NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **310559** (13) B1

(51) Int Cl[7] C 07 K 14/745

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19924405	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1991.05.21, PCT/US91/03584
(22) Inng. dag	1992.11.13	(85) Videreføringsdag	1992.11.13
(24) Løpedag	1991.05.21	(30) Prioritet	1990.05.21, US, 526397
(41) Alm. tilgj.	1993.01.13		
(45) Meddelt dato	2001.07.23		
(83) Mikroorganisme deponert:	ATCC nr 67831, 67832, 68328, 68456, 68606		

(71) Patenthaver Bio-Technology General Corp, 1250 Broadway, New York, NY 10001, US
(72) Oppfinner Tikva Vogel, Rehovot, IL
Avigdor Levanon, Rehovot, IL
Moshe Werber, Tel-Aviv, IL
Rachel Guy, Rehovot, IL
Amos Panet, Jerusalem, IL
Jacob Hartman, Holon, IL
Hadassa Shaked, Ramat Gan, IL
(74) Fullmektig Bryns Zacco AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Fibrinbindende domene-polypeptider og anvendelse derav**

(56) Anførte publikasjoner Uehara et al., Jour. of Nucl. Med., vol. 29, nr. 7, 1988, side 1264-1267
Obara et al., FEBS Letters, vol. 213, nr. 4, 1985, side 13256-13260
Kornblihtt et al, EMBO Journal, vol. 4, nr. 7, 1985, side 1755-1759

(57) Sammendrag

Avbildingsmiddel som omfatter et polypeptid merket med en avbildbar markør, der polypeptidet har en aminosyresekvens som idet vesentlige er tilstede i fibrinbindende domene til naturlig forekommende human fibronektin og som har evnen til binding til fibrin. Det skaffes tilveie en fremgangsmåte der avbildingsmidlet blir anvendt for å avbilde en fibrin-inneholdende substans, dvs. en trombus eller aterosklerotisk plaque. Det skaffes videre tilveie plasmider for ekspresjon av polypeptider som har en aminosyresekvens som idet vesentlige er tilstede i fibrinbindende domene til naturlig forekommende human fibronektin og som har evne til binding til fibrin, verter som inneholder disse plasmider, fremgangsmåter for å fremstille polypeptidene, fremgangsmåter for behandling ved å anvende polypeptidene, og fremgangsmåter for å utvinne, folde på nytt og oksydere på nytt polypeptidene. Det skaffes også tilveie rensede polypeptider som idet vesentlige er fri for andre substanser av human opprinnelse som har en aminosyresekvens som idet vesentlige er tilstede i fibrinbindende domene til naturlig forekommende human fibronektin og som har evne til å binde til fibrin.

Endotelskade antas å være det første trinn i trombosedannelse og bli forårsaket av for eksempel hemodynamisk tilstand, hyperkolesterolemi, hypertensjon og immunkomplekssykdom. Endotelskade fører til fortykkelse av intima, celleproliferasjon, kolesterolakkumulering og dannelse av bindevevsfibre. IgG og komplementfaktor C3 akkumulering i skadede endotelceller og ikke-endotelisert intima har blitt observert. Mononukleære celler avledet fra blod er også del av cellepopulasjonen i aterosklerotiske skader. Mekanismen ved plaquedannelse er ikke fullstendig kjent. En sansynlig mekanisme er imidlertid at den tidligste skade, fettstriper, består av en blanding av T celler og monocytt-avledede makrofager, dannes i subendotelium etterfulgt av en sekresjon av forskjellige cytokiner, som fører til en bevegelse av glatte celler inn i intima og deres akkumulering deri.

De fleste eksisterende prosedyrene for diagnose og behandling av aterosklerose og trombose er angripne, kostbare og av begrenset effektivitet hos en signifikant prosentdel av pasienttilfellene.

Tema med plaque-økning ved påføring av en farge har blitt rapportert [Spears, J. et al., J. Clin. Invest, 71: 395-399 (1983)]. Disse fargene markerer plaque-overflatene med en fluorescerende forbindelse. Plaque-nedbrytning ved fotoaktivering av hematoporfyrinderivater som anvender en intraluminal laser-sendende optisk fiber har blitt foreslått [Abela, G. et al., Am. J. Cardiol. 50: 1199-1205 (1982)]. Videre har tetracyklinfarger også blitt antydet. [Murphy-Chutorian, D. et al., Am. J. Cardiol. 55: 1293-1297 (1985)].

De ovenfor identifiserte fargene ble valgt på grunn av deres evne til å binde til komponenter i den aterosklerotiske plaquen. Prinsipielt absorberer fargen laserlys som konsentrerer lyset på den fargede overflaten. Noe farging av friskt vev forekommer og dette forårsaker farge som er assosiert med skade på det omgivende vev. Fordi laser-

lysbølgelengden er begrenset til absorbsjonsbølgelengden av fargen, må kromoforer som gir optimal absorbsjon av laserlys bli anvendt for å skaffe tilveie best mulig kontrollert fjerning av vev.

Avbilding og påvisning av koronartrombi, pulmonær emboli, dypvenet trombose og aterosklerotiske skader har stor klinisk viktighet, særlig i lys av de nye trombolyttiske midlene som i det siste har blitt utviklet. Flere eksperimentelle tilnærmelser når det gjelder ikke-invasiv påvisning av trombi ved anvendelse av radiofarmasøytiske midler har blitt rapportert, men ingen er oppnådd ved klinisk anerkjennelse på grunn av interne ulemper som er forbundet med hvert middel.

Hovedkaraktertrekkene til et radiofarmasøytisk middel for tidlig påvisning av intravaskulær aterosklerotiske skader og trombi er følgende: (i) høy affinitet for trombuskomponenter; (ii) relativt rask farmakokinetisk blodklaringshastighet [for å oppnå et høyt forhold mellom trombus (bundet) til blod (ubundet) radiomerket tracer]; (iii) sikkerhet: ikke-toksisk og ikke-immunogenisk; og (iv) enkelhet ved preparering og anvendelse.

De forskjellige midlene for avbilding av trombi som er beskrevet i litteraturen og deres ulemper er som følger: (a) autologe plater merket med ^{111}In: fremgangsmåten er arbeidskrevende, tidskrevende og blodklaringstiden er relativt lang, for eksempel 2 dager (2); (b) ^{131}I-fibrinogen: analysen er basert på (lav) affinitet av injisert radiomerket fibrinogen for trombus, men den er ikke velegnet for raske avbildingstester på grunn av dens lange oppholdstid i blodet og videre blir den ikke inkorporert i gamle trombi og den blir heller ikke inkorporert i nærvær av heparin (3, 36); (c) fragment E1 av human fibrin: selv om den synes overlegen i forhold til fibrinogen er den vanskelig å fremstille i tilstrekkelige mengder for omfattende klinisk anvendelse (4); (d) muse anti-

fibrinmonoklonale antistoffer: selv om de er spesifikke og har høye affiniteter for trombi, har de en relativt lang blodklaringstid og er potensielle immunogene til humane subjekter (5, 33, 34); (e) musemonoklonale antistoffer spesifikk for aktiverte plater (6, 7): ulempen som (d); og (f) merket fibronektin (1): selv om fibronektin (se under) har en affinitet for en lang rekke substanser som forekommer i trombi, den har en relativt lang blodklaringstid og oppbygningen av radioaktivitet i trombus er langsom. Det er således et behov innenfor fagområdet for et trombus-spesifikt radiofarmasøytisk middel for rask avbilding av trombi.

U.S. patent 4,343,734 (Lian et al.) beskriver spesifikk gamma-karboksyglutaminsyre (GLA) antistoffer som kan bli merket med fluorescerende middel for immunofluorescensfarging av vev for å bestemme tilstedeværelse av GLA. Spesifikke GLA antistoffer bindes til GLA som er tilstede i fremskredne aterosklerotiske plaque, som har kalsiumavsetninger. Lian et al. rapporterte at GLA ikke blir funnet i ukalsifiserte plaque og at GLA blir funnet i kardiakventiler og aorta, og i sirkulerende proteiner, slik som protrombin, koaguleringsfaktorene VII, IX og X, protein C og protein S. GLA bindende antistoffer til Lian et al., binder imidlertid ikke selektivt til aterosklerotiske plaque.

Fibronektin er et glykoprotein som består av to identiske subenheter som hver er på tilnærmet 220 000 i molekylvekt. To hovedformer fibronektin blir fremstilt og sekrert av humane celler i kultur og in vivo (8). Celleassosiert fibronektin er relativt uoppløslig og deltar i celleadhesjon, sårhelning, celledifferensiering og fagocytose. Plasmafibronektin, primært fremstilt i leveren, er et oppløslig serumprotein med biologiske egenskaper som tilsvarer de i cellefibronektin.

Fibronektin blir betraktet å være et multifunksjonelt modulært protein siden begrenset proteolyttisk kløyving gir

polypeptider med distinkte aktiviteter. De hovedfunksjonelle domenene til fibronektinmolekylet har blitt oppnådd og definert ved partiell proteolyttisk spaltning, og inkluderer heparin, DNA, fibrin, kollagen eller gelatin, og cellebindende domener (8-13).

