNA-kloner eller subkloner. p3.48 ble åpnet med BamHI (nuc. 4743) og SalI (pBR322 tet-området) for å tjene som vektor. Inn i disse seter ble det ligert et 778 b BamHI/NdeI (nuc. 5520) fragment fra p3.12 og en 2106 b NdeI/SalI (i pBR322) fragment fra subklonen p λ 10.44RI.9. Riktig ligering resulterte i et tetracyklinresistent plasmid pF8Sca-RI.

Den meste 3'-delen i faktor VIII cDNA ble klonet direkte inn i en SV40-ekspresjonsvektor. Plasmidet pCVSVEHBV inneholder en SV40-tidligpromotor fulgt av en polylinker og genet for hepatitt B-overflateantigenet.

5

[pCVSVEHBV, også betegnet pCVSVEHBS, er en svak variant av p342E (73). Spesielt ble pCVSVEHBV oppnådd som følger:

10

540 bp HindIII-HindIII-fragmentet omfattende SV40-replikasjonsopprinnelsen (74) ble ligert inn i plasmid pML (75) mellom EcoRI-sete og HindIII-setet. Plasmidet EcoRI-setet og SV40 HindIII-setet ble gjort butt ved tilsetning av Klenow DNA-polymerase I i nærvær av 4 dNTPs før nedbrytning med HindIII. Det resulterende plasmidet,

15

pESV ble nedbrutt med HindIII og BamHI og 2900 b vektorfragmentet isolert. Til dette fragment ble ligert et HindIII-BglII-fragment på 2025 b fra HBV modifisert til å inneholde en polylinker (DNA-fragment inneholdende flere restriksjonssteder) ved EcoRI-setet. HBV-fragmentet omfatter overflateantigen-genet og er avledet ved EcoRI-BglII-

20

nedbrytning av klonet HBV DNA (74). Det dobbelttrådede linker-DNA-fragmentet (5'-daAGCTTATCGATTCTAGAATTC3'...) ble nedbrutt med HindIII og EcoRI og tilsatt til HBV-fragmentet, idet EcoRI-BglII-fragmentet ble omdannet til et HindIII-BglII-fragment. Selv om dette kunne gjøres

25

som en tre-del-ligering bestående av linker, HBV-fragment og vektor, er det mer hensiktsmessig og ble slik foretatt at man først tilsatte HindIII-EcoRI-linkeren til den klonede HBV DNA og deretter sørget for utskjæring av HindIII-BglII-fragmentet ved ko-nedbrytning av plasmidet

30

med de enzymene. Det resulterende plasmid, pCVSVEHBV, inneholder en bakteriell replikasjonsopprinnelse fra den pBR322-avlede pML, og ampicillin-resistensmarkør, også fra pML, et SV40-fragment orientert slik at tidligpromotoren vil dirigere transkripsjonen av det innførte HBV-fragment, og overflateantigen-genet fra HBV. HBV-fragmentet tilveiebringer også et polyadenyleringssignal for produksjon av polyadenylert mRNA'er slik som normalt dannes i cytoplasma i pattedyrceller.

35

Plasmidet pCVSVEHBV inneholdt et nyttig ClaI-sete umiddelbart 5' til et XbaI-sete i polylinkeren. Dette plasmidet ble åpnet med XbaI og BamHI (i det hepatitt Ag 3'-utranslaterte område) og endene ble ifylt med DNA-polymerase. Dette fjernet det hepatitt-overflateantigen-kodende område, men bibeholdt dets 3'-polyadenylering-signalområde, samt SV40-promotoren. Inn i denne vektoren ble det ligert et 1883 b EcoRI-fragment (med ifylte ender) fra cDNA-klonen λ 10.3. Dette inneholdt de endelige 77 kodende basepar til faktor VIII, det 1805 b 3'-utranslaterte område, 8-adenosinrester og den ifylte EcoRI-adaptoren. I kraft av koblingen av de ifylte restriksjonssetene, ble EcoRI-enden gjenskapt ved 5'-enden fra ifylt XbaI koblet med ifylt EcoRI) men ødelagt ved 3'-enden ifylt EcoRI koblet med ifylt BamHI). Dette plasmidet ble betegnet pCVSVE/10.3.

Det komplette faktor VIII cDNA-området ble forbundet i en tre-delers ligering. pCVSVE/10.3 ble åpnet med ClaI og EcoRI og tjente som vektor for innføringen av 3870 b ClaI/ScaI-fragmentet fra pF8Cla-Sca og 3182 b ScaI/EcoRI-fragmentet fra pF8Sca-RI. Dette ekspresjonsplasmidet ble betegnet pSVEFVIII.

25

b. Konstruksjon for ekspresjon av faktor VIII i vevskulturceller

En variantvektor basert på pSVEFVIII, inneholdende adeno-virus hoved-senpromotoren, tredelt ledersekvens, og et forkortet faktor VIII 3'-utranslatert område produserte aktiv faktor VIII når den på stabil måte ble transfektert inn i BHK-celler.

Fig. 12 viser konstruksjonen av pAML3P.8cl, ekspresjonsplasmidet som produserer aktiv faktor VIII. For å komme frem til denne konstruksjon ble først SstII-setet i pFD11

(49r) og ClaI-setet i pEHED22 (49y) fjernet med Klenow-DNA-polymerase I. Disse setene er de 3'- og 5'-utranslaterte områdene i DHFR-genet på disse plasmidene. Deretter ble en tre-del-ligering av fragmenter inneholdende de sløyfede setene og hepatitt B-overflateantigen-genet fra pCVSVEHBS (supra) foretatt for å utvikle vektoren pCVSVEHED22ΔCS som bare har et ClaI- og et SstII-sete. Plasmidet pSVEFVIII inneholdende det sammensatte faktor VIII-gen (fig. 11) ble spaltet med ClaI og HpaI for å utskjære hele det kodende område og ca. 380 b av det 3'-utranslaterte område. Dette ble innført i ClaI, SstII-sløyfingsvektoren ved dens unike ClaI- og HpaI-seter, idet man erstattet overflateantigen-genet for oppnåelse av ekspresjonsplasmidet pSVE.8clD.

Separat ble adenovirus-hoved-senpromotoren med dens tredelte 5'-leder sammensatt fra to subkloner av deler av adenovirus-genomet sammen med et DHFR-ekspresjonsplasmid, pEDH22 (49y). Konstruksjon av de to adenovirus-subklonene (pUCHSX og pMLP2 er beskrevet i metodene. pMLP2 inneholder SstI til HindIII-fragmentet fra adenoviruskoordinater 15.4 til 17.1 klonet i SstI til HindIII-setet i pUC13 (59). pUCHSX inneholder HindIII til XhoI-fragmentkoordinater 17.1 til 26.5 klonet i HindIII til SalI-setet i pUC13. Ved sammen-setning ved HindIII-setet inneholder disse to adenovirus-fragmentene hoved-senpromoteren i adenovirus, de første to eksonene og intronene, og endel av det tredje ekson opp til XhoI-setet i det 5'-utranslaterte området.

En tre-delligering sammensatte adenovirus-promoteren foran DHFR-genet i plasmidet pAML3P.D22. Dette anbragte et ClaI-sete kort etter det foregående XhoI-setet i det tredje ekson i den tredelte 5'-leder i adenovirus. Til slutt ble SV40-tidligpromotoren i faktor VIII-ekspresjonsplasmidet, pSVE.8clD fjernet med ClaI og SalI og erstattet med en SV40 tidlig/adenovirus-tandempromotor (se fig. 12) for å utvikle det sluttlige ekspresjonsplasmidet pAML3P.8cl. Dette plasmidet inneholder den tredelte lederen i adenovirus

spelisert i det tredje ekson til det 5'-utranslaterte område i faktor VIII. Dette følges av den fulle lengde av faktor VIII-strukturen inkludert dets signalsekvens. Det 3'-utranslaterte området i faktor VIII-genet spleises ved HpaI-setet til det 3'-utranslaterte området i hepatitt B overflateantigen-gen. Dette følges av DHFR-genet som har en SV40-tidligpromoter og et hepatitt 3'-utranslatert område som bidrar med en funksjonelt polyadenyleringssignal.

Faktor VIII-ekspresjonsplasmidet, pAML3P.8cl, ble ko-transfektet inn i BHK-celler med neomycin-resistensvektoren pSVEneoBal6 (ATCC No. CRL 8544, deponert 20. april 1984). Disse cellene ble først selektert med G418 fulgt av en seleksjon med metotreksat.

Innledende karakterisering av faktor VIII RNA produsert med BHK-cellelinjen ble foretatt ved Northern-analyse av poly(A)⁺ cytoplasmisk RNA ved hybridisering til en ³²P-merket faktor VIII DNA-probe. Denne analysen viser et bånd med en lengde på omkring 9 kb. Basert på hybridiseringsintensiteter er dette båndet ca. 100-200 ganger anriket sammenlignet med 9 kb-båndet som finnes i CH-2-cellelinjen.

9. Identifikasjon av rekombinant faktor VIII

a. Radioimmun-analyse

Radioimmun-analyser ble foretatt som beskrevet i metodene angående supernatanter og lyserte celler fra BHK faktor VIII-produserende cellelinjer. Tabell 1 viser at supernatantene (som inneholder faktor VIII-aktivitet) (se 96) også inneholder omtrent like mengder av 210 kD (C10)- og 80 kD (C7F7) delene i faktor VIII bedømt ved disse radioimmun-analysene. Faktor VIII kan også detekteres i cellelysatsene ved begge radioimmunanalysene. Kontroll-cellelinjer som ikke uttrykket faktor VIII ga verdier ved radioimmunanalyse på mindre enn 0,001 enheter pr. ml.

Tabell 1

Faktor VIII-radioimmunanalyse av BHK-cellelinje transfektert med pAML3P.8c1

5

	<u>C10</u>	<u>C7F7</u>
Celle-supernatant		
Forsøk 1	0,14 U/ml	0,077
10 Forsøk 2	0,022	0,021
Celle-lysate		
Forsøk 1	0,42	0,016

15

I^{125} cpm bundet ble omdannet til enheter/ml med en standard kurve basert på fortynninger av normalt plasma. Alle verdier er signifikant over bakgrunnsverdien. Grenser for detektering var 0,005 U/ml for C10- og 0,01 U/ml for C7F7-analysene.

20

b. Kromogenanalyse på BHK-cellemedia

25 Som vist i tabell 2 utviklet media fra disse celler en absorbans ved 405 nm ved testing i Coatest-analysen. Som beskrevet ovenfor er denne analysen spesifikk for faktor VIII-aktivitet i aktivering av faktor X. Tilsetning av monoklonale antistoffer som er spesifikke for faktor

30 VIII nedsatte mengden av utviklet faktor X_a hvilket fremgår ved nedgangen i absorbans fra 0,155 for media til 0,03 for media pluss antistoffer (etter subtrahering av blindverdien). Derfor produserer cellene en aktivitet som virker i en analyse som er spesifikk for faktor VIII-aktivitet,

35 og denne aktiviteten nøytraliseres av antistoffer som er spesifikke for faktor VIII.

Inkubering av mediaene i reaksjonsblandingen uten til-

setning av faktoren IX_a, faktor X og fosfolipid resulterte ikke i en økning i absorbansen ved 405 nm over blindverdien. Den observerte aktiviteten skyldes derfor ikke tilstedeværelsen av en ikke-spesifikk protease som spalter substratet, og i tillegg nøytralisert av antistoffer som er

Tabell 2

Faktor VIII-aktivitet til BHK-cellelinje bestemt ved kromogen analyse¹

<u>Prøve</u>	<u>Absorbans ved 405 nm</u>	<u>Absorbans ved 405 nm (kontroll-verdi subtrahert)</u>
Media	0,193	0,155
Bufferkontroll ²	0,038	(0,0)
Media + faktor VIII-antistoff ³	0,064	0,030
Bufferkontroll ² + faktor VIII-antistoff	0,034	(0,0)

1 Reaksjoner modifisert som følger: 50 µl hver av IX_a/X/ fosfolipid CaCl₂, og 1-100 fortynnet prøve ble inkubert i 10 min. ved 37°C. S2222 (50 µl) ble tilsatt og reaksjonen terminert med 100 µl 50% eddiksyre etter 60 min. ved 37°C.

2 Buffer benyttet istedenfor prøve var 0,05 M Tris - HCl, pH 7,3, inneholdende 0,2% storfeserumalbumin.

3. Antistoff var en blanding av C8 og C7F7 (10 µg av hver). Mediaene ble preinkubert 5 min. før analysestart.

c. Kromatografi av media på monoklonal harpiks

Serumholdige media inneholdende faktor VIII-aktivitet ble kromatografert på C8 monoklonal antistoff (ATCC No. 40115, deponert 20. april 1984)-kolonnen som beskrevet (supra). De eluerte fraksjonene ble fortynnet 1:100 og analysert for aktivitet. Til 50 μ l av den fortynnede toppfraksjon ble det tilsatt forskjellige monoklonale antistoffer kjent for å være nøytraliserende for plasma-faktor VIII-aktivitet. Resultatene som er vist i tabell 3 demonstrerer at faktor VIII-aktiviteten eluert fra kolonnen (nå mye mer konsentrert enn mediaene) ble også nøytralisert av disse faktor VIII-antistoffene

Tabell 3

Kromogen analyse¹ av toppfraksjon i monoklonal antistoff-eluat

<u>Prøve</u>	<u>Absorbans ved 405 nm¹</u>
Toppfraksjon ²	0,186
Toppfraksjon plus faktor VIII-antistoff ³	0,060
Bufferkontroll	0,000
Bufferkontroll plus faktor VIII-antistoff	0,045

1 Analyse ble foretatt som følger: 50 μ l av fortynnet prøve ble inkubert i 5 min. med 50 μ l av IXa/X/fosfolipid-oppløsning ved 37°C. Reaksjonen ble inkubert med 50 μ l av CaCl₂ og fikk forløpe i 10 min. ved 37°C. Det kromogene substratet (50 μ l) ble tilsatt og reaksjonen terminert ved tilsetning av 100 μ l 50% eddiksyre etter 10 min.

2 Toppfraksjonen ble fortynnet 1:100 i 0,05M Tris, pH 7,2, inneholdende 0,15 M NaCl for analyser.

5 3 Antistoff var 10 μ l av symbiotisk antistoff tilsatt til den fortynnede prøven og inkubert i 5 min. ved romtemperatur.

d. Koaguleringsaktivitet for rensset faktor VIII

10

Aktiviteten detektert i cellemediaene ble rensset og konsentrert ved føring over en C8-monoklonalharpiks (supra).

15 Toppfraksjonen ble dialysert mot 0,05 M imidazol, pH 6,9, inneholdende 0,15 M NaCl, 0,02 glycinetyl ester, 0,01 M CaCl_2 , og 10% glycerol for å fjerne elueringsbufferen.

Aktivitettoppfraksjonen ble analysert ved koaguleringsanalyse i faktor VIII-mangelfullt plasma (tabell 4).

En fibrinklump ble observert ved 84 sek. Uten noen tilsetning dannet hemofiliplasma en klump i løpet av 104,0 sek.

20

Derfor korrigerte den eluerte fraksjonen koaguleringsdefekten i hemofiliplasma. Normalt humanplasma ble fortynnet og analysert på samme måte. En standard kurve preparert for dette plasma indikerte at den eluerte fraksjonen hadde omtrent 0,01 enheter pr. ml av faktor VIII-koaguleringsaktivitet.

25

Tabell 4

Koaguleringsaktivitet for monoklonalantistoff-renset faktor VIII

30

<u>Prøve</u>	<u>Levrings- tid (sek.)</u>
Rekombinant faktor VIII ^{1a}	86,5
Rekombinant faktot VIII ^{1a} og	
35 C7F7-antistoff	101,3
Kontroll ²	101,3

(Tabell 4, forts.)

	<u>Prøve</u>	<u>Levrings- tid (sek.)</u>
5	Rekombinant faktor VIII ^{1b}	82,4
	Rekombinant faktor VIII ^{1b}	
	of 10λ synbiotisk antistoff	110,6
	Kontroll ²	95,5
10	1. Faktor VIII var toppfraksjon eluert fra C8-monoklonal-harpiksen og dialysert i 1,5 (1a) eller 2 (1b) timer for å fjerne elueringsbuffer.	
15	2. Kontrollbuffer var 0,05 M Tris, pH 7,3, inneholdende 0,2% storfeserumalbumin.	

e. Trombinaktivering av renset faktor VIII

20 Aktivering av koaguleringsaktivitet med trombin er en vel-etablert egenskap til faktor VIII. Den eluerte fraksjonen fra monoklonalkolonnen ble analysert med henblikk på denne egenskap. Etter dialyse av prøven for å fjerne eluerings-

25 bufferet (supra), ble 100 µl av eluatet fortynnet med 100 µl 0,05 M imidazol, pH 7,6, inneholdende 0,15 M NaCl, 0,02 M glycinetyl ester, 0,01 M CaCl₂ og 10% glycerol. Denne fortynning ble foretatt for ytterligere å fortynne eventuell

30 gjenværende elueringsbuffer (som ville kunne forstyrre trombinfunksjoneringen) samt for å øke pH-verdien til reaksjonsblandingen. Trombin (25 ng) ble tilsatt til oppløsningen, og reaksjonen ble foretatt ved romtemperatur. Aliquoter på 25 µl ble fjernet ved forskjellige tids-

35 punkter, fortynnet 1:3, og analysert med henblikk på koaguleringsaktivitet. Resultatene er vist på fig. 17. Faktor VIII-aktiviteten øket med tiden og avtok senere, som forventet for en faktor VIII-aktivitet. Mengden av tilsatt trombin levret ikke faktor VIII-mangelfullt plasma i

løpet av tider observert for disse analyser, og den obser-
verte, tidsavhengige økning og etterfølgende minskning av
observert koagulerings- og fibrinolytisk aktivitet, viste at aktiviteten som ble
overvåket, i virkeligheten skyldtes trombinaktivering av
5 faktor VIII. Den observerte, omtrentlige 20-gangers
aktiveringen med trombin er i overensstemmelse med den
som ble observert for plasma faktor VIII.

