



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 08 076 T2 2006.03.16**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 255 821 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 08 076.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/00020**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 904 786.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/057193**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.01.2001**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **09.08.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.11.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **29.12.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.03.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 9/64 (2006.01)**

C12N 15/57 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

179801 P 02.02.2000 US

189197 P 14.03.2000 US

(73) Patentinhaber:

Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind., US

(74) Vertreter:

Spott & Weinmiller, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**GERLITZ, Edward, Bruce, Indianapolis, US;
JONES, Edward, Bryan, Carmel, US**

(54) Bezeichnung: **PROTEIN C DERIVATE**

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

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

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft neue Polynukleotide, Polypeptide, die von ihnen kodiert werden und die Verwendung von solchen Polynukleotiden und Polypeptiden. Insbesondere betrifft die Erfindung Humanprotein C-Derivate mit Resistenz gegen Serpininaktivierung und erhöhter Antikoagulationsaktivität verglichen zu aktiviertem Protein C vom Wildtyp, ihre Herstellung und pharmazeutische Zusammensetzungen, die diese Humanprotein C-Derivate umfassen.

[0002] Das Protein C ist eine Serinprotease und ein natürlich auftretendes Antikoagulationsmittel, das eine Rolle spielt bei der Regulation der Hämostase durch die Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa in der Koagulations- oder Gerinnungskaskade. Humanprotein C wird in vivo hergestellt als ein einzelnes Polypeptid mit 461 Aminosäuren. Dieses Polypeptid durchläuft mehrfache posttranslationale Modifizierungen einschließlich 1) Spaltung von einer 42 Aminosäuresignalsequenz; 2) Spaltung von Lysin- und Argininresten (Positionen 156 und 157), um ein(en) 2-kettigen inaktiven Precursor oder Vorläufer oder Zymogen (eine 155 Aminosäurereste leichte Kette befestigt über eine Disulfidbrücke mit einer 262 Aminosäurereste schweren Kette) zu bilden; 3) Vitamin K abhängige Carboxylierung von neun Glutaminsäureresten, die angeordnet sind innerhalb der aminoterminalen 45 Reste (gla-Domäne); und 4) Kohlenhydratbefestigung an vier Stellen (eine in der leichten Kette und drei in der schweren Kette). Schließlich kann das 2-kettige Zymogen aktiviert werden durch Entfernung eines Dodecapeptids an dem N-Terminus der schweren Kette, was aktiviertes Protein C (aPC) erzeugt, das größere Enzymaktivität besitzt als das 2-kettige Zymogen.

[0003] Die Blutkoagulation oder -gerinnung ist ein hoch komplexer Prozess, der reguliert wird durch das Gleichgewicht zwischen Prokoagulationsmittel- und Antikoagulationsmittelmechanismen. Dieses Gleichgewicht bestimmt einen Zustand von entweder normaler Hämostase oder abnormaler pathologischer Thrombusbildung und den Fortschritt von z.B. einer Koronarthrombose, die zu akuten koronaren Syndromen führt (ACS (akute coronary syndromes); z.B. instabile Angina, Myokardinfarkt). Zwei Hauptfaktoren kontrollieren oder steuern dieses Gleichgewicht; die Bildung von Fibrin und die Aktivierung der nachfolgenden Aggregation von Plättchen, beide Prozesse kontrolliert oder gesteuert durch die Bildung des Enzyms Thrombin, das auftritt folgend auf die Aktivierung der Gerinnungskaskade. Thrombin im Komplex mit Thrombomodulin wirkt auch als wirksames Antikoagulans oder Antikoagulationsmittel, da es das Protein C Zymogen zu aPC aktiviert, das wiederum die Bildung von Thrombin inhibiert oder hemmt. Daher wirkt aPC durch die Rückkopplungs- oder Feedback-Regulation der Thrombinerzeugung über die Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa, als das vielleicht wichtigste Regulationsmittel zum Herabregeln oder als der wichtigste Abwärts-Regulator der Blutkoagulation oder Blutgerinnung, was zum Schutz gegen Thrombose führt. Zusätzlich zur Antikoagulation weist aPC antiinflammatorische Effekte auf und zeigt profibrinolytische Eigenschaften, die die Spaltung oder Lyse eines Gerinnsels erleichtern.

[0004] Arterienthrombose findet statt bei ACS als Antwort auf eine Endothelverletzung, typischerweise als Ergebnis einer Störung oder Spaltung von lipidreicher Plaque. Die Anfangsphasen dieser Antwort schließen Plättchenanhaftung, Aktivierung und den Zusammenbau von verschiedenen Prokoagulationsmitteln an der Stelle der Verletzung und auf den Oberflächen der aktivierten Plättchen ein. Die erhaltene Ausführung oder Vervollkommnung der Thrombinbildung spielt eine entscheidende Rolle bei dem Fortschreiten einer Thrombusbildung: sowohl durch Fibrinabscheidung als auch durch Plättchenaktivierung, was daher zur Verstärkung oder Potenzierung der Aktivierung des Koagulationssystems führt. Traditionelle (z.B. unfraktioniertes Heparin [UFH]) und aktuelle (z.B. Heparin mit niedrigem Molekulargewicht [LMWH] (low molecular weight heparin)) Antikoagulationstherapien für ACS stützen sich auf die Inhibierung oder Hemmung von Thrombin und/oder den Faktor Xa (z.B. die Heparine inaktivieren sowohl Thrombin als auch Xa durch dramatische Stimulierung ihrer Wechselwirkung mit Antithrombin-III). Jedoch aufgrund der sterischen Beschränkungen sind diese Mittel nicht so wirksam bei der Inhibierung von Gerinnsel gebundenem Xa oder Thrombin. Das Vermögen von aPC den Gerinnsel gebundenen Xa/Va-Komplex als Ziel zu finden und irreversibel zu inaktivieren dämpft oder unterdrückt die lokale Thrombinbildung und den Fortschritt der Thrombose. Daher stellt aPC einen Vorteil bereit gegenüber aktuellen Inhibitoren von Thrombin oder Xa, da der Effekt der verringerten Thrombinbildung bestehen bleiben wird, nachdem sich die Konzentration von aPC abgebaut hat.

[0005] Die entscheidende Rolle von aPC bei der Kontrolle oder Steuerung der Hämostase wird auch beispielhaft gezeigt durch die erhöhte Rate oder Geschwindigkeit der Thrombose bei heterozygotem Mangel, Protein C Resistenz (z.B. aufgrund der allgemeinen Faktor V Leiden-Mutation) und dem fatalen Ergebnis eines unbehandelten homozygoten Protein C Mangels. Aus Plasma abgeleitete und rekombinant erzeugte aPC zeigten, dass sie wirksame und sichere antithrombotische Mittel sind bei einer Vielzahl von Tiermodellen sowohl von venöser, als auch arterieller Thrombose.

[0006] Es wurde auch gezeigt, dass Protein C Werte abnormal gering sind bei den folgenden Krankheiten und Zuständen: disseminierte intravaskuläre Koagulation (DIC) [Fourrier et al., Chest 101: 816 bis 823, 1992], Sepsis [Gerson et al., Pediatrics 91: 418 bis 422, 1993], „Major Trauma“/„Major Surgery“ [Thomas et al., Am. J. Surg. 158: 491 bis 494, 1989], Verbrennungen [Lo et al., Burns 20: 186 bis 187 (1994)], Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS) [Hasegawa et al., Chest 105(1): 268 bis 277, 1994] und Transplantationen [Gordon et al., Bone Marrow Trans. 11: 61 bis 65 (1993)]. Außerdem gibt es zahlreiche Erkrankungen mit thrombotischen Abnormalitäten oder Komplikationen, bei denen aPC geeignet sein kann bei der Behandlung, wie: Heparin-induzierte Thrombocytopenie (HIT) [Phillips et al., Annals of Pharmacotherapy 28: 43 bis 45, 1994], Sichelzellenkrankheit oder Thalassämie [Karayalcin et al., The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology 11(3): 320 bis 323, 1989], virales hämorrhagisches Fieber [Lacy et al., Advances in Pediatric Infectious Diseases 12: 21 bis 53, 1997], thrombotische thrombocytopenische Purpura (TTP) und hämolytisches Urämysyndrom (HUS) [Moake, Seminars in Hematology 34(2): 83 bis 89, 1997]. Außerdem kann aPC bei der Kombination mit bakterizidem Permeabilität steigerndem Protein (BPI) brauchbar sein bei der Behandlung von Sepsis [Fisher et al., Crit. Care Med. (22(4): 553 bis 558, 1994].

[0007] Es ist weithin bekannt, dass die (Blut-)Plättcheninhibierung wirksam ist sowohl bei der Vermeidung als auch Behandlung einer thrombotischen Erkrankung. Jedoch die Verwendung von Thrombozytenaggregationshemmern (antiplatelet agents), wie Aspirin, erhöht das Risiko eines Blutens, was die Dosierung oder Dosis des Mittels und die Dauer der Behandlung beschränkt. Die Kombination von aPC und Thrombozytenaggregationshemmern führt zu einer Synergie, die die Reduzierung der Dosis sowohl von aPC als auch dem/den Thrombozytenaggregationshemmer(n) erlaubt. Die Reduzierung der Dosierungen der Mittel in einer Kombinationstherapie führt umgekehrt zu reduzierten Nebeneffekten, wie erhöhtem Bluten, das oft beobachtet wird bei der Kombination von einer Antikoagulans-/Thrombozytenaggregationshemmer-Therapie.

[0008] Verschiedene Verfahren zur Gewinnung von Protein C aus Plasma und zur Herstellung von Protein C, aPC und Protein C/aPC-Polypeptiden durch rekombinante DNA- oder DNS-Technologie sind in der Technik bekannt und wurden beschrieben. Siehe z.B. die US-Patente mit den Nummern US 4 775 624 A und US 5 358 932 A. Trotz Verbesserungen bei den Verfahren, um aPC durch rekombinante DNA-Technologie herzustellen, sind aPC und Polypeptide davon schwierig und kostspielig herzustellen.

[0009] Im Gegensatz zum Zymogenprotein C weist aktiviertes Protein C eine extrem kurze Halbwertszeit auf. Ein Hauptproblem für die kurze Halbwertszeit ist, dass Blutkonzentrationen von aPC reguliert werden durch Moleküle, die bekannt sind als Serpine (Serinproteaseinhibitoren), die kovalent an aPC binden, was einen inaktiven Serpin/aPC-Komplex bildet. Die Serpin/aPC-Komplexe werden gebildet, wenn sich aPC bindet und proteolytisch eine Schleife mit reaktivem oder aktivem Zentrum oder Stelle innerhalb des Serpin spaltet; nach der Spaltung das Serpin eine Konformationsveränderung durchläuft, die ein aPC irreversibel inaktiviert. Der Serpin/aPC-Komplex wird dann aus dem Blutstrom über hepatische Rezeptoren für den Serpin/aPC-Komplex eliminiert. Als Ergebnis weist aPC eine relativ kurze Halbwertszeit auf, verglichen mit dem Zymogen; etwa 20 min für aPC gegenüber etwa 10 h für humanes Protein C-Zymogen (Okajima et al., Thromb. Haemost. 63(1): 48 bis 53, 1990).

[0010] Daher stellt ein aPC-Derivat, das Resistenz gegenüber einer Serpininaktivierung zeigt, während es die gewünschten biologischen Aktivitäten von aPC (z.B. Antikoagulation, Fibrinolyse und antiinflammatorische Aktivitäten) beibehält, eine Verbindung bereit, die eine erhöhte Plasmahalbwertszeit aufweist und effektiv stärker ist als die Eltern- oder Stammverbindung, was beträchtlich reduzierte Dosierungskonzentrationen für therapeutische Anwendungen notwendig macht. Die Stärkevorteile sind insbesondere wichtig bei Krankheitszuständen, bei denen die Serpinwerte erhöht sind.

[0011] Durch wissenschaftliche Experimente, Analysen und Innovation identifizierten die Erfinder der vorliegenden Erfindung Serpin- und Protein C-Bindungsstellen, die entscheidend sind für die Bildung von Serpin/aPC-Komplexen. Als Ziel ausgewählte Aminosäurereste in dem aPC-Molekül wurden modifiziert und inhibierten überraschend die Bildung von dem Serpin/aPC-Komplex (der Komplex, der irreversibel aPC inaktiviert), während gleichzeitig die Spezifität des aPC-Derivats für die natürlichen Substrate von aPC (z.B. Faktor Va und VIIIa) beibehalten wurden. Außerdem wurde gefunden, dass die Hemmung oder Inhibierung einer Bindung des Serpin/Human-aPC-Derivat auftrat durch Substitution von einer oder mehreren der folgenden Aminosäuren: 194 (Leu), 195 (Ala), 228 (Leu), 249 (Tyr), 254 (Thr), 302 (Tyr) und 316 (Phe) der SEQ ID NO: 1 mit einer oder mehreren Aminosäure(n), ausgewählt aus Ser, Ala, Thr, His, Lys, Arg, Leu, Asn, Asp, Glu, Gly und Gln, mit der Maßgabe, dass die Position 194 nicht substituiert ist durch Leu und die Position 254 nicht substituiert ist durch Thr.

[0012] Außerdem stellt ein aPC-Derivat, das erhöhte Antikoagulationsaktivität zeigt, während es die anderen biologischen Aktivitäten von aPC beibehält (z.B. fibrinolytische und antiinflammatorische Aktivitäten), eine Verbindung bereit, die in wirksamer Weise stärker ist als die Stammverbindung, was beträchtlich verringerte Dosierungswerte für therapeutische Anwendungen notwendig macht.