Baralle, F.E., Europeisk patentpublikasjon nr. 207,751, publisert 7. januar 1989, beskriver den fullstendige cDNA sekvensen til fibronektin. Baralle beskriver også ekspresjon av fusjonsproteiner som inneholder en del av den kollagenbindende domenen til fibronektin sammensmeltet til Escherichia coli protein β-galaktosidase. Tilsvarende fusjonsproteiner blir beskrevet av Owens og Baralle (14). Obara et al. (1987) beskriver ekspresjon av en del av den cellebindende domenen til human fibronektin sammensmeltet til Escherichia coli β-galaktosidase (15). I tillegg beskriver Obara et al. (1988) ekspresjon av deler av cellebindingsdomenen som er sammensmeltet til β-galaktosidase som har blitt mutagenisert, det vil si setespesifikk delesjon av deler av den cellebindende domenen ble oppnådd som sammensmeltede proteiner (16). Den karboksyterminale fibrin-bindende domenen av human fibronektin har blitt uttrykt i muse L celler som et fusjonsprotein med signalsekvensen til humanprotein C hemmer (17).

Ingen av referansene over beskriver ekspresjon av N-terminal fibrinbindende domene av fibronektin; videre er alle de rekombinante proteinene som beskrives fusjonsproteiner.

Oppfinnelsen skaffer tilveie polypeptider som har aminosyresekvens som idet vesentlige er tilstede i den N-terminale fibrinbindende domenen til fibronektin. Disse polypeptidene har tilnærmede molekylvekter på 31 kD, 20 kD, 18,5 kD og 12 kD, som definert ved sammenligningsmarkører på SDS geler under reduserende betingelser, og som har følgende karaktertrekk som gjør dem lovende som farmasøytiske midler: (i) har en aminosyresekvens som er tilstede i et humant protein og blir således ikke tilsiktet å være immunogenisk; (ii) har

spesifisitet til fibrin basert på dens evne til å bli kovalent tverrbundet i en trans-glutaminasekatalysert reaksjon til tilblivende såvel som forhåndsdannede trombi (koaguleringer); (iii) bindes til ekstracellulær matriks, denne egenskapen kan bli utviklet til å påvise aterosklerotiske plaque; (iv) har en relativt kort blodklaringstid; (v) inkorporerer inn i koaguleringer i nærvær av heparin; og (vi) blir fremstilt ved rekombinante teknikker og kan derfor muligens bli fremstilt i stor skala.

Foreliggende oppfinnelse skaffer tilveie et avbildingsmiddel, kjennetegnet ved at det omfatter et polypeptid merket med en avbildbar markør der polypeptidet har en aminosyresekvens som i det vesentlige er identisk med en sekvens som er tilstede i det N-terminale fibrinbindingsdomene av naturlig forekommende humant fibronektin, som er istand til å binde til fibrin, som har en molekylvekt over 6 kD, men mindre enn 20 kD, og som har aminosyresekvensen gln-ala-gln-gln eller met-gln-ala-gln-gln i N-terminalen til polypeptidet.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse renset polypeptid istand til å binde fibrin, i det vesentlige fri for andre substanser av human opprinnelse, kjennetegnet ved at den har en aminosyresekvens som i det vesentlige er tilstede i det aminoterminale fibrinbindingsdomene i det naturlig forekommende humane fibronektinet, som har en molekylvekt over 6 kD, men mindre enn 20 kD, og som har aminosyresekvensen gln-ala-gln-gln eller met-gln-ala-gln-gln N-terminalt i polypeptidet.

Oppfinnelsen skaffer også tilveie anvendelse av polypeptidet som tidligere nevnt, for fremstilling av en diagnostisk sammensetning for avbildning av en fibrininneholdende substans ved å bringe i kontakt den fibrininneholdende substansen under betingelser slik at polypeptidet binder til den fibrininneholdende substansen.

I figurene vil tallene i hakeparentes som er tilgrensende visse av restriksjonsenzymsetene som er vist korrespondere til de identisk nummererte posisjonene langs nukleotidsekvensen til human fibronektin cDNA som vist i figur 2 (se også figur 3 til Baralle, F.E., Europeisk patentpublikasjon nr. 207,751, publisert 7. januar 1987).

Følgende figurer beskriver konstruksjon av plasmider som uttrykker polypeptider som har en aminosyresekvens som idet vesentlige er tilstede i den amino-terminale fibrinbindende domenen (FBD) av fibronektin. FBD starter ved aminosyre nr. 1 i moden fibronektin, som er glutamin og korresponderer til fjerde aminosyre (Q) vist i figur 2A, det vil si N-terminalen til FBD sekvensen er Q-A-Q-Q (glutamin-alanin-glutamin-glutamin); det korresponderende første nukleotidet i cDNA sekvensen av figur 2A er derfor nr. 14, angitt med en pil. Alle rekombinante FBD polypeptider som er beskrevet i disse tallene og gjennom beskrivelsen er nummerert fra denne første glutamin som aminosyre 1 og alle korresponderende cDNA sekvenser er nummerert som vist i figur 2.

Noen av figurene beskriver konstruksjon av plasmider som uttrykker en FBD polypeptid knyttet ved sin C-terminal til deler av den cellebindende domenen (CBD) av fibronektin. cDNA sekvensen som tilsvarer CBD som foreliggende søkere har klonet og uttrykt mangler 270 bp ekstra domene (ED) segmentet som strekker seg fra nukleotid 4811 til og med 5080, på Baralle kartet (se figur 2). cDNA sekvensen som således sies å strekke seg fra nukleotid 3317 til 5566 på Baralle kartet, inneholder bare 1980 nukleotider, fordi den mangler 270 nukleotider av ED segmentet, nemlig fra nukleotid 4811 til og med 5080; dette området er også kjent innenfor fagområdet som ED-A området. Fordi nukleotid 5081 er endret fra G til A, er aminosyre 1690 endret fra alanin til treonin. På tilsvarende måte vil polypeptidet som er uttrykt av det DNA fragmentet kode fra aminosyre 1102 til aminosyre 1851 på Baralle kartet, men vil mangle 90 aminosyrer som er kodet av ED området,

nemlig å aminosyrene 1600 til og med 1689, og vil således bare inneholde 660 aminosyre. Dette stemmer for alle CBD polypeptider som er beskrevet i søknaden som utspenner ED området. (Området er kjent innenfor fagområdet som ED-B området mangler både i Baralle sekvens og foreliggende søknads DNA.)

Definisjon av polypeptider som er uttrykt som 31 kD, 20 kD, 18,5 kD, 12 kD og 33 kD er en operasjonell definisjon, basert på deres tilnærmede molekylvektbestemmelse på SDS polyakrylamidgeler under reduserende betingelser sammenlignet med den til markører av kjent molekylvekt.

Figur 1. Denne figuren er en skjematisk beskrivelse av forskjellige fibronektindomener og rekombinante polypeptider som er konstruert.

Figur 2. Denne figuren viser nukleotidsekvensen til human fibronektin cDNA.

Figur 3. Syv par av skjematisk syntetiserte oligomerer ble fremstilt. De syntetiske oligomerene koder for de første 153 N-terminale aminosyrene til human fibronektin (FN). Denne figuren viser sekvensen av disse 7 parene med syntetiske oligomerer.

Figur 4. DNA fragmentet som koder for aminosyrene 1 til 153 til N-terminal domene av human FN ble samlet fra 7 par med kjemisk syntetiserte oligomerer som er vist i figur 3 som følger:
Oligomere 3/4, 5/6, 7/8 og 9/10, hvert par i separat rør, ble satt sammen og deretter fosforylert ved 5' ende ved å anvende T4 polynukleotidkinaseenzym.

I det andre trinnet ble parene 3/4 og 5/6 ligert til hverandre ved å anvende T4 DNA ligase. På tilsvarende måte ble reaksjonspar 7/8 og 9/10 ligert til hverandre. Etter

hvert ligeringstrinn ble en prøve av ligeringsblandingen analysert på gel for å bestemme størrelsen av de nylige dannede fragmentene og ligeringseffektiviteten.

I det tredje trinnet ble to av de ovenfor nevnte ligeringsblandingene blandet sammen og par 6, oligomerene 11/12 som hadde blitt satt sammen og fosforylert tidligere i et separat rør ble tilsatt blandingen. Et 326 basepar DNA fragment som ble oppnådd fra ligeringsblandingen over ble isolert fra en agarosegel og renset.

Det rensede syntetiske 326 fragmentet ble tilsatt to ytterligere par med syntetiske linkere: par 1, oligomer 1/2 og par 7, oligomer 13/14. I par 1 ble bare oligomer 2 fosforylert ved 5' ende og i par 7 ble bare oligomer 13 fosforylert ved 5' ende.

Etter ligering med T4 DNA ligase ble blandingen uten noe ytterligere isolering tilsatt pBR322 vektor DNA spaltet med EcoRI og BamHI endonukleaser.

Det oppnådde plasmidet, med betegnelse pFN 932-18 inneholdt hele den syntetiske EcoRI (5' ende) - BamHI (3' ende) restriksjonsfragment som koder for N-terminale 153 aminosyrer av human FN, i en pBR322 vektor.

Figur 5. Ekspresjon av N-terminal 153 aminosyresekvens av FN

Plasmid pFN 932-18 ble spaltet med NdeI og BamHI endonuklease. NdeI-BamHI DNA fragmentet som koder for FN (første 153 aminosyrer + ytterligere N-terminal metionin) ble isolert og ligert inn i det store fragmentet som ble oppnådd ved spalting av plasmid pTV301 med NdeI og BglII endonuklease. (Plasmid pTV301 uttrykker human veksthormon, hGH, under regulering av λ P_L promoter og cII RBS).

Plasmidet som ble oppnådd ble betegnet pFN949-2.