10 f. Binding av rekombinant faktor VIII til immobilisert
von Willebrand sefarose

Faktor VIII er kjent for å sirkulere i plasma i et reversibelt
kompleks med von Willebrand faktor (vWF) (10-20). En nyttig
15 form av rekombinant faktor VIII skulle derfor også være i
besittelse av denne evne for dannelsen av en slik kompleks
for å bekrefte identiteten som faktor VIII. I tillegg ville
evnen til å danne et slikt kompleks bevise evnen til en
rekombinant faktor VIII til å danne den naturlige, sirkulerende
20 form for denne aktivitet som faktor VIII/vWF-komplekset ved
infusjon inn i pasienter med hemofili. For å teste evnen til
rekombinant faktor VIII til å reagere med vWF, ble vWF
renset og immobilisert på en harpiks som følger:

25 Human von Willebrand-faktor ble fremstilt ved kromatografi
av human faktor VIII-konsentrater (innkjøpt fra f.eks.
Cutter Laboratories) på en sefarose CL4B-harpiks ekvilibrent
med 0,05 M Tris, pH 7,3, inneholdende 0,15 M NaCl. von
Willebrand-faktoren eluerer ved kolonnens tomvolum. Dette
30 området ble oppsamlet, konsentrert ved utfelling med
ammoniumsulfat ved 40% metning og rekromatografert på
kolonnen i nærvær av den ovenfor angitte buffer inneholdende
0,25 M CaCl_2 for å separere faktor VIII-koagulerings-
aktiviteten fra von Willebrand-faktoren. Tomvolumfraksjonene
35 ble igjen oppsamlet, konsentrert under anvendelse av ammonium-
sulfat og dialysert mot 0,1 M natriumbikarbonat. Det
resulterende preparat ble kovalent festet til cyanogenbromid-

sefaroze (innkjøpt fra Pharmacia) som anbefalt av produsenten. Kolonnen ble vasket 0,02 M Tris, pH 7,3, inneholdende 0,05 M NaCl og 0,25 M CaCl_2 for å fjerne ubundede proteiner. Rekombinantfaktor VIII ble fremstilt i serumfrie media og anbragt på en 1,0 ml kolonne av vWF-harpiksen ved romtemperatur.

Kolonnen ble vasket for å fjerne ubundet protein og eluert med 0,02 M Tris, pH 7,3, inneholdende 0,05 M NaCl og 0,25 M CaCl_2 . Fraksjoner på 1,0 ml ble oppsamlet, forsynnet 1:10 og analysert. Resultatene er vist i tabell 5. Faktor VIII-aktiviteten blir absorbert fra mediaene på kolonnen. Aktiviteten kan deretter elueres fra kolonnen under anvendelse av høyt saltinnhold (tabell 5) som forventet for human faktor VIII. Derfor har faktor VIII produsert av BHK-cellene egenskapen med spesifikk reaksjon med von Willebrand-faktorprotein.

Tabell 5

<u>Prøve</u>	<u>Absorbans ved 405 nm¹</u>
Cellemedia	0,143
Vask	0,015
<u>Eluerte fraksjoner</u>	
1	0,000
2	0,410
3	0,093
4	0,017
5	0,000
6	0,000

¹ Analysemetoder var som anbefalt av produsenten, med unntagelse for at alle volumer ble minsket med en halvpart.

10. Analyse av fusjonsproteiner

Formålet med dette sett av forsøk var å bevise immunologisk identitet for proteinet innkodet av klonen med polypeptider i plasma. Dette ble oppnådd ved å uttrykke deler av genet som fusjonsproteiner i *E. coli*. Alle eller en del av kodingssekvensene i det klonede gen kan uttrykkes i former som er konstruert for å tilveiebringe materiale egnet for oppnåelse av antistoffer. Disse antistoffene, som er spesifikke for ønskede områder i det klonede protein, kan være nyttige i analyse og rensing av proteiner. En rekke *E. coli*/faktor VIII-"fusjonsproteiner" ble fremstilt for dette formål. Fragmenter av faktor VIII-kloner ble ligert inn i BglII-setet i plasmid pNCV (70) på en slik måte at faktor VIII-kodingssekvensene ble sammenføyet, i riktig leseramme, med de første 12 aminosyrene i det sammensmeltede *E. coli* trp LE proteinet (48, 70, 71). Vesentlige mengder rekombinant proteinprodukt produseres vanligvis fra dette sterke trp-promotorsystemet.

pfus1 ble konstruert ved isolering av et 189 bp StuI/HincII-fragment i faktor VIII (koder for aminosyrer 1799-1860) og ligering av dette inn i SmaI-setet i pUC13 (49K). Dette intermediære plasmid ble nedbrutt med BamHI og EcoRI og 200 bp-fragmentet innført i pNCV (70) hvorfra 526 bp BglII til EcoRI-fragmentet hadde blitt fjernet. Dette plasmidet, pfus1, produserer under kontroll av trp-promotor et 10 kD-fusjonsprotein bestående av 16 trpLE og linker-kodede aminosyrer, fulgt av 61 rester av faktor VIII og en sluttlig kodet 9-linker og trpE karboksy-terminalrester.

pfus3 ble konstruert ved fjerning av et 290 bp AvaII-fragment i faktor VIII (aminosyrer 1000-1096), ifylling av de overhengende nukleotidene under anvendelse av Klenow-fragment i DNA-polymerase, og ligering av dette nå butt-endede DNA-fragmentet inn i pNCV som hadde blitt kuttet med BglII og likeledes ifylt. Dette plasmidet, med det ifylte fragmentet i riktig orientering (som bestemt ved restriksjons-

nedbrytninger og DNA-sekvensanalyse), dirigerer syntesen av et omtrent 40 kD fusjonsprotein inneholdende 97 aminosyrer i faktor VIII innleiret i 192 aminosyre trpLE-proteinet.

5

pfus4 ble fremstilt ved kutting av en faktor VIII-subklon, λ 222.8 med BanI, tilbakenedbrytning av overhenget med nuklease S_1 , fulgt av PstI-nedbrytning og isolering av det resulterende 525 bp butte/PstI-fragmentet (aminosyrer 710-885). Dette ble ligert inn i pNCV, som hadde blitt nedbrutt med BglII, behandlet med S_1 , nedbrutt med PstI, og vektorfragmentet ble isolert. pfus4 dirigerer syntesen av et 22 kD-fusjonsprotein inneholdende 175 aminosyrer i faktor VIII etter de innledende 12 aminosyrene i trpLE.

15

Fusjonsproteinene ble rensset og injisert i kaniner for å utvikle antistoffer som beskrevet ovenfor. Disse antistoffene ble testet for binding til plasmaavledet faktor VIII ved Western-blot-analyse.

20

Resultatene fra en slik Western-overføring er vist på fig. 13. Hvert av fusjonsproteinene reagerer med plasmafaktor VIII. Fusjon 1 ble utviklet fra området i genet som koder et 80.000 dalton polypeptid. Det fremgår at fusjon 1-antisera bare reagerer med 80.000 dalton-båndet, og reagerer ikke med proteiner av høyere molekylvekt. Fusjon 3- og 4-antisera viser kryssreaktivitet med proteinene større enn 80.000 dalton og reagerer ikke med 80.000 dalton-båndet. Det monoklonale antistoff C8 er en aktivitetsnøytraliserende monoklonal rettet mot faktor VIII og er kjent for å reagere med 210.000 dalton-proteinet. Fig. 14 viser at fusjon 4-protein vil reagere med dette monoklonale antistoffet og dermed demonstrere at aminosyresekvensen som gjenkjennes av C8, er kodet av fusjon 4-polypeptidet. Dette understøtter videre identiteten til fusjon 4-protein inneholdende proteinsekvenser som koder 210.000 dalton proteinet. De ovenfor omtalte studier beviser på avgjørende måte at genet koder aminosyresekvensen for både 210.000 dalton-proteinet og

35

80.000 dalton-proteinet.

11. Farmasøytiske preparater

5

Forbindelsene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse kan
formuleres ifølge kjente metoder for fremstilling av
farmasøytisk nyttige preparater, hvorved human faktor VIII-
produktet heri kombineres i blanding med en farmasøytisk
10 akseptabel bærer. Egnede bærere og deres formulering, inkl.
andre humanproteiner, f.eks. human serumalbumin, er
beskrevet f.eks. i Remington's Pharmaceutical Sciences av
E. W. Martin, som det herved vises til. Slike preparater
vil inneholde en effektiv mengde av det aktuelle protein
15 sammen med en egnet mengde bærer for å fremstille farma-
søytisk akseptable preparater som er egnet for effektiv
administrasjon til en vert. F.eks. kan den aktuelle human-
faktor VIII administreres parenteralt til individer som
lider av f.eks. hemofili A.

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for fremstilling av human faktor VIII, k a r a k t e r i s e r t v e d at eukaryote vertsceller transformerer med ekspresjonsvektoren pAML3P. 8 cl, (fig. 12 III), cellene dyrkes og faktor VIII isoleres fra cellene.

2.

Vektor pAML3P.8cl, (fig. 12 III) k a r a k t e r i s e r t v e d at den kan uttrykke i en pattedyrvertscelle DNA kodende for full-lengde humanfaktor VIII, og den inneholder en adenovirus tripartitt-leder spleiset i dennes tredje exon til den 5' utranslaterte regionen til humanfaktor VIII, etterfulgt av et strukturelt gen kodende for full-lengde humanfaktor VIII inkludert dets signalsekvens, den 3' utranslaterte regionen som er spleiset ved et HpaI sete til den 3' utranslaterte regionen til hepatitt B overflateantigenet, etterfulgt av et gen kodende for DHFR som har en SV40 tidlig promoter og en hepatitt 3' utranslatert region som utviser et funksjonelt polyadenyleringssignal.

3.

Vektor pESVDA, k a r a k t e r i s e r t v e d at den kan tilveiebringe det korresponderende RNA-segmentet av et innskutt faktor VIII DNA-fragment fri for intron ved transkripsjon i en transfektert eukaryot cellekultur, og den inneholder 342 bp PvuII-HindIII-fragmentet til SV40 virus, som dekker SV40 replikasjonsorigo omgitt av EcoRI seter, og den inneholder polyadenyleringsssetet til hepatitt B virus overflateantigen, innbefattet på et 580-bp BamHI-BglII-fragment, der det mellom EcoRI-setet etter SV40 til promoteren og BamHI-setet til hepatitt B virusoverflateantigenet er skutt inn PvuII-HindIII-fragmentet, inneholdende donor-spleisesetet til den første sene lederen, øyeblikkelig etterfulgt av 840-bp HindIII-SacI-fragmentet til Adenovirus 2, inneholdende Elb akseptorspleisesetet, og hvor det mellom

donor og akseptorsetene ligger unike BglIII og HindIII-seter for innskudd av genomiske (f.eks. faktor VIII) DNA-fragmenter, som vist i figur 6.

Litteraturfortengelse

1. Hemostasis and Thrombosis, Bloom and Thomas, Eds.,
Churchill, Livingstone, NY (1981).
- 5 2. Davie, et al., Ann. Rev. Biochem. 44, 799 (1975).
3. Jackson, et al., Ann. Rev. Biochem. 49, 767 (1980).
- 10 4. Wight, J. Am. Med. Assoc. 170, 325 (1959).
5. Schmer, et al., J. Biol. Chem. 247, 2512 (1972).
6. Legaz, et al., J. Biol. Chem. 247, 3946 (1973).
- 15 7. J. Shapiro, et al., J. Clin. Invest, 52, 2198 (1973).
8. Nilsson, et al., Acta. Med Scanl. 159, 179 (1957).
- 20 9. McKee, Ann. NY Acad. Sci. 240, 8 (1975).
10. Thelin, et al., Arch. Biochem. Biophys. 95, 70 (1961).
11. Griggs, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 2814 (1973).
- 25 12. Donati, et al., Thromb. Res. 2, 97 (1973).
13. Weiss, et al., Br. J. Haematol 18, 89 (1970).
- 30 14. Weiss, et al., Thromb. Diath. Haemorrh 27, 212 (1972).
15. Weiss, et al., Science 182, 1149 (1973).
16. Rick, et al., Blood 42, 737 (1973).
- 35 17. Rick, et al., Thromb. Res. 7, 909 (1975).

18. Thelin, et al., Arch. Biochem. Biophys. 95, 70 (1961).
19. Owen, et al., Thromb. Diath. Haemorrh. 27, 502 (1972).
- 5 20. Cooper, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 2326 (1973)
21. Vehar, et al., Biochemistry 19, 401 (1980).
22. Fulcher, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 1648 (1982).
- 10 23. Fulcher, et al., Blood 61, 807 (1983).
24. Fulcher, et al., Blood 63, 486 (1984).
- 15 25. Fass, et al., Blood, 594 (1982).
26. Knutson, et al., Blood 59, 615 (1982).
27. Fay, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 7200 (1982).
- 20 28. Gordon, et al., Thrombosis Res. 6, 127 (1975).
29. Sacharski, et al., Mayo Clinic Proc. 44, 784 (1969).
- 25 30. Green et al., Blood 37, 47 (1971).
31. Schwinn, et al., US patent 4067964.
- 31a. Zimmerman, et al., Haemostasis and Thrombosis, Bloom
30 and Thomas, Eds., Churchill, Livingstone, NY, p.111 (1981).
32. Bolivar, et al., Gene 2, 95 (1977).
33. Chang, et al., Nature 275, 615 (1978).
- 35 34. Itakura, et al., Science 198, 1056 (1977).
35. Goeddel, et al., Nature 281, 544 (1979).

36. Goeddel, et al., Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980).
37. Europeisk patentsøknad nr. 0036776.
- 5 38. Siebenlist, et al., Cell 20, 269 (1980).
39. Stinchcomb, et al., Nature 282, 39 (1979).
40. Kingsman, et al., Gene 7, 141 (1979).
- 10 41. Tschemper, et al., Gene 10, 157 (1980).
42. Jones, Genetics 85, 12 (1977).
- 15 43. Hitzeman, et al., J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980).
44. Hess, et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7, 149 (1968).
45. Holland, et al., Biochemistry 17, 4900 (1978).
- 20 46. Graham, et al., Virology 52, 546 (1978).
47. Cohen, et al., PNAS (USA) 69, 2110 (1972).
- 25 47a. Crea, et al., Nucleic Acids Res. 8, 2331 (1980).
- 47b. Beaucage, et al., Tetrahedron Lett. 22, 1859 (1981)
48. Maniatis, et al., Molecular Cloning: A laboratory
30 Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring
Harbor, N.Y. (1982).
- 48a. Lawn, et al., Nucleic Acids Res. 9, 1045 (1981).
- 35 49. Karn, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5172 (1980).
- 49a. Southern, J. Molec. Biol. 98, 503 (1975).

- 49b. Goldberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5794 (1980).
- 49c. Taylor, et al., Biochem. biophys. Acta 442, 324 (1976).
- 5 49f. Ullrich, et al., Science 196, 1313 (1977).
- 49g. Berger, et al., Biochemistry 18, 5143 (1979).
- 49h. Aviv, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408 (1972).
- 10 49i. Sanger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463
(1977).
- 49j. Gingeras, et al., J. Biol. Chem. 257 13475 (1982).
- 15 49k. Norrander, et al., Gene 26, 101 (1983).
- 49l. Picken, et al., Inf. and Immun. 42, 269 (1983).
- 20 49m. Beck, et al., Gene 19, 327 (1982).
- 49n. Simonson, et al., Mol. Cell Biol. 3, 2250 (1983).
- 49o. Southern, et al., J. Mol. and Applied Gen. 1, 327
25 (1982).
- 49p. Graham, et al., Virology 52, 456 (1978).
- 49q. Wingler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3567
30 (1980).
- 49r. Simonsen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2495
(1983).
- 49s. Rotblat, et al., Thromb. Res. 21, 431 (1981).
- 35 49t. Rotblat, et al., J. Lab. Clin. Med. 101, 736 (1983).

- 49u. Kearney, et al., J. Immun. 123, 1548 (1979).
- 49v. Kohler, et al., Nature 256, 495 (1975).
- 5 49w. Benton, et al., Virol. 117, 490 (1982).
- 49x. Chalon, et al., J. Immun. 9, 259 (1979).
- 49y. U.S.S.N. 459152, 19. januar 1983.
- 10 50. Ish-Horowitz, et al., Nucl. Acids Res. 9, 2989
(1981).
51. Stel, et al., Nature 303, 530 (1983).
- 15 52. Kelly, et al., Brit. J. Haem. (1984).
53. Exmer, et al., Thrombosis Res. 32, 427 (1983).
- 20 54. Jaffe, et al., J. Clin. Invest. 53, 36a (1974).
55. Fay, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7200
(1982).
- 25 56. Zimmerman, et al., Haemostasis and Thrombosis Bloom,
A.L. and Duncan, P.T. (Churchill Livingstone, New
York) pp 111-123 (1981).
- 30 56a. Meili, et al., Thromb. Diathes. Haemorrh. 24, 161
(1970).
57. Grantham, et al., Nuclei Arts Res. 8, r49 (1980).
- 35 58. Kurachi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6461
(1982).
59. Viera, et al., Gene 19, 259 (1982).

60. Breathnach, et al., Ann. Rev. Biochem 50, 349 (1981).
61. Sharp, Cell 23, 643 (1981).
- 5 62. Fritsch, et al., Cell 19, 959 (1980).
63. Collins, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4242 (1978).
- 10 66. Kafatos, et al., Nucleic Acids Res. 7, 1541 (1979).
67. Capon, et al., Nature 304, 507 (1983).
- 67a. Capon, et al., Nature 301, 33 (1983).
- 15 68. Huynh, et al., Practical Approaches in Biochemistry (IRL Press Ltd., Oxford, England) (1984).
69. Perlman, et al., J. Mol. Biol. 167, 391 (1983).
- 20 70. Kleid, et al., Science 214, 1125 (1981).
71. Goeddel, et al., Nature 287, 411 (1980).
- 25 73. Crowley, et al., Mol. Cell Biol. 3, 44 (1983).
74. Liu, et al., DNA 1, 213 (1982).
75. Lusky, et al., Nature 293, 79 (1981).
- 30 76. Hanahan, J. Mol. Biol. 166, 557 (1983).
77. Gluzman Cell 23, 175 (1981).
- 35 78. Grunstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961 (1975).