[0013] Eine Steigerung der Humanprotein C Calcium- und Membranbindungsaktivität durch ortsgerichtete Mutagenese der gla-Domäne wurde berichtet von verschiedenen Forschern, z.B. Shen et al. (J. Biol. Chem. 273(47): 31086 bis 31091, 1998) und Shen et al. (Biochemistrz 36(51): 16025 bis 16031, 1997). Einige der darin dargestellten Mutanten zeigen auch höhere Aktivität von aPC bei Standardkoagulationsassays, verglichen zu aPC vom Wildtyp. Die WO 91 09 960 A und JP 3 072 877 A offenbaren Humanprotein C-Muteine, die jeweils erhöhte Resistenz gegenüber der Inaktivierung durch Humanplasmafaktoren zeigen und erhöhte Serumhalbwertszeit. Durch fortgesetzte wissenschaftliche Experimente, Analysen und Innovation identifizierten die Erfinder der vorliegenden Erfindung spezielle Stellen und modifizierten als Ziel gesetzte Aminosäurereste in der gla-Domäne von dem aPC-Molekül. Überraschenderweise wurde gefunden, dass erhöhte Antikoagulationsaktivität von dem aPC-Derivat auftrat, wenn spezielle ortsgerichtete Mutationen durchgeführt wurden. Insbesondere wurde gefunden, dass Substitutionen an den Aminosäurepositionen: 10 (His), 11 (Ser), 12 (Ser), 32 (Gln) und 33 (Asn) von der SEQ ID NO: 1 allein oder in Kombination davon eine erhöhte Antikoagulationsaktivität zeigen im Vergleich zu aPC vom Wildtyp oder Wildtyp aPC.

[0014] Demzufolge beschreibt die vorliegende Erfindung neue Humanprotein C-Derivate. Diese Humanprotein C-Derivate behalten die wichtige biologische Aktivität von dem Protein C vom Wildtyp bei und weisen größere Antikoagulationsaktivität auf und weisen längere Halbwertszeiten im menschlichen Blut auf als aPC vom Wildtyp. Daher stellen diese Verbindungen viele Vorteile bereit, z.B. weniger häufige Verabreichung und/oder geringere Dosierungen oder Dosen und daher eine Reduzierung in den Gesamtkosten der Herstellung und Therapie. Außerdem zeigen diese Verbindungen einen Vorteil gegenüber traditionellen Antikoagulationstherapien bei Krankheitszuständen wie ACS. Bedeutend kann die Erhöhung der Humanprotein C-Derivat-Antikoagulationsaktivität und Resistenz gegenüber der Serpininaktivierung erreicht werden, vorzugsweise durch 2 bis 6 Aminosäuresubstitutionen, die weniger wahrscheinlich immunogen sind im Vergleich zu Molekülen, die mehr als 6 Aminosäuresubstitutionen enthalten (US-Patent Nr. US 5 358 932 A; Holly et al., Biochemistry 33: 1876 bis 1880, 1994).

[0015] Die [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von den schweren und leichten Ketten des Protein C-Moleküls, einschließlich der Pre-Pro Leader (Signal) Sequenz.

[0016] Die vorliegende Erfindung stellt ein Humanprotein C-Derivat bereit, umfassend die SEQ ID NO: 1, die mindestens 2 Aminosäuresubstitutionen aufweist, ausgewählt aus den Gruppen, bestehend aus

- A) His an der Position 10 ist substituiert durch Gln; Ser an der Position 11 ist substituiert durch Gly; Ser an der Position 12 ist substituiert durch Lys; Gln an der Position 32 ist substituiert durch Glu; Asn an der Position 33 ist substituiert durch Asp oder Phe; und
- B) die Aminosäure an der Position 194, 195, 228, 249, 254, 302 oder 316 ist substituiert durch eine Aminosäure, ausgewählt aus Ser, Ala, Thr, His, Lys, Leu, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly und Gln,

wobei mindestens eine Substitution aus der Gruppe A) und eine Substitution aus der Gruppe B) vorliegt.

[0017] Die vorliegende Erfindung stellt auch rekombinante DNS-Moleküle bereit, welche die Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung kodieren, insbesondere solche, welche die SEQ ID NOS: 7, 8, 9 und 10 umfassen.

[0018] Ein weiterer Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung stellt Proteinsequenzen von den oben genannten Humanprotein C-Derivaten bereit, insbesondere solche, die die SEQ ID NOS: 3, 4, 5 und 6 umfassen, und die aktivierten Formen von diesen Humanprotein C-Derivaten.

[0019] Die vorliegende Erfindung stellt ferner Substanzen und Zusammensetzungen bereit, die brauchbar sind bei der Behandlung von Gefäßverschlussstörungen und hyperkoagulablen Zuständen, einschließlich Sepsis, disseminierte intravaskuläre Koagulation, Purpura fulminans, „Major Trauma“, „Major Surgery“, Verbrennungen, Adult Respiratory Distress Syndrome, Transplantationen, Tiefvenenthrombose, Heparin-induzierte Thrombocytopenie, Sichelzellenkrankheit, Thalassämie, virales hämorrhagisches Fieber, thrombotische thrombocytopenische Purpura und hämolytisches Urämiesyndrom.

[0020] Die Erfindung stellt ferner die Verwendung der Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung

bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung der oben genannten Krankheiten und Zustände bereit.

[0021] Eine noch andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von menschlichen Patienten mit genetisch prädisponierenden prothrombotischen Störungen. Beispiele von genetisch prädisponierenden prothrombotischen Störungen sind Protein C-Mangel, die Faktor-V-Leiden-Mutation und die G20210A-Mutation im Prothrombin-Gen.

[0022] Die vorliegende Erfindung stellt auch eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit, die einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder ein Verdünnungsmittel und ein Humanprotein C-Derivat dieser Erfindung umfasst.

[0023] Die vorliegende Erfindung stellt auch die Verwendung der humanaktivierten Protein C-Derivate dieser Erfindung zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung der oben genannten Indikationen bereit.

[0024] Verfahren und Gesichtspunkte der Herstellung der neuen Humanproteinderivate stellen ebenfalls einen Gesichtspunkt dieser Erfindung dar.

[0025] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung, wie sie beschrieben und beansprucht ist in dieser Beschreibung, sind die folgenden Begriffe, wie unten definiert.

[0026] Thrombozytenaggregationshemmer – ein oder mehrere Mittel allein oder in Kombination, die das Vermögen von (Blut-)Plättchen reduzieren zu aggregieren. Mittel, die in der Technik darunter verstanden werden und anerkannt sind, schließen solche ein, die zitiert sind, z.B. in Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19. Auflage, Band II, Seiten 924 bis 925, Mack Publishing Co. Solche Mittel schließen Aspirin (ASS), Clopidogrel, ReoPro® (Abciximab), Dipyridamol, Ticlopidin und IIb/IIIa Antagonisten ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0027] Zymogen – Protein C-Zymogen, wie in dieser Beschreibung verwendet, bezieht sich auf ausgeschiedene inaktive Formen, ob nun eine Kette oder zwei Ketten von Protein C oder Derivaten davon. Die Spaltung von Lysin- und Argininresten (Positionen 156 und 157) führt zu einem 2-kettigen (aus einer schweren und einer leichten Kette) inaktiven Zymogen.

[0028] Aktiviertes Protein C bezieht sich auf die aktivierte Form des Protein C-Zymogens, das hergestellt wird durch Entfernung von einem Dodecapeptid an dem N-Terminus der schweren Kette, was aktiviertes Protein C erzeugt.

[0029] Aktiviertes Protein C oder aPC bezieht sich auf rekombinantes aPC. aPC schließt ein und ist vorzugsweise rekombinantes humanes aPC, obwohl aPC auch andere Spezies einschließen kann, die Protein C proteolytische, amidolytische, esterolytische und biologische (Antikoagulations- oder gerinnungshemmende, antiinflammatorische oder profibrinolytische) Eigenschaften aufweisen.

[0030] Humanprotein C-Derivat(e) bezieht sich auf die rekombinant erzeugten Derivate dieser Erfindung, die sich von Humanprotein C vom Wildtyp unterscheiden, aber wenn sie aktiviert sind, die wichtigen Eigenschaften beibehalten, das heißt die proteolytischen, amidolytischen, esterolytischen und biologischen (Antikoagulations- oder gerinnungshemmende, antiinflammatorische, profibrinolytische) Aktivitäten. Die Definition der Humanprotein C-Derivate, wie sie in dieser Beschreibung verwendet wird, schließt auch die aktivierte Form der oben angegebenen Humanprotein C-Derivate ein.

[0031] Behandlung – beschreibt das Management und die Pflege von einem Patienten zum Zweck der Bekämpfung einer Krankheit, eines Zustands oder einer Störung, um entweder die Krankheit, den Zustand oder die Störung zu beseitigen oder prophylaktisch das Einsetzen oder den Beginn der Symptome oder Komplikationen dieser Krankheit, dieses Zustands oder dieser Störung zu vermeiden.

[0032] Kontinuierliche Infusion – fortwährende im Wesentlichen nicht unterbrochene Einführung oder Einleitung einer Lösung oder Suspension in eine Vene über einen spezifizierten Zeitraum.

[0033] Bolusinjektion – die Injektion eines Arzneimittels in einer definierten Menge (genannt Bolus) über einen Zeitraum bis zu etwa 120 min.

- [0034]** Geeignet zur Verabreichung – eine lyophilisierte Formulierung oder Lösung, die geeignet ist, um als therapeutisches Mittel gegeben zu werden.
- [0035]** Einheitsdosierungsform – bezieht sich auf physikalisch getrennte Einheiten, die geeignet sind als einheitliche Dosierungen für menschliche Patienten, wobei jede Einheit eine vorherbestimmte Menge eines aktiven oder wirksamen Materials enthält, berechnet, um den gewünschten therapeutischen Effekt zu erzeugen in Verbindung mit einem geeigneten pharmazeutischen Hilfsstoff.
- [0036]** Hyperkoagulabile Zustände – exzessive oder überhöhte Koagulabilität oder Gerinnbarkeit, verbunden mit disseminierter intravaskulärer Koagulation, präthrombotischen Zuständen, Aktivierung der Koagulation oder kongenitaler oder erworbener Mangel an Gerinnungsfaktoren, wie z.B. aPC.
- [0037]** Protein C-Mangel – Protein C-Mangel, wie er in der Beschreibung verwendet wird, kann kongenital oder erworben sein. Bei jedem Typ ist die Protein C-Konzentration im Kreislauf unterhalb der unteren Grenze des normalen Bereichs. Fachleute erkennen, dass der normale Zustand hergestellt wird durch ein Standardprotokoll unter Verwendung einer Ausrüstung und diagnostischen Kits, die von der FDA (Food and Drug Administration des US Departments of Health, Education and Welfare) anerkannt sind.
- [0038]** Pharmazeutisch wirksame Menge – eine therapeutisch wirksame Menge einer pharmazeutischen Verbindung. Die bestimmte Dosis der Verbindung, die gemäß der Erfindung verabreicht wird, wird natürlich bestimmt von dem behandelnden Arzt, der die bestimmten Umstände bewertet, die den Fall umgeben, welche die verabreichte Verbindung, den besonderen zu behandelnden Zustand, die Eigenschaften des Patienten und ähnliche Überlegungen einschließt.
- [0039]** Akute koronare Syndrome (ACS) – klinische Manifestationen oder Erscheinungsformen der koronaren Arteriosklerose kompliziert durch koronare Plaquezerstörung, überlagerter Koronarthrombose und gefährdeter Koronarblutfluss, der zu Koronarischämie und/oder Myokardinfarkt führt. Das Spektrum der akuten koronaren Syndrome schließt instabile Angina, nicht Q-wellenförmigen (das heißt nicht ST-Segmentbewertung) Myokardinfarkt und Q-Wellen (das heißt ST-Segmentbewertung)-Myokardinfarkt ein.
- [0040]** Gentherapie – eine therapeutische Maßnahme oder Kur, die die Verabreichung eines Vektors einschließt, der DNS oder DNA enthält, die ein therapeutisches Protein kodiert, direkt auf betroffene Zellen, wo das therapeutische Protein erzeugt werden wird. Zielgewebe für die Genabgabe schließt z.B. ein: Skelettmuskeln, vaskuläre glatte Muskeln und Leber. Vektoren schließen z.B. ein: Plasmid DNS, Liposomen, Protein-DNS-Konjugate und Vektoren basierend auf dem Adenovirus oder Herpesvirus. Die Gentherapie wurde z.B. beschrieben von Kessler et al., PNAS, USA, 93: 14082 bis 14087, 1996.
- [0041]** Thrombotische Störungen – eine Störung, die sich bezieht auf oder betroffen ist mit der Bildung oder Gegenwart von einem Blutgerinnsel innerhalb eines Blutgefäßes. Solche Störungen schließen Schlaganfall, abrupten Verschluss folgend auf Angioplastie oder das Einsetzen eines Stents und Thrombose als Ergebnis einer peripheren vaskulären Operation ein, sind aber nicht darauf beschränkt.
- [0042]** Purpura fulminans – Ekchymosen-Hautläsionen, Fieber, Hypotonie, verbunden mit bakterieller Sepsis, virale, bakterielle oder Protozoen-Infektionen. Disseminierte intravaskuläre Koagulation tritt in der Regel auf.
- [0043]** Gewebefaktorweginhibitor oder Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) – bezieht sich auf natürliche oder rekombinante Formen von TFPI. Man glaubt, dass dieses Protein gewebevermittelte Gerinnung in kleinen Blutgefäßen, die möglicherweise zu Organversagen und Tod führen, blockiert.
- [0044]** Serpin – beliebiges von einer Gruppe von strukturell verwandten Proteinen, die typischerweise Serinproteaseinhibitoren sind, dessen Inhibitionsaktivität oder Hemmaktivität bestimmt wird durch eine reaktive Stelle in einer hoch variablen und mobilen Peptidschleife und die den Protein C-Inhibitor (PCI) und α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT) einschließt, aber nicht darauf beschränkt ist.
 Inhibitorerkennungssequenz S2: der zweite Rest N-terminal zu der Spaltungsstelle von PCI oder α_1 -AT.
 Inhibitorerkennungssequenz S3': der dritte Rest C-terminal zu der Spaltungsstelle von PCI oder α_1 -AT.
 Inhibitorerkennungssequenz S4': der vierte Rest C-terminal zu der Spaltungsstelle von PCI oder α_1 -AT.
- [0045]** Protein C vom Wildtyp – der Typ des Protein C, der in einer natürlichen Population von Menschen vorherrscht im Gegensatz zu natürlichen Mutanten oder Labormutanten von Polypeptidformen von Protein C.