Figur 6. Innføring av termineringskodon TAA ved 3' ende av N-terminal domene av FN (ved aminosyre 262)

Et syntetisk oligonukleotid som inneholder en TAA termineringskodon og en BglII sete har følgende sekvens:

CTGTTTAAGCA

GACAAATTCGTCTAG

ble ligert til 3' ende (PvuII sete) av et EcoRI-PvuII FN fragment isolert fra cDNA plasmid p931-5 (se figur 6) spaltet med EcoRI og PvuII. Ligeringen ble gjennomført i nærvær av DNA vektorplasmid pBR322 spaltet med EcoRI og BamHI (stort fragment). Det oppnådde plasmidet ble betegnet pFN935-12.

Figur 7. Sammenligning av farmakokinetikk av fibronektin (FN) og r31 kD FBD i rotter

^{125}I-FN (0,1 mg/kg; 5 x 10^6 cpm) eller ^{125}I-r31 FBD (0,1 mg/kg; 5 x 10^6 cpm) ble injisert intravenøst og ved de angitte tidspunktene ble det tatt blodprøver. Uoppløslig radioaktivitet i blodprøvene ble bestemt ved trikloreddiksyreutfelling; ved tid null vil 100% verdi representere 40000 cmp/ml for FN og 46000 cpm/ml for FBD.

Figur 8. Binding av S. aureus til katetere

Binding av 3,0 x 10^6 PFU/ml ^{125}I-S.aureus (1 CPM/3 PFU) til "Uno" bronkiale plastkatetere (3 cm for hver reaksjon, dobbel) belagt med FN ble gjennomført som beskrevet i fremgangsmåter. Når konkurrerende reaksjoner ble utført, ble bakterer og tilsatt protein forinkubert ved romtemperatur i 30 minutter og deretter tilsatt kateterene for videre inkubering som beskrevet i fremgangsmåteseksjonen.

Polypeptider som blir anvendt i konkurrerende reaksjoner var: P-31 (p31 kD),r-20 (rekombinant 20 kD FBD polypeptidfragment) og r-31 (reoksydert og gjenfoldet r31kD). Noen av reaksjonene (se figur) ble målt i nærvær av 5 μM heparin (fra porsin-intestinal mukosa, molekylvekt - 10000; Sigma).

Binding av "kontroll" reaksjon i fravær av konkurrenter (8,8% av innførte bakterier) ble normalisert til 100%.

Figur 9. Rekombinante polypeptider av fibronektindomener sammenlignet med fullengdefibronektin

Denne figuren viser tilegning av cDNA kloner som koder for forskjellige rekombinante polypeptider relativt til hverandre og til fullengdesekvensen av fibronektin cDNA og en skjematisk representasjon av forskjellige domener som er tilstede i det humane fibronektinmolekylet.

Figur 10. Konstruksjon av plasmid pFN 196-2 som uttrykker r12 kD FBD polypeptidet

Det store BspMI-HindIII fragmentet som ble oppnådd ved spalting av plasmid pFN 975-25 (figur 10) med BspMI og HindIII ble ligert med T4 DNA ligase til det syntetiske par av linkere A (se figur 15). Plasmid pFN 196-2 ble fremstilt, transformert inn i Escherichia coli stamme A1645 og transformert på nytt inn i Escherichia coli stamme A4255. Plasmid pFN 196-2 inneholder 5'-terminal sekvens av fibronektin cDNA fra nukleotid 14 til nukleotid 340, det vil si det koder for de første 109 aminosyrene av FBD av fibronektinterminering med en argininresidie. En ytterligere N-terminal metionin er tilstede i det endelige polypeptidet. Plasmid pFN 196-2 gir god ekspresjon av et r12 kD FBD polypeptid under regulering av λ-promoteren og β-laktamaseribosomal bindingssete, og har blitt deponert i ATCC under aksesjonsnr. 68328.

Figur 11. Konstruksjon av plasmid pFN 197-10, som uttrykker et modifisert 12 kD FBD polypeptid (12 kD')

Plasmid pFN 975-25 ble behandlet som beskrevet i figur 10 med unntagelse av at et ulikt par linkere, B (se figur 15) ble anvendt. Ligeringen fremstilt i plasmid pFN 197-10 som koder for den N-terminale sekvensen av FBD av FN; en modifikasjon etter nukleotid 340 for å fremstille et NdeI sete (CATATG) før stoppkodon resulterer imidlertid i koding av et polypep-

tid som inneholder 111 aminosyrer der de første 109 aminosyrene korresponderer til de i r12 KD polypeptid etterfulgt av to ytterligere aminosyreresidier, det vil si histidin og metionin. En ytterligere N-terminal metioninresidie er tilstede i det endelige polypeptidet. Plasmid pFN 197-10 ble transformert inn i Escherichia coli stamme A1645 og deretter inn i Escherichia coli stamme A4255, og ga god ekspresjon av en modifisert r12 kD (12 kD') FBD polypeptid under regulering av λ promoteren og β-laktamaseribosomal bindingssete.

Figur 12. Konstruksjon av plasmid pFN 202-5 som uttrykker r12 kD' FBD sammensmeltet til r33 kD cellebindingsdomene (CBD) av fibronektin

Det store fragmentet som ble fremstilt etter NdeI og HindIII spalting av plasmid pFN 197-10 (figur 11) ble ligert med T4 DNA ligase til NdeI-HindIII CBD (cellebindingsdomene) fragmentet av plasmid pFN 137-2. Plasmid 137-2, deponert i ATCC under aksesjonsnr. 67910 har blitt beskrevet i den opprinnelige patentsøknaden, U.S. serienr. 345,952; r33 kD CBD sekvensen inneholder aminosyrer nummerert fra 1329-1722 av fibronektin (se figur 2) som ekskluderer 90 aminosyrer med nummer 1600-1689 kodet av ED-A regionen (se innledning til beskrivelsen av figurene).

Det resulterende plasmid pFN 202-5, ble transformert inn i Escherichia coli stamme A1645 og derfra til Escherichia coli stamme A4255. Plasmid pFN 202-5 inneholder cDNA sekvensen til 111 aminosyrer som er kodet av plasmid pFN 197-10 fulgt av cDNA sekvensen for r33 kD CBD som starter med kodon for serin (den første aminosyren i r33 kD CBD). Dette plasmidet ga god ekspresjon av en tilnærmet 45 kD polypeptid som omfatter r12 KD fibrin bindende domene og 33 kD cellebindingdomene av fibrinonektin; dette sammensmeltede polypeptidet ble uttrykt under regulering av λ promoteren og β-laktamaseribosomal-bindingssetet.

Figur 13. Konstruksjon av plasmid pFN 195-4 som uttrykker r31 kD FBD sammensmeltet til sekvensen DGRGDS

Det store fragmentet som ble oppnådd ved spalting av plasmid pFN 975-25 med PvuII og HindIII ble isolert og ligert med T4 DNA ligase til et par med syntetiske linkere, C (se figur 15). Det resulterende plasmidet med betegnelsen pFN 195-4 ble transformert inn i Escherichia coli stamme A1645 og derfra til Escherichia coli stamme A4255. Plasmid pFN 195-4 inneholder fullengde FBD cDNA sekvensen fra nukleotid 14 til nukleotid 793 (som koder for 260 aminosyrer) etterfulgt av en sekvens som koder asp-gly-arg-gly-asp-ser, det vil si det kodede polypeptidet var samlet 260 aminosyrer etterfulgt av sekvensen DGRGDS. En ytterligere N-terminal metioninresidie er tilstede i det endelige polypeptidet. Plasmid pFN 195-4 er en god ekspressor for r31 kD fibrinbindende domene sammensmeltet til sekvensen asp-gly-arg-gly-asp-ser (DGRGDS), under regulering av λ promoteren og β-laktamaseribosomalbindingssetet.

Figur 14. Konstruksjon av plasmid pFN 194-2 som uttrykker et sammensmeltet 31 kD FBD-33 kD CBD polypeptid

Det store PvuII-HindIII fragmentet fremstilt ved spalting av plasmid pFN 975-25 med PvuII og HindIII ble isolert og ligert med T4 DNA ligase til et par med linkere, D (figur 15) og deretter ligert til cellebindende domene (CBD) fragment oppnådd ved spalting av plasmid pFN 137-2 (ATCC aksesjonsnr. 67910) med NdeI og HindIII; se figur 12 for definisjon av CBD domenen. Det resulterende plasmid med betegnelsen pFN 194-2, ble transformert til Escherichia coli stamme A1645 og derfra til Escherichia coli stamme A4255. Plasmid pFN 194-2 er en lavekspressor av et sammensmeltet r31 kD FBD-r33 kD CBD polypeptid med tilnærmet molekylvekt 64 kD, under regulering av λ P_L promoteren og β-laktamaseribosomalbindingssetet. Polypeptidet som er kodet av plasmid pFN 194-2 inneholder DNA som koder for de første 265 aminosyrene av fibronektin sammensmeltet til et metioninkodon, etterfulgt av cDNA

sekvensen for CBD av fibronektin, som starter ved kodon for aminosyren serin ved posisjon 1 i CBD.

En med kunnskap innenfor fagområdet vet hvordan man skal oppnå høy ekspresjon av polypeptidet som er uttrykt av plasmid pFN 194-2. Et eksempel på en slik høy ekspressor er plasmid pFN 205-5 beskrevet i figur 25.

Figur 15. Oligotidlinkere som blir anvendt i konstruksjon av plasmider

Fire par med kjemisk syntetiserte oligomerer (A, B, C og D) ble fremstilt og ble anvendt for å konstruere plasmider som er beskrevet i henholdsvis figur 10, 11, 13 og 14.

Figur 16. Opptak av merket r31 kD FBD ved rustfrie stålcoil-induserte venøse trombi

Søyler og vertikale streker representerer gjennomsnittlig ± SEM (N=10) av spesifikk radioaktivitet forbundet med isolerte trombi, venesegmenter som bærer trombus ("trombi in-situ"), eller periferiblodprøver 24 timer etter administrering av ^{125}I-31 kD FBD. For detaljer, se eksempel 7, seksjon A.