79. Tuddenham, et al., Symposium on Factors VIII/
von Willebrand Factor, October 7-9, 1982, p.1.
80. Morrissey, Anal. Biochem 117, 307 (1981).
- 5 81. Laemmli, Nature 227, 680 (1970).
82. Greenwood, et al., Biochem. J 89, 114 (1963).
- 10 83. Maniatis, et al., Cell 15, 687 (1963).
84. Sompayrac. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 78,
7575 (1981).
- 15 86. Messing, et al., Nucl. Acids. Res. 9, 304 (1981).
87. Wood, et al., J. Biol. Chem. 256, 1502 (1981).
88. Shen, et al., Cell 19, 379 (1981).
- 20 89. Proudfoot, et al., Nature 252, 359 (1976).

25

30

35

Fig. 1(I).

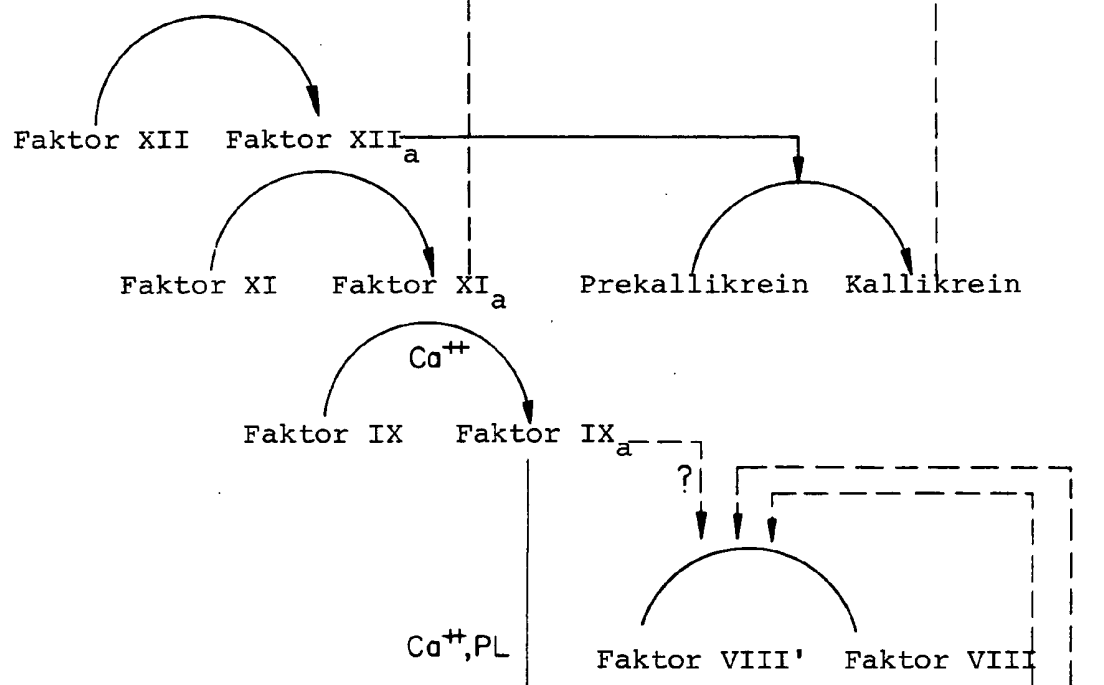
Overflate-mediert aktivering av blodkoagulering
(Reellt system)

1. Overflate (HMW kininogen, prekallikrein)

2. Kallikrein

3. Faktor XI_a

4. Plasmin



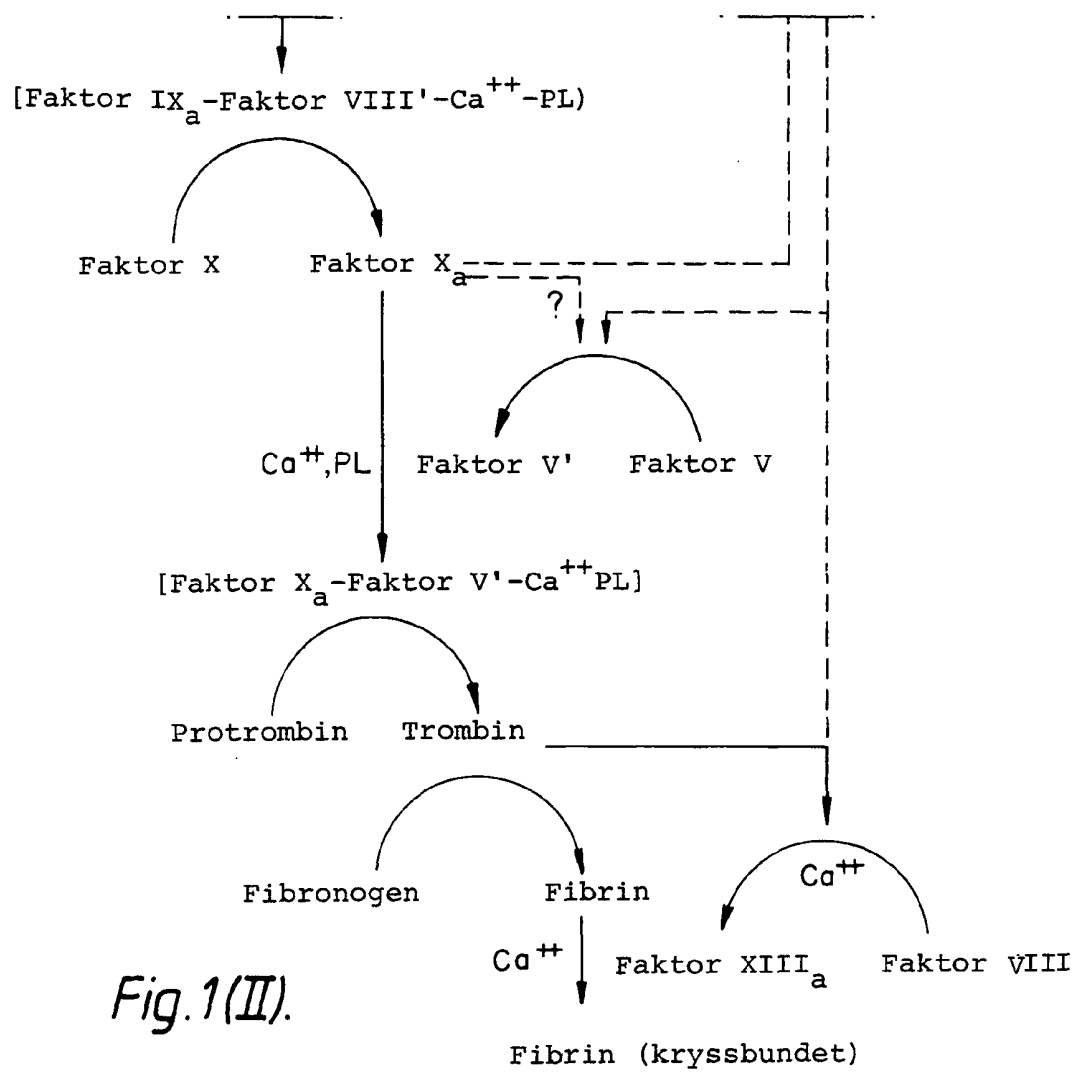


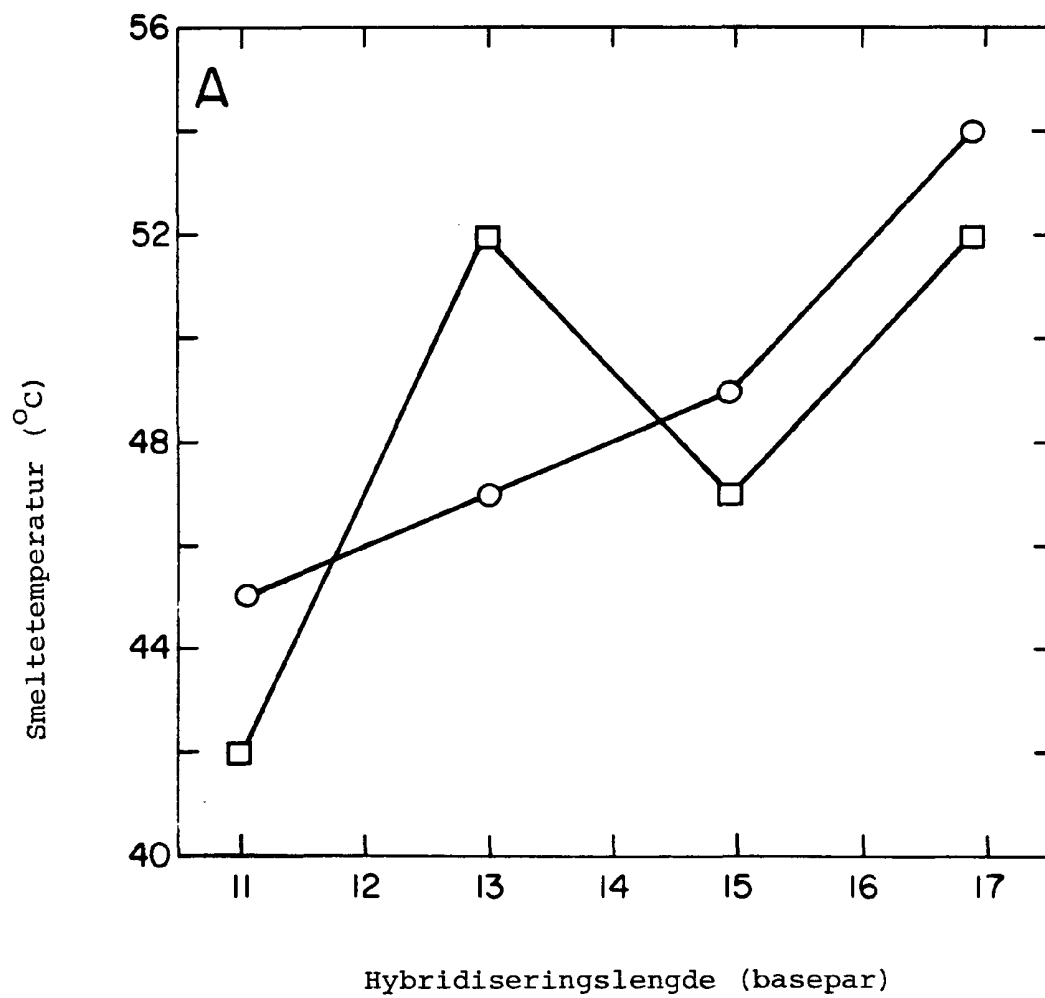
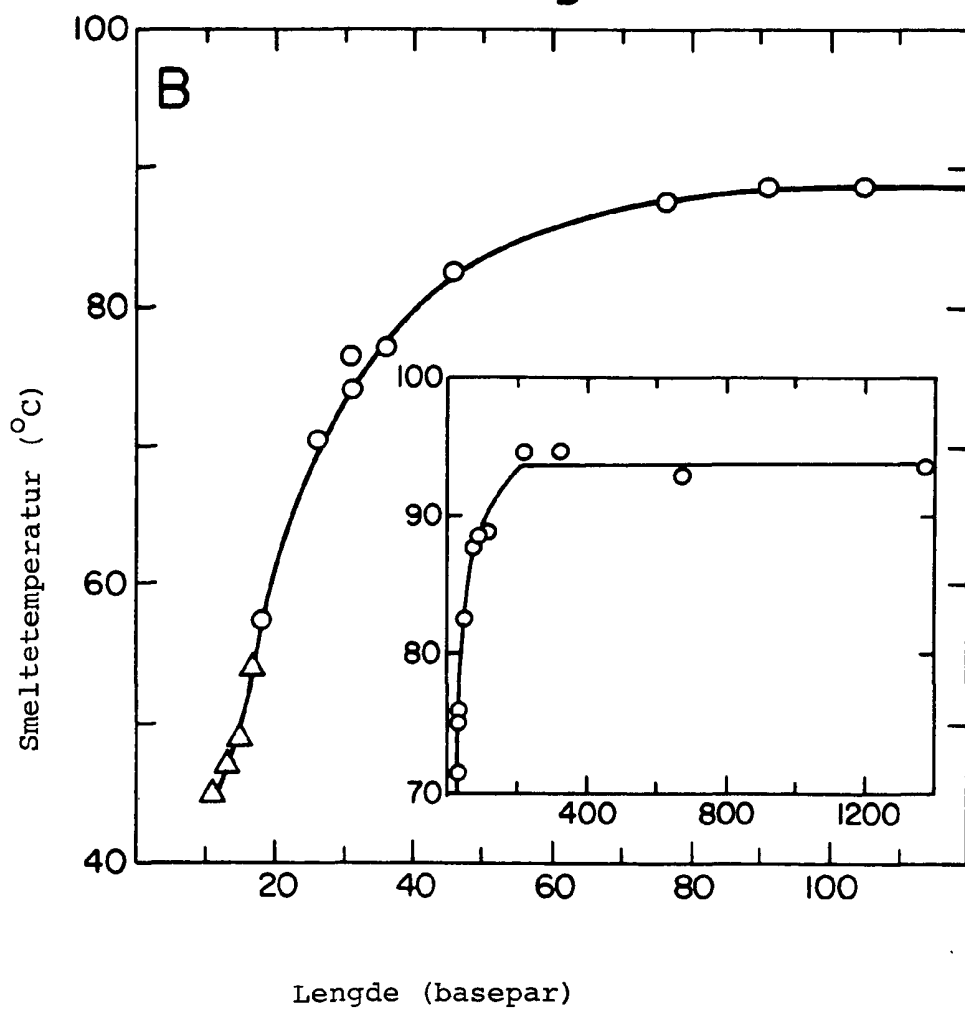
Fig. 2A.

Fig.2B.

174934

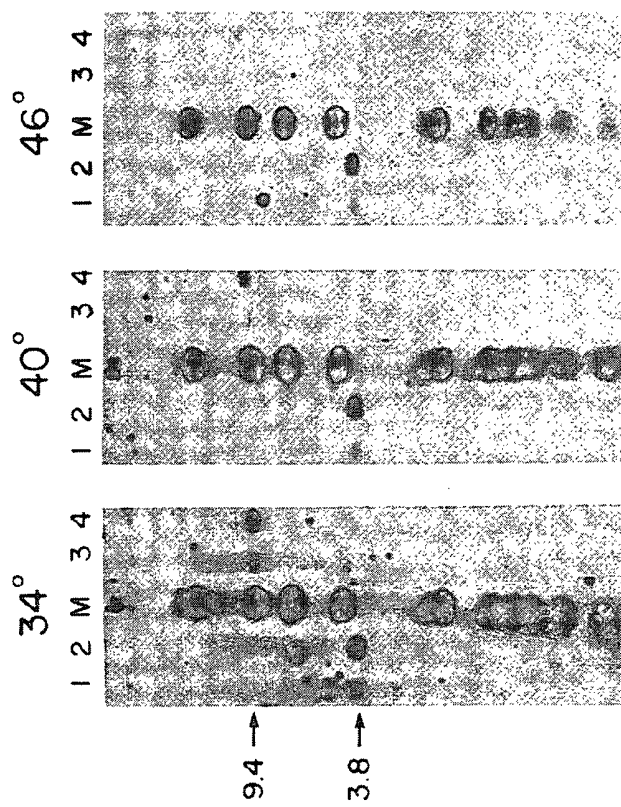
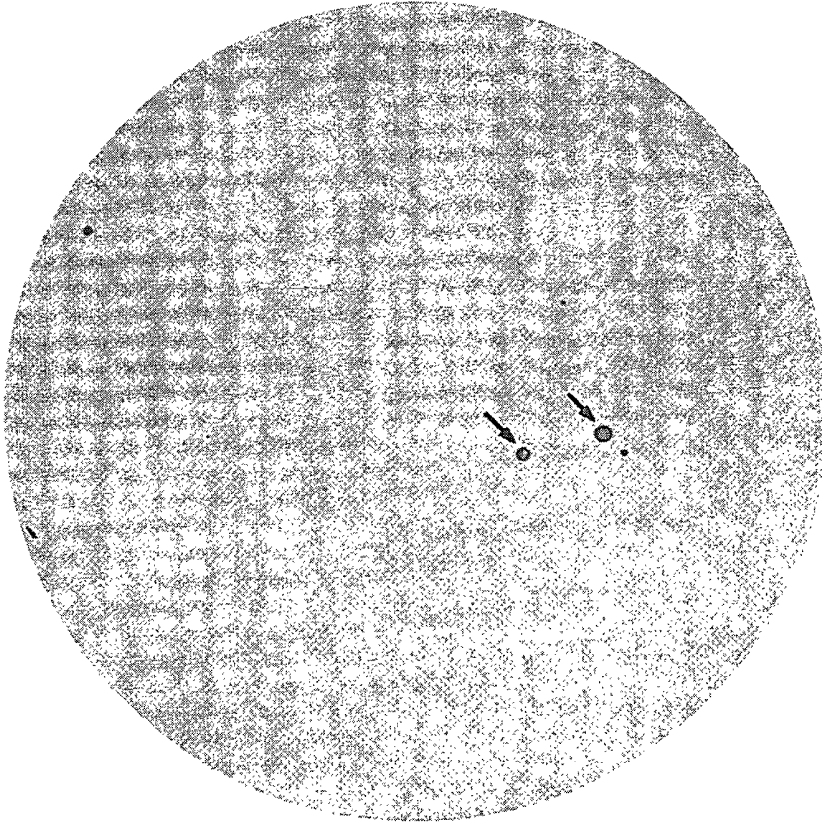


Fig. 3.