[0046] Bactericidal/Permeability-Increasing Protein (BPI) oder bakterizides permeabilitätssteigerndes Protein – schließt ein natürliches und rekombinant hergestelltes bakterizides permeabilitätssteigerndes (BPI) Protein; natürliche, synthetische und rekombinante biologisch aktive Polypeptidfragmente des BPI-Proteins; biologisch aktive Polypeptidvarianten des BPI-Proteins oder Fragmente davon, einschließlich Hybridfusionsproteine und -dimere; biologisch aktive Analogvarianten des BPI-Proteins oder Fragmente oder Varianten davon, einschließlich Cystein substituierte Analoga; und von BPI abgeleitete Peptide. Die vollständige Aminosäuresequenz von humanem BPI sowie die Nucleotidsequenz von DNS, die BPI kodiert, wurden beschrieben von Gray et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 9505. Rekombinante Gene, die BPI-Proteine kodieren und Verfahren zur Expression der BPI-Proteine, einschließlich BPI-Holoprotein und Fragmente von BPI, sind offenbart in dem US-Patent mit der Nummer US 5 198 541 A.

[0047] Die Aminosäureabkürzungen werden von dem US-Patent- und Markenamt (United States Patent and Trademark Office) akzeptiert, wie es festgelegt ist in 37 C. F. R. 1.822 (d)(1) (1998).

[0048] Die vorliegende Erfindung stellt Humanprotein C-Derivate bereit, einschließlich der aktivierten Formen davon, die erhöhte Antikoagulations- oder Blutgerinnungsaktivität und Resistenz gegenüber einer Serpininaktivierung zeigen, verglichen zu Protein C vom Wildtyp oder Wildtyp Protein C. Die aktivierte Form von aPC oder humanen aPC-Derivaten können hergestellt werden durch Aktivierung von rekombinantem humanem Protein C-Zymogen oder rekombinantem humanem Protein C-Derivat Zymogen in vitro oder durch direkte Sekretion der aktivierten Form von Protein C. Die Mittel, durch die die Aktivierung stattfindet, ist nicht entscheidend, und die Verfahrensgesichtspunkte dieser Erfindung schließen beliebige und alle Maßnahmen zur Aktivierung ein. Humanprotein C-Derivate können hergestellt werden in eukaryotischen Zellen, transgenen Tieren oder transgenen Pflanzen, einschließlich z.B. der Sekretion von humanen Nierenzellen 293 oder AV12-Zellen als ein Zymogen, dann gereinigt und aktiviert durch Techniken, die dem Fachmann bekannt sind.

[0049] Bevorzugte Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung schließen ein:
S11G:Q32E:N33D:L194S, S11G:Q32E:N33D:L194S:T254S, H10Q:S11G:Q32E:N33D:L194S,
H10Q:S11G:Q32E:N33D:L194S:T254S und aktivierte Formen davon.

[0050] Das Humanprotein C-Derivat S11G:Q32E:N33D:L194S enthält einen Glycinrest an der Position 11 anstelle eines Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glutaminsäurerest an der Position 32 anstelle des Glutaminrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Asparaginsäurerest an der Position 33 anstelle des Asparaginrests, der normalerweise an dieser Stelle gefunden wird, und ein Serin an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Stelle gefunden wird. Andere bevorzugte Aminosäuresubstitutionen an der Position 194 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0051] Das Humanprotein C-Derivat S11G:Q32E:N33D:L194S:T254S enthält einen Glycinrest an der Position 11 anstelle eines Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glutaminsäurerest an der Position 32 anstelle des Glutaminrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Asparaginsäurerest an der Position 33 anstelle des Asparaginrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 254 anstelle eines Threoninrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere bevorzugte Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 194 und 254 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His, mit der Maßgabe, dass die Position 11 nicht Ser ist, die Position 32 nicht Gln ist, 33 nicht Asn ist, 194 nicht Leu ist und 254 nicht Thr ist.

[0052] Das Humanprotein C-Derivat H10Q:S11G:Q32E:N33D:L194S enthält einen Glutaminrest an der Position 10 anstelle des Histidinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glycinrest an der Position 11 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glutaminsäurerest an der Position 32 anstelle des Glutaminrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Asparaginsäurerest an der Position 33 anstelle des Asparaginrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Mit der Lehre der vorliegenden Erfindung ist dem Fachmann ersichtlich, dass andere Aminosäuresubstitutionen an diesen Positionen dem erhaltenen Derivatmolekül erhöhte Antikoagulationsaktivität und Resistenz gegen Serpininaktivierung verleihen können. Beispiele von solchen Aminosäuresubstitutionen schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0053] Das Humanprotein C-Derivat H10Q:S11G:Q32E:N33D:L194S:T254S enthält einen Glutaminrest an der Position 10 anstelle des Histidinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glycin-

rest an der Position 11 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glutaminsäurerest an der Position 32 anstelle des Glutaminrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Asparaginsäurerest an der Position 33 anstelle des Asparaginrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 254 anstelle des Threoninrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere bevorzugte Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 194 und 254 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0054] Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung schließen die Humanprotein C-Derivate ein: S12K:L194S, S12K:L194S:T254S, H10Q:S11G:S12K:L194S, H10Q:S11G:S12K:L194S:T254S, S11G:L194S, H10Q:S11G:L194S, S11G:L194S:T254S, H10Q:S11G:L194S, S11G:L194S:T254S und aktivierte Formen davon, die erhöhte Anitkoagulationsaktivität und Resistenz gegen Serpininaktivierung zeigen im Vergleich zu aktiviertem Protein C vom Wildtyp.

[0055] Das Humanprotein C-Derivat S12K:L194S enthält einen Lysinrest an der Position 12 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere bevorzugte Aminosäuresubstitutionen an der Position 194 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0056] Das Humanprotein C-Derivat S12K:L194S:T254S enthält einen Lysinrest an der Position 12 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 254 anstelle eines Threoninrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere solche bevorzugte Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 194 und 254 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0057] Das Humanprotein C-Derivat H10Q:S11G:S12K:L194S enthält einen Glutaminrest an der Position 10 anstelle des Histidinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glycinrest an der Position 11 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Lysinrest an der Position 12 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere bevorzugte Aminosäuresubstitutionen an der Position 194 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0058] Das Humanprotein C-Derivat H10Q:S11G:S12K:L194S:T254S enthält vorzugsweise einen Glutaminrest an der Position 10 anstelle eines Histidinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glycinrest an der Position 11 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Lysinrest an der Position 12 anstelle der Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 254 anstelle des Threoninrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere bevorzugte Aminosäuresubstitutionen für die Positionen 194 und 254 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0059] Das Humanprotein C-Derivat S11G:L194S enthält einen Glycinrest an der Position 11 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere bevorzugte Aminosäuresubstitutionen für die Position 194 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0060] Das Humanprotein C-Derivat H10Q:S11G:L194S enthält vorzugsweise einen Glutaminrest an der Position 10 anstelle eines Histidinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glycinrest an der Position 11 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere bevorzugte Aminosäuresubstitutionen für die Position schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0061] Das Humanprotein C-Derivat S11G:L194S:T254S enthält einen Glycinrest an der Position 11 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der 254 anstelle des Threoninrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere solche bevorzugte Aminosäuresubstitutionen für die Positionen 194 und 254 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys,

Gln, Leu, Thr und His.

[0062] Zusätzlich bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung schließen ein die Protein C-Derivate: S11G:Q32E:L194S, S11G:Q32E:L194S:T254S, S11G:Q32E:N33F:L194S und S11G:Q32E:N33F:L194S:T254S und aktivierte Formen davon, die erhöhte Antikoagulationsaktivität und Resistenz gegen Serpininaktivierung zeigen im Vergleich zu aktiviertem Protein C vom Wildtyp.

[0063] Das Humanprotein C-Derivat S11G:Q32E:L194S enthält einen Glycinrest an der Position 11 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glutaminsäurerest an der Position 32 anstelle des Glutaminrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere bevorzugte solche Aminosäuresubstitutionen an der Position 194 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0064] Das Humanprotein C-Derivat S11G:Q32E:L194S:T254S enthält einen Glycinrest an der Position 11 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glutaminsäurerest an der Position 32 anstelle des Glutaminrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 254 anstelle des Threoninrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere bevorzugte solche Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 194 und 254 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0065] Das Humanprotein C-Derivat S11G:Q32E:N33F:L194S enthält einen Glycinrest an der Position 11 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glutaminsäurerest an der Position 32 anstelle des Glutaminrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Phenylalaninrest an der Position 33 anstelle des Asparaginrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere bevorzugte Aminosäuresubstitutionen an der Position 194 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0066] Das Humanprotein C-Derivat S11G:Q32E:N33F:L194S:T254S enthält einen Glycinrest an der Position 11 anstelle des Serinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Glutaminsäurerest an der Position 32 anstelle des Glutaminrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Phenylalaninrest an der Position 33 anstelle des Asparaginrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, einen Serinrest an der Position 194 anstelle des Leucinrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird, und einen Serinrest an der Position 254 anstelle des Threoninrests, der normalerweise an dieser Position gefunden wird. Andere bevorzugte Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 194 und 254 schließen ein: Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Gln, Leu, Thr und His.

[0067] Außerdem schließen Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung zusätzlich Deletionen, Additionen oder Substitutionen von Aminosäureresten der oben beschriebenen Protein C-Derivate ein, aber die zu Veränderungen führen, die die Grundeigenschaften dieser Erfindung nicht verändern. Aminosäuresubstitutionen können durchgeführt werden auf der Basis der Ähnlichkeit in der Polarität, Ladung, Löslichkeit, Hydrophobie, Hydrophilie und/oder der amphipathischen Eigenschaft der einbezogenen Reste. Daher schließen die Derivate der vorliegenden Erfindung Derivate ein, die eine Aminosäuresequenz aufweisen, die verschieden ist von den SEQ ID NOS: 3, 4, 5 und 6 durch konservative Substitutionen, das heißt solche, die einen Rest mit einem anderen von ähnlichen Eigenschaften substituieren. Typische Substitutionen sind darunter Ala, Val, Leu und Ile; unter Ser und Thr; unter den sauren Resten Asp und Glu; unter Asn und Gln; und unter den basischen Resten Lys und Arg; oder aromatischen Resten Phe und Tyr. Andere Derivate sind solche, in denen mehrere, 5–10, 1–5 oder 1–2 Aminosäuren substituiert, deletiert oder ausgelassen oder zugefügt oder addiert sind in beliebiger Kombination. Eine bevorzugte Ausführungsform basiert auf SEQ ID NO: 1, die die Addition einschließt von dem 42 Aminosäuresignalpeptid (Pre-Pro Leader) Sequenz, wie sie veranschaulicht ist in der [Fig. 1](#) und gezeigt ist in SEQ ID NO: 2.

[0068] Vorzugsweise sind die Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung nicht weiter substituiert oder modifiziert. Das heißt, die Substitutionen sind begrenzt auf die Derivate der vorliegenden Erfindung.

[0069] Die Erfindung stellt auch DNS-Verbindungen bereit zur Verwendung bei der Herstellung der Humanprotein C-Derivate. Diese DNS-Verbindungen umfassen die Kodierungssequenz für die leichte Kette von Humanprotein C-Zymogen oder Humanprotein C-Derivatzymogen, das unmittelbar benachbart dazu positioniert

ist strangabwärts und in dem Translationsleserahmen oder Übersetzungsleserahmen mit der Präpropeptidsequenz von Humanprotein C-Zymogen oder Humanprotein C-Derivatzymogen. Die DNS-Sequenzen kodieren vorzugsweise das Lys-Arg Dipeptid, das verarbeitet wird während der Reifung des Protein C-Moleküls, das Aktivierungspeptid und die schwere Kette des Humanprotein C-Derivats. Daher sind die Protein C-Derivate der vorliegenden Erfindung Polypeptidvarianten oder Polypeptidmutanten, die mindestens 2, vorzugsweise 2 bis 6, Aminosäuren aufweisen, die verschieden sind von der Sequenz des Protein C vom Wildtyp, wie sie identifiziert ist als SEQ ID NO: 1 (das die 42 Aminosäuresignalsequenz nicht enthält) oder die entsprechende Aminosäure vom Wildtyp in der SEQ ID NO: 2 (welche die 42 Aminosäuresignalsequenz enthält). Daher erkennt der Fachmann, dass ein Humanprotein C-Derivat, das sich von der Aminosäuresequenz von der Protein C-Sequenz vom Wildtyp, die als SEQ ID NO: 1 identifiziert ist, verwandtschaftlich der Protein C-Sequenz vom Wildtyp, wie sie identifiziert ist als SEQ ID NO: 2, entspricht, an der Aminosäureposition, die bestimmt wird nach Entfernung der 42 Aminosäuresignalsequenz. Außerdem erkennt der Fachmann, dass vor der Aktivierung die Spaltung der Lysin- und Argininreste (Positionen 156 und 157) stattfindet.

[0070] Die Fachleute erkennen, dass aufgrund der Entartung oder Degeneration des genetischen Codes eine Vielzahl von DNS-Verbindungen die oben beschriebenen Derivate kodieren kann. Das US-Patent mit der Nummer US 4 775 624 A offenbart die Wildtypform des Humanprotein C-Moleküls. Der Fachmann könnte leicht ohne weiteres bestimmen, welche Veränderungen in den DNS-Sequenzen die genauen Derivate, wie sie in dieser Beschreibung offenbart sind, kodieren könnten. Die Erfindung ist nicht auf die speziellen DNS-Sequenzen, die offenbart sind, beschränkt. Demzufolge ist die unten und in den begleitenden Beispielen folgende Beschreibung des Aufbaus für die bevorzugten DNS-Verbindungen nur zur Veranschaulichung gedacht und beschränkt den Umfang oder Schutzbereich der Erfindung nicht.

[0071] Alle der DNS-Verbindungen der vorliegenden Erfindung wurden hergestellt unter Verwendung der ortsgerichteten Mutagenese, um bestimmte Positionen innerhalb des Humanprotein C-Zymogens zu verändern. Die Technik zur Modifizierung der Nucleotidsequenz durch ortsgerichtete Mutagenese ist den Fachleuten gut bekannt. Siehe z.B. Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe (1989).