Figur 17. Sammenligning av merket r12 kD, r20 kD og r31 kD FBD polypeptider i rottevenøs trombusmodell

Søylene og vertikale streker representerer gjennomsnittlig ± SEM (N=5) og spesifikk radioaktivitet forbundet med isolerte trombi (T) eller blod (B) 24 timer etter administrering av ^{125}I-merkede rekombinante polypeptider som angitt. For detaljer, se eksempel 7, seksjon B.

Figur 18. Metabolsk stabilitet av ^{125}I-merket r31 kD FBD i rotter

Rotter ble injisert intravenøst med ^{125}I-r31 kD FBD (5×10^6 cpm/rotte) i et tilsvarende eksperiment som det som er beskrevet i figur 7. På de samme angitte tidsintervallene ble blodprøver tatt, plassert i natriumcitratinneholdende rør (endelig natriumcitratkonsentrasjon = 0,38%) og de resul-

terende blodprøvene ble behandlet som følger: enten (A) behandlet med 20% TCA og TCA uoppløselige tellinger (etter TCA utfelling) ble målt; eller (B) inkubert med forlagede koageler (ved å anvende 20 µl fullblod fra kontrollrotte); binding av ^{125}I-31 kD FBD til den forlagede koagelen ble målt under betingelsene i to-trinns reaksjon II (eksempel 6). Radioaktiviteten ble målt med en gammateller og aktiviteten av hver prøve ble beregnet som en prosentdel av samlet cpm som er tilstede i reaksjonsblandingen. (Normal TCA utfelling inkluderer at man plasserer prøvene på filtere som blir talt for totalt cpm, vasking av filteret tre ganger med 20% TCA etterfulgt av to ganger med 20% etanol for å ekstrahere TCA, og telle filterene på nytt for TCA uoppløslige tellinger, hvorved prosentdelen av TCA uoppløslige tellinger kan bli beregnet).

Figur 19. Binding av fibrinbindende domenepolypeptider til fibrinkoagelen

Dette eksperimentet ble idet vesentlige gjennomført som beskrevet for to-trinns reaksjon II (eksempel 6). 0,15 µM ^{125}- av en av de fibrinbindende domenepolypeptidene som angitt under ble inkubert ved 37°C med forlaget fibrinkoagel avledet fra 20 µl citratbehandlet fullblod. Binding ble målt i nærvær av 5 mM $CaCl_2$ og 0,02 enheter/ml transglutaminase. Reaksjonen ble avsluttet, etter en 45 minutters inkubering med sentrifugering; pelleten ble vasket tre ganger med PBS og radioaktiviteten ble målt i en gammateller.

1. Plasmatisk 31 kD FBD (p31 kD)
2. r12 kD
3. r20 kD
4. r31 kD (sats A)
5. r31 kD (sats B)
6. r31 kD (sats C)

Figur 20. Sammenligning av binding av ^{125}I-r12 kD til frisk og frosne fibrinkoageler

Dette eksperimentet ble gjennomført idet vesentlige som beskrevet for to-trinns reaksjon II (eksempel 6). Forlagede fibrinkoageler avledet fra 20 µl citratbehandlet helt humant blod ble enten frosset ved -70°C i 7 dager (frosne koageler) eller anvendt umiddelbart etter deres dannelse (friske koageler).

Fibrinkoagelene ble inkubert med 0,15 µM ^{125}I-r12 kD i nærvær eller fravær av 0,02 enheter/ml marsvinlevertransglutaminase (Sigma). Bindingen til fibrinkoageler ble målt som beskrevet i eksempel 6.

Figur 21. Folding på nytt og rensing av r20 kD polypeptidet som registrert ved elueringsprofiler fra Superose 12 kolonne (tilknyttet en FPLC)

Prøver med 200 µl av r20 kD polypeptidet i forskjellige trinn og folding på nytt og rensingsprosessen ble injisert på toppen av Superose 12 kolonne (tilknyttet en FPLC). Kolonnen ble ekvilibrert og eluert med en oppløsning av 150 mM NaCl/20 mM Tris HCl, pH 7,8, ved en strømningshastighet på 0,8 ml/min. De lavere sporene blir oppnådd fra FPLC kontroller LCC-500. A. Pellet av r20 kD polypeptid oppløst i 6 M Guanidin-HCl og redusert med 50 mM ß-merkaptoetanol; B. Foldet på nytt og luft-reoksydert r20 kD polypeptid; C. Q-Sepharose bundede polypeptider, dvs. materiale som ble separert fra den rensede r20 kD; D. Gjennomstrømming fra Q-Sepharose kolonnen; E. Gjennomstrømming fra Heparin-Sepharose kolonne, dvs. materiale som ble separert fra renset r20 kD; F. renset 20 kD polypeptid (retensjonstid = 18,16 min.), eluert fra Heparin-Sepharose kolonnen med 0,5 M NaCl. Legg merke til at det ikke er noen topp ved denne retensjonstiden på 18,16 min i profil A, der materialet er i redusert form, heller ikke profilene C og E, som inneholder ukorrekte foldede former av 20 kD polypeptidet.

Figur 22. Folding på nytt og rensing av r12 kD polypeptidet som registrert ved elueringsprofiler fra en Superose 12 kolonne (tilknyttet et vann HPLC system)

Prøver med 25-100 µl av r12 kD polypeptidet ved forskjellige trinn og folding på nytt og renseprosess ble injisert på toppen av en Superose 12 kolonne (tilknyttet et vann HPLC system). Kolonnen ble ekvilibrert og eluert med en oppløsning med 150 mM NaCl/20 mM Tris HCl, pH 7,8, ved strømningshastighet på 0,8 ml/min. A. Pellet av r12 kD polypeptid oppløst i 6 M Guanidin-HCl og redusert med 50 mM β-merkaptoetanol; B. Foldet på nytt og luft-gjenoksydert r12 kD polypeptid; C. Q-Sepharose bundede polypeptider, dvs. materiale som blir separert fra renset r12 kD; D. Gjennomstrømming fra både Q- og Heparin-Sepharose kolonner (i dette tilfellet, ble kolonnene knyttet sammen i serier og gjennomstrømmingen fra Q-Sepharose ble derfor automatisk anbragt på Heparin-Sepharose kolonnen), dvs. materiale som ble separert fra renset r12 kD; E. Renset r12 kD polypeptid (retensjonstid-18,83 min.), eluert fra Heparin-Sepharose kolonnen med 0,5 M NaCl. Legg merke til at det ikke er noen topp ved denne retensjonstiden på 18,83 min. i profil A, der materialet er i redusert form, og heller ikke i profilene C og D, som inneholder ukorrekt foldede former av r12 kD polypeptidet.

Figur 23. Konstruksjon av plasmid pFN 208-13

To prøver med plasmid pFN 975-25 (ATCC nr. 67832) ble separat spaltet med henholdsvis XmnI og XbaI-StyI. De store fragmentene ble isolert fra hver spalting og blandet sammen med den syntetiske oligomeren som er vist i figur 8. Blandingen ble deretter kokt i 2,5 min., gradvis avkjølt i 60 min. ved 30°C, etterfulgt av 60 min. ved 4°C, og endelig 30 min. ved 0°C. Den nå gjenannilerte DNA ble deretter fyllt i ved Klenow fragment og ligert med T4 DNA ligase. DNA ble transformert inn i E. coli A1645 og transformanter ble screenet for en klon som var positiv for oligomeren. Plasmidet fra et positivt klon fikk betegnelse pFN 208-13, og deponert i ATCC

i en vert E. coli A4255 som aksesjonsnr. 68456. Plasmidet uttrykker en 18,5 kD FBD polypeptid av aminoterminal ende av molekylet under regulering av λ P_L promoter og β-laktamase-ribosomalbindingssete.

Figur 24. Syntetisk linker som blir anvendt i konstruksjon av plasmid pFN 208-13

Denne figuren viser den syntetiske oligomeren som blir anvendt i konstruksjon av plasmid pFN 208-13 (figur 23).

Figur 25. Konstruksjon av plasmid pFN 205-5

Det lille fragmentet blir isolert fra spaltingen av plasmid pFN 194-2 (figur 14) ved XbaI-HindIII. Det lille fragmentet ble isolert fra NdeI-HindIII spalting av plasmid pFN 962-3 (beskrevet i patentsøknad PCT/US89/05875 og publisert i internasjonal publikasjon nr. WO/90/07577 12. juli 1990, figur 45-49 og beskrivelsen av figurene). Disse fragmentene ble deretter ligert med det store fragmentet isolert fra NdeI-HindIII spalting av plasmid pMLK-100 (ATCC aksesjonsnr. 68605). Det resulterende plasmidet med betegnelse 205-5 er en høy ekspressor av et 64 kD polypeptid som inneholder 31 kD FBD sammensmeltet til 33 kD CBD under regulering av λ P_L promoter, CII ribosomalbindingssetet og som inneholder trp transkripsjonsterminator med betegnelse "ter" umiddelbart nedstrøms av det strukturelle genet. Dette polypeptidet har blitt renset og foldet på nytt vesentlig som beskrevet for et 31 kD FBD polypeptid som er beskrevet i den ovenfor refererte PCT publikasjon.