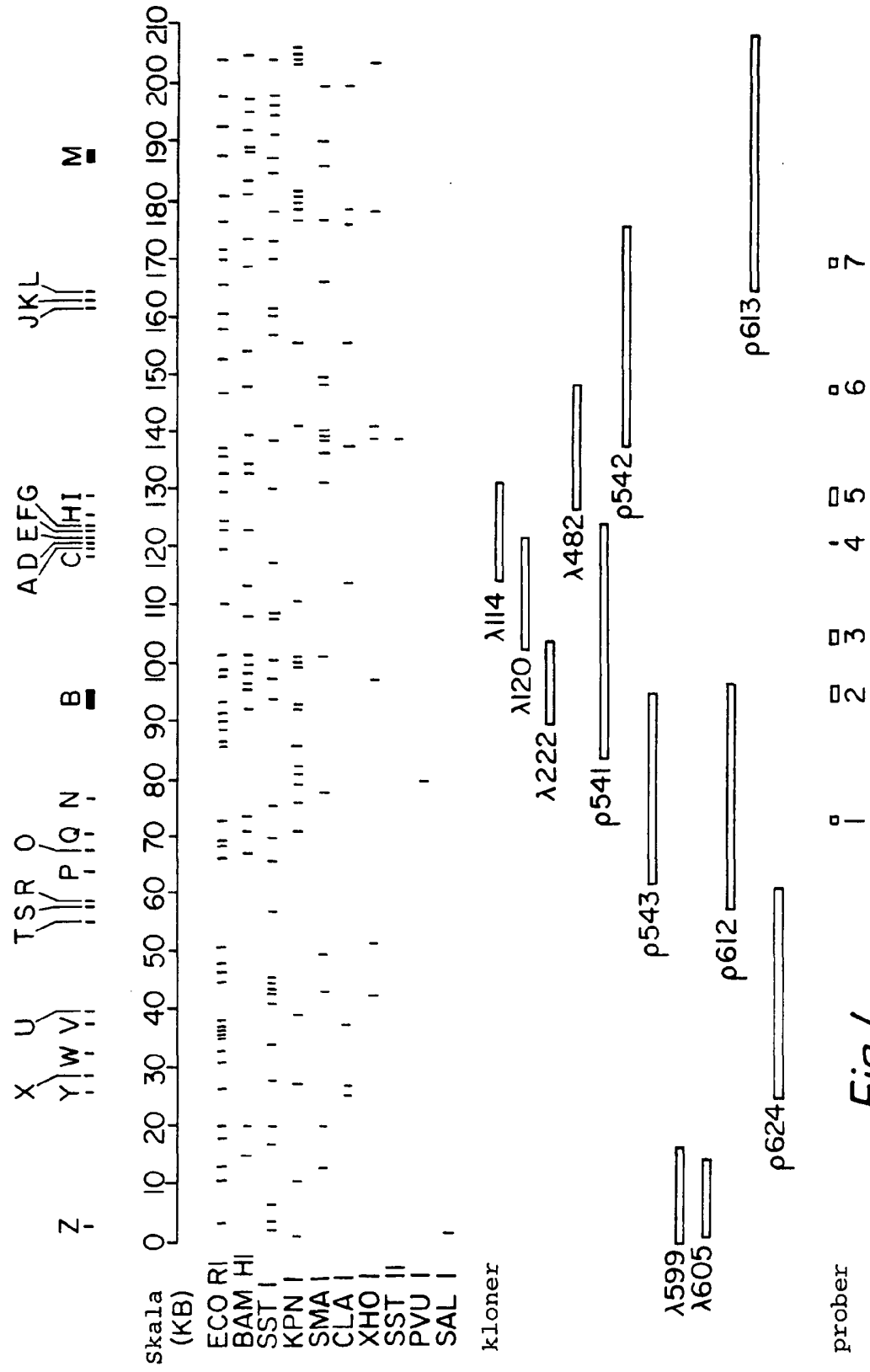


Fig.4.

Fig. 5.

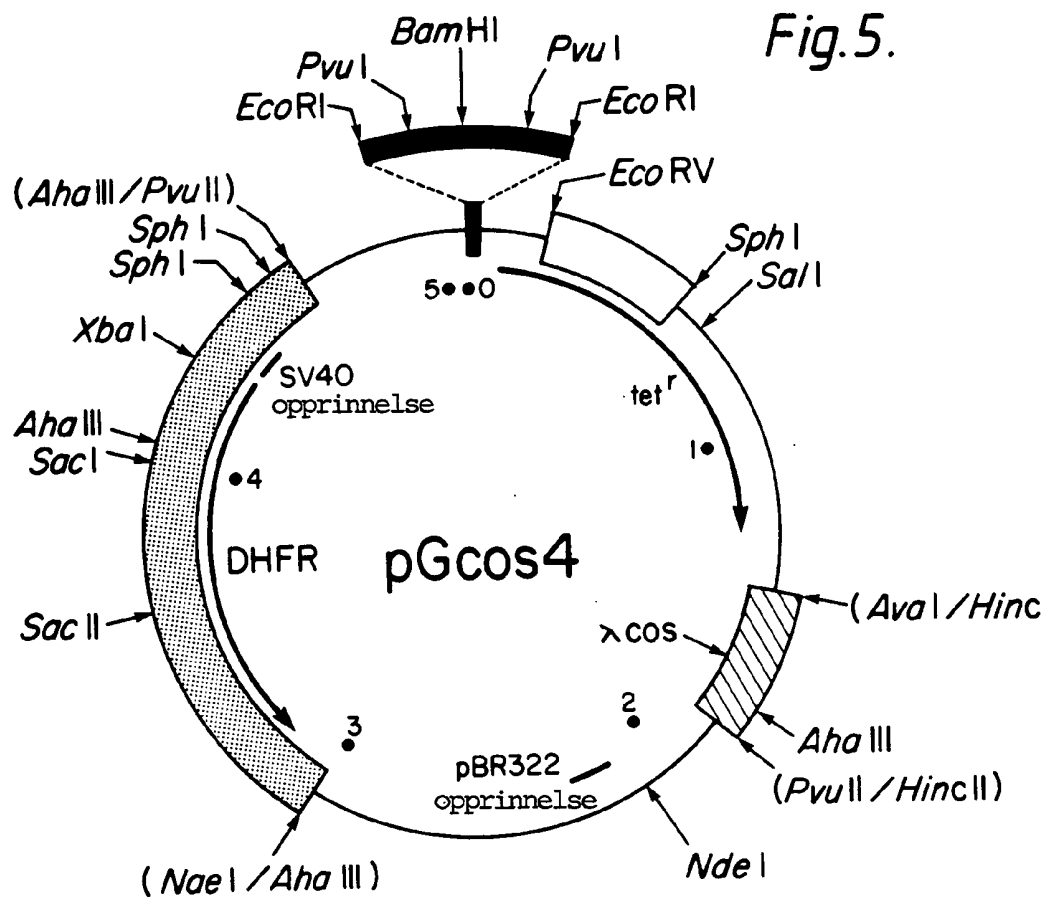


Fig. 6.

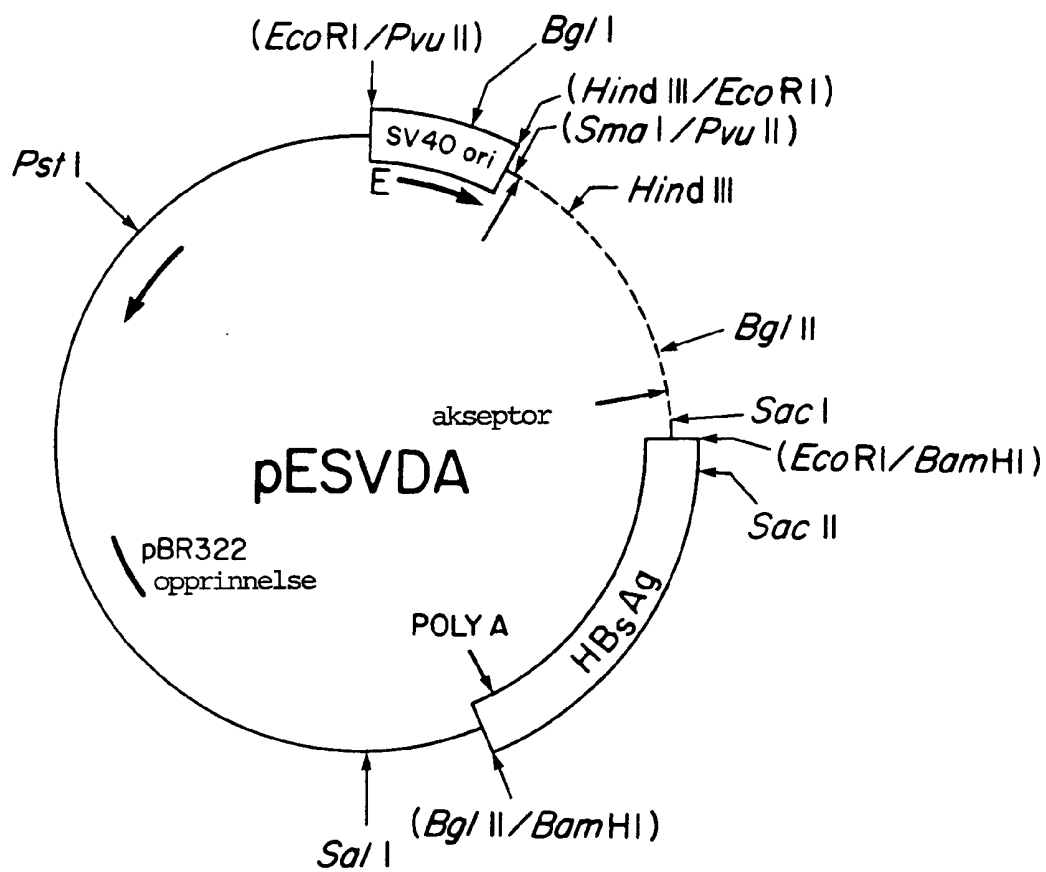
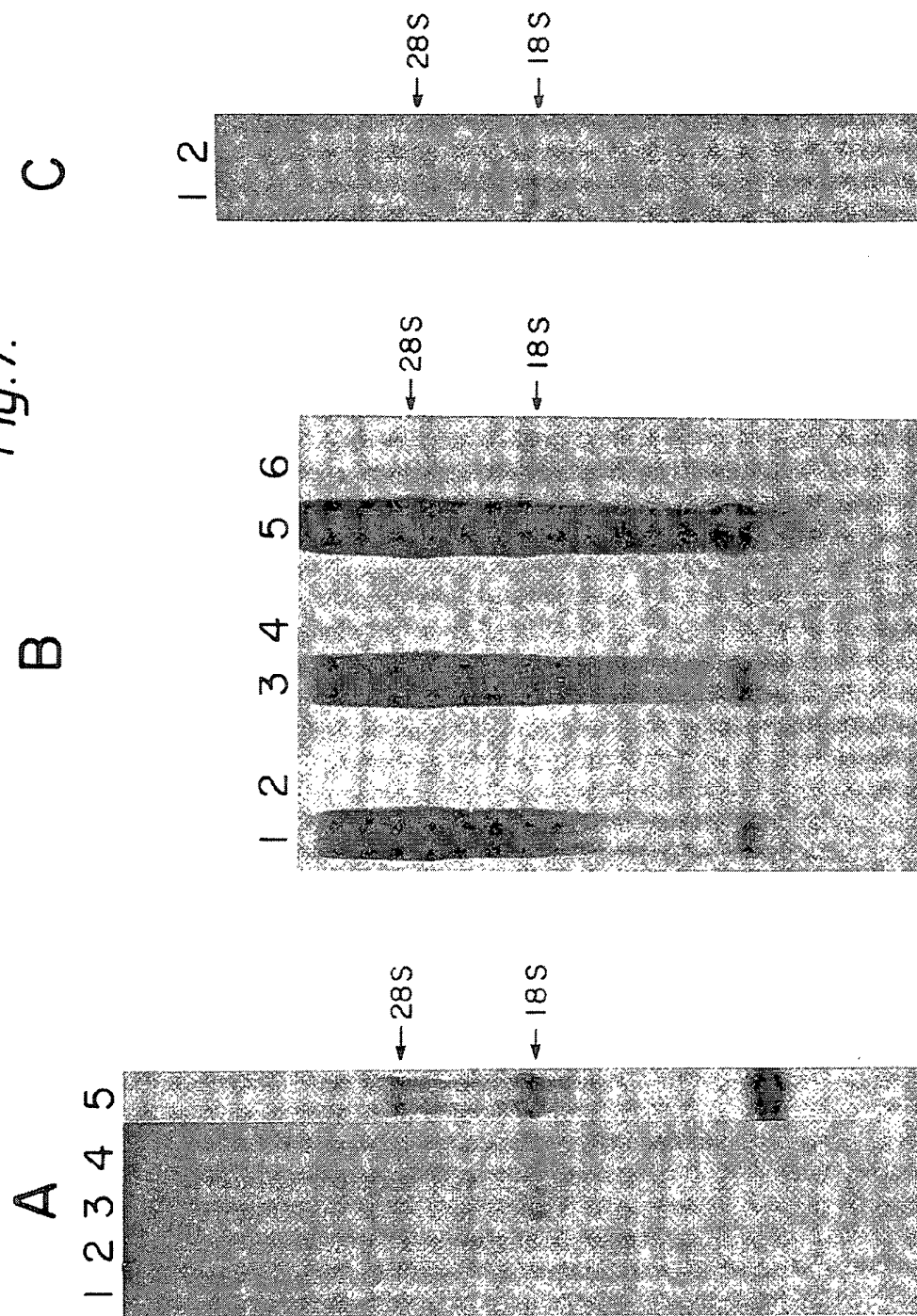


Fig.7.



174934

Sekvens for pESVDA.S127 cDNA

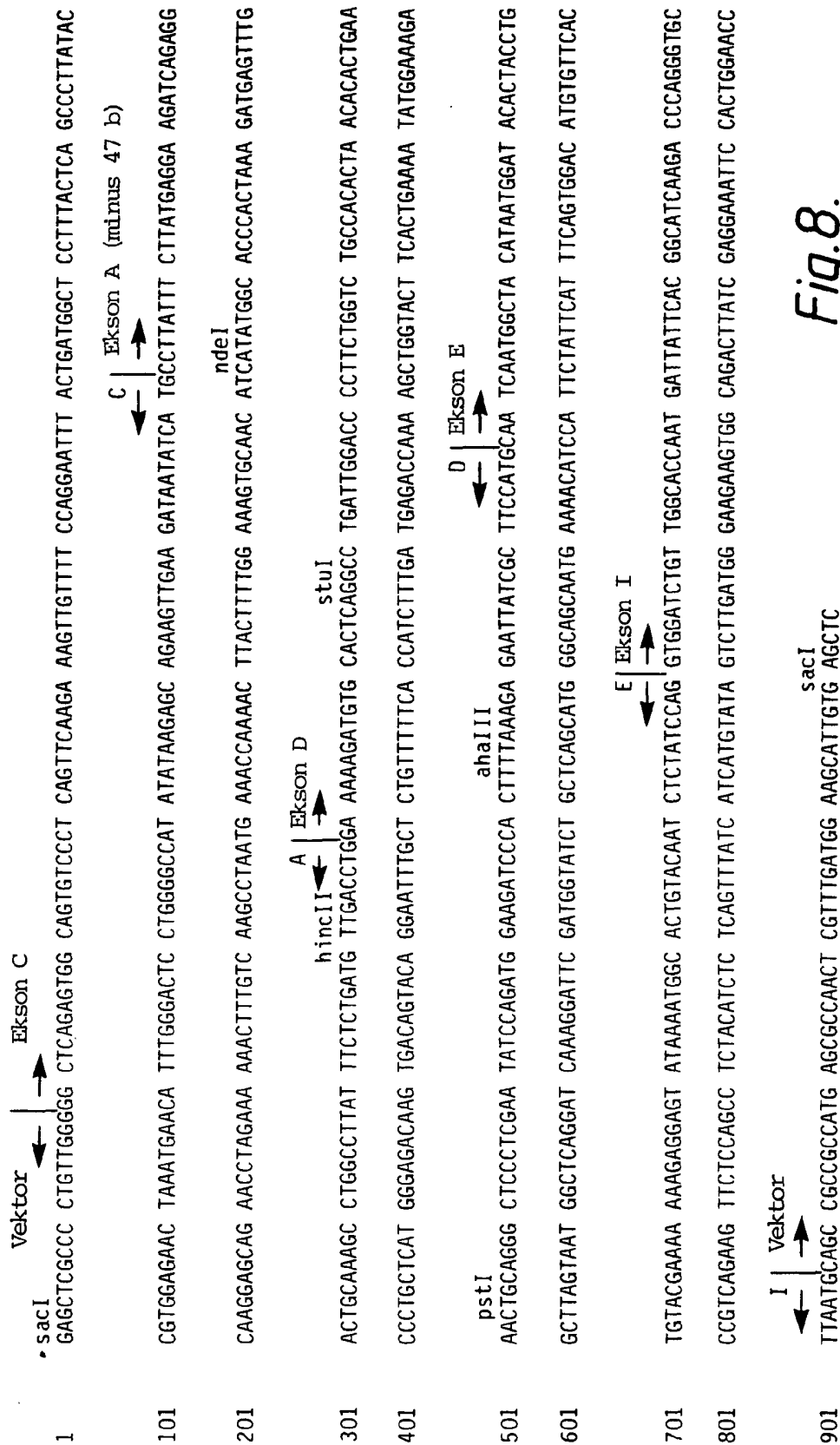
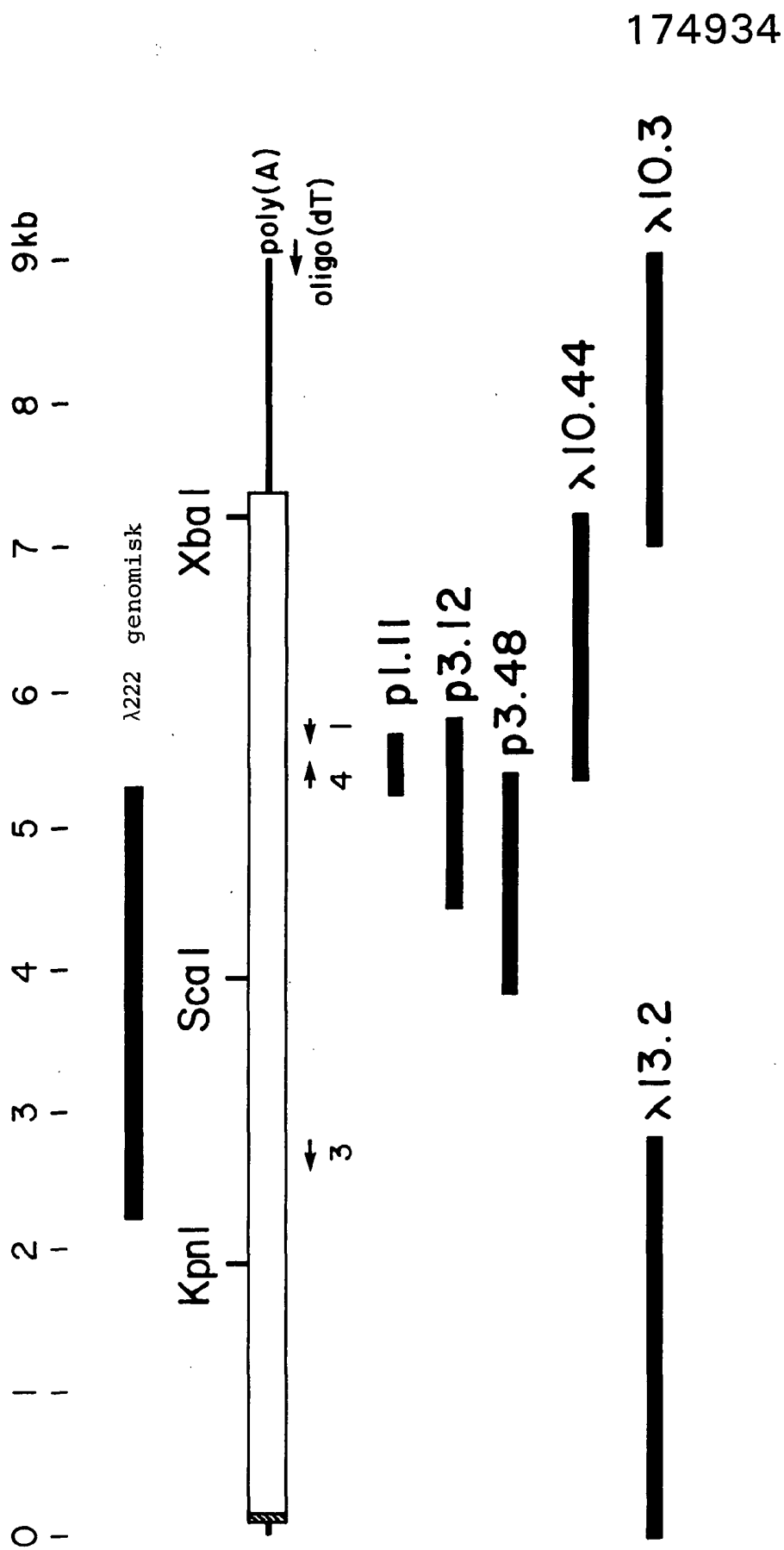