[0072] Die Humanprotein C-Derivate können hergestellt werden durch Techniken, die im Stand der Technik gut bekannt sind, unter Verwendung von eukaryotischen Zelllinien, transgenen Tieren oder transgenen Pflanzen. Die Fachleute werden unmittelbar verstehen, dass geeignete eukaryotische Wirtszelllinien HepG2, LLC-MK₂, CHO-K1, 293 oder AV12-Zellen, Beispiele, die beschrieben sind in dem US-Patent Nr. US 5 681 932 A einschließen, aber nicht darauf beschränkt sind. Außerdem sind Beispiele einer transgenen Produktion von rekombinanten Proteinen beschrieben in den US-Patenten mit den Nummern US 5 589 604 A und US 5 650 503 A.

[0073] Fachleute erkennen, dass eine Vielzahl von Vektoren brauchbar sind bei der Expression von einer DNS-Sequenz, die von Interesse ist, in einer eukaryotischen Wirtszelle. Vektoren, die geeignet sind zur Expression in Säugerzellen, schließen ein: pGT-h, pGT-d; pCDNA 3.0, pCDNA 3.1, pCDNA 3.1+Zeo und pCDNA 3.1+Hygro (Invitrogen); und pIRES/Hygro und pIRES/neo (Clontech), sind aber nicht darauf beschränkt. Der bevorzugte Vektor der vorliegenden Erfindung ist pIG3, wie in Beispiel 2 beschrieben.

[0074] Andere Sequenzen können auch erwünscht sein, die die Regulation der Expression der Proteinsequenzen, bezogen auf das Wachstum der Wirtszellen, erlauben. Solche regulatorischen Sequenzen sind den Fachleuten bekannt, und Beispiele schließen solche ein, die die Expression eines Gens, das an- oder ausgeschaltet wird, als Antwort auf einen chemischen oder physikalischen Stimulus, einschließlich der Gegenwart einer regulatorischen Verbindung, verursachen. Andere Typen der regulatorischen Elemente können auch in dem Vektor vorliegen, z.B. Enhancersequenzen.

[0075] Die Kontrollsequenzen und andere regulatorische Sequenzen können gebunden oder ligiert werden an die kodierende Sequenz vor der Insertion in einen Vektor, wie die oben beschriebenen Klonierungsvektoren. Alternativ oder bei einer weiteren Ausführungsform kann die Kodierungssequenz direkt in einen Expressionsvektor, der schon die Kontrollsequenzen und eine geeignete Restriktionsstelle enthält, kloniert werden.

[0076] In einigen Fällen kann es notwendig sein, die Kodierungssequenz zu modifizieren, sodass sie an den Kontrollsequenzen befestigt ist mit der geeigneten Orientierung, das heißt um den geeigneten Leserahmen beizubehalten.

[0077] Die Humanprotein C-Derivate, die nach einem beliebigen nach diesen Verfahren hergestellt werden

können, müssen posttranslationalen Modifizierungen unterliegen, wie der Addition der zehn gamma-Carboxyglutamate, der Addition von einem Erythro-beta-hydroxy-Asp (beta-Hydroxylierung), der Addition von vier Asn-verbundenen Oligosacchariden (Glycosylierung) und der Entfernung der Führungs- oder Leadersequenz (42 Aminosäurereste). Solche posttranslationalen Modifizierungen sind notwendig für eine wirksame Herstellung und Sekretion der Protein C-Derivate aus Säugerzellen.

[0078] Es ist im Stand der Technik bekannt, dass posttranslationale Modifizierungen von rekombinanten Proteinen, wie den Humanprotein C-Derivaten der vorliegenden Erfindung, verschieden sein können in Abhängigkeit davon, welche Wirtszelllinie verwendet wird für die Expression des rekombinanten Proteins. Z.B. kann die posttranslationale Modifizierung der gamma-Carboxylierung, die entscheidend ist für die Antikoagulationsaktivität der Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung höher, etwas niedriger oder viel niedriger sein als aus dem Plasma stammende Wildtypprotein C gamma-Carboxylierung, in Abhängigkeit von der verwendeten Wirtszelllinie (Yan et al., Bio/Technology 8(7): 655 bis 661, 1990). Solche Unterschiede in der gamma-Carboxylierung stellt einen Basis bereit für die Verwendung der ortsgerichteten Mutagenese, um besondere Positionen innerhalb des Humanprotein C-Moleküls zu verändern, die zu einer Erhöhung der Antikoagulationsaktivität führen.

[0079] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht in der erhöhten Produktion der Konzentrationen und erhöhten spezifischen Aktivität von geeignetem gamma-carboxylierten Protein C und/oder Protein C mit erhöhter Antikoagulationsaktivität und Resistenz gegen Serpininaktivierung, erhalten durch die Inhibierung der Phosphorylierung auf dem Serinrest an der Position 12, wie beschrieben in Beispiel 1. Diese Inhibierung der Phosphorylierung kann erreicht werden durch Austausch des Serinrests an der Position 12 durch eine nicht phosphorylierbare Aminosäure durch ortsgerichtete Mutagenese, das heißt einer anderen Aminosäure als Ser, Tyr oder Thr oder durch die Inhibierung der Kinase, die verantwortlich ist für die Phosphorylierung des Serinrests an der Position 12, z.B. durch Einschluss eines nicht toxischen Kinaseinhibitors in dem Gewebekulturmedium, das verwendet wird zur Kultivierung der Wirtszelllinie.

[0080] Daher ist eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein Humanprotein C-Derivat mit erhöhter Antikoagulationsaktivität und Resistenz gegen Serpininaktivierung im Vergleich zu aktiviertem Protein C vom Wildtyp, das hergestellt wird durch das Verfahren, das umfasst: eine Transformation einer Wirtszelle mit einem Vektor, der Nucleinsäure enthält, die ein Humanprotein C-Derivat kodiert; Kultivierung der Wirtszelle in einem Medium, das geeignet ist zur Expression des Humanprotein C-Derivats; Isolierung des Humanprotein C-Derivats aus dem Kulturmedium; und Aktivierung des Humanprotein C-Derivats.

[0081] Verfahren zur Aktivierung von Zymogenformen von Humanprotein C und Humanprotein C-Derivaten zu aktiviertem Humanprotein C und aktivierten Humanprotein C-Derivaten sind alt und im Stand der Technik gut bekannt. Humanprotein C kann aktiviert werden durch Thrombin allein, durch einen Thrombin/Thrombomodulinkomplex, durch RVV-X, eine Protease aus Russell's Viperngift, durch Pankreas-Trypsin oder durch andere proteolytische Enzyme.

[0082] Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von aPC-Derivaten mit erhöhter Antikoagulationsaktivität und Resistenz gegen Serpininaktivierung im Vergleich zu aPC vom Wildtyp bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von akuten koronaren Syndromen umfassend Myokardinfarkt und instabile Angina.

[0083] Die rekombinanten Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung sind auch brauchbar für die Behandlung von thrombotischen Störungen, wie Schlaganfall, abrupter Verschluss folgend auf eine Angioplastie oder die Einsetzung eines Stents und Thrombose als Ergebnis einer peripheren vaskulären Operation.

[0084] Außerdem sind die rekombinanten Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung brauchbar für die Behandlung von vaskulären Verschlussstörungen oder hyperkoagulablen Zuständen, die verbunden sind mit Sepsis, disseminierter intravaskulärer Koagulation, „Major Trauma“, „Major Surgery“, Verbrennungen, Adult Respiratory Distress Syndrome, Transplantationen, tiefe Venenthrombose, Heparin-induzierte Thrombocytopenie, Sichelzellerkrankung, Thalassämie, virales hämorrhagisches Fieber, thrombotische thrombocytopenische Purpura und hämolytisches Urämiesyndrom. Bei einer weiteren Ausführungsform sind die rekombinanten Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung brauchbar für die Behandlung von Sepsis in Kombination mit bakterizidem Permeabilität steigerndem (PBI) Protein. Unter einem noch weiteren Gesichtspunkt dieser Erfindung werden die aktivierten Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung kombiniert mit einem oder mehreren Thrombozytenaggregationshemmer(n), um verschiedene thrombotische Störungen zu behandeln oder solchen vorzubeugen.

[0085] Die rekombinanten Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung sind brauchbar für die Behandlung von akutem arteriellem thrombotischem Verschluss, Thromboembolismus oder Stenose bei koronaren, zerebralen oder peripheren Arterien oder in vaskulären Transplantaten in Kombination mit einem thrombolytischen Mittel, wie einem Gewebefibrinolyseaktivator, Streptokinase und verwandten Verbindungen oder Analoga davon.

[0086] Bei einer weiteren Ausführungsform sind die rekombinanten Humanprotein C-Derivate der vorliegenden Erfindung brauchbar für die Behandlung von Sepsis in Kombination mit einem Gewebefaktor-Inhibitor.

[0087] Ein weiterer Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung umfasst die Verwendung von den Humanprotein C-Derivaten der vorliegenden Erfindung bei der Herstellung von einem Medikament für die Behandlung der Krankheiten und Zustände, die verursacht werden oder sich ergeben aus einem Protein C-Mangel, wie er in dieser Beschreibung definiert ist. Dieser Gesichtspunkt der Erfindung umfasst beliebige und alle Modifikationen an einem aPC-Molekül, was zu erhöhter Antikoagulationsaktivität und Resistenz gegen Serpininaktivierung führt im Vergleich zu Wildtyp aPC.

[0088] Die Humanprotein C-Derivate können gemäß bekannten Verfahren formuliert werden, um eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitzustellen, die als Wirkstoff oder wirksames Mittel oder aktives Mittel ein aPC-Derivat und ein pharmazeutisch annehmbares Trägermittel (bulking agent) umfasst. Z.B. würde eine gewünschte Formulierung eine solche sein, die ein stabiles lyophilisiertes Produkt ist von hoher Reinheit, umfassend ein Trägermittel, wie Sucrose, Trehalose oder Raffinose; ein Salz, wie Natriumchlorid oder Kaliumchlorid; einen Puffer, wie Natriumcitrat, Trisacetat oder Natriumphosphat, bei einem pH von etwa 5,5 bis etwa 6,5; und ein aktiviertes Humanprotein C-Derivat.

[0089] Die Human-aPC-Derivate der vorliegenden Erfindung können bei geeigneten Dosierungskonzentrationen verabreicht werden, die in der Technik verstanden und als vorteilhaft erachtet werden und bestimmt werden durch den behandelnden Arzt, der die besonderen Umstände, die den Fall umgeben, bewertet. Insbesondere kann die Menge des Human-aPC-Derivats, das verabreicht wird, von 0,01 µg/kg/h bis etwa 50 µg/kg/h betragen. Insbesondere kann die Menge des humanen aPC-Derivats, das verabreicht wird, etwa 0,1 µg/kg/h bis etwa 25 µg/kg/h betragen. Ganz besonders bevorzugt kann die Menge des humanen aPC-Derivats, das verabreicht wird, etwa 0,1 µg/kg/h bis etwa 15 µg/kg/h betragen. Noch bevorzugter wird die Menge des humanen aPC-Derivats, das verabreicht wird, etwa 1 µg/kg/h bis etwa 15 µg/kg/h betragen. Die am meisten bevorzugten Mengen des humanen aPC-Derivats, das verabreicht wird, werden etwa 5 µg/kg/h oder etwa 10 µg/kg/h betragen.

[0090] Vorzugsweise werden die humanen aPC-Derivate parenteral verabreicht, um eine Abgabe in dem Blutstrom in einer wirksamen Form zu gewährleisten durch Injektion einer Dosis von 0,01 mg/kg/Tag bis etwa 1,0 mg/kg/Tag, ein- bis sechsmal am Tag über einen Zeitraum von 1 bis 10 Tagen. Insbesondere können die humanen aPC-Derivate 3 Tage lang zweimal am Tag (B. I. D.) verabreicht werden.

[0091] Bei einer weiteren Ausführungsform werden die humanen aPC-Derivate in einer Dosis von etwa 0,01 µg/kg/h bis etwa 50 µg/kg/h verabreicht durch eine kontinuierliche Infusion über einen Zeitraum von 1 bis 240 h.

[0092] Die bevorzugten Plasmakonzentrationsbereiche, die erhalten werden aus der Menge des Humanprotein C-Derivats, das verabreicht wird, werden 0,02 ng/ml bis weniger als 100 ng/ml betragen.

[0093] Bei einer weiteren Ausführungsform wird das humane aPC-Derivat verabreicht durch Injektion von einer Portion (1/3 bis 1/2) der geeigneten Dosis pro Stunde als eine Bolusinjektion über einen Zeitraum von etwa 5 min bis etwa 120 min, gefolgt von einer kontinuierlichen Infusion der geeigneten Dosis während bis zu 240 h.

[0094] Bei einer weiteren Ausführungsform wird das humane aPC-Derivat durch lokale Abgabe durch einen Intrakoronarkatheter verabreicht als eine Hilfe oder Zusatz zu einer hoch riskanten Angioplastie (mit und ohne Stent und mit oder ohne Kombinationstherapie mit Thrombozytenaggregationshemmern). Die Menge von humanem aPC-Derivat, das verabreicht wird, beträgt von etwa 0,01 mg/kg/Tag bis etwa 1,0 mg/kg/Tag durch kontinuierliche Infusion, Bolusinjektion oder eine Kombination davon.

[0095] Bei einer noch weiteren alternativen Ausführungsform werden die humanen aPC-Derivate subkutan in einer Dosis von 0,01 mg/kg/Tag bis etwa 1,0 mg/kg/Tag verabreicht, um eine langsamere Freisetzung in den Blutstrom zu gewährleisten. Die Formulierung für subkutane Präparationen wird hergestellt unter Verwendung von bekannten Verfahren, um solche pharmazeutischen Zusammensetzungen herzustellen.

[0096] Der Begriff oder der Ausdruck "in Kombination mit", wie er in dieser Beschreibung verwendet wird, bezieht sich auf die Verabreichung von zusätzlichen Mitteln mit aPC entweder simultan oder gleichzeitig, nacheinander oder einer Kombination davon. Beispiele von zusätzlichen Mitteln sind die Thrombozytenaggregationshemmern, thrombolytische Mitteln und BPI-Protein.