Figur 26. Konstruksjon av plasmid pFN 201-3

Det store fragmentet ble isolert fra HindIII-StyI spalting av plasmid pFN 949-2 (ATCC aksesjonsnr. 67831), og ligert med det lille fragmentet isolert fra HindIII-StyI spalting av plasmid pFN 196-2 (ATCC aksesjonsnr. 68328). Det resulterende plasmidet med betegnelse pFN 201-3 uttrykker 12 kD FBD polypeptid under regulering av λP_L promoter og CII ribosomal bindingssete.

Figur 27. Konstruksjon av plasmid pFN 203-2

Det store fragmentet ble isolert fra NdI-HindIII spalting av plasmid pMLK-100 (deponert i E. coli 4300 under ATCC aksesjonsnr. 68605) og ligert med det mindre fragmentet isolert fra NdeI-HindIII spaltingen av plasmid pFN 201-3. Det resulterende plasmidet med betegnelse pFN 203-2 som uttrykker 12 kD FBD polypeptidet under regulering av λP_L promoter, C_{II} ribisomalbindingssetet og trp transkripsjonsterminering-ssekvens betegnet "ter" ble deponert i ATCC i E. coli A4255 under ATCC aksesjonsnr. 68606. Plasmid pFN 203-2 er også kjent som pFN 203-2-3.

Figur 28. Binding av FBD polypeptidfragmenter til vaskulære komponenter

Denne figurene viser den lave grad av binding av 12 kD polypeptidet til vaskulære komponenter slik som endotele celler, ekstracellulær matriks og immobilisert fibronektin ved sammenligning med 31 kD som beskrevet i eksempel 9. Binding av 12 kD ble øket men forble fremdeles relativt lav sammenligning med 31 kD, selv med tilsetning av eksogen transglutaminase.

Figur 29. Effekt av forskjellig FBD polypeptidfragmenter på binding av S. aureus til endotele celler (EC)

Fremstilling av merket S. aureus og endotel celle (EC) bindingsanalyse er beskrevet i eksempel 9. Den hemmende effekten av plasmatisk og rekombinant 31 kD, rekombinant 18,5 kD og rekombinant 12 kD på binding av S. aureus til EC ble undersøkt.

Denne figuren viser doseeffekt av forskjellige FBD polypeptider på binding av S. aureus til endotele celler ved 4°C i nærvær eller fravær av fetalt kalveserum (FCS). (Tidligere eksperimenter viste en dramatisk økning på 2-3 ganger i binding av S. aureus til EC i nærvær av FCS ved 37°C, men bare en svak økning ved 4°C. Økningen skyldes sansynligvis tilstedeværelse av plasmafibronektin i FCS). I eksperimentet

som ble gjennomført ved 4°C er det ingen signifikant effekt av tilsatt FCS på binding. Både plasmatisk og rekombinant 31 kD viser en sterk doseavhengig hemming av binding, mens rekombinant 18,5 kD og 12 kD polypeptidfragmenter forårsaket i virkeligheten ikke noe hemming av binding og dette indikerer at de har liten eller ingen S. aureus bindingsaffinitet.

Figur 30. Binding av forskjellig FBD polypeptidfragmenter til fibrinkoagel laget på forhånd (reaksjon II)

Denne figuren viser spesifisiteten av forskjellig FBD polypeptider til fibrinkoagel laget på forhånd som beskrevet i eksempel 9. FBD polypeptider som ble undersøkt var 31 kD, 20 kD, 18,5 kD og 12 kD. I tillegg ble et 45 kD fusjonspolypeptid av 12 kD FBD fragment sammensmeltet til 33 kD CBD (eksempel 40) undersøkt. Et 33 kD CBD polypeptid (se PCT publikasjon nr. WO/90/07577, side 62-64) ble inkludert som en kontroll. Alle av FBD polypeptidene ble undersøkt, inkludert 45 kD fusjonspolypeptid, bundet til en forlaget fibrinkoagel i tilsvarende andeler (25-38% bundet). 33 kD CBD alene bundet til koagelen bare i en mindre andel. Transglutaminasehemmer jodacetat (IAC) hemmet binding med 50-75% og dette indikerer at transglutaminase er en aktiv komponent i bindingsreaksjonen. Binding av 33 kD CBD polypeptid var ikke merkbart påvirket av jodacetat og dette indikerer at den binder med en forskjellig mekanisme.

Figur 31. In vivo trombimerking ved å anvende 12 kD og 18,5 kD FBD polypeptidfragmenter ble beskrevet i eksempel 13. Figuren viser resultatene av spesifikk radioaktivitet av trombus (skraverte søyler) og blod (åpne søyler) i rustfritt stål coil-bærende rotter, 24 timer etter intravenøs administrering av ^{111}In-merkede rekombinante FBD proteiner. Søylene og de vertikale strekene representerer gjennomsnittlig og SEM av cpm/g våtvekt. Trombus: blodforhold er vist i figur 32.

Figur 32. Trombus til blodforhold av spesifikk radioaktivitet 24 timer etter administrering av ^{111}In-merket 12 kD-, 18,5 kD- og 31 kD-FBD i rottecoilmodell beskrevet i figur 31.

Figur 33. Lineweaver-Burke plott av human Glu-plasminogenaktiveringskinetikk, ved pH 7,4 og 37°C, ved å anvende enten SK eller FBD-SK kompleks som aktivatorer. I et 200 µl volum i 96-brønners plate, varierte plasminogensubstratkonsentrasjonen mellom $0,9x10^{-6}$ og $2,7x10^{-6}$M. S-2251 substrat (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) endelig konstrasjon var $5x10^{-4}$M og endelig aktivatorkonsentrasjon var $2x10^{-9}$M. Reaksjonshastigheten v, representerer endring i absorbans ved 405 nm, ΔA (absorbansenheter), pr. tid Δt (min.).

Figur 34. Fibrin-agarplater ble fremstilt ved å blande 5 ml (2 mg/ml) fibrinogen, 5 ml (0,4%) Noble-agar, 0,5 ml (1M) $CaCl_2$ og 0,5 ml (10 µ/ml) trombin, alle i imidazolbufret saltvann pH 7,4. Etter polymerisering, ble små brønner laget ved å anvende Pasteur pipetter og vakuum, og i disse ble prøver med SK eller FBD-SK kompleks, ved konsentrasjoner mellom 10^2-10^4 ng/ml tilsatt. Etter inkubering ved 37°C over natten ble lyseringssonen målt.

Figur 35. Marsvintransglutaminasekatalysert inkorporering av [^{14}C] putresin inn i FBD eller FBD-SK komplekset

Analyser ble utført opp til 30 minutter ved romtemperatur med 6 µM FBD SK, eller FBD-SK kompleks, 0,05 µ/ml transglutaminase, 6 µM [^{14}C] putresin, 6 µM kald putresin, 50 mM Tris HCl pH 7,5 og 10 mM $CaCl_2$. Kontroller med 20 mM EDTA (prikket linje) eller 5 mM DTT (stiplet linje) ble også inkludert. (△) SK, (◘) FBD, (□) FBD-SK kompleks.

Plasmidene pFN 975-25, pFN 949-2, pFN 137-2 og pFN 196-2 ble deponert i henhold til i overensstemmelse med kravene i Budapest-avtalen når det gjelder International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent

Procedure with the American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 under ATCC nr. 67832, 67831, 67910 og 68328. På tilsvarende måte var mange av de andre ATCC deponeringene som er referert til i den opprinnelige søknaden også deponert i overensstemmelse med kravene i Budapest-avtalen.

Primærsekvensen av human fibronektin har blitt vist seg å bli gjenkjent i tre typer homologe gjentagelser, type I, II og III. Fibrin-bindende domene, som består av 259 aminosyrer med tilsynelatende molekylvekt på 31 kD, blir laget opp av fem type I gjentagelser ("fingre", hver ca. 45 aminosyrer lang med to disulfidbindinger, knyttet til to strekninger av ca. 20 aminosyrer hver ved begge N- og C-terminale ender av proteinet.

Samlet skjematisk skisse av strukturen til domenene av fibronektin og rekombinante molekyler som er konstruert er vist i figur 1.

Rekombinant fibrinbindende domene (FBD) polypeptider omfatter polypeptidfragmenter av fibrinbindende domene (r20 kD, r18,5 kD og r12 kD polypeptider). Disse polypeptidene er mindre enn 31 kD polypeptidet og omfatter deler av sekvensen av fibrinbindende domenen. Mange andre polypeptider av fibrinbindende domene kan bli uttrykt ved ytterligere plasmider som blir konstruert, ved å anvende fremgangsmåter som er kjent innenfor fagområdet, fra plasmider som er beskrevet i denne søknad og de polypeptidene som kan bli foldet på nytt, oksydert på nytt og renset ved å anvende metoder som er beskrevet i søknaden.

Fullengderekombinant fibrinbindende domene (r31 kD polypeptid) som er beskrevet i foreliggende søknad omfatter de første 262 aminosyrene av fibronektin med sekvensen arg-ala-ala-val ved karboksy-terminal. En ytterligere metioninresidie er tilstede i aminoterminalen til alle de endelige polypep-

tidene og polypeptidfragmentene av FBD. Plasmatisk fibrinbindende domene som er avledet ved tryptisk spalting av plasmafibronektin omfatter de første 259 aminosyrene av fibronekten, dvs. arginin ved karboksyterminal og den første kodeaminosyre, glutamin, omdannet til et pyroglutamatresidie.

r31 kD polypeptid har fem av type I homologiløkkene eller fingrene som er diskutert over (dvs. 10 disulfidbindinger), r20 kD polypeptid og r18,5 kD polypeptid har begge tre løkker (dvs. 6 disulfidbindinger), og r12 kD polypeptid har to løkker (dvs. 4 disulfidbindinger). Tilstedeværelse av disse disulfidbindingene forklarer nødvendighet og også vanskelighet med å folde på nytt/reoksyderingsprosedyren som er utviklet for å oppnå og rense korrekt foldet FBD polypeptider som har de korrekte disulfidbindingene. Korrekt foldede FBD polypeptider er biologisk aktive, dvs. de kan bindes til fibrin; i tillegg kan r31 kD polypeptid bindes til Staphylococcus aureus.