Fig.8.

Fig.9.



-109 CTTTTCATTAAATCAGAAAATTTTACCTTTTTCCCTCGGAGCTAAAGATATTTTAGAGAAGAATAAACCTTTTGCTTCCAGTTGAACATTTGTAGCAATAAGTC
 S10 S19 S1 met gln
 ile glu leu ser thr cys phe phe leu cys phe ser ala thr arg arg tyr leu gly ala val glu leu ser
 7 ATA GAG CTC TCC ACC TGC TTC TTT CTG TGC CTT TTG CGA TTC AGT GCC ACC AGA TAC TAC CTG GGT GCA GTG GAA CTG TCA
 20 30 40
 trp asp tyr met gln ser asp leu gly glu leu pro val asp ala arg phe pro pro arg val pro lys ser phe pro phe asn thr ser
 97 TGG GAC TAT ATG CAA AGT GAT CTC GGT GAG CTG CCT GTG GAC GCA AGA TTT CCT CCT AGA GTG CCA AAA TCT TTT CCA TTC AAC ACC TCA
 50 60 70
 val val tyr lys thr leu phe val glu phe thr asp his leu phe asn ile ala lys pro arg pro pro trp met gly leu leu gly
 187 GTC GTG TAC AAA AAG ACT CTG TTT GTA GAA TTC ACG GAT CAC CTT TTC AAC ATC GCT AAG CCA AGG CCA CCC TGG ATG GGT CTG CTA GGT
 80 90 100
 pro thr ile gln ala glu val tyr asp thr val val ile thr leu lys asn met ala ser his pro val ser leu his ala val gly val
 277 CCT ACC ATC CAG GCT GAG GTT TAT GAT ACA GTG GTC ATT ACA CTT AAG AAC ATG GCT TCC CAT CCT GTC AGT CTT CAT GCT GGT GGT GTA
 110 120 130
 ser tyr trp lys ala ser glu gly ala glu tyr asp asp gln thr ser gln arg glu lys glu asp asp lys val phe pro gly gly ser
 367 TCC TAC TGG AAA GCT TCT GAG GGA GCT GAA TAT GAT GAT CAG ACC AGT CAA AGG GAG AAA GAA GAT GAT AAA GTC TTC CCT CCT GGT GGA AGC
 140 150 160
 his thr tyr val trp gln val leu lys glu asn gly pro met ala ser asp pro leu cys leu thr tyr ser tyr leu ser his val asp
 457 CAT ACA TAT GTC TGG CAG GCT CTG AAA GAG AAT GGT CCA ATG GCC TCT GAC CCA CTG TGC CTT ACC TAC TCA TAT CTT TCT CAT GTG GAC
 170 180 190
 leu val lys asp leu asn ser gly leu ile gly ala leu leu val cys arg glu gly ser leu ala lys glu lys thr gln thr leu his
 547 CTG GTA AAA GAC TTG AAT TCA GGC CTC ATT GGA GCC CTA CTA GTA TGT AGA GAA GAA GGG AGT CTG GCC AAG GAA AAG ACA CAG ACC TTG CAC
 200 210 220
 lys phe ile leu leu phe ala val phe asp glu gly lys ser trp his ser glu thr lys asn ser leu met gln asp arg asp ala ala
 637 AAA TTT ATA CTA CTT TTT GCT GTA TTT GAT GAA GGG AAA AGT TGG CAC TCA GAA ACA AAC TCC TTG ATG CAG GAT AGG GAT GCT GCA
 230 240 250
 ser ala arg ala trp pro lys met his thr val val asn gly tyr val val asn arg ser leu pro gly leu ile gly cys his arg lys ser val
 727 TCT GCT CGG GCC TGG CCT AAA ATG CAC ACA GTC AAT GGT TAT GTA AAC AGG TCT CTG CCA GGT CTG ATT GGA TGG CAC AGG AAA TCA GTC

Fig.10A(II)

```

260      tyr trp his val ile gly met gly thr thr pro glu val his ser ile phe leu glu gly his thr phe leu val arg asn his arg gln
817      TAT TGG CAT GTG ATT GGA ATG GGC ACC ACT CCT GAA GTG CAC TCA ATA TTC CTC GAA GGT CAC ACA TTT CTT GTG AGG AAC CAT CGC CAG

290      ala ser leu glu ile ser pro ile thr phe leu thr ala gln thr leu leu met asp leu gly gln phe leu phe cys his ile ser
907      GCG TCC TTG GAA ATC TCG CCA ATA ACT TTC CTT ACT GCT CAA ACA CTC TTG ATG GAC CTT GGA CAG TTT CTA CTG TTT TGT CAT ATC TCT

320      ser his gln his asp gly met glu ala tyr val lys val asp ser cys pro glu glu pro gln leu arg met lys asn asn glu glu ala
997      TCC CAC CAA CAT GAT GGC ATG GAA GCT TAT GTC AAA GTA GAC AGC TGT CCA GAG GAA CCC CAA CTA CGA ATG AAA AAT AAT GAA GAA GCG

350      glu asp tyr asp asp leu thr asp ser glu met asp val val arg phe asp asp asp asn ser pro ser phe ile gln ile arg ser
1087     GAA GAC TAT GAT GAT CTT ACT ACT TCT GAA ATG ATG GTC AGG TTT GAT GAT GAC AAC TCT CCT TCC TTT ATC CAA ATT CGC TCA

380      val ala lys lys his pro lys thr trp val his tyr ile ala ala glu glu glu asp trp asp tyr ala pro leu val leu ala pro asp
1177     GTT GCC AAG AAG CAT CCT AAA ACT TGG GTA CAT TAC ATT GCT GCT GAA GAG GAG GAC TGG GAC TAT GCT CCC TTA GTC CTC GCC CCC GAT

410      asp arg ser tyr lys ser gln tyr leu asn asn gly pro gln arg ile gly arg lys tyr lys val arg phe met ala tyr thr asp
1267     GAC AGA AGT TAT AAA AGT CAA TAT TTG AAC AAT GGC CCT CAG CGG ATT GGT AGG AAG TAC AAA AAA GTC CGA TTT ATG GCA TAC ACA GAT

440      glu thr phe lys thr arg glu ala ile gln his glu ser gly ile leu gly pro leu leu tyr gly glu val gly asp thr leu leu ile
1357     GAA ACC TTT AAG ACT CGT GAA GCT ATT CAG CAT GAA TCA GGA ATC TTG GGA CCT TTA CTT TAT GGG GAA GTT GGA GAC ACA CTG TTG ATT

470      ile phe lys asn gln ala ser arg pro tyr asn ile tyr pro his gly ile thr asp val arg pro leu tyr ser arg arg leu pro lys
1447     ATA TTT AAG AAT CAA GCA AGC AGA CCA TAT AAC ATC TAC CCT CAC GGA ATC ACT GAT GTC CGT CCT TTG TAT TCA AGG AGA TTA CCA AAA

500      gly val lys lys his leu lys asp phe pro ile leu pro gly glu ile phe lys tyr lys trp thr val thr val glu asp gly pro thr lys
1537     GGT GTA AAA CAT TTG AAG GAT TTT CCA ATT CTG CCA GGA GAA ATA TTC AAA TAT AAA TGG ACA GTG ACT GTA GAA GAT GGG CCA ACT AAA

530      ser asp pro arg cys leu thr arg tyr tyr ser ser phe val asn met glu arg asp leu ala ser gly leu ile gly pro leu leu ile
1627     TCA GAT CCT CGG TGC CTG ACC CGC TAT TAC TCT AGT TTC GTT AAT ATG GAG AGA GAT CTA GCT TCA GGA CTC ATT GGC CCT CTC CTC ATC

```

174934

Fig. 10A(III)

1717	cys tyr lys glu ser val asp gln arg gly arg gln ile met ser asp gln arg asn val ile leu phe ser val phe asp glu asn arg TGC TAC AAA GAA TCT GTA GAT CAA AGA GGA AAC CAG ATA ATG TCA GAC AAG AGG AAT GTC ATC CTG TTT TCT GTA TTT GAT GAG AAC CGA	580
1807	ser trp tyr leu thr glu asn ile gln arg phe leu pro asn pro ala gct gga gln leu glu asp pro glu phe gln ala ser asn ile AGC TGG TAC CTC ACA GAG AAT ATA CAA CGC TTT CTC CCC AAT CCA GCT GGA GTG CAG CTT GAG GAT CCA GAG TTC CAA GCC TCC AAC ATC	610
1897	met his ser ile asn gly tyr val phe asp ser leu gln leu ser val cys leu his glu val ala tyr trp tyr ile leu ser ile gly ATG CAC AGC ATC AAT GGC TAT GTT TTT GAT AGT TTG CAG TTG TCA GTT TGT TTG CAT GAG GTG GCA TAC TGG TAC ATT CTA AGC ATT GGA	640
1987	ala gln thr asp phe leu ser val phe phe ser gly tyr thr phe lys his lys met val tyr glu asp thr leu thr leu phe pro phe GCA CAG ACT GAC TTC CTT TCT TCT TCT GGA TAT ACC TTC AAA CAC AAA ATG GTC TAT GAA GAC ACA CTC ACC CTA TTC CCA TTC	670
2077	ser gly glu thr val phe met ser met glu asn pro gly leu trp ile leu gly cys his asn ser asp phe arg asn arg gly met thr TCA GGA GAA ACT GTC TTC ATG TCG ATG GAA AAC CCA CCA GGT CTA TGG ATT CTG GGG TGC CAC AAC TCA GAC TTT CCG AAC AGA GGC ATG ACC	700
2167	ala leu leu lys val ser ser cys asp lys asn thr gly asp tyr tyr glu asp tyr glu asp ile ser ala tyr leu leu ser lys GCC TTA CTG AAG GTT TCT AGT TGT GAC AAG AAC ACT GGT GAT TAT TAC GAG GAC AGT TAT GAA GAT ATT TCA GCA TAC TTG CTG AGT AAA	730
2257	asn asn ala ile glu pro arg ser phe ser gln asn ser arg his pro ser thr arg gln lys gln phe asn ala thr thr ile pro glu AAC AAT GCC ATT GAA CCA AGA AGC TTC TCC CAG AAT TCA AGA CAC CCT AGC ACT AGG CAA AAG CAA TTT AAT GCC ACC ACA ATT CCA GAA	760
2347	asn asp ile glu lys thr asp pro trp phe ala his arg thr pro met pro lys ile gln asn val ser ser ser asp leu met leu AAT GAC ATA GAG AAG ACT GAC CCT TGG TTT GCA CAC AGA ACA CCT ATG CCT AAA ATA CAA AAT GTC TCC TCT AGT GAT TTG TTG ATG CTC	790
2437	leu arg gln ser pro thr pro his gly leu ser leu ser asp leu gln glu ala lys tyr glu thr phe ser asp pro ser pro gly TTG CGA CAG AGT CCT ACT CCA CAT GGG CTA TCC TTA TCT GAT CTC CAA GAA GCC AAA TAT GAG ACT TTT TCT GAT GAT CCA TCA CCT GGA	820
2527	ala ile asp ser asn asn ser leu ser glu met thr his phe arg pro gln leu his his ser gly asp met val phe thr pro glu ser GCA ATA GAC AGT AAT AAC AGC CTG TCT GAA ATG ACA CAC TTC AGG CCA CAG CTC CAT CAC AGT GGG GAC ATG GTA TTT ACC CCT GAG TCA	850

174934

Fig. 10B(I)

2617	gly leu gln leu arg leu asn glu lys leu gly thr ala ala thr glu leu lys lys leu asp phe lys val ser ser thr ser asn GGC CTC CAA TTA AGA TTA AAT GAG AAA CTG GGG ACA ACT GCA GCA ACA GAG TTTG AAG AAA CTT GAT TTC AAA GTT TCT AGT ACA TCA AAT	860	870	880
2707	asn leu ile ser thr ile pro ser asp asn leu ala ala gly thr asp asn thr ser ser leu gly pro pro ser met pro val his tyr AAT CTG ATT TCA ACA ATT CCA TCA GAC AAT TTG GCA GCA GGT ACT GAT AAT ACA AGT TCC TTA GGA CCC CCA AGT ATG CCA GTT CAT TAT	890	900	910
2797	asp ser gln leu asp thr thr leu phe gly lys lys ser ser pro leu thr glu ser gly gly pro leu ser leu ser glu glu asn asn GAT AGT CAA TTA GAT ACC ACT CTA TTT GGC AAA AAG TCA TCT CCC CTT ACT GAG TCT GGT GGA CCT CTG AGC TTG AGT GAA GAA AAT AAT	920	930	940
2887	asp ser lys leu leu glu ser gly leu met asn ser gln glu ser ser trp gly lys asn val ser ser thr glu ser gly arg leu phe GAT TCA AAG TTG TTA GAA TCA GGT TTA ATG AAT AGC CAA GAA AGT TCA TGG GGA AAA AAT GTA TCG TCA ACA GAG AGT GGT AGG TTA TTT	950	960	970
2977	lys gly lys arg ala his gly pro ala leu leu thr lys asp asn ala leu phe lys val ser ile ser leu leu lys thr asn lys thr AAA GGG AAA AGA GCT CAT GGA CCT GCT TTG TTG ACT AAA GAT AAT GCC TTA TTC AAA GTT AGC ATC TCT TTG TTA AAG ACA AAC AAA ACT	980	990	1000
3067	ser asn asn ser ala thr asn arg lys thr his ile asp gly pro ser leu leu ile glu asn ser pro ser val trp gln asn ile leu TCC AAT AAT TCA GCA ACT AAT AGA AAG ACT CAC ATT GAT GGC CCA TCA TTA TTA ATT GAG AAT AGT CCA TCA GTC TGG CAA AAT ATA TTA	1010	1020	1030
3157	glu ser asp thr glu phe lys lys val thr pro leu ile his asp arg met leu met asp lys asn ala thr ala leu arg leu asn his GAA AGT GAC ACT GAG TTT AAA AAA AAA GTG ACA CCT TTG ATT CAT GAC AGA ATG CTT ATG GAC AAA AAT GCT ACA GCT TTG AGG CTA AAT CAT	1040	1050	1060
3247	met ser asn lys thr thr ser ser lys asn met glu met val gln gln lys lys glu gly pro ile pro pro asp ala gln asn pro asp ATG TCA AAT AAA ACT ACT TCA TCA AAA AAC ATG GAA ATG GCA ATG GTC CAA CAG AAA AAA GAG GGC CCC ATT CCA CCA GAT GCA CAA AAT CCA GAT	1070	1080	1090
3337	met ser phe phe lys met leu phe leu pro glu ser ala arg trp ile gln arg thr his gly lys asn ser leu ser ser gly gln gly ATG TCG TTC TTT AAG ATG CTA TTC TTG CCA GAA TCA GCA AGG TGG ATA CAA AGG ACT CAT GGA AAG AAC TCT CTG AAC TCT GGG CAA GGC	1100	1110	1120
3427	pro ser pro lys gln leu val ser leu gly pro glu lys ser val glu gly gln asn phe leu ser glu lys asn lys val val gly CCC AGT CCA AAG CAA TTA GTA TCC TCC TTA GGA CCA GAA AAA TCT GTG GAA GGT CAG AAT TTC TTG TCT GAG AAA AAC AAA GTG GTA GTA GGA	1130	1140	1150

Fig. 10B(III)