[0097] Die humanen aPC-Derivate, die in dieser Erfindung beschrieben sind, weisen beträchtlich erhöhte Antikoagulationsaktivität und erhöhte Plasmahalbwertszeit auf im Vergleich zu humanem aPC vom Wildtyp. Daher benötigen diese Verbindungen entweder weniger häufige Verabreichung und/oder geringere Dosierung. Schließlich können die überlegenen Erhöhungen in der Antikoagulationsaktivität und Resistenz gegen Serpininaktivierung von humanem aPC-Derivat erreicht werden über 2 bis 6 Aminosäuresubstitutionen, die weniger wahrscheinlich immunogen sind als aPC-Derivate mit mehr als 3 Aminosäuresubstitutionen.

Beispiel 1

Protein C-Derivatkonstruktion und -produktion

[0098] Humanprotein C-Derivate werden hergestellt unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR (Polymerase Chain Reaction)) unter Anwendung von Standardverfahren. Die Quelle der den Wildtyp kodierenden Sequenz war das Plasmid pLPC (Bio/Technology 5: 1189 bis 1192, 1987). Die universellen PCR-Primer, die verwendet wurden, schließen ein: PC001b; 5'-GCGATGCTAGaccaccATGTGGCAGCTCACAAGCCTCCTGC-3', der eine XbaI-Restriktionsstelle (unterstrichen) kodiert, die verwendet wird zum Subklonieren einer Kozak Übereinstimmungssequenz (Kleinbuchstaben) (Kozak, J. Cell Biol. 108(2): 229 bis 241, 1989), und das 5'-Ende der kodierenden Region für das Protein C: PC002E; 5'-CAGGGATGATCACTAAGGTGCCAGCTCTTCTGG-3', das das 3'-Ende der Kodierungsregion für Humanprotein C kodiert, und eine Bc1I-Restriktionsstelle (unterstrichen) einschließt zum Subklonieren. Alle ortsgerichteten Mutagenesen wurden bewerkstelligt durch Einsatz der PCR-Methode unter Verwendung von komplementären Oligonucleotiden, die die gewünschten Sequenzveränderungen enthielten. Die erste Runde der PCR wurde verwendet, um zwei Fragmente des Protein C-Gens zu vervielfältigen oder zu amplifizieren; das 5'-Fragment wurde erzeugt unter Verwendung von PC001b und des mutagenen Antisense Primers und das 3'-Fragment wurde erzeugt unter Verwendung von PC002e und des mutagenen Sense Primers. Die erhaltenen verstärkten oder amplifizierten Produkte wurden gereinigt durch Standardverfahren. Diese Fragmente wurden kombiniert und dann verwendet als Templat für eine zweite Runde der PCR unter Verwendung der Primer PC001b und PC002e. Das End-PCR-Produkt wurde verdaut mit XbaI und Bc1I und subkloniert in einem ähnlich verdauten Expressionsvektor pIG3. Ein Wildtypkonstrukt wurde in ähnlicher Weise erzeugt durch PCR unter Verwendung der zwei universellen Primer und des Plasmids pLPC als Templat, gefolgt von einem Subklonieren in pIG3. Die Mutationen wurden bestätigt durch DNS-Sequenzieren von sowohl den kodierenden als auch nicht kodierenden Strängen. Der pIG3-Vektor wurde erzeugt durch die Insertion von einer „Internal Ribosome Entry Site“ (IRES) (Jackson et al., Trends Biochem. Sci. 15(12): 447 bis 483, 1990) und grün fluoreszierendem Protein (GFP) (Cormack et al., Gene 173: 33 bis 38, 1996)-Gen in den Säuger Expressionsvektor pGTD (Gerlitz et al., Biochem. J. 295(Pt1): 131 bis 140, 1993). Wenn eine cDNS von Interesse kloniert wird in die mehrfachen Klonierungsstellen von pIG3, treibt der GBMT-Promoter (Berg et al., Nucleic Acids Res. 20(20): 5485 bis 5486, 1992) die Expression von einer bicistronischem mRNA oder mRNS (5'-cDNS – IHRES – GFP-3'). Eine wirksame Translation oder Übersetzung des ersten Cistrons wird initiiert durch klassischen Zusammenbau der Ribosomuntereinheiten von der 5'-methylierten Kopfstruktur der mRNS; während die normal unwirksame Translation von einem zweiten Cistron überwunden wird durch die IRES-Sequenz, die den inneren Ribosomenzusammenbau an der mRNS erlaubt. Die Kupplung der cDNS und des Rezeptors auf einer einzelnen mRNS, übersetzt als getrennte Proteine, erlaubt es nach den höchst produzierenden Klonen zu suchen auf der Basis der Fluoreszenzintensität. Der Expressionsvektor enthält auch eine Ampicillinresistenzkassette zur Beibehaltung des Plasmids in E. coli, und ein Maus-DHFR-Gen mit geeigneten Expressionssequenzen zur Auswahl und Vervielfältigungs- oder Amplifikationszwecken bei der Säugergewebeexpression.

[0099] Die durch den Adenovirus transformierte syrische Hamsterezelllinie AV12-664 wurde in Dulbecco's modifiziertem Eagle's-Medium, das ergänzt war mit 10% fötalem Rinderserum, 50 µg/ml Gentamicin, 200 µg/ml Geneticin (G418) und 10 µg/ml Vitamin K1 gezüchtet. Einen Tag vor der Transfizierung wurden die Zellen in einer Dichte von etwa 10⁵ Zellen/25 cm² ausplattiert. FspI-linearisierte Plasmide wurden transfiziert unter Verwendung von entweder dem Calciumphosphatverfahren (ProFection, Gibco BRL-Life Technologies) oder FuGene-6 (Boehringer Mannheim) unter Anwendung der Anleitungen der Hersteller. Etwa 48 h nach der Transfizierung wurde das Medium ersetzt durch ein Medium, das 250 nM Methotrexat zur Selektion enthielt. Kolonien, die resistent waren gegenüber Methotrexat wurden 2 bis 3 Wochen zusammengegeben nach dem Anwenden der Arzneimittelauswahl und ausgeweitet. Die zusammengegebenen Kolonien wurden einem Fluoreszenz

aktivierten Sortieren der Zellen unterworfen, basierend auf der GFP-Fluoreszenzintensität (Cormack, 1996), wobei die intensivsten 5% der fluoreszierenden Zellen beibehalten werden und ausgeweitet werden. Um Material zur Reinigung zu erhalten, wurden die rekombinanten Zellen in einem modifizierten Gemisch gezüchtet von Dolbecco's modifizierten Eagle's und Ham's F-12-Medien (1:3), die 1 µg/ml Humaninsulin, 1 µg/ml Humantransferrin und 10 µg/ml Vitamin K1 enthielten. Konditionierte Medien wurden gesammelt, eingestellt auf eine Endkonzentration von 5 mM Benzamidin und 5 mM EDTA, pH 8,0 und Protein C wurde gereinigt durch Anionenaustauschchromatographie, wie beschrieben (Yan et al., Bio/Technology 8: 655 bis 661, 1990). Gereinigtes Protein wurde entsalzt/konzentriert in Ultrafree-CL 30.000 NMWL Filtrationseinheiten (Millipore) unter Verwendung von Puffer A (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4) und quantifiziert nach einem Pierce BCA-Assay unter Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA) als Standard.

Beispiel 2

Serpine-resistente Mutanten

[0100] Die Verwendung von ortsgerichteter Mutagenese, um bestimmte Positionen innerhalb des Humanprotein C-Moleküls zu verändern, die die Inaktivierung durch Serpine reduzieren und demzufolge zu verlängerten Plasmahalbwertszeiten führen, ist beschrieben. Die Erkennungssequenzen in den zwei primären aPC-Inhibitoren α_1 -AT und PCI zeigen einige Unterschiede, die ausgenutzt werden können durch Veränderung der Reste in aPC, die mit diesen Sequenzen wechselwirken. Die Tabelle 1 zeigt die Sequenzen, die erkannt werden durch aPC. Die Spaltungsstelle tritt auf zwischen den zwei Resten, die gezeigt sind durch Kursivdruck. Die Reste, die die spezifischen Substellen besetzen, S2, S3' und S4', sind unterstrichen.

[0101] Im Allgemeinen sind die erkannten Stellen im Faktor Va verschieden von den Stellen in entweder dem Faktor VIIIa oder den Inhibitoren, daher ist es möglich, die aktive Stelle von aPC zu konstruieren oder zu erzeugen, um die bevorzugte Spaltung des entscheidenderen Gerinnungsfaktors Va zu spalten, während gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit, dass aPC durch Serpine inhibiert wird, gesenkt wird.

Tabelle I.

Blutgerinnungsfaktoren		S2'	S3'S4'
Faktor Va	300-313	N C P K K <u>T</u> R N L <u>K</u> <u>K</u> I T R	
Faktor Va	500-513	S R S L D <u>R</u> R G I <u>Q</u> <u>R</u> A A A	
Faktor Va	673-685	S T V M A <u>T</u> R K M <u>H</u> <u>D</u> R L E	
Faktor VIIIa	330-341	P E E P Q <u>L</u> R M K <u>N</u> <u>N</u> E E A	
Faktor VIIIa	560-571	K E S V D <u>Q</u> R G N <u>Q</u> <u>I</u> M S D	
Serpine			
PCI		G T I F T <u>F</u> R S A <u>R</u> <u>L</u> N S Q	
α_1 -AT		F L E A I <u>P</u> M S I <u>P</u> <u>P</u> E V K	

[0102] Insbesondere zeigen drei Stellen der Erkennung innerhalb der aktiven Stelle bedeutende Unterschiede zwischen Substraterkennungssequenzen und Inhibitorerkennungssequenzen: S2 (der 2. Rest N-terminal zu der Spaltungsstelle), S3'-Stelle und S4'. Die S2-Stelle wird hauptsächlich besetzt von polaren Resten in den Faktor Va-Sequenzen; nicht so wie PCI und α_1 -AT, die hydrophobe Reste an dieser Position aufweisen. Die S3'-Stelle wird besetzt von polaren Seitenketten in allen der Substratsequenzen, aber vorzugsweise von einer hydrophoben Seitenkette in der α_1 -AT-Sequenz. Die S4'-Stelle wird besetzt durch geladene Reste in allen drei Faktor Va-Sequenzen, aber sie wird besetzt von hydrophoben Resten in den Faktor VIIIa- und Inhibitorsequenzen.

[0103] Basierend auf den Kristallstrukturen des PPACK inhibierten aPC (Mather et al., EMBO J. 15 (24): 6822 bis 6831, 1996) und Hirulog 3 inhibiertes Thrombin (Qiu et al., Biochemistry 31(47): 11689 bis 11697, 1992)

wurden zwei aPC-Substratmodellstrukturen erzeugt und energetisch minimiert unter Verwendung eines CHARMM-Protokolls:

- (1) Die Sequenz, die die Faktor Va R506 Spaltungssequenz darstellt.
- (2) Die Erkennungsstelle von α_1 -AT, bei der Met substituiert ist durch Arg (entsprechend einem Polypeptid von α_1 -AT, das extrem hohe Affinität für aPC zeigt).

[0104] Diese Modelle erlauben die Identifizierung von Resten, die entscheidende Kontakte bilden in diesen drei speziellen Steilen. Eine Zusammenfassung von Resten, die spezielle Kontakte bilden können innerhalb der aktiven Stelle und Austauschmöglichkeiten, die erwartungsgemäß gesteigerte Spezifität bereitstellen und/oder Aktivität werden zusammengefasst in der Tabelle II. Im allgemeinen sind die Mutationen der Reste, die Kontakte bilden innerhalb der speziellen Unterstellen oder Substellen (subsites) der aktiven Stelle so entworfen, um Veränderungen zu zeigen in der Umgebung, um die Spezifität der Human aPC-Derivate wegzutreiben von den der Erkennung der zwei primären physiologischen Inhibitoren und möglicherweise oder potenziell die proteolytische Aktivität des Human aPC-Derivats zu steigern.

Tabelle II.

Mutationen, die konstruiert sind zur Veränderung der Spezifität

Stelle	APC Rest	Konstruierte Ersetzungen	Substratkontakt
S2	Thr254	Ser	Aliphatischer Teil der Seitenkette
S3'	Tyr302	Glu, Gln	Ende der Seitenkette
S4'	Leu194	Ser, Thr, Ala	Aliphatischer Teil der Seitenkette
S4'	Ala195	Gly	Aliphatischer Teil der Seitenkette
S4'	Leu228	Gln	Ende der Seitenkette
S4'	Phe316	Asn	Aliphatischer Teil der Seitenkette

Beispiel 3

Aktivierung des rekombinanten Protein C

[0105] Eine vollständige Aktivierung der zymogenen Formen von Protein C und Derivaten wurde erreicht durch Inkubation mit Thrombin-Sepharose. Thrombin-Sepharose wurde ausgiebig mit Puffer A gewaschen. 200 μ l von gepackter Thrombin-Sepharose wurde gemischt mit 250 μ g von Protein C in 1 ml des gleichen Puffers und 4 h lang bei 37°C inkubiert unter vorsichtigem Schütteln auf einer rotierbaren Plattform. Während des Verlaufs der Inkubation wurde der Grad der Protein C-Aktivierung beobachtet durch kurzes Tablettieren (Pelletieren) der Thrombin-Sepharose und durch Testen eines kleinen Aliquots von dem Überstand hinsichtlich der aPC-Aktivität unter Verwendung des chromogenen Substrats S-2366 (Dia-Pharma). Unter Durchführung der vollständigen Aktivierung wurde Thrombin-Sepharose tablettiert (pelletiert), und der Überstand gesammelt. Die Konzentration von aPC wurde verifiziert durch einen Pierce BCA-Test (Assay) und das aPC wurde entweder direkt bestimmt oder gefroren in Aliquoten bei -80°C. Alle Derivate wurden analysiert durch SDS-PAGE mit entweder Coomassie-Blau-Färbung oder Western Blot-Analyse, um die vollständige Aktivierung zu bestätigen (Laemmli, Nature 227: 680 bis 685, 1970).

Beispiel 4

Funktionelle Charakterisierung

[0106] Die amidolytische Aktivität von rekombinanten Human aPC-Derivaten wurde bestimmt durch Hydrolyse des Tripeptidsubstrats S-2366 (Glu-Pro-Arg-p-Nitroanilid), S-2238 (Pip-Pro-Arg-p-Nitroanilid) und S-2288 (Ile-Pro-Arg-p-Nitroanilid).