Rekombinante FBD polypeptider blir fremstilt i inklusjonslegemer som blir oppnådd i pellet fremstilt etter brudd av cellekaken.

Produksjon av rekombinante polypeptidfragmenter av fibronektinfibrinbindende domene (FBD) er fremlagt for anvendelse i trombusavbilding og å forhindre trombusdannelse. Disse polypeptidene kan også bli bundet til et trombolyttisk middel for å målrette midlet til en trombus.

Rekombinante celler som fremstiller polypeptidfragmenter av FBD kan være en hvilken som helst celle der en DNA sekvens som koder for et FBD polypeptidfragment har blitt introdusert ved rekombinante DNA teknikker. Cellen må ha evnen til ekspresjon av DNA sekvensen og produsering av polypeptidproduktet. Cellen kan være en pattedyrcelle, en soppcelle slik som gjærcelle eller en bakteriecelle.

Bakteriecellen kan være en hvilken som helst stamme som inkluderer auksotropiske, prototrofiske og lytiske stammer, F^+ og F^- stammer, stammer som innehar cI857 repressorsekvensen til λ profag og stammer som utelater deo repressor eller deo gen.

Eksempler på vildtype Escherichia coli stammer er prototrof ATCC nr. 12435, og auksotrof MC1061 (ATCC aksesjonsnr. 67361).

Eksempler på Escherichia coli stammer som inneholder λ cI857 repressorsekvensen er autotrofer A1645 som innehar plasmid pTVR 279-8 (ATCC nr. 53216), A1637 som innehar plasmid pTV 104(2) (ATCC nr. 39384) og A2097 som innehar plasmid pSODα2 (ATCC nr. 39786), og prototrofer A4255 som innehar plasmid pFN 975-25 (ATCC nr. 67832) og biotin-uavhengig A4346 som innehar plasmid pHG44 (ATCC nr. 53218).

Et eksempel på en lytisk Escherichia coli stamme er A4048 som innehar plasmid pHG44 (ATCC nr. 53217).

Eksempler på F^- stammer er Escherichia coli Sø930 (F^-) som innehar plasmid pMF 5534 deponert under ATCC nr. 67703 og Escherichia coli W31100 (F^-) som innehar plasmid pMFS 929 deponert under ATCC nr. 67705.

Eksempler på Escherichia coli stammer som utelater deo gen eller deo repressorer er Sø732 som innehar plasmid pMF 2005 (ATCC nr. 67362), Sø540 som innehar plasmid pJBF 5401 (ATCC nr. 67359), og Sø930 som inneholder plasmid pEFF 920 (ATCC nr. 67706) (se Europeisk patentsøknad publikasjonsnr. 0303972, publisert 22. februar 1989).

Plasmidene kan bli innført i velegnede bakterievertsceller, fortrinnsvis Escherichia coli. Et eksempel på en velegnet Escherichia coli celle er stamme A4255 (F^+) [ATCC aksesjonsnr. 67832], men andre Escherichia coli stammer og andre

bakterier kan også bli anvendt som vertsceller for plasmidene. Slike bakterier inkluderer Pseudomonas aeruginosa og Bacillus subtilis.

Alle Escherichia coli vertsstammer som er beskrevet over kan bli "herdet" ("cured") av plasmidene de innehar ved fremgangsmåter som er velkjente innenfor fagområdet, f.eks. etidiumbromidfremgangsmåter som er beskrevet av R.P. Novick i Bacteriol. Rev. 33: 210 (1969).

Bakteriecellen kan inneholde FBD sekvensen som koder for FBD polypeptidet i legemet til et vektor DNA molekyl slik som et plasmid. Vektoren eller plasmidet er konstruert ved rekombinante DNA teknikker slik at sekvensen som koder for FBD polypeptidet er inkorporert i en velegnet posisjon i molekylet.

Plasmider som blir anvendt for produksjon av FBD polypeptider kan inneha en lang rekke promotere slik som λ promoter eller deo promotere.

Blant plasmidene som kan bli anvendt for produksjon av FBD polypeptider er følgende:

a) Plasmid pFN 975-25 som uttrykker r31 kD FBD og som har blitt deponert i Escherichia coli stamme A4255 i ATCC under aksesjonsnr. 67832;

b) Plasmid pFN 949-2 som uttrykker r20 kD FBD og som har blitt deponert i Escherichia coli stamme A4255 i ATCC under aksesjonsnr. 67831;

c) Plasmid pFN 196-2 som uttrykker r12 kD FBD og som har blitt deponert i Escherichia coli stamme A4255 i ATCC under aksesjonsnr. 68328;

d) Plasmid pFN 197-10 som uttrykker et modifisert 12 kD FBD polypeptid, og som har blitt beskrevet i figur 11 i foreliggende søknad;

e) Plasmid pFN 195-4 som uttrykker r31 kD polypeptid sammensmeltet til sekvens DGRGDS og som har blitt beskrevet i figur 13 i foreliggende søknad;

f) Plasmid pFN 201-3 som uttrykker et 12 kD FBD polypeptidfragment under regulering av λP_L og C_{II} rbs, og som har blitt beskrevet i figur 26 i foreliggende søknad.

g) Plasmid pFN 203-2 som uttrykker et 12 kD FBD polypeptidfragment under regulering av λP_L og CII rbs, og som ytterligere inneholder en transkripsjonsterminator med betegnelse "ter", og som har blitt beskrevet i figur 27 i foreliggende søknad og som har blitt deponert i Escherichia coli A4255 i ATCC under aksesjonsnr. 68606.

h) Plasmid pFN 205-5 som uttrykker et 64 kD polypeptid som omfatter et 31 kD fullengde FBD polypeptid sammensmeltet til et 33 kD fragment av fibronektincellebindende domene (CBD) og som har blitt beskrevet i figur 25 i foreliggende søknad.

i) Plasmid pFN 208-13 som uttrykker et 18,5 kD FBD polypeptidfragment som er blitt beskrevet i figur 23 i foreliggende søknad og som har blitt deponert i Escherichia coli A4255 i ATCC under aksesjonsnr. 68456.

j) Et hvilket som helst plasmid, avledet fra plasmidene over, inneholdende FBD sekvenser som er kodet av plasmidene over; og

k) Et hvilket som helst plasmid som inneholder FBD sekvenser som er kodet av plasmidene over.

Foreliggende oppfinnelse skaffer tilveie et avbildingsmiddel som omfatter et polypeptid merket med en avbildbar markør, slikt polypeptid har en aminosyresekvens som idet vesentlige er tilstede i den fibrinbindende domenen til naturlig forekommende humanfibronektin og har evne til binding til fibrin. Det ble også skaffet til veie en sammensetning som omfatter en effektiv avbildingsmengde av et slikt avbildingsmiddel og en fysiologisk aksepterbar bærer.

Polypeptidene som blir merket med en avbildbar markør kan være polypeptidfragmenter av fibrinbindende domene av human fibronektin; de kan bli fremstilt ved å anvende rekombinante DNA teknikker; eller kodet av gener syntetisert i DNA syntetiserer. Foreliggende søknad har skaffet tilveie tre eksempler på slike polypeptider, der foretrukne utførelsesformer er 18,5 kD og 12 kD polypeptider. En person med kunnskap innenfor fagområdet forstår at begrepene "som har en aminosyresekvens som idet vesentlige er tilstede i den fibrinbindende domenen til naturlig forekommende human fibronektin" omfatter naturlig forekommende alleliske variasjoner og rekombinante variasjoner, slik som sete-rettet mutagenese. Disse er alle omfattet av foreliggende søknads "polypeptid", den eneste begrensning er evnen til å binde til fibrin.

Den avbildbare markøren er et valg som personen innenfor fagområdet må foreta. Det er foretrukket at markøren er en radioaktiv isotop, et element som ugjennomsiktig for røntgen, eller et paramagnetisk ion.

Radioaktive isotoper blir vanligvis anvendt i medisin og er velkjent innenfor fagområdet. Det er for tiden foretrukket at markøren er indium-111, teknetium-99m, jod-123, jod-125, jod-131, krypton-81m, xenon-133, eller gallium-67, eller blandinger av disse. Den mest foretrukne markøren er i teknetium-99m eller indium-111.

Den detekterbare markøren kan også være et paramagnetisk ion. Paramagnetiske ioner blir vanligvis anvendt i medisin. Eksempler på slike markører inkluderer gelaterte metallioner av krom (III), mangan (II), jern (III), jern (II), kobolt (II), nikkel (II), kobber (II), praseodymium (III), neodymium (III), samarium (III), gadolinium (III), terbium (III), dysprosium (III), holmium (III), erbium (III), ytterbium (III), eller blandinger av disse.