3517	lys gly glu phe thr lys asp val gly leu lys glu met val phe pro ser ser arg asn leu phe leu thr asn leu asp asn leu his	1160	1170	1180
	AAG GGT GAA TTT ACA AAG GAC GTA GGA CTC AAA GAG ATG GTT TTT CCA AGC AGC AGA AAC CTA TTT CTT ACT AAC TTG GAT AAT TTA CAT			
3607	glu asn asn thr his asn gln glu lys lys ile gln glu glu ile glu thr leu ile gln glu asn val leu pro gln	1190	1200	1210
	GAA AAT AAT ACA CAC AAT CAA GAA AAA ATT CAG GAA GAA ATA GAA AAG AAG ACA TTA ATC CAA GAG AAT GTA GTT TTG CCT CAG			
3697	ile his thr val thr gly thr lys asn phe met lys asn leu phe leu phe thr arg gln asn val glu gly ser tyr asp gly ala	1220	1230	1240
	ATA CAT ACA GTG ACT GGC ACT AAG AAT TTC ATG AAG AAC CTT TTC TTA CTG AGC ACT AGG CAA AAT GTA GAA GGT TCA TAT GAC GGG GCA			
3787	tyr ala pro val leu gln asp phe arg ser leu asn asp ser thr asn arg thr lys lys his thr ala his phe ser lys lys gly glu	1250	1260	1270
	TAT GCT CCA GTA CTT CAA GAT TTT AGG TCA TTA AAT GAT TCA ACA AAT AGA ACA AAG AAA CAC ACA GCT CAT TTC TCA AAA AAA GGG GAG			
3877	glu glu asn leu glu gly leu thr lys asn gln thr lys gln ile val glu lys tyr ala cys thr thr arg ile ser pro asn thr ser gln	1280	1290	1300
	GAA GAA AAC TTG GAA GGC TTG GGA AAT CAA ACC AAG CAA ATT GTA GAG AAA TAT GCA TGC ACC ACA AGG ATA TCT CCT AAT ACA AGC CAG			
3967	gln asn phe val thr gln arg ser lys arg ala leu lys gln phe arg leu pro leu glu glu thr glu leu glu lys arg ile ile val	1310	1320	1330
	CAG AAT TTT GTC ACG CAA CGT AGT AAG AGA GCT TTG AAA CAA TTC AGA CTC CCA CTA GAA GAA ACA GAA CTT GAA AAA AGG ATA ATT GTG			
4057	asp asp thr ser thr gln trp ser lys asn met lys asn thr lys his leu thr pro ser thr leu thr gln ile asp tyr asn glu lys glu lys gly	1340	1350	1360
	GAT GAC ACC TCA ACC CAG TGG TCC AAA AAC ATG AAA CAT TTG ACC CCG AGC ACC CTC ACA CAG ATA GAC TAC AAT GAG AAG GAG AAA GGG			
4147	ala ile thr gln ser pro leu ser asp cys leu thr arg ser his ser ile pro gln ala asn arg ser pro leu pro ile ala lys val	1370	1380	1390
	GCC ATT ACT CAG TCT CCC TTA TCA GAT TGC CTT ACG AGG AGT CAT AGC ATC CCT CAA GCA AAT AGA TCT CCA TTA CCC ATT GCA AAG GTA			
4237	ser ser phe pro ser ile arg pro ile tyr leu thr arg val leu phe gln asp asn ser ser his leu pro ala ala ser tyr arg lys	1400	1410	1420
	TCA TCA TTT CCA TCT ATT AGA CCT ATA TAT CTG ACC AGG GTC CTA TTC CAA GAC AAC TCT TCT CAT CTT CCA GCA GCA TCT TAT AGA AAG			
4327	lys asp ser gly val gln glu ser ser his phe leu gln gly ala lys lys asn leu ser leu ala ile leu thr leu glu met thr	1430	1440	1450
	AAA GAT TCT GGG GTC CAA GAA AGC AGT CAT TTC TTA CAA GGA GCC AAA AAA AAT AAC CTT TCT TTA GCC ATT CTA ACC TTG GAG ATG ACT			

174934

Fig.10B(III)

1460
 gly asp gln arg glu val gln ser leu gly thr ser ala thr asn ser val thr tyr lys lys val glu asn thr val leu pro lys pro
 4417 GGT GAT CAA AGA GAG GTT GGC TCC CTG GGG ACA AGT GCC ACA AAT TCA CTC GAT GAG AAC ACT GTT CTC CCG AAA CCA
 1490
 asp leu pro lys thr ser gly lys val glu leu leu pro lys val his ile tyr gln lys asp leu phe pro thr glu thr ser asn gly
 4507 GAC TTG CCC AAA ACA TCT GGC AAA GTT GAA TTG CTT CCA AAA GTT CAC ATT TAT CAG AAG GAC CTA TTC CCT ACG GAA ACT AGC AAT GGG
 1520
 ser pro gly his leu asp leu val glu gly ser leu leu leu gln gly thr glu gly ala ile lys trp asn glu ala asn arg pro gly lys
 4597 TCT CCT GGC CAT CTG GAT CTC GTG GAA GGG AGC CTT CTT CAG GGA ACA GAG GGA GCG ATT AAG TGG AAT GAA GCA AAC AGA CCT GGA AAA
 1550
 val pro phe leu arg val ala thr glu ser ser ala lys thr pro ser lys leu leu asp pro leu ala trp asp asn his tyr gly thr
 4687 GTT CCC TTT CTG AGA GTA GCA ACA GAA AGC TCT GCA AAG ACT CCC TCC AAG CTA TTG GAT CCT CTT GCT TGG GAT AAC CAC TAT GGT ACT
 1580
 gln ile pro lys glu thr trp lys ser gln glu lys ser pro glu lys thr ala phe lys lys asp thr ile leu ser leu asn ala
 4777 CAG ATA CCA AAA GAA GAG TGG AAA TCC CAA GAG AAG TCA CCA GAA AAA ACA GCT TTT AAG AAA AAG GAT ACC ATT TTG TCC CTG AAC GCT
 1610
 cys glu ser asn his ala ile ala ala ile asn glu gly gln asn lys pro glu ile glu val thr trp ala lys gln gly arg thr glu
 4867 TGT GAA AGC AAT CAT GCA ATA GCA GCA ATA AAT GAG GGA CAA AAT AAG CCC GAA ATA GAA GTC ACC TGG GCA AAG CAA GGT AGG ACT GAA
 1640
 arg leu cys ser gln asp pro val leu lys arg his gln arg glu ile thr arg thr thr leu gln ser asp gln glu glu ile asp
 4957 AGG CTG TGC TCT CAA AAC CCA CCA GTC TTG AAA CGC CAT CAA CGG GAA ATA ACT CGT ACT ACT CTT CAG TCA GAT CAA GAG GAA ATT GAC
 1670
 tyr asp asp thr ile ser val glu met lys lys glu asp phe asp ile tyr asp glu asp glu asn gln ser pro arg ser phe gln lys
 5047 TAT GAT GAT ACC ATA TCA GTT GAA ATG AAG AAG GAA GAT TTT GAC ATT TAT GAT GAG GAT GAA AAT CAG AGC CCC CGC AGC TTT CAA AAG
 1700
 lys thr arg his tyr phe ile ala ala val glu arg leu trp asp tyr gly met ser ser ser pro his val leu arg asn arg ala gln
 5137 AAA ACA CGA CAC TAT TTT ATT GCT GCA GTG GAG AGG CTC TGG GAT TAT GGG ATG AGT AGC TCC CCA CAT GTT CTA AGA AAC AGG GCT CAG
 1730
 ser gly ser val pro gln phe lys lys val val phe gln glu phe thr asp gly ser phe thr gln pro leu tyr arg gly glu leu asn
 5227 AGT GGC AGT GTC CCT CAG TTC CAG AAA GTT GTT TTC CAG GAA TTT ACT GAT GGC TCC TTT ACT CAG CCC TTA TAC CGT GGA GAA CTA AAT

Fig.10C(II)

5317	glu his leu gly leu leu gly pro tyr ile arg ala glu val glu asp asn ile met val thr phe arg asn gln ala ser arg pro tyr	1760	1770	1780
	GAA CAT TTG GGA CTC CTG GGG CCA TAT ATA AGA GCA GAA GTT GAA GAT AAT ATC ATG GTA ACT TTC AGA AAT CAG GCC TCJ CGT CCC TAT			
5407	ser phe tyr ser ser leu ile ser tyr glu glu asp gln arg gln gly ala glu pro arg lys asn phe val lys pro asn glu thr lys	1790	1800	1810
	TCC TTC TAT TCT AGC CTT ATT TCT TAT GAG GAA GAT CAG AGG CAA GGA GCA GAA CCT AGA AAA AAC TTT GTC AAG CCT AAT GAA ACC AAA			
5497	thr tyr phe trp lys val gln his his met ala pro thr lys asp glu phe asp cys lys ala trp ala tyr phe ser asp val asp leu	1820	1830	1840
	ACT TAC TTT TGG AAA GTG CAA CAT CAT ATG GCA CCC ACT AAA GAT GAG TTT GAC TGC TGC AAA GCC TGG GCT TAT TTC TCT GAT GTT GAC CTG			
5587	glu lys asp val his ser gly leu ile gly pro leu leu val cys his thr leu asn pro ala his gly arg gln val thr val	1850	1860	1870
	<u>GAA AAA</u> GAT GTG CAC TCA GGC CTG ATT GGA CCC CTT CTG GTC TGC CAC ACT AAC ACA CTG AAC CCT GCT CAT GGG AGA CAA GTG ACA GTA			
5677	gln glu phe ala leu phe thr ile phe asp glu thr lys ser trp tyr phe thr glu asn met glu arg asn cys arg ala pro cys	1880	1890	1900
	CAG GAA TTT GCT CTG TTT TTC ACC ATC TTT GAT GAG ACC AAA AGC TGG TAC TTC ACT GAA AAT ATG GAA AGA AAC TGC AGG GCT CCC TGC			
5767	asn ile gln met glu asp pro thr phe lys glu asn tyr arg phe his ala ile asn gly tyr ile met asp thr leu pro gly leu val	1910	1920	1930
	AAT ATC CAG ATG GAA GAT CCC ACT TTT AAA GAG AAT TAT CGC TTC CAT GCA ATC AAT GGC TAC ATA ATG GAT ACA CTA CCT GGC TTA GTA			
5857	met ala gln asp gln arg ile arg trp tyr leu leu ser met gly ser asn glu asn ile his ser ile his phe ser gly his val phe	1940	1950	1960
	ATG GCT CAG GAT CAA AGG ATT CGA TGG TAT CTG CTC AGC ATG GGC AGC AAT GAA AAC ATC CAT TCT ATT CAT TTC AGT GGA CAT GTG TTC			
5947	thr val arg lys lys glu glu tyr lys met ala leu tyr asn leu tyr pro gly val phe glu thr val glu met leu pro ser lys ala	1970	1980	1990
	ACT GTA CGA AAA AAA GAG GAG TAT AAA ATG GCA CTG TAC AAT CTC TAT CCA GGT GTT TTT GAG ACA GTG GAA ATG TTA CCA TCC AAA GCT			
6037	gly ile trp arg val glu cys leu ile gly glu his leu his ala gly met ser thr leu phe leu val tyr ser asn lys cys gln thr	2000	2010	2020
	GGA ATT TGG CGG GTG GAA TGC CTT ATT ATT GGC GAG CAT CTA CAT GCT GGG ATG AGC ACA CTT TTT CTG GTG TAC AGC AAT AAG TGT CAG ACT			
6127	pro leu gly met ala ser gly his ile arg asp phe gln ile thr ala ser gly gln tyr gly gln trp ala pro lys leu ala arg leu	2030	2040	2050
	CCC CTG GGA ATG GCT TCT GGA CAC ATT AGA GAT TTT CAG ATT ACA GCT TCA GGA CAA TAT GGA CAG TGG GCC CCA AAG CTG GCC AGA CTT			

Fig. 10C(II)

6217	his tyr ser gly ser ile asn ala trp ser thr lys glu pro phe trp ile lys val asp leu ala pro met ile ile his gly CAT TAT TCC GGA TCA ATC AAT GCC TGG AGC ACC AAG GAG CCC TTT TCT TGG ATC AAG GTG GAT CTG TTG GCA CCA ATG ATT ATT CAC GGC	2060	2070	2080
6307	ile lys thr gln gly ala arg gln lys phe ser ser leu tyr ile ser gln phe ile ile met tyr ser leu asp gly lys lys trp gln ATC AAG ACC CAG GGT GCC CGT CAG AAG TTC TCC AGC CTC TAC ATC TCT CAG TTT ATC ATC ATG TAT AGT CTT GAT GGG AAG AAG TGG CAG	2090	2100	2110
6397	thr tyr arg gly asn ser thr gly thr leu met val phe phe gly asn val asp ser ser gly ile lys his asn ile phe asn pro pro ACT TAT CGA GGA AAT TCC ACT GGA ACC TTA ATG GTC TTC TTT GGC AAT GTG GAT TCA TCT GGG ATA AAA CAC AAT ATT TTT AAC CCT CCA	2120	2130	2140
6487	ile ile ala arg tyr ile arg leu his pro thr his tyr ser ile arg ser thr leu arg met glu leu met gly cys asp leu asn ser ATT ATT GCT CGA TAC ATC CGT TTG CAC CCA ACT CAT TAT AGC ATT CGC AGC ACT CTT CGC ATG GAG TTG ATG GGC TGT GAT TTA AAT AGT	2150	2160	2170
6577	sphI			
	cys ser met pro leu gly met glu ser lys ala ile ser asp ala gln ile thr ala ser ser tyr phe thr asn met phe ala thr trp TGC AGC ATG CCA TTG GGA ATG GAG AGT AAA GCA ATA TCA GAT GCA CAG ATT ACT GCT TCA TCC TAC TTT ACC AAT ATG TTT GCC ACC TGG	2180	2190	2200
6667	ser pro ser lys ala arg leu his leu gln gly arg ser asn ala trp arg pro gln val asn asn pro lys glu trp leu gln val asp TCT CCT TCA AAA GCT CGA CTT CAC CTC CAA GGG AGG AGT AAT GCC TGG AGA CCT CAG GTG AAT AAT CCA AAA GAG TGG CTG CAA GTG GAC	2210	2220	2230
6757	phe gln lys thr met lys val thr gly val thr thr gln gly val lys ser leu leu thr ser met tyr val lys glu phe leu ile ser TTC CAG AAG ACA ATG AAA GTC ACA GGA GTA ACT ACT ACT CAG GGA GTA AAA TCT CTG CTT ACC AGC ATG TAT GTG AAG GAG TTC CTC ATC TCC	2240	2250	2260
6847	ser ser gln asp gly his gln trp thr leu phe phe gln asn gly lys val lys val phe gln gly asn gln asp ser phe thr pro val AGC AGT CAA GAT GGC CAT CAG TGG ACT CTC TTT TTT CAG AAT GGC AAA GTA AAG GTT TTT CAG GGA AAT CAA GAC TCC TTC ACA CCT GTG	2270	2280	2290
6937	val asn ser leu asp pro pro leu thr arg tyr arg tyr leu arg ile his pro gln ser trp val his gln ile ala leu arg met glu val GTG AAC TCT CTA GAC CCA CCG TTA CTG ACT CGC TAC CTT CGA ATT CAC CCC CAG AGT TGG GTG CAC CAG ATT GCC CTG AGG ATG GAG GTT	2300	2310	2320

Fig. 10C(III)

	leu cys glu ala gln asp leu tyr OP	2330	2332
7027	CTG GGC TGC GAG GCA CAG GAC CTC TAC TGA GGGTGGCCACTGCAGCACCTGCCACTGCCGTACACCTCTCCCTCCTCAGCTCCAGGGCAGTGTCCCTCCCTGGCTTGCCTT		
7137	CTACCTTTGTGCTAAATCCTAGCAGACACTGCGCTTGAAGCTCCTGAATTAACTATCATCAGTCTGCAATTCTTTGGTGGGGGCCAGGAGGGTGCATCCAAATTTAACTTAACTCTTAC		
7257	CTATTTTCGAGCTGCTCCAGATTACTCTTCCTTCCCAATAAAGTAGG&AAAAAGAGTGAAGGAGAAACCTGCATGAAAGCATTCTTCCCTGAAAAAGTTAGGCCCTCTCAGAGTCACC		
7377	ACTTCCCTCTGTTGTAGAAAAAACAATATGTGATGTTAACAATTTCAAGGTTAAGCCTCATAGGTTTAAAAATAAAACTCTCAGTTGTTTATTATCTCTGAT		
7497	CAAGCATGGAACAAGACATGTTTCAGGATCAGATCAATACAATCTTGGAGTCAAAAGGCCAAATCATTTGGACAATCTGCAAAATGGAGAGAATACAATAACTACTACAGTAAAGTCTGTT		
7617	TCTGCTTCTTACACATAGATATAATTATGTTATTAGTCATTATGAGGGGCACATCTTATCTCCAAACTAGCATTCTTAAACTGAGAAATTATAGATGGGTTTCAAGAAATCCCTAAGT		
7737	CCCCTGAAATTATATAAGGCATTCTGTATAAATGCAAAATGTGCATTTTCTGACGAGTGTCCATAGATATAAAGCCATTGGTCTTAATCTGACCAATAAAAAAATAAGTCAGGAGGAT		
7857	GCAATTGTTGAAAGCTTTGAAATAAAATAACAATGCTCTCTTGAAATTTGTGATGGCCAGAAAGAAATGATGATGACATTAGGCTTCTAAAGGACATACATTTAATAATTTCTGTGGAA		
7977	ATATGAGGAAATCCATGGTTATCTGAGATAGGAGATACAAACTTTGTAATCTTAATATGCATCAGTTTACTCTCTCCCTCTACTAATTTTCCCTGCTGAAAAATAACACACAAAAAATGT		
8097	AACAGGGGAAATTTATATACCGTGAAGTGAAGTCTTACTTACATAGTTGAAATATCAAGGAGGTGAGAAGAAATTTGGACTGGTGAACACAGAAAAACACTCCAGTCTGCCATA		
8217	TCACCACACAATAGGATCCCCCTTCTTGCCCTCCACCCCATAGATTGTGAAGGGTTTACTGCTCTTCCATCTGACCCCTTCACTATGACTACACAGAAATCTCCTGATAGTAAA		
8337	GGGGCTGGAGGCAAGGATAAGTTATAGAGCAGTTGGAGGAAGCATCCAAAGATTGCAACCCAGGGGCAAAATGGAAACAGGAGATCCTAATATGAAAGAAAAATGGATCCCAATCTGAGA		bamHI
8457	AAAGGCAAAAGAAATGGCTACTTTTTTCTATGCTGGAGTATTTTCTAATAATCCCTGCTTGACCCCTTATCTGACCTCTTTGGAAACTATAACATAGCTGTACAGTATAGTCACAAATCCACA		
8577	AATGATGCAGGTGCAAAATGGTTATAGCCCTGTGAAGTCTTAAAGTTTAGAGGCTAACTTACAGAAATGAATAAGTTGTTTGTATAGCCGGTAGAGGAGTTAACCCCAAAGGTG		
8697	ATATGGTTTTTATTCCTGTTAIGTTTAACTTGATAATCTTATTTGGCATTCTTTTCCCATGACTATATACATCTCTATTTCTCAAAATGTTTCATGGAACTAGCTCTTTTATTTTCTGTC		
8817	TGGTTTCTTCAGTAATGAGTTAAATAAAACATTGACACATACAAAAAAA		