[0107] Die Tests (Assays) wurden durchgeführt bei 25°C im Puffer A, der 1 mg ml⁻¹ BSA, 3 mM CaCl₂ und 0,5 nM aPC enthält. Umsetzungen (200 μ l/Gläschen) wurden durchgeführt in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, und die amidolytische Aktivität wurde gemessen als Veränderung in Absorptionseinheiten/min bei 405 nm, wie beobachtet in einem kinetischen Mikrometerplattenleser ThermoMax. Die kinetischen Konstanten wurden bestimmt oder abgeleitet durch Einpassen oder Fitten der Geschwindigkeitsdaten bei verschiedenen Sub-

stratkonzentrationen (16 μM bis 2 mM) in die Michaelis-Menten-Gleichung. Die Veränderungen in A_{405} wurden umgewandelt in mmol Produkt unter Verwendung einer Pfadlänge von 0,53 cm (Molecular Devices Technical Applications Bulletin 4-1) und einem Extinktionskoeffizienten für das freigesetzte p-Nitroanilid von $9620 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Pfleiderer, Methods Enzymol 19: 514 bis 521, 1970). Die Antikoagulansaktivität wurde bestimmt durch Messen der Verlängerung der Gerinnungszeit in dem Gerinnungstest der aktivierten Teilthromboplastinzeit (Helena Laboratories). Die Gerinnungsreaktionen wurden beobachtet in einem kinetischen Mikroplattenleser ThermoMax unter Messung der Zeit bis V_{max} an der Veränderung der Trübung.

Beispiel 5

Inaktivierung von aPC-Derivaten

[0108] Die Raten oder Geschwindigkeiten der Inaktivierung von aPC-Derivaten wurden bestimmt durch Inkubation von Kaninchenplasma oder normalem humanen Plasma (Helena Labs) mit 20 nM aPC (oder Derivaten) bei 37°C . Die Plasmakonzentration betrug 90% (v/v) in dem Endreaktionspuffer, der 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4 und 1 mg ml^{-1} BSA enthielt. Aliquote wurden entfernt bei ausgewählten Zeiten, und die Aktivität wurde gemessen als amidolytische Aktivität unter Verwendung von S-2366 bei einer Endkonzentration von 1 mM. Die gemessenen Halbwertszeiten für die aPC-Derivate S11G:Q32E:N33D:L194S (GEDS), S11G:Q32E:N33D:L194S:T254S (GEDSS), H10Q:S11G:Q32E:N33D:L194S (QGEDS) und H10Q:S11G:Q32E:N33D:L194S:T254S (QGEDSS) sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle III.

Variante	Inaktivierung in Plasma ($t_{1/2}$ bezogen auf den Wildtyp (WT))	
	Mensch	Kaninchen
WT	1x	1x
GED-S	5,8x	8,5x
GED-SS	13x	>20x
QGED-S	5,9x	8,5x
QGED-SS	8,5x	>20x

Beispiel 6

In vivo Pharmakokinetiken

[0109] In vivo pharmakokinetische Experimente wurden durchgeführt bei normalen Kaninchen, um die beobachteten in vitro Effekte in der Halbwertszeit als Ergebnis der Mutationen zu verifizieren. Eine Ohrvene am Rand und eine Ohrvene in der Mitte wurde mit einer Kanüle versehen in dem bewusstlosen Kaninchen. Aktivierte Protein C-Derivate im Puffer A ($300 \mu\text{g/ml}$) wurden verwendet, um eine Dosis zu verabreichen von $100 \mu\text{g/kg}$ oder $0,1 \text{ mg/kg}$ Bolus durch den Ohrenvenenkatheder am Rand. Blutproben ($0,45 \text{ ml}$) wurden in einer Spritze aufgenommen, die $0,05 \text{ ml}$ von $3,8\%$ Citrat enthaltenden Benzamidin enthielt – Einstellungen wurden gemacht, um den Spritzen-/Nadeltotraum zu kompensieren, um die Endkonzentrationen von 1 Teil Citrat/Benzamidin : 9 Teilen Blut zu erhalten. Die Proben wurden 0, 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 und 360 min nach der Behandlung gesammelt, rotiert oder gespinnt sobald es praktisch ist nach der Sammlung, und $200 \mu\text{l}$ von Plasma wurde in aliquoten Teilen in Platten mit 96 Vertiefungen gegeben. Die Konzentration oder der Wert der aktivierten Protein C-Derivate wurde bestimmt unter Verwendung eines Enzymerfassungstests („Enzyme Capture Assay“ – ECA), wie zuvor beschrieben (Gruber et al., Blood 79(9): 2340 bis 2348, 1992), verglichen mit Standards, die im Bereich liegen von 1 bis 250 ng/ml , verdünnt in gesammeltem Kaninchenplasma.

[0110] Pharmakokinetische Halbwertszeiten für die aPC-Derivate S11G:Q32E:N33D:L194S (GEDS), S11G:Q32E:N33D:L194S:T254S (GEDSS), H10Q:S11G:Q32E:N33D:L194S (QGEDS) und H10Q:S11G:Q32E:N33D:L194S:T254S (QGEDSS), nach einer intravenösen Bolusverabreichung an Kaninchen, sind in Tabelle IV gezeigt. Die mittleren $T_{1/2}$ -Werte zeigen an, dass alle der aPC-Derivate eine erhöhte Halbwertszeit aufweisen verglichen mit Wildtyp aPC.

Tabelle IV.

		0,1 mg/kg			Mittelwert	Standardabweichung des Mittelwerts	N
		1	2	3			
WT	T _{1/2} (h)	0,17	0,31	0,18	0,2	0,04	3
GEDS	T _{1/2} (h)	0,4	0,042	0,36	0,40	0,02	3
GEDSS	T _{1/2} (h)	0,61	0,53	0,57	0,57	0,02	3
QGEDS	T _{1/2} (h)	0,36	0,38	0,37	0,37	0,01	3
QGEDSS	T _{1/2} (h)	0,57	0,65	0,44	0,54	0,06	3

Beispiel 7

Antithrombotische Wirksamkeit in einem Modell für Thrombose beim Kaninchen

[0111] Das arteriovenöse (AV) Shunt-Modell der Thrombose ist ein häufig verwendetes und sehr reproduzierbares Modell der Thrombose, das die klinischen Zustände nachahmt, bei dem Blut durch ein künstliches Gefäß zirkuliert, wie eine Herz-Lungen-Bypassmaschine oder eine Nierendialysemaschine. Bei dem anästhesierten Kaninchenmodell der AV-Shunt-Thrombose wird Blut über einen festgesetzten Zeitraum von der Karotidarterie abgeleitet durch einen 3-Teile-Shunt (Abzweigung oder Ableitung) aus Kunststoffleitungen in die Jugularvene. Der zentrale Abschnitt der Leitungen enthält ein Gewinde, auf dem thrombotisches Material abgeschieden ist. Während Fibrin und Plättchen den Thrombus zusammensetzen, überwiegt Fibrin. Die antithrombotische Wirksamkeit wird bestimmt in dem AV-Shunt-Modell beim Kaninchen, da die funktionelle Halbwertszeit der Varianten mit Modifizierungen der aktiven Stelle verlängert wird beim Kaninchen.

[0112] Humanprotein C-Derivate mit Resistenz gegen Serpininaktivierung und erhöhter Antikoagulationsaktivität im Vergleich zu aktiviertem Protein C vom Wildtyp wurden bewertet. Jede Variante wurde 75 min lang eingeleitet mit einer Geschwindigkeit von 0,15 mg/kg/h. Der 15 min Zeitraum der Thrombose trat zwischen 60 und 75 min auf. Blutproben wurden entnommen zur Bestimmung von einer aPTT- und aPC-Konzentration. Die Proben wurden analysiert hinsichtlich einer Antikoagulationsaktivität im gesamten Blut, unter Verwendung von aPTT und hinsichtlich der Plasmakonzentration von aPC unter Verwendung eines Immunocapture und der amidolytischen Aktivität.

[0113] Der antithrombotische Effekt von einer i.v. Dosis von 0,15 mg/kg/h wurde ausgedrückt als das mittlere Thrombusgewicht für jede Variante und für das Wildtyp (WT) aPC und zusammengefasst in der Tabelle V. Die Ergebnisse zeigen, dass die Humanprotein C-Derivate mit Resistenz gegenüber Serpininaktivierung und erhöhter Antikoagulationsaktivität wirksamer waren als aPC vom Wildtyp.

Tabelle V

Derivat	Thrombusgewicht (mg)	(n)
Träger	92,2 +/- 1,7	(5)
WT aPC	97,5 +/- 1,6	(4)
S11G:Q32E:N33D:L194S	80,1 +/- 5,9	(3)
S11G:Q32E:N33D:L194S:T254S	67,6 +/- 10,7	(4)
H10Q:S11G:Q32E:N33D:L194S	73,8 +/- 6,6	(4)
H10Q:S11G:Q32E:N33D:L194S:T254S	70,1 +/- 3,5	(4)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Gerlitz, Bruce E.
Jones, Bryan E.