Avbildingsmidlet omfatter fortrinnsvis et 20 kD polypeptid som korresponderer til en aminosyresekvens som er tilstede i fibrinbindende domene av human fibronektin og som har aminosyresekvensen av aminosyrene 1-153 som vist i figur 2 og ca. 20 ytterligere aminosyrer; eller et 18,5 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i fibrinbindende domene av human fibronekten og som har aminosyresekvensen til aminosyrer 1-154 som vist i figur 2; eller et 12 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i fibrinbindende domene til human fibronektin og som har aminosyresekvensen til aminosyrer 1-109 som vist i figur 2. Ved hjelp av partiell aminosyresekvensanalyse er det funnet at 12 kD og 20 kD såvel som de tidligere beskrevet 31 kD polypeptidene alle inneholder en ytterligere N-terminal metionin. Siden alle polypeptidfragmentene av FBD har identiske N-terminale sekvenser kan det antas at 18,5 kD, 45 kD og 64 kD polypeptider også har ytterligere N-terminal metionin. Foreliggende oppfinnelse innbefatter imidlertid også polypeptider uten ytterligere N-terminal metionin.

En fremgangsmåte for å avbilde en fibrin-inneholdende substans, dvs. en trombus eller aterosklerotisk plaque er beskrevet, som omfatter at man bringer den fibrin-inneholdende substansen som skal bli avbildet i kontakt med midlet som er beskrevet over under betingelser slik at midlet bindes til den fibrin-inneholdende substansen og avbildningsbundet middel og dermed avbilder den fibrin-inneholdende substansen.

Det blir videre skaffet tilveie en fremgangsmåte for å avbilde en fibrin-inneholdende substans i et subjekt og omfatter:

(a) administrering til subjektet en sammensetning av midlet som beskrevet over under betingelser som tillater avbildingsmidlet deri å trenge inn i blodstrømmen og binde til fibrin som er tilstede i blodkarene;

(b) avbildingsbundet middel i blodkarene; og dermed

(c) avbilde den fibrin-inneholdende substansen.

Polypeptidet av reagensen som blir anvendt i de ovenfor nevnte fremgangsmåtene for avbilding av en fibrin-inneholdende substans er fortrinnsvis et 20 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i den fibrinbindende domenen til human fibronektin og som har aminosyresekvens til aminosyre 1-153 som vist i figur 2; 20 kD polypeptidet omfatter mindre enn ca. 20 ytterligere aminosyrer; et 18,5 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i den fibrinbindende domenen til human fibronektin og som har aminosyresekvens som aminosyre 1-154 som vist i figur 2; eller et 12 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i den fibrinbindende domenen til human fibronektin og som har aminosyresekvens som aminosyrer 1-109 som vist i figur 2.

Markører som blir anvendt i fremgangsmåten over for avbilding av en fibrin-inneholdende substans er radioaktive isotoper, elementer som er ugjennomsiktig for røntgen, eller paramagnetiske ioner. De mest foretrukne markørene er radioaktive isotoper, slik som indium-111, teknetium-99m, jod-123, jod-125, jod-131, krypton-81m, xenon-133 og gallium-67.

Avbildingen kan bli gjort med en hvilken som helst av fremgangsmåtene som er kjent innenfor fagområdet. Disse

fremgangsmåtene omfatter, men er ikke begrenset til røntgen, CAT scan, PET scan, MNRI og fluorskopi. Avbilding av den fibrin-inneholdende substansen ved fremgangsmåtene over blir fortrinnsvis gjennomført ved å anvende et gammakamera.

Et plasmid for ekspresjon av et polypeptid kan tilveiebringes som har en aminosyresekvens som idet vesentlige er tilstede i den fibrinbindende domenen av naturlig-forekommende human fibronektin og som har evne til binding til fibrin og som omfatter DNA som koder for polypeptidet og DNA som koder for velegnede regulatoriske elementer som er plassert relativt til DNA som koder for polypeptidet, slik at det foregår ekspresjon av polypeptidet i en velegnet vertscelle.

Søkerne har tilveiebragt tre eksempler på polypeptidfragmenter av fibrinbindende domene av fibronektin. Disse innbefatter r20 kD, r18,5 kD og r12 kD polypeptider. Disse polypeptidene utviser binding og adhesive egenskaper av deler av naturlig-forekommende human fibronektin. Rekkevidden av kravene til foreliggende søknad har ikke til hensikt å være begrenset til disse tre FBD polypeptidfragmentene, som bare er eksempler på foretrukkede utførelsesformer.

I de foretrukkede utførelsesformene er polypeptidet ca. en 20 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i den fibrinbindende domenen av human fibronektin; ca. et 18,5 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i fibrinbindende domene av human fibronektin; eller ca. et 12 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i fibrinbindende domene av human fibronektin.

I mer foretrukkede utførelsesformer er polypeptidet et 18,5 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i fibrinbindende domene og som har aminosyresekvensen til aminosyre 1-154 som vist i figur 2, et 20 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede

i fibrinbindende domene av human fibronektin og som har aminosyresekvensen til aminosyrer 1-153 som vist i figur 2; 20 kD polypeptidet omfatter mindre enn ca. 20 ytterligere aminosyrer; eller et 12 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i fibrinbindende domene av human fibronektin og som har aminosyresekvensen til aminosyre 1-109 som vist i figur 2. Som beskrevet over, kan polypeptidet også ha ytterligere N-terminal metionin. Oppfinnelsen omfatter imidlertid også polypeptider uten ytterligere N-terminal metionin.

Naturlig forekommende human fibronektin er som den forekommer i det menneskelige legemet (i plasma).

Som brukt i beskrivelsen, er en vesentlig del minst en femtedel (1/5). Et polypeptid som har biologisk aktivitet av fibrinbindende domene til naturlig forekommende human fibronektin utviser binding eller adhesive egenskaper som tilsvarer de til fibrinbindende domene av naturlig forekommende human fibronektin når nivået av slik aktivitet blir undersøkt eller bestemt.

I foreliggende oppfinnelse blir aminosyresekvensen til forskjellige funksjonelle domener bestemt ved kløyving av cDNA som koder for domener med restriksjonsenzymer, og som ikke nødvendigvis tilsvarer aminosyresekvensen i domenene som ble oppnådd og definert ved proteolyttisk spalting av fibronektin.

Plasmidet omfatter videre velegnede regulatoriske elementer som er plassert relativt til DNA som koder for polypeptidet, slik at det gjennomføres ekspresjon av polypeptidet i en velegnet vertscelle, slik som promotere og operatorer, f.eks. λ P_LO_L, ribosomale bindingsseter, f.eks. C_{II} og repressorer. Andre velegnede regulatoriske elementer innbefatter f.eks. lac, trp, tac, lpp og deo promoterne (Europeisk patentpublikasjon nr. 0303972, publisert 22. februar 1989).

Velegnede regulatoriske elementer er plassert relativt til DNA som koder for polypeptidet slik at det gjennomføres ekspresjon av polypeptidet i en velegnet bakterievertscelle. I foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen er de regulatoriske elementene plassert nær til og oppstrøms DNA som koder for polypeptidet.

Det blir videre bragt tilveie et plasmid med betegnelse pFN 949-2 og deponert i Escherichia coli stamme A1645 under ATCC aksesjonsnr. 67831. Plasmid pFN 949-2 koder for et humant 20 kD polypeptidfragment av fibrinbindende domene til human fibronektin og omfatter aminosyrer 1-153 i figur 2 med en ytterligere N-terminal metionin, og mindre enn 20 ytterligere aminosyrer.

Det ble også bragt tilveie et plasmid med betegnelse pFN 196-2 og deponert i Escherichia coli stamme A4255 under ATCC aksesjonsnr. 68328. Plasmid pFN 196-2 koder for et humant 12 kD polypeptidfragment av fibrinbindende domene til human fibronektin som omfatter aminosyrer 1-109.

Det ble også bragt tilveie et plasmid med betegnelse pFN 208-13 deponert i Escherichia coli A4255 under ATCC aksesjonsnr. 68456. Plasmid pFN 208-13 koder for et 18,5 kD polypeptidfragment av fibrinbindende domene til human fibronektin som omfatter aminosyre 1-154 i figur 2 og kan være antatt å ha en ytterligere N-terminal metionin som beskrevet over.

Det ble også skaffet tilveie et plasmid med betegnelse pFN 203-2 deponert i Escherichia coli A4255 under ATCC aksesjonsnr. 68606. Plasmid pFN 203-2 uttrykker et 12 kD polypeptidfragment av fibrinbindende domene til human fibronektin som omfatter aminosyrer 1-109 i figur 2 med en ytterligere N-terminal metionin.

Det ble også skaffet tilveie et plasmid med betegnelse pFN 205-5 som uttrykker et 64 kD polypeptid som omfatter et 31 kD fullengde FBD polypeptid sammensmeltet til et 33 kD fragment av fibronektin CBD (beskrevet i figur 25).

Som diskutert over, kan man anta at alle polypeptidene som blir fremstilt ved plasmidene i foreliggende oppfinnelse inneholder en ytterligere N-terminal metionin.

En Escherichia coli celle som inneholder plasmidet med betegnelse pFN 975-25 og der cellen er deponert under ATCC aksesjonsnr. 67832 er skaffet tilveie; en Escherichia coli celle som inneholder plasmidet med betegnelsen pFN 949-2 og der cellen er deponert under ATCC aksesjonsnr. 67831; og en Escherichia coli celle som inneholder plasmider med betegnelse pFN 196-2 og der cellen er deponert under ATCC aksesjonsnr. 68328; en Escherichia coli celle som inneholder plasmidet med betegnelse pFN 203-2 og der cellen er deponert under ATCC aksesjonsnr. 68606; og en Escherichia coli celle som inneholder plasmidet med betegnelse pFN 208-13 og der cellen er deponert under ATCC aksesjonsnr. 68456.

En fremgangsmåte er beskrevet for å fremstille et polypeptid som har en aminosyresekvens som i det vesentlige er tilstede i fibrinbindende domene av naturlig forekommende human fibronektin, og som har evne til binding til fibrin og som omfatter behandling av en celle som inneholder et plasmid som omfatter DNA som koder for polypeptidet, slik at DNA gjennomfører ekspresjon av polypeptidet og utvinner fra cellen polypeptidet som blir uttrykt slik.