Fig. 11(I)

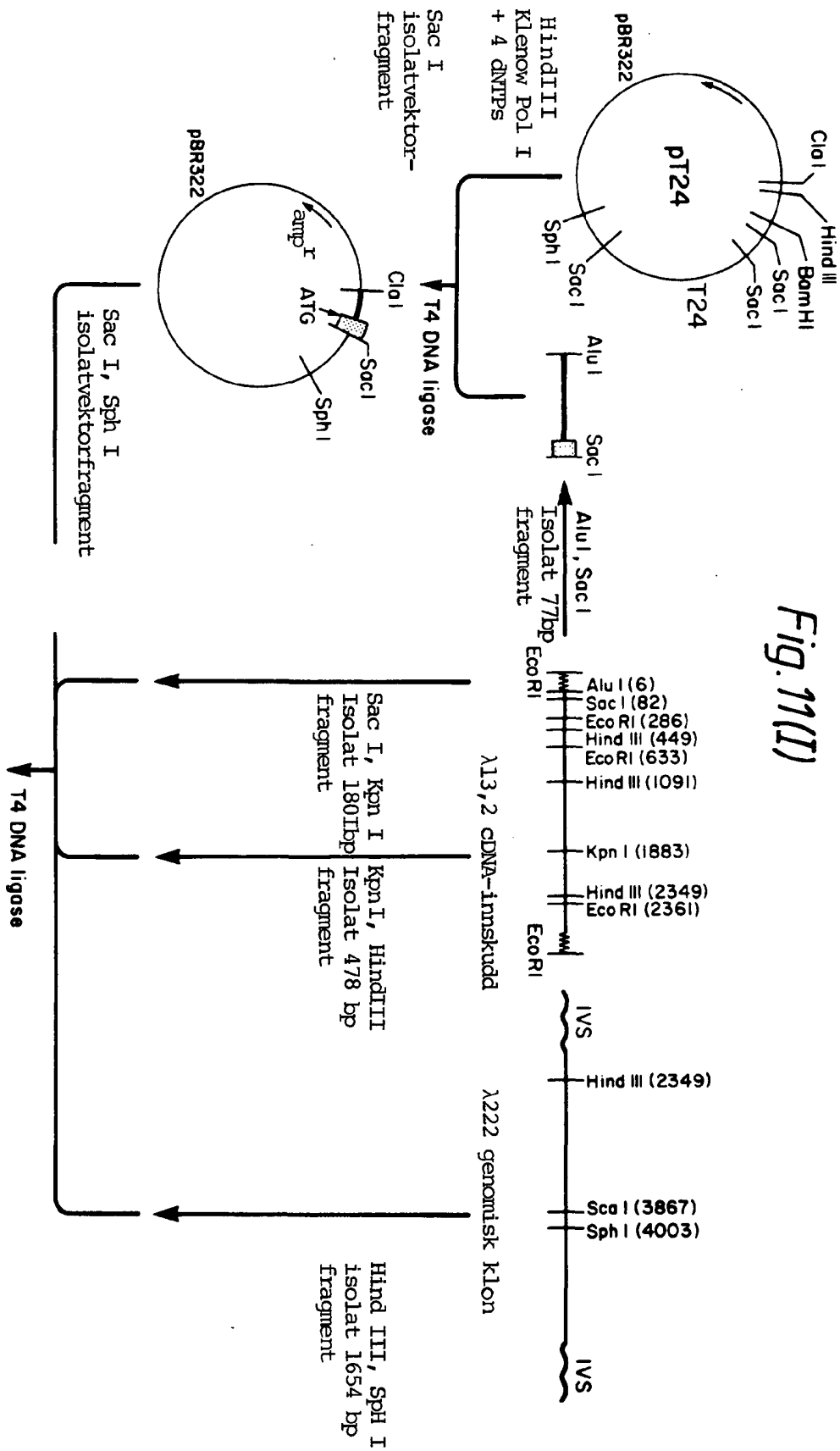
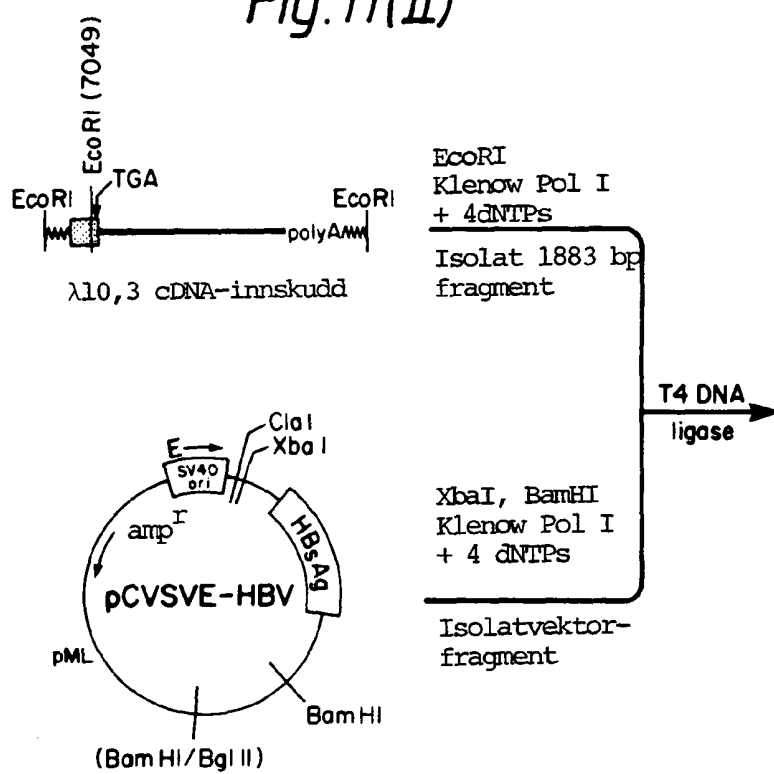


Fig. 11(II)





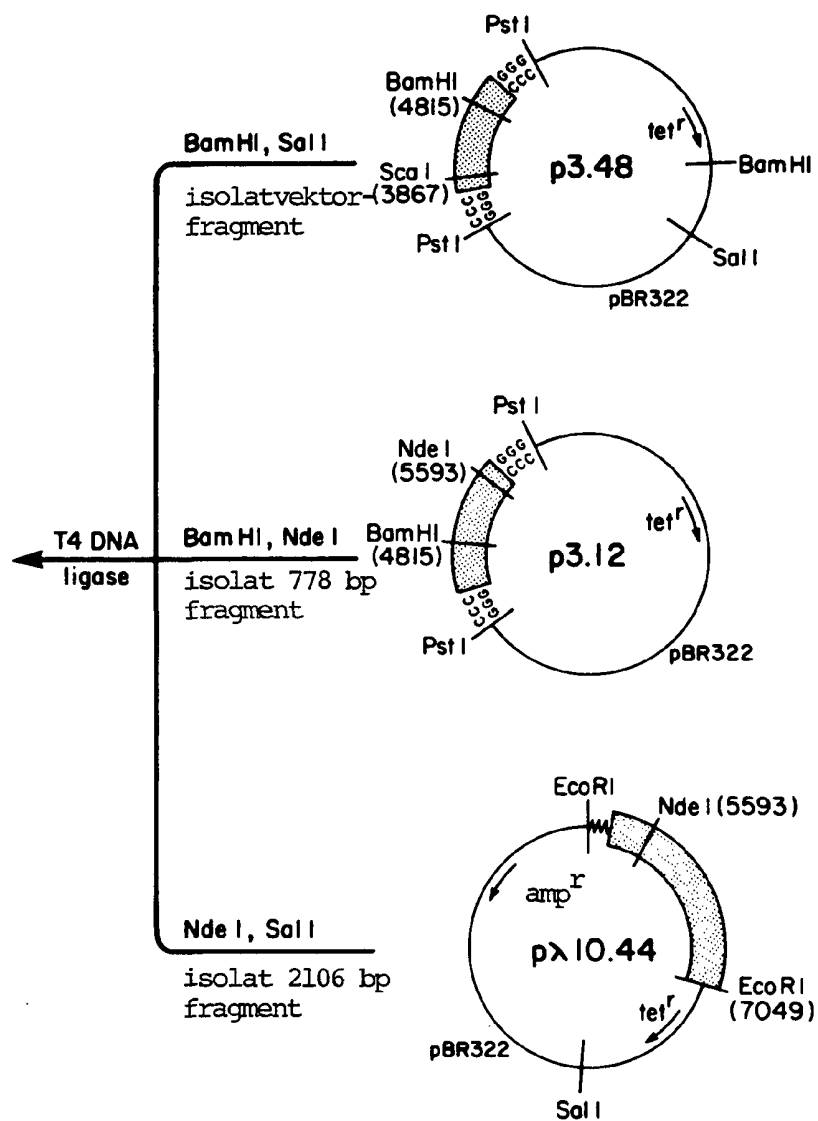
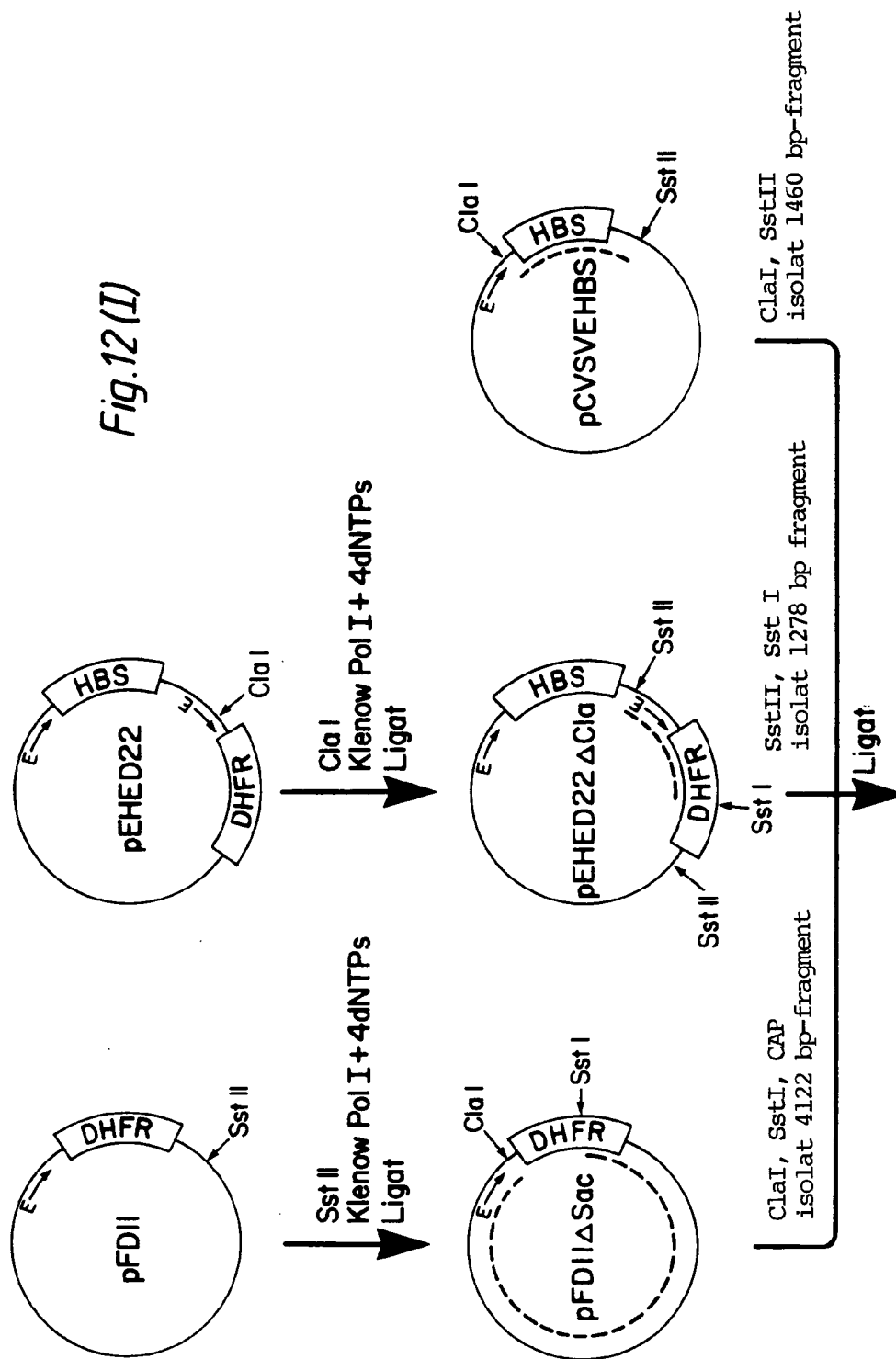
*Fig.11(IV)*

Fig.12 (I)



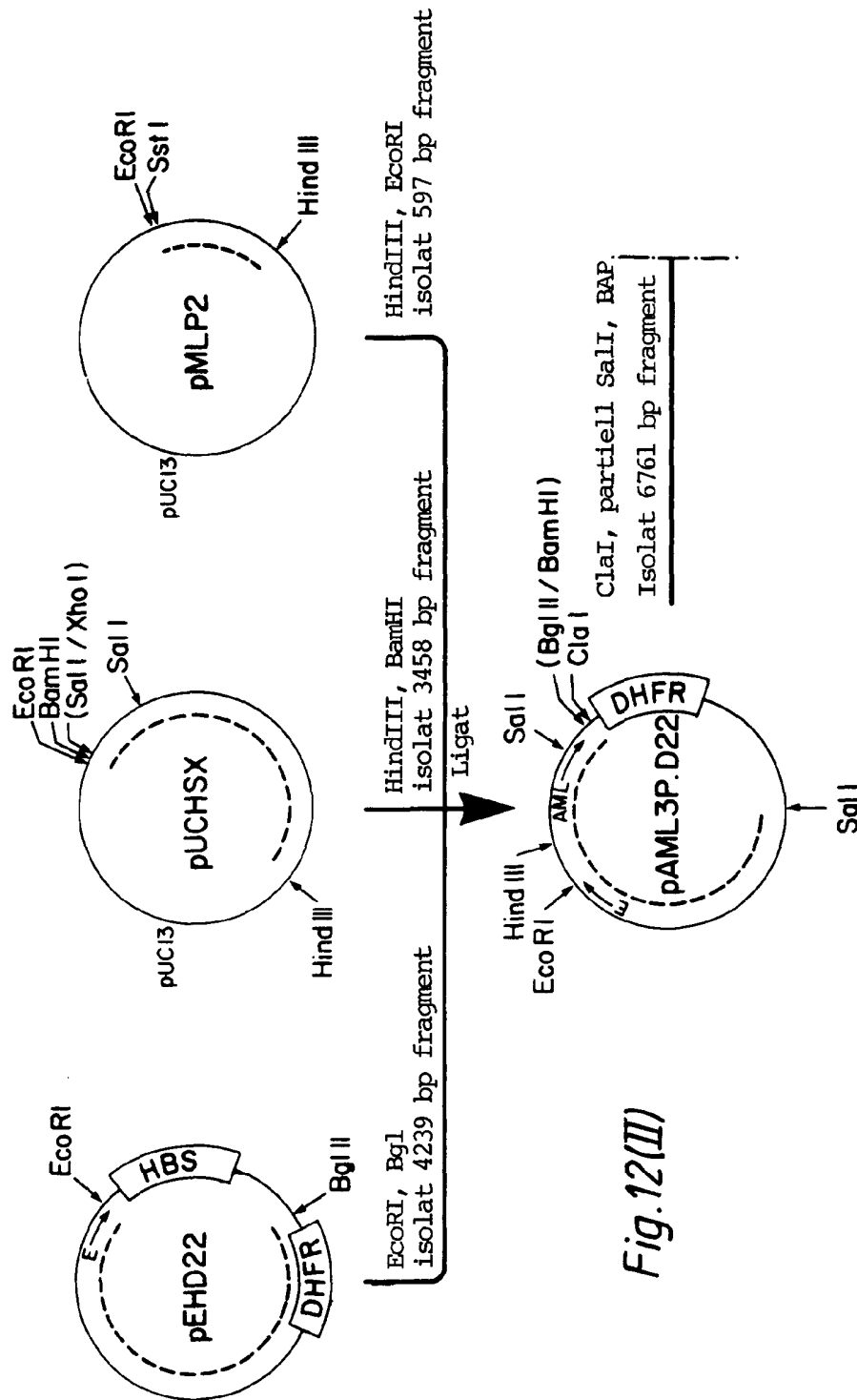


Fig.12(II)