<120> PROTEIN C-DERIVATE

<130> PCT - Global

<140>

<141>

<150> 60/179 801

<151> 2000-02-02

<150> 60/189 197

<151> 2000-03-14

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 419

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg His Ser Ser Leu Glu Arg Glu
  1           5           10
Cys Ile Glu Glu Ile Cys Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Gln
  20           25           30
Asn Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp Gly Asp
  35           40           45
Gln Cys Leu Val Leu Pro Leu Glu His Pro Cys Ala Ser Leu Cys Cys
  50           55           60
Gly His Gly Thr Cys Ile Asp Gly Ile Gly Ser Phe Ser Cys Asp Cys
  65           70           75
Arg Ser Gly Trp Glu Gly Arg Phe Cys Gln Arg Glu Val Ser Phe Leu
  85           90           95
Asn Cys Ser Leu Asp Asn Gly Gly Cys Thr His Tyr Cys Leu Glu Glu
  100          105          110
Val Gly Trp Arg Arg Cys Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Lys Leu Gly Asp
  115          120          125
Asp Leu Leu Gln Cys His Pro Ala Val Lys Phe Pro Cys Gly Arg Pro
  130          135          140
Trp Lys Arg Met Glu Lys Lys Arg Ser His Leu Lys Arg Asp Thr Glu
  145          150          155
Asp Gln Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Met Thr
  165          170          175
Arg Arg Gly Asp Ser Pro Trp Gln Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Lys
  180          185          190
Lys Leu Ala Cys Gly Ala Val Leu Ile His Pro Ser Trp Val Leu Thr
  195          200          205

```

Ala Ala His Cys Met Asp Glu Ser Lys Lys Leu Leu Val Arg Leu Gly
 210 215 220

Glu Tyr Asp Leu Arg Arg Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu Asp Ile
 225 230 235 240

Lys Glu Val Phe Val His Pro Asn Tyr Ser Lys Ser Thr Thr Asp Asn
 245 250 255

Asp Ile Ala Leu Leu His Leu Ala Gln Pro Ala Thr Leu Ser Gln Thr
 260 265 270

Ile Val Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ser Gly Leu Ala Glu Arg Glu Leu
 275 280 285

Asn Gln Ala Gly Gln Glu Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser
 290 295 300

Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu Asn Phe
 305 310 315 320

Ile Lys Ile Pro Val Val Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val Met Ser
 325 330 335

Asn Met Val Ser Glu Asn Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly Asp Arg
 340 345 350

Gln Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Ala Ser Phe
 355 360 365

His Gly Thr Trp Phe Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys
 370 375 380

Gly Leu Leu His Asn Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Leu
 385 390 395 400

Asp Trp Ile His Gly His Ile Arg Asp Lys Glu Ala Pro Gln Lys Ser
 405 410 415

Trp Ala Pro

<210> 2
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Trp Gln Leu Thr Ser Leu Leu Leu Phe Val Ala Thr Trp Gly Ile
 1 5 10 15

Ser Gly Thr Pro Ala Pro Leu Asp Ser Val Phe Ser Ser Ser Glu Arg
 20 25 30

Ala His Gln Val Leu Arg Ile Arg Lys Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu
 35 40 45

Glu Leu Arg His Ser Ser Leu Glu Arg Glu Cys Ile Glu Glu Ile Cys
 50 55 60

Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Gln Asn Val Asp Asp Thr Leu
 65 70 75 80

Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp Gly Asp Gln Cys Leu Val Leu Pro
 85 90 95

Leu Glu His Pro Cys Ala Ser Leu Cys Cys Gly His Gly Thr Cys Ile
 100 105 110
 Asp Gly Ile Gly Ser Phe Ser Cys Asp Cys Arg Ser Gly Trp Glu Gly
 115 120 125
 Arg Phe Cys Gln Arg Glu Val Ser Phe Leu Asn Cys Ser Leu Asp Asn
 130 135 140
 Gly Gly Cys Thr His Tyr Cys Leu Glu Glu Val Gly Trp Arg Arg Cys
 145 150 155 160
 Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Lys Leu Gly Asp Asp Leu Leu Gln Cys His
 165 170 175
 Pro Ala Val Lys Phe Pro Cys Gly Arg Pro Trp Lys Arg Met Glu Lys
 180 185 190
 Lys Arg Ser His Leu Lys Arg Asp Thr Glu Asp Gln Glu Asp Gln Val
 195 200 205
 Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Met Thr Arg Arg Gly Asp Ser Pro
 210 215 220
 Trp Gln Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Lys Lys Leu Ala Cys Gly Ala
 225 230 235 240
 Val Leu Ile His Pro Ser Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Met Asp
 245 250 255
 Glu Ser Lys Lys Leu Leu Val Arg Leu Gly Glu Tyr Asp Leu Arg Arg
 260 265 270
 Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu Asp Ile Lys Glu Val Phe Val His
 275 280 285
 Pro Asn Tyr Ser Lys Ser Thr Thr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu His
 290 295 300
 Leu Ala Gln Pro Ala Thr Leu Ser Gln Thr Ile Val Pro Ile Cys Leu
 305 310 315 320
 Pro Asp Ser Gly Leu Ala Glu Arg Glu Leu Asn Gln Ala Gly Gln Glu
 325 330 335
 Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg Glu Lys Glu Ala
 340 345 350
 Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu Asn Phe Ile Lys Ile Pro Val Val
 355 360 365
 Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val Met Ser Asn Met Val Ser Glu Asn
 370 375 380
 Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly Asp Arg Gln Asp Ala Cys Glu Gly
 385 390 395 400
 Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Ala Ser Phe His Gly Thr Trp Phe Leu
 405 410 415
 Val Gly Leu Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Gly Leu Leu His Asn Tyr
 420 425 430
 Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Leu Asp Trp Ile His Gly His
 435 440 445

Ile Arg Asp Lys Glu Ala Pro Gln Lys Ser Trp Ala Pro
 450 455 460

<210> 3
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg His Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 Cys Ile Glu Glu Ile Cys Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Glu
 20 25 30
 Asp Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp Gly Asp
 35 40 45
 Gln Cys Leu Val Leu Pro Leu Glu His Pro Cys Ala Ser Leu Cys Cys
 50 55 60
 Gly His Gly Thr Cys Ile Asp Gly Ile Gly Ser Phe Ser Cys Asp Cys
 65 70 75 80
 Arg Ser Gly Trp Glu Gly Arg Phe Cys Gln Arg Glu Val Ser Phe Leu
 85 90 95
 Asn Cys Ser Leu Asp Asn Gly Gly Cys Thr His Tyr Cys Leu Glu Glu
 100 105 110
 Val Gly Trp Arg Arg Cys Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Lys Leu Gly Asp
 115 120 125
 Asp Leu Leu Gln Cys His Pro Ala Val Lys Phe Pro Cys Gly Arg Pro
 130 135 140
 Trp Lys Arg Met Glu Lys Lys Arg Ser His Leu Lys Arg Asp Thr Glu
 145 150 155 160
 Asp Gln Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Met Thr
 165 170 175
 Arg Arg Gly Asp Ser Pro Trp Gln Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Lys
 180 185 190
 Lys Ser Ala Cys Gly Ala Val Leu Ile His Pro Ser Trp Val Leu Thr
 195 200 205
 Ala Ala His Cys Met Asp Glu Ser Lys Lys Leu Leu Val Arg Leu Gly
 210 215 220
 Glu Tyr Asp Leu Arg Arg Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu Asp Ile
 225 230 235 240
 Lys Glu Val Phe Val His Pro Asn Tyr Ser Lys Ser Thr Thr Asp Asn
 245 250 255
 Asp Ile Ala Leu Leu His Leu Ala Gln Pro Ala Thr Leu Ser Gln Thr
 260 265 270
 Ile Val Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ser Gly Leu Ala Glu Arg Glu Leu
 275 280 285
 Asn Gln Ala Gly Gln Glu Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser
 290 295 300

Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu Asn Phe
 305 310 315 320
 Ile Lys Ile Pro Val Val Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val Met Ser
 325 330 335
 Asn Met Val Ser Glu Asn Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly Asp Arg
 340 345 350
 Gln Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Ala Ser Phe
 355 360 365
 His Gly Thr Trp Phe Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys
 370 375 380
 Gly Leu Leu His Asn Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Leu
 385 390 395 400
 Asp Trp Ile His Gly His Ile Arg Asp Lys Glu Ala Pro Gln Lys Ser
 405 410 415
 Trp Ala Pro

<210> 4
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg His Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 Cys Ile Glu Glu Ile Cys Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Glu
 20 25 30
 Asp Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp Gly Asp
 35 40 45
 Gln Cys Leu Val Leu Pro Leu Glu His Pro Cys Ala Ser Leu Cys Cys
 50 55 60
 Gly His Gly Thr Cys Ile Asp Gly Ile Gly Ser Phe Ser Cys Asp Cys
 65 70 75 80
 Arg Ser Gly Trp Glu Gly Arg Phe Cys Gln Arg Glu Val Ser Phe Leu
 85 90 95
 Asn Cys Ser Leu Asp Asn Gly Gly Cys Thr His Tyr Cys Leu Glu Glu
 100 105 110
 Val Gly Trp Arg Arg Cys Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Lys Leu Gly Asp
 115 120 125
 Asp Leu Leu Gln Cys His Pro Ala Val Lys Phe Pro Cys Gly Arg Pro
 130 135 140
 Trp Lys Arg Met Glu Lys Lys Arg Ser His Leu Lys Arg Asp Thr Glu
 145 150 155 160
 Asp Gln Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Met Thr
 165 170 175
 Arg Arg Gly Asp Ser Pro Trp Gln Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Lys
 180 185 190

Lys Ser Ala Cys Gly Ala Val Leu Ile His Pro Ser Trp Val Leu Thr
 195 200 205
 Ala Ala His Cys Met Asp Glu Ser Lys Lys Leu Leu Val Arg Leu Gly
 210 215 220
 Glu Tyr Asp Leu Arg Arg Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu Asp Ile
 225 230 235 240
 Lys Glu Val Phe Val His Pro Asn Tyr Ser Lys Ser Thr Ser Asp Asn
 245 250 255
 Asp Ile Ala Leu Leu His Leu Ala Gln Pro Ala Thr Leu Ser Gln Thr
 260 265 270
 Ile Val Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ser Gly Leu Ala Glu Arg Glu Leu
 275 280 285
 Asn Gln Ala Gly Gln Glu Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser
 290 295 300
 Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu Asn Phe
 305 310 315 320
 Ile Lys Ile Pro Val Val Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val Met Ser
 325 330 335
 Asn Met Val Ser Glu Asn Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly Asp Arg
 340 345 350
 Gln Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Ala Ser Phe
 355 360 365
 His Gly Thr Trp Phe Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys
 370 375 380
 Gly Leu Leu His Asn Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Leu
 385 390 395 400
 Asp Trp Ile His Gly His Ile Arg Asp Lys Glu Ala Pro Gln Lys Ser
 405 410 415
 Trp Ala Pro

<210> 5
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg Gln Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 Cys Ile Glu Glu Ile Cys Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Glu
 20 25 30
 Asp Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp Gly Asp
 35 40 45
 Gln Cys Leu Val Leu Pro Leu Glu His Pro Cys Ala Ser Leu Cys Cys
 50 55 60
 Gly His Gly Thr Cys Ile Asp Gly Ile Gly Ser Phe Ser Cys Asp Cys
 65 70 75 80

Arg Ser Gly Trp Glu Gly Arg Phe Cys Gln Arg Glu Val Ser Phe Leu
 85 90 95
 Asn Cys Ser Leu Asp Asn Gly Gly Cys Thr His Tyr Cys Leu Glu Glu
 100 105 110
 Val Gly Trp Arg Arg Cys Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Lys Leu Gly Asp
 115 120 125
 Asp Leu Leu Gln Cys His Pro Ala Val Lys Phe Pro Cys Gly Arg Pro
 130 135 140
 Trp Lys Arg Met Glu Lys Lys Arg Ser His Leu Lys Arg Asp Thr Glu
 145 150 155 160
 Asp Gln Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Met Thr
 165 170 175
 Arg Arg Gly Asp Ser Pro Trp Gln Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Lys
 180 185 190
 Lys Ser Ala Cys Gly Ala Val Leu Ile His Pro Ser Trp Val Leu Thr
 195 200 205
 Ala Ala His Cys Met Asp Glu Ser Lys Lys Leu Leu Val Arg Leu Gly
 210 215 220
 Glu Tyr Asp Leu Arg Arg Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu Asp Ile
 225 230 235 240
 Lys Glu Val Phe Val His Pro Asn Tyr Ser Lys Ser Thr Thr Asp Asn
 245 250 255
 Asp Ile Ala Leu Leu His Leu Ala Gln Pro Ala Thr Leu Ser Gln Thr
 260 265 270
 Ile Val Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ser Gly Leu Ala Glu Arg Glu Leu
 275 280 285
 Asn Gln Ala Gly Gln Glu Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser
 290 295 300
 Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu Asn Phe
 305 310 315 320
 Ile Lys Ile Pro Val Val Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val Met Ser
 325 330 335
 Asn Met Val Ser Glu Asn Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly Asp Arg
 340 345 350
 Gln Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Ala Ser Phe
 355 360 365
 His Gly Thr Trp Phe Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys
 370 375 380
 Gly Leu Leu His Asn Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Leu
 385 390 395 400
 Asp Trp Ile His Gly His Ile Arg Asp Lys Glu Ala Pro Gln Lys Ser
 405 410 415
 Trp Ala Pro

<210> 6
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg Gln Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 Cys Ile Glu Glu Ile Cys Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Glu
 20 25 30
 Asp Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp Gly Asp
 35 40 45
 Gln Cys Leu Val Leu Pro Leu Glu His Pro Cys Ala Ser Leu Cys Cys
 50 55 60
 Gly His Gly Thr Cys Ile Asp Gly Ile Gly Ser Phe Ser Cys Asp Cys
 65 70 75 80
 Arg Ser Gly Trp Glu Gly Arg Phe Cys Gln Arg Glu Val Ser Phe Leu
 85 90 95
 Asn Cys Ser Leu Asp Asn Gly Gly Cys Thr His Tyr Cys Leu Glu Glu
 100 105 110
 Val Gly Trp Arg Arg Cys Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Lys Leu Gly Asp
 115 120 125
 Asp Leu Leu Gln Cys His Pro Ala Val Lys Phe Pro Cys Gly Arg Pro
 130 135 140
 Trp Lys Arg Met Glu Lys Lys Arg Ser His Leu Lys Arg Asp Thr Glu
 145 150 155 160
 Asp Gln Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Met Thr
 165 170 175
 Arg Arg Gly Asp Ser Pro Trp Gln Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Lys
 180 185 190
 Lys Ser Ala Cys Gly Ala Val Leu Ile His Pro Ser Trp Val Leu Thr
 195 200 205
 Ala Ala His Cys Met Asp Glu Ser Lys Lys Leu Leu Val Arg Leu Gly
 210 215 220
 Glu Tyr Asp Leu Arg Arg Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu Asp Ile
 225 230 235 240
 Lys Glu Val Phe Val His Pro Asn Tyr Ser Lys Ser Thr Ser Asp Asn
 245 250 255
 Asp Ile Ala Leu Leu His Leu Ala Gln Pro Ala Thr Leu Ser Gln Thr
 260 265 270
 Ile Val Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ser Gly Leu Ala Glu Arg Glu Leu
 275 280 285
 Asn Gln Ala Gly Gln Glu Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser
 290 295 300
 Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu Asn Phe
 305 310 315 320
 Ile Lys Ile Pro Val Val Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val Met Ser

325

330

335

Asn Met Val Ser Glu Asn Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly Asp Arg
 340 345 350

Gln Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Ala Ser Phe
 355 360 365

His Gly Thr Trp Phe Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys
 370 375 380

Gly Leu Leu His Asn Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Leu
 385 390 395 400

Asp Trp Ile His Gly His Ile Arg Asp Lys Glu Ala Pro Gln Lys Ser
 405 410 415

Trp Ala Pro

<210> 7

<211> 1260

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gccaaactcct tcctggagga gctccgtcac agcagcctgg agcgggagtg catagaggag 60
 atctgtgact tcgaggaggc caaggaaatt ttccaaaatg tggatgacac actggccttc 120
 tggccaagc acgtcgacgg tgaccagtgc ttggctcttc ccttgagca cccgtgcgcc 180
 agcctgtgct gcgggcacgg cacgtgcatc gacggcatcg gcagcttcag ctgcgactgc 240
 cgcagcggct gggagggccg cttctgccag cgcgagtgga gcttcctcaa ttgctcgtcg 300
 gacaacggcg gctgcacgca ttactgccta gaggagtggt gctggcggcg ctgtagctgt 360
 gcgcctggct acaagctggg ggacgacctc ctgcagtgtc accccgcagt gaagtccct 420
 tgtgggaggc cctggaagcg gatggagaag aagcgcagtc acctgaaacg agacacagaa 480
 gaccaagaag accaagtaga tccgcggctc attgatggga agatgaccag gcggggagac 540
 agccccctggc aggtgtctct gctggactca aagaagaagc tggcctgcgg ggcagtgtc 600
 atccaccct cctgggtgct gacagcggcc cactgcatgg atgagtccaa gaagtcctt 660
 gtcaggcttg gagagtatga cctgcggcgc tgggagaagt gggagctgga cctggacatc 720
 aaggaggtct tcgtccacce caactacagc aagagacca ccgacaatga catcgcactg 780
 ctgcacctgg cccagccgc caccctctcg cagaccatag tgcccatctg cctcccggac 840
 agcggccttg cagagcgcga gctcaatcag gccggccagg agaccctcgt gacgggctgg 900
 ggctaccaca gcagccgaga gaaggaggcc aagagaaacc gcacctcgt cctcaacttc 960
 atcaagattc ccgtggtccc gcacaatgag tgcagcgagg tcatgagcaa catggtgtct 1020
 gagaacatgc tgtgtcgggg catcctcggg gaccggcagg atgcctgcga gggcgacagt 1080
 ggggggcccc tggctgcctc cttccaagcc acctggttcc tgggtggcct ggtgagctgg 1140
 ggtgagggct gtgggtcctc tcacaactac ggcgtttaca ccaaagtcag ccgctacctc 1200

gactggatcc atgggacacat cagagacaag gaagccccc agaagagctg ggcaccttag 1260

<210> 8
 <211> 1386
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 atgtggcagc tcacaagcct cctgctgttc gtggccacct ggggaatttc cggcacacca 60
 gctcctcttg actcagtgtt ctccagcagc gagcgtgccc accagggtgct gcggatccgc 120
 aaacgtgccca actccttccct ggaggagctc cgtcacagca gcctggagcg ggagtgcata 180
 gaggagatct gtgacttcga ggaggccaag gaaatattcc aaaatgtgga tgacacactg 240
 gccttctgggt ccaagcacgt cgacgggtgac cagtgccttg tcttgccctt ggagcaccog 300
 tggccagcc tgtgctgctg gcacggcagc tgcacgacg gcacggcag cttcagctgc 360
 gactgcccga cgggctggga gggccgcttc tgccagcggc aggtgagctt cctcaattgc 420
 tcgctggaca acggcggctg cacgcattac tgccatagagg aggtgggctg cggcgctgt 480
 agctgtgctg ctggctacaa gctgggggac gacctcctgc agtgtcacc cgcagtgaag 540
 ttcccttctg ggaggccctg gaagcggatg gagaagaagc gcagtcacct gaaacgagac 600
 acagaagacc aagaagacca agtagatccg cggctcattg atgggaagat gaccaggcgg 660
 ggagacagcc cctggcaggt ggtcctgctg gactcaaaga agaagctggc ctgccccgca 720
 gtgctcatcc acccctcctg ggtgctgaca cgggcccact gcattggatga gtccaagaag 780
 ctccctgtca ggcttgaga gtatgacctg cggcgctggg agaagtggga gctggacctg 840
 gacatcaagg aggtccttct ccacccaac tacagcaaga gcaccaccga caatgacatc 900
 gcaactgctg acctggccca gcccgccacc ctctcgaga ccatagtgcc catctgcctc 960
 ccggacagcg gccttgaga gcgagctc aatcaggccg gccaggagac cctcgtgacg 1020
 ggctggggct accacagcag ccgagagaag gaggccaaga gaaaccgcac cttcgtcctc 1080
 aacttcatca agattcccgt ggtcccgcac aatgagtgca gcgaggatcat gagcaacatg 1140
 gtgtctgaga acatgctgtg tggggcacc ctccgggacc ggcaggatgc ctgagagggc 1200
 gacagtgggg ggcccatggt cgcctccttc cacggcaact ggctcctggt gggcctgggt 1260
 agctgggggt agggctgtgg gctccttcac aactacggcg ttacaccaa agtcagccgc 1320
 tacctcgact ggatccatgg gcacatcaga gacaaggaag cccccagaa gagctgggca 1380
 ccttag 1386

<210> 9
 <211> 1386
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 atgtggcagc tcacaagcct cctgctgttc gtggccacct ggggaatttc cggcacacca 60

gctcctcttg actcagtgtt ctccagcagc gagcgtgccc accaggtgct gcggatccgc 120
aaacgtgcc aactccttcc ggaggagctc cgtcacggga gcctggagcg ggagtgcata 180
gaggagatct gtgacttcga ggaggccaag gaaatcttcg aagatgtgga tgacacactg 240
gccttctggg ccaagcacgt cgacgggtgac cagtgtctgg tcttgccctt ggagcacccg 300
tgcgccagcc tgtgctgctg gcacggcacg tgcacgacg gcacggcag cttcagctgc 360
gactgccgca gcggctggga gggccgcttc tgcacgacg aggtgagctt cctcaattgc 420
tctctggaca acggcggctg caagcattac tgcctagagg aggtgggctg gcggcgctgt 480
agctgtgcgc ctggctacaa gctgggggac gacctcctgc agtgcaccc cgagtgaaag 540
ttcccttggt ggaggccctg gaagcggatg gagaagaagc gcagtcacct gaaacggagc 600
acagaagacc aagaagacca agtagatccg cggctcattg atgggaagat gaccaggcgg 660
ggagacagcc cctggcaggt ggtcctgctg gactcaaaga agaagtccgc ctgcggggca 720
gtgctcatcc acccctcctg ggtgctgaca gcggccact gcacggatga gtccaagaag 780
ctccttgta ggcttgaga gtatgacctg cggcgtggtg agaagtggga gctggacctg 840
gacatcaagg aggtcttcgt ccacccaac tacagcaaga gcaccaccga caatgacatc 900
gcactgctgc acctggccca gcccgccacc ctctgcaga ccatagtgc catctgctc 960
cggacagcg gccttgaca gcggagctc aatcaggccg gccaggagac cctogtgacg 1020
ggctggggct accacagcag ccgagagaag gaggccaaga gaaaccgac ctctgtctc 1080
aacttcatca agattcccgt ggtcccgcac aatgagtgca gcgaggtcat gagcaacatg 1140
gtgtctgaga acatgctgtg tgcgggcatc ctccgggacc gccaggatgc ctgcgagggc 1200
gacagtgggg ggcccatggt cgctccttc cacggcacct ggttctctgg gggcctggtg 1260
agctgggggt agggctgtgg gctccttcac aactacggcg ttacaccaa agtcagccgc 1320
tacctcgact ggatccatgg gcacatcaga gacaaggaag cccccagaa gagctgggca 1380
ccttag 1386

<210> 10

<211> 1386

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

atgtggcagc tcacaagcct cctgctgttc gtggccacct ggggaatttc cggcacacca 60
gctcctcttg actcagtgtt ctccagcagc gagcgtgccc accaggtgct gcggatccgc 120
aaacgtgcc aactccttcc ggaggagctc cgtcacggga gcctggagcg ggagtgcata 180
gaggagatct gtgacttcga ggaggccaag gaaatcttcg aagatgtgga tgacacactg 240
gccttctggg ccaagcacgt cgacgggtgac cagtgtctgg tcttgccctt ggagcacccg 300
tgcgccagcc tgtgctgctg gcacggcacg tgcacgacg gcacggcag cttcagctgc 360

gactgccgca ggggctggga gggccgcttc tgccagcgcg aggtgagctt cctcaattgc 420
tctctggaca acggcgctg cagcattac tgctagagg aggtgggctg gggcgctgt 480
agctgtgctc ctggctacaa gctgggggac gacctcctgc agtgtcacc cgcagtgaag 540
ttcccttggt ggaggccctg gaagcggatg gagaagaagc gcagtcacct gaaacgagac 600
acagaagacc aagaagacca agtagatccg cggctcattg atgggaagat gaccaggcgg 660
ggagacagcc cctggcaggt ggtcctgctg gactcaaaga agaagtccgc ctgcggggca 720
gtgctcatcc acccctcctg ggtgctgaca gggccact gcatggatga gtccaagaag 780
ctccttgta ggcttgaga gtatgacctg cggcgctggg agaagtggga gctggacctg 840
gacatcaagg aggtcttctg ccacccaac tacagcaaga gcaccagcga caatgacatc 900
gcactgctgc acctggccca gcccgccacc ctctgcaga ccatagtcc catctgcctc 960
ccggacagcg gccttgaga gcgagctc aatcaggccg gccaggagac cctcgtgacg 1020
ggctgggctt accacagcag ccgagagaag gaggccaaga gaaaccgac ctctgtcctc 1080
aacttcatca agattcccgt ggtcccgcac aatgagtgca gcgaggtcat gagcaacatg 1140
gtgtctgaga acatgctgtg tggggcacc ctggggacc ggcaggatgc ctgaggggc 1200
gacagtgggg ggccatggt cgctccttc caaggcact ggttctggt gggcctggtg 1260
agctgggggt agggctgtg gctccttca aactacggcg ttacaccaa agtcagccgc 1320
tacctcgact ggatccatg gcacatcaga gacaaggaag cccccagaa gagctgggca 1380
ccttag 1386

<210> 11
<211> 1386
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
atgtggcagc tcacaagcct cctgctgttc gtggccacct ggggaatttc cggcacacca 60
gctcctcttg actcagtgtt ctccagcagc gacggtgccc accagggtgt gggatccgc 120
aaacgtgcca actccttctt ggaggagctc cgtcaagga gcctggagcg ggagtgcata 180
gaggagatct gtgacttca ggaggccaag gaaatttctg aagatgtgga tgacacactg 240
gccttctggt ccaagcagc cgacgggtgac cagtgttgg tcttgcctt ggagcaccg 300
tgccagcacc tgtgctgagg gcacggcagc tgcacgacg gcatcggcag cttcagctgc 360
gactgccgca ggggctggga gggccgcttc tgccagcgcg aggtgagctt cctcaattgc 420
tctctggaca acggcgctg cagcattac tgctagagg aggtgggctg gggcgctgt 480
agctgtgctc ctggctacaa gctgggggac gacctcctgc agtgtcacc cgcagtgaag 540
ttcccttggt ggaggccctg gaagcggatg gagaagaagc gcagtcacct gaaacgagac 600
acagaagacc aagaagacca agtagatccg cggctcattg atgggaagat gaccaggcgg 660
ggagacagcc cctggcaggt ggtcctgctg gactcaaaga agaagtccgc ctgcggggca 720

gtgctcatcc acccctcctg ggtgctgaca gcggcccact gcatggatga gtccaagaag 780
 ctccctgtca ggcttgaga gtatgacctg cggcgctggg agaagtggga gctggacctg 840
 gacatcaagg aggtcttctg ccacccaac tacagcaaga gcaccaccga caatgacatc 900
 gcactgctgc acctggccca gcccgccacc ctctcgaga ccatagtgcc catctgcctc 960
 ccggacagcg gccttgaga gcgagagctc aatcaggccg gccaggagac cctcgtgacg 1020
 ggctggggct accacagcag ccgagagaag gaggccaaga gaaaccgcac cttcgtcctc 1080
 aacttcatca agattcccgt ggtcccgcac aatgagtgca gcgaggtcat gagcaacatg 1140
 gtgtctgaga acatgctgtg tgggggcatc ctccgggacc ggcaggatgc ctgagagggc 1200
 gacagtgggg ggcccatggt cgctccttc cacggcacct ggttcctggt gggcctggtg 1260
 agctgggggt agggctgtgg gctccttcac aactacggcg tttacaccaa agtcagccgc 1320
 tacctcgact ggatccatgg gcacatcaga gacaaggaag cccccagaa gagctgggca 1380
 ccttag 1386

<210> 12
 <211> 1386
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 atgtggcagc tcacaagcct cctgctgttc gtggccacct ggggaatttc cggcacacca 60
 gtcctcttg actcagtgtt ctccagcagc gagcgtgcc accaggtgct gcggatccgc 120
 aaacgtgcc actccttctt ggaggagctc cgtcaagga gcctggagcg ggagtgcata 180
 gaggagatct gtgacttcca ggaggccaag gaaatttctg aagatgtgga tgacacactg 240
 gccttctggt ccaagcacgt cgacggtgac cagtgttgg tcttgccctt ggagcacccg 300
 tggccagcc tgtgctgccc gcacggcagc tgcatcgac gcacggcag cttcagctgc 360
 gactgccgca gggctggga gggccgctt tgccagcgc aggtgagctt cctcaattgc 420
 tctctggaca acggcgctg cacgcattac tgcttagagg aggtgggctg gggcgctgt 480
 agctgtgccc ctggctacaa gctgggggac gacctcctgc agtgtcacc cgcagtgaag 540
 ttcccttgtg ggaggccctg gaagcggatg gagaagaag gcagtcacct gaaacgagac 600
 acagaagacc aagaagacca agtagatccg cggctcattg atgggaagat gaccaggcgg 660
 ggagacagcc cctggcaggt ggtcctgctg gactcaaaga agaagtccgc ctgaggggca 720
 gtgctcatcc acccctcctg ggtgctgaca gcggcccact gcatggatga gtccaagaag 780
 ctccctgtca ggcttgaga gtatgacctg cggcgctggg agaagtggga gctggacctg 840
 gacatcaagg aggtcttctg ccacccaac tacagcaaga gcaccagcga caatgacatc 900
 gcactgctgc acctggccca gcccgccacc ctctcgaga ccatagtgcc catctgcctc 960
 ccggacagcg gccttgaga gcgagagctc aatcaggccg gccaggagac cctcgtgacg 1020
 ggctggggct accacagcag ccgagagaag gaggccaaga gaaaccgcac cttcgtcctc 1080
 aacttcatca agattcccgt ggtcccgcac aatgagtgca gcgaggtcat gagcaacatg 1140
 gtgtctgaga acatgctgtg tgggggcatc ctccgggacc ggcaggatgc ctgagagggc 1200
 gacagtgggg ggcccatggt cgctccttc cacggcacct ggttcctggt gggcctggtg 1260
 agctgggggt agggctgtgg gctccttcac aactacggcg tttacaccaa agtcagccgc 1320
 tacctcgact ggatccatgg gcacatcaga gacaaggaag cccccagaa gagctgggca 1380
 ccttag 1386

Patentansprüche

1. Humanprotein C-Derivat, umfassend die SEQ ID NO: 1, die mindestens zwei Aminosäuresubstitutionen aufweist, ausgewählt aus den Gruppen, bestehend aus:
A) His an der Position 10 ist substituiert durch Gln; Ser an der Position 11 ist substituiert durch Gly; Ser an der Position 12 ist substituiert durch Lys; Gln an der Position 32 ist substituiert durch Glu; Asn an der Position 33 ist substituiert durch Asp oder Phe; und
B) die Aminosäure an der Position 194, 195, 228, 249, 254, 302 oder 316 ist substituiert durch eine Aminosäure, ausgewählt aus Ser, Ala, Thr, His, Lys, Leu, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly und Gln, wobei mindestens eine Substitution aus der Gruppe A) und eine Substitution aus der Gruppe B) vorliegt.
2. Humanprotein C-Derivat von Anspruch 1, wobei das Humanprotein C-Derivat in seiner aktivierten Form vorliegt.
3. Humanprotein C-Derivat von Anspruch 2, wobei das Derivat ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus S11G:Q32E:N33D:L194S (SEQ ID NO: 3), S11G:Q32E:N33D:L194S:T254S (SEQ ID NO: 4), H10Q:S11G:Q32E:N33D:L194S (SEQ ID NO: 5) und H10Q:S11G:Q32E:N33D:L194S:T254S (SEQ ID NO: 6).
4. Rekombinantes DNS-Molekül, welches das Humanprotein C-Derivat von einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert.
5. Humanprotein C-Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Verwendung als Arzneimittel.
6. Verwendung von dem Humanprotein C-Derivat nach Anspruch 2 für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung eines Zustands, der ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Gefäßverschlussstörungen und hyperkoagulablen Zuständen, Krankheitszuständen prädisponierend für eine Thrombose, Protein C-Mangel und akuten koronaren Syndrome, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Myocardinfarkt und instabile Angina.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend: das Humanprotein C-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in einem pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmittel.
8. Vektor, umfassend eine Nukleinsäure nach Anspruch 4.
9. Wirtszelle, die durch den Vektor nach Anspruch 8 transformiert ist.
10. Verfahren zur Herstellung des Humanprotein C-Derivats nach Anspruch 2, umfassend:
(a) Transformation einer Wirtszelle mit einem Vektor, der Nukleinsäure enthält, die das Humanprotein C-Derivat nach Anspruch 2 kodiert;
(b) Kultivierung der Wirtszelle in einem Medium, das geeignet ist für Expression des Humanprotein C-Derivats;
(c) Isolierung des Humanprotein C-Derivats aus dem Kulturmedium; und
(d) Aktivierung des Humanprotein C-Derivats.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

FIG. 1