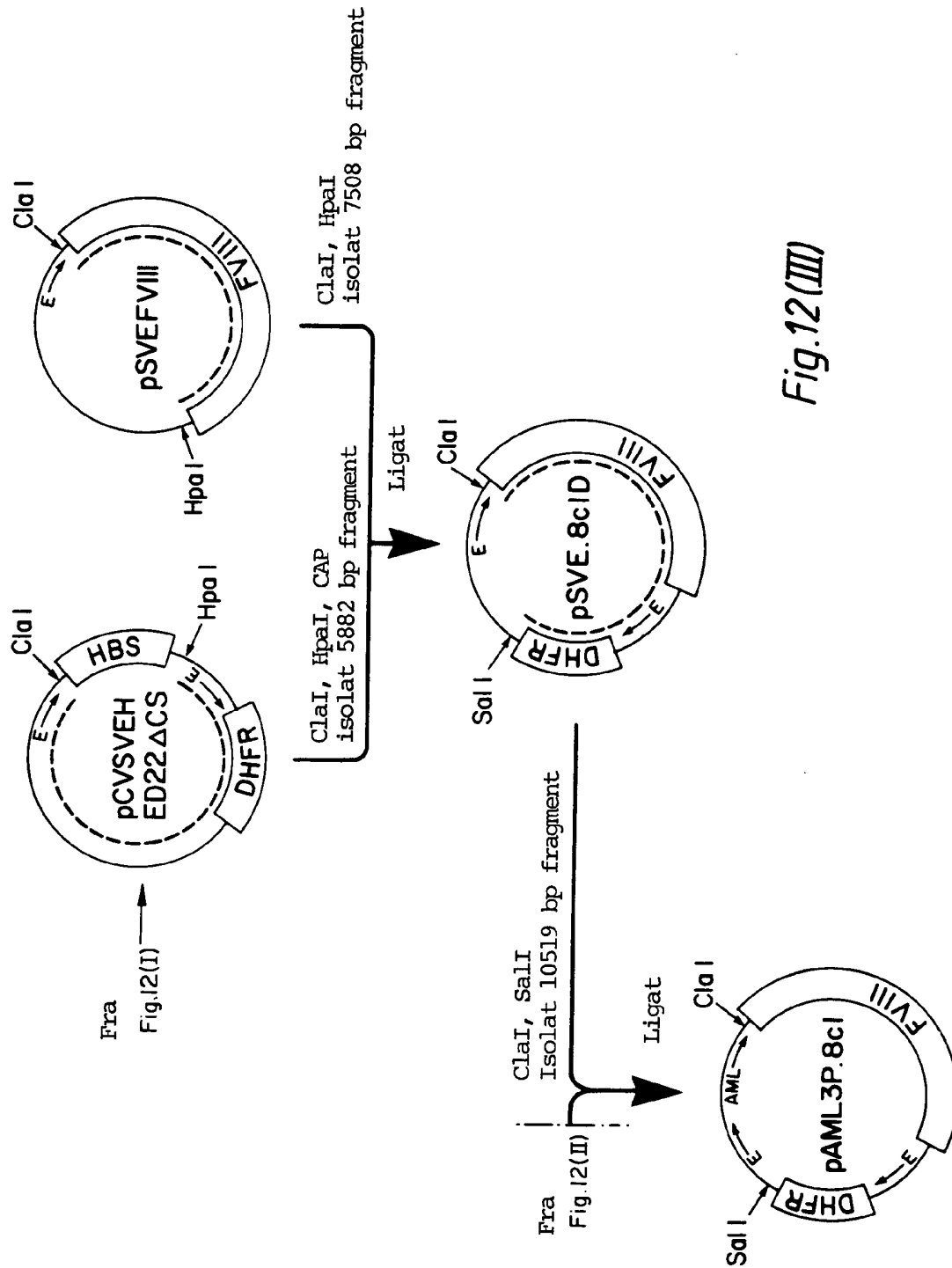


Fig.13.

Western-blot-analyse av faktor VIII ved bruk av fusjons-
protein-antisera

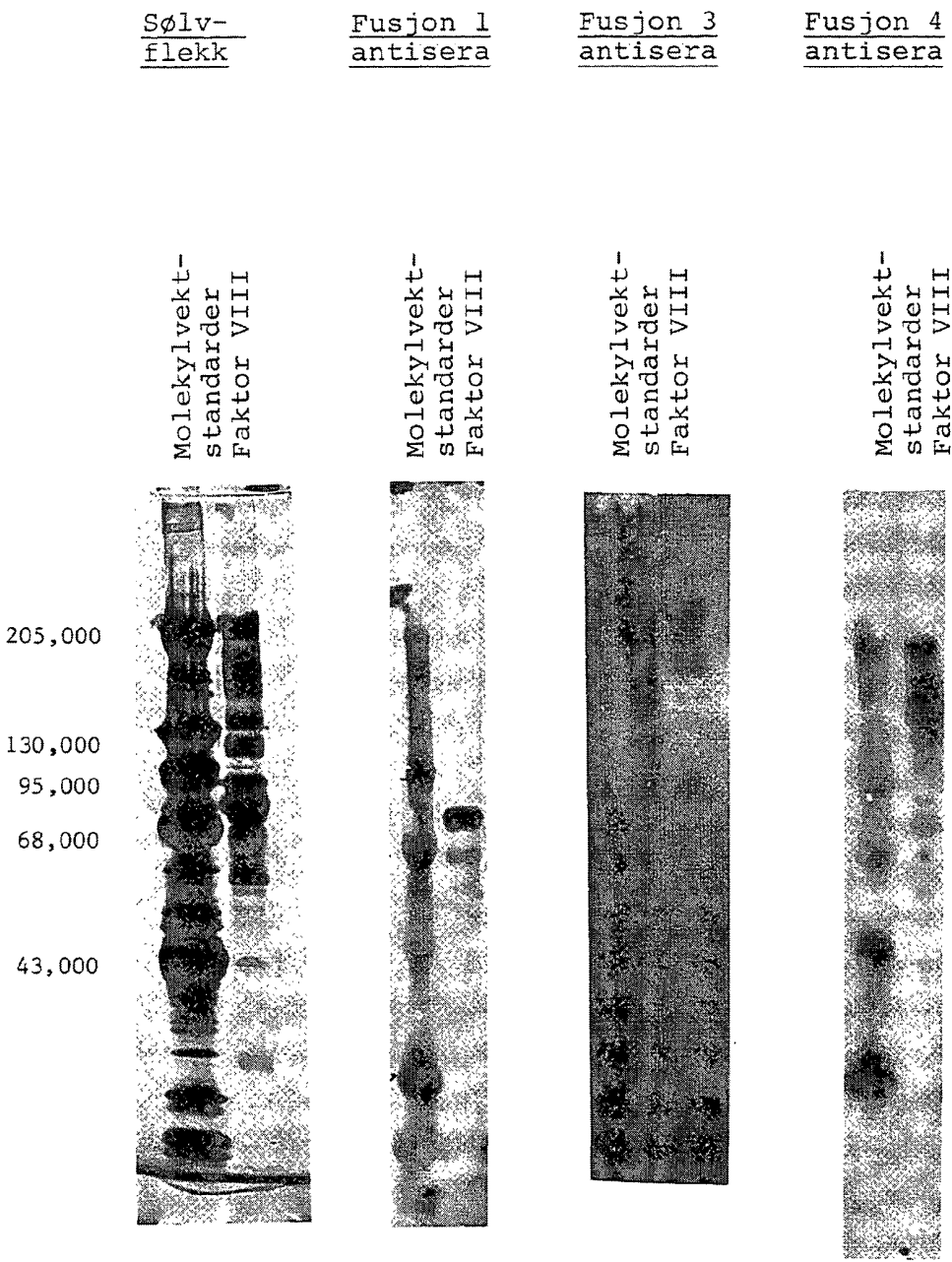
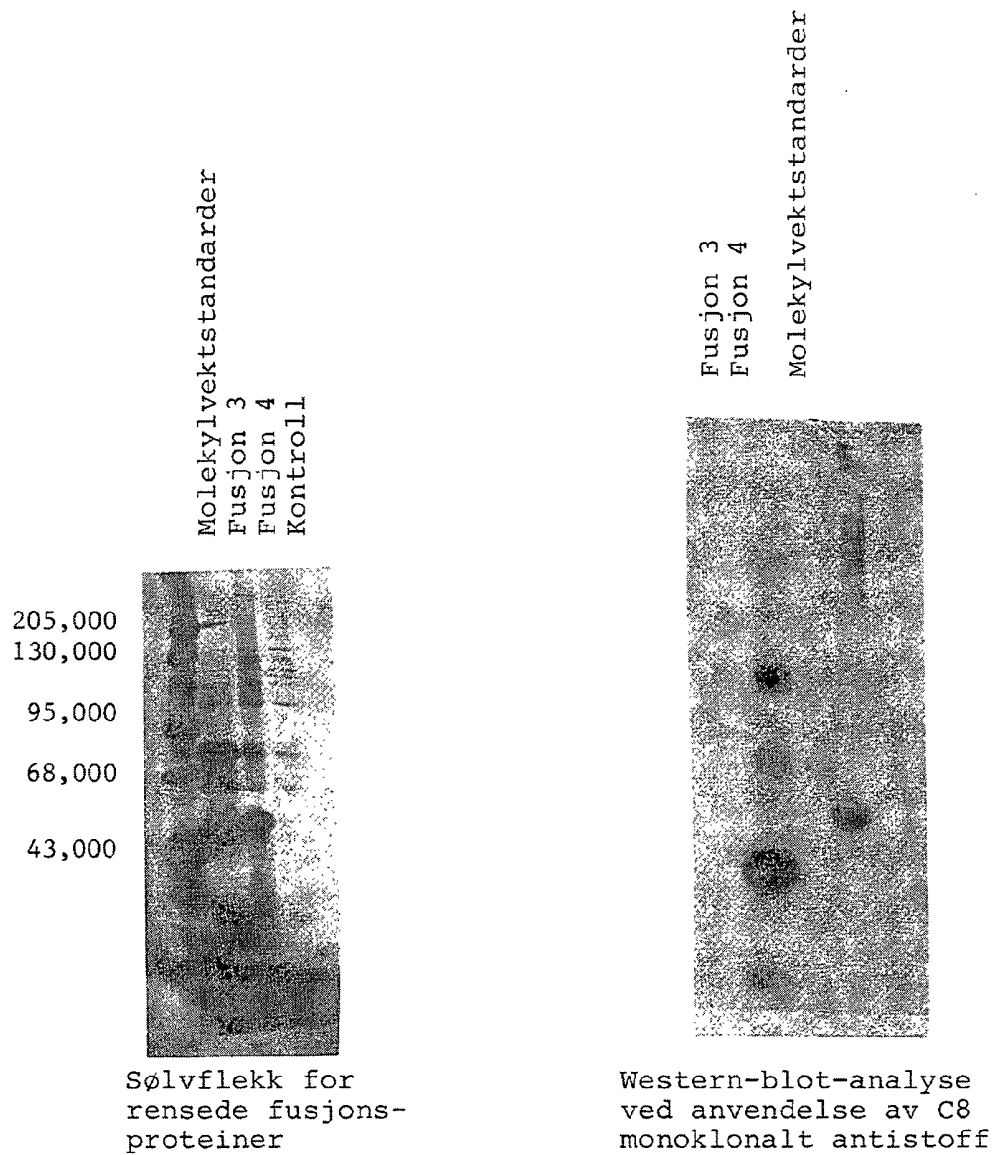


Fig. 14.

Analyse av fusjonsproteiner



174934

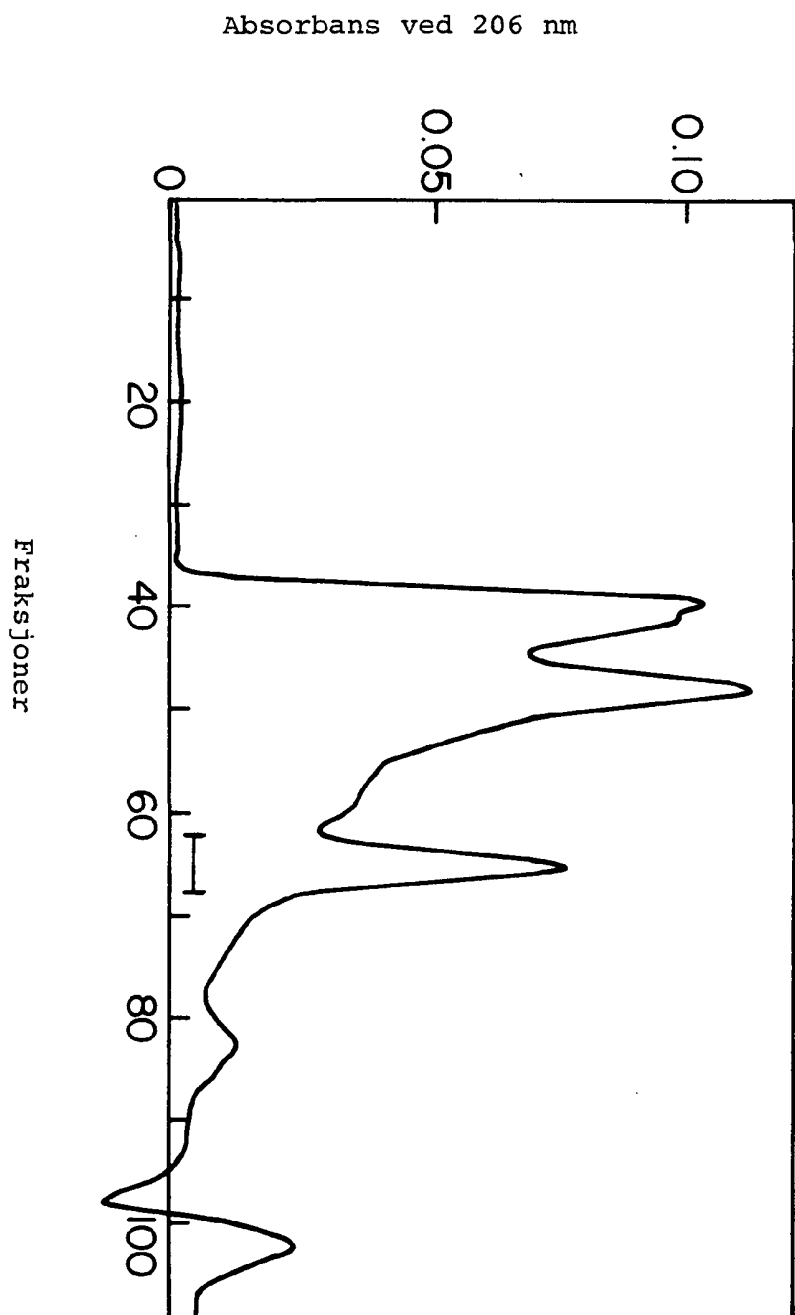


Fig.15.

174934

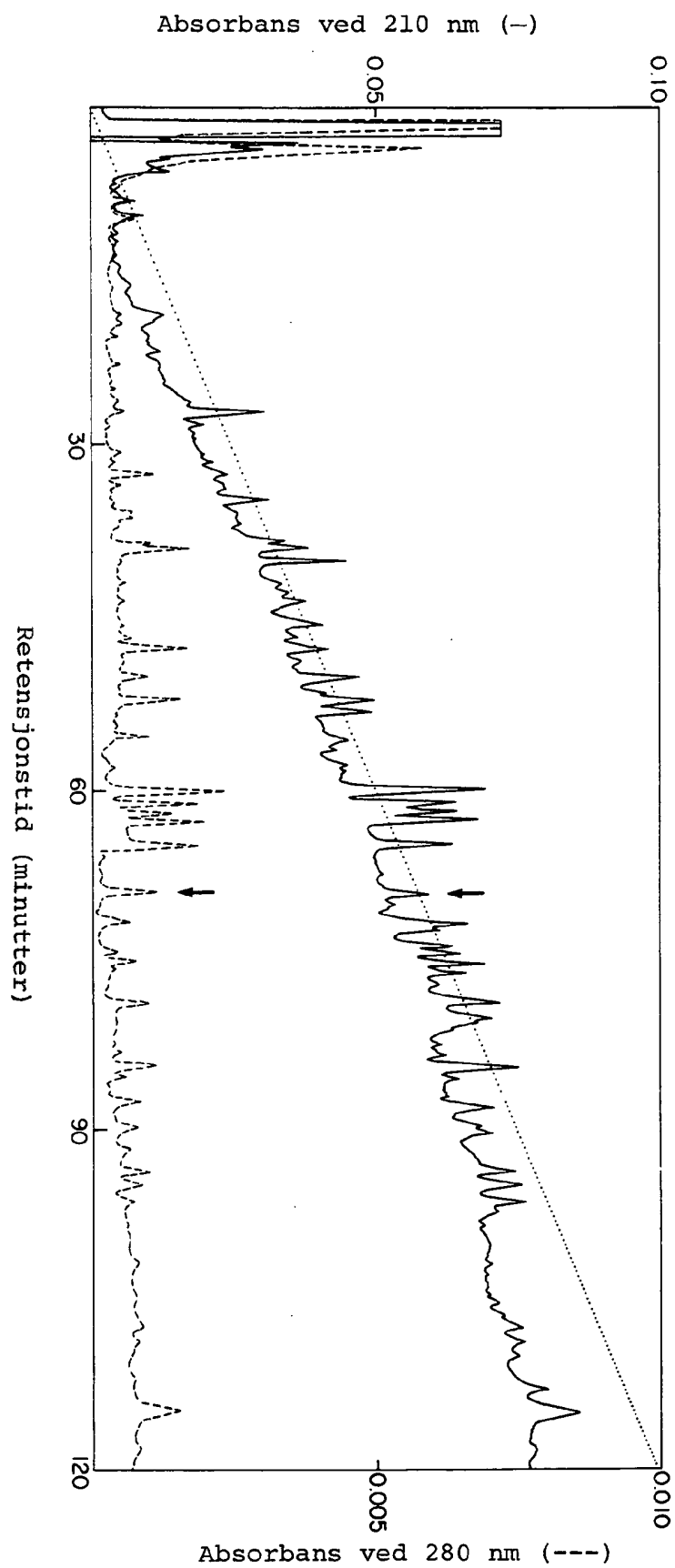


Fig. 16.

FIG.17.

Trombinaktivering av rekombinant faktor VIII