Polypeptidet som blir fremstilt er fortrinnsvis et 18,5 kD, 20 kD eller 12 kD polypeptidfragment av fibrinbindende domene.

Det blir videre skaffet tilveie et renset polypeptid som idet vesentlig er fri for andre substanser av human opprinnelse

som har en aminosyresekvens som idet vesentlige er tilstede i den fibrinbindende domenen av naturlig forekommende human fibronektin og som har evne til binding til fibrin.

Polypeptidet er fortrinnsvis et 20 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i fibrinbindende domene av human fibronektin og som har aminosyresekvensen til aminosyrer 1-153 som vist i figur 2; 20 kD polypeptidet omfatter mindre enn ca. 20 ytterligere aminosyrer; eller et 18,5 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i fibrinbindende domene av human fibronektin og som har aminosyresekvens som aminosyre 1-154 som vist i figur 2; eller et 12 kD polypeptid som tilsvarer en aminosyresekvens som er tilstede i fibrinbindende domene til human fibronektin og som har aminosyresekvens som aminosyre 1-109 som vist i figur 2. Som bemerket over, kan polypeptidene også ha ytterligere N-terminal metionin. Oppfinnelsen inkluderer imidlertid også polypeptider uten ytterligere N-terminal metionin.

Disse kortere FBD polypeptidfragmentene, dvs. 20 kD, 18,5 kD og 12 kD er fordelaktige i forhold til 31 kD FBD polypeptidet. De er også enklere å folde på nytt, mangler bakteriebindingsdomene og de har en mer redusert bindingsspesifisitet for andre vaskulære komponenter slik som endotele celler, ekstracellulær matrisk og fibronektin sammenlignet med 31 kD polypeptidet, mens de opprettholder en fibrinbindingsaktivitet som er tilsvarende den til 31 kD polypeptidet.

Oppfinnelsen skaffer videre tilveie et renset polypeptid som idet vesentlige er fri for andre substanser av human opprinnelse sammensmeltet til et andre polypeptid, det andre polypeptidet omfatter en vesentlig del av aminosyresekvensen til den cellebindende domenen av naturlig forekommende human fibronektin.

Det sammensmeltede polypeptidet er fortrinnsvis et 45 kD sammensmeltet polypeptid, der det rensede polypeptidet er et 12 kD polypeptid og det andre polypeptidet som omfatter en vesentlig del av cellebindende domene til naturlig forekommende human fibronektin og er et 33 kD polypeptid. Det sammensmeltede polypeptidet kan også omfatte et 31 kD renset polypeptid og et annet polypeptid som inneholder aminosyresekvensen DGRGDS. Et annet foretrukket sammensmeltet polypeptid er et 64 kD sammensmeltet polypeptid, der det rensede polypeptidet er et 31 kD polypeptid og det andre polypeptidet som omfatter en vesentlig del av cellebindende domene til naturlig forekommende human fibronektin er et 33 kD polypeptid.

Det er også skaffet tilveie et plasmid for ekspresjon av 45 kD sammensmeltet polypeptid, som diskutert over, med betegnelse pFN 202-5; et plasmid for ekspresjon av 31 kD/GRGDS sammensmeltet polypeptid som diskutert over, med betegnelse pFN 195-4; og et plasmid for ekspresjon av 64 kD sammensmeltet polypeptid som diskutert over, med betegnelsen pFN 194-2.

Når den blir brukt i foreliggende søknad vil "sammensmeltet" eller "bundet" omfatte polypeptider som er bundet kovalent, ikke-kovalent eller konjugert. Polypeptidene kan være konjugert gjennom andre kjemiske deler som innbefatter aminosyre eller polypeptidtverrbindere, som blir anvendt som standard innenfor fagområdet og er velkjent for personer innenfor fagområdet som angår foreliggende oppfinnelse.

En lang rekke fremgangsmåter er kjent innenfor fagområdet for påvisning av trombi, slik som radioaktiv merking (kjernemedisinsk anvendelse av isotoper), radio-opak merking (slik som CAT scan), og magnetisk ressonansavbilding (MRI). En hvilken som helst av disse merkingsmetodene kan bli anvendt i fremgangsmåten i foreliggende oppfinnelse for påvisning av

trombus. I hver av disse påvisningsmetodene blir polypeptidet anvendt som et diagnostisk middel for påvisning av trombus.

En fremgangsmåte kan anvendes for folding på nytt og reoksydering av et polypeptid som har en aminosyresekvens som idet vesentlige er tilstede i fibrinbindende domene til naturlig forekommende human fibronektin, men som mangler disulfidbindinger til naturlig forekommende human fibronektin og som har evne til binding til fibrin og som omfatter at man bringer polypeptidet i kontakt med en tiolinneholdende forbindelse i nærvær eller fravær av et disulfid slik at man folder på nytt og reoksyderer polypeptidet.

Den tiolinneholdende forbindelsen blir fortrinnsvis valgt fra gruppen som består av glutation, tioredoksin, β-merkaptoetanol og cystein.

Den tiolinneholdende forbindelsen er fortrinnsvis β-merkaptoetanol og disulfidet kan bli fremstilt in situ ved innføring av luft.

Polypeptidet blir fortrinnsvis valgt fra gruppen som består av et 18,5 kD polypeptid, et 20 kD polypeptid, et 12 kD polypeptid og et 45 kD polypeptid. 45 kD chimera polypeptidet består av 12 kD FBD sammensmeltet til 33 kD CBD har blitt foldet på nytt og oksydert på nytt ved å anvende nøyaktig samme fremgangsmåte som de mindre FBD polypeptidene.

Fremgangsmåten med å folde på nytt og oksydere på nytt kan i tillegg omfatte at man bringer polypeptidet i kontakt med et denatureringsmiddel. Foretrukne denatureringsmidler er guanidinhydroklorid og urea.

Polypeptidet er fortrinnsvis ved en lav konsentrasjon, slik som under 1000 µg/ml.

En fremgangsmåte for å utvinne et renset biologisk aktivt polypeptid kan anvendes, som har en aminosyresekvens som i det vesentlige er tilstede i fibrinbindende domene til naturlig forekommende human fibronektin og som har evnen til binding til fibrin og omfatter:

(a) fremstilling av en bakteriecelle ved hjelp av ekspresjon av et plasmid som inneholder DNA som koder for polypeptidet et første polypeptid som har aminosyresekvensen til polypeptidet, men som mangler disulfidbindingen;

(b) bryter cellen for å fremstille et lysat som inneholder det første polypeptidet;

(c) sentrifugerer lysatet for å konsentrere det første polypeptidet;

(d) separere det konsentrerte første polypeptidet;

(e) oppløsliggjøre det separerte, konsentrerte første polypeptidet;

(f) folde på nytt og oksydere på nytt det oppløste første polypeptidet for å danne biologisk aktivt polypeptid;

(g) separere det gjenfoldede og gjenoksyderte biologisk aktive polypeptidet;

(h) utvinne det rensede gjenfoldede og gjenoksyderte biologisk aktive polypeptidet; og

(i) rense det biologisk aktive polypeptidet som blir utvunnet.

Gjenfolding og gjenoksydering omfatter at man bringer polypeptidet i kontakt med en tiolinneholdende forbindelse i

nærvær eller fravær av et disulfid slik at man folder på nytt og oksyderer på nytt polypeptidet. Den tiolinneholdende forbindelsen blir fortrinnsvis valgt fra gruppen som består av glutation, tioredoksin, β-merkaptoetanol og cystein.

Den tiolinneholdende forbindelsen β-merkaptoetanol og disulfidet kan bli fremstilt in situ ved innføring av luft.

Polypeptidet blir fortrinnsvis valgt fra gruppen som består av et 18,5 kD polypeptid, et 20 kD polypeptid, et 12 kD polypeptid og et 45 kD polypeptid. Som bemerket over, består 45 kD chimerapolypeptid av 12 kD FBD sammensmeltet til 33 kD CBD som har blitt foldet på nytt og oksydert på nytt ved å anvende nøyaktig samme fremgangsmåte som de mindre FBD polypeptidene.

Fremgangsmåten kan ytterligere omfatte at man bringer polypeptidet i kontakt med et denatureringsmiddel, slik som guanidinhydroklorid eller urea.

Polypeptidet er fortrinnsvis ved en lav konsentrasjon, slik som under 1000 µg/ml.

Separering av det konsentrerte polypeptidet i trinn (c) omfatter fortrinnsvis kromatografi, fortrinnsvis Heparin-Sepharose kromatografi.

En fremgangsmåte for hemming av trombusdannelse i et subjekt som er utsatt for trombusdannelse og som omfatter administrering til subjektet en mengde av et polypeptid (valgt fra polypeptider og sammensmeltede polypeptider som er diskutert over) og som er effektiv i å hemme trombusdannelse kan benyttes. Polypeptidet kan være redusert eller alternativt kan S-H gruppene bli blokkert (f.eks. ved karboksymetylering eller karboksamidometylering for å forhindre reoksydering).

Et polypeptid som diskutert over til et trombolyttisk middel for målretting av trombolyttiske midler kan anvendes. De trombolyttiske midlene kan bli valgt fra vevsplasminogenaktivator (TPA), urokinase, streptokinase, prourokinase, anisoylert plasminogen-streptokinaseaktivatorkompleks (Eminase^{TM}), TPA analoger eller protease.

I en utførelsesform av oppfinnelsen har polypeptidet en aminosyresekvens som idet vesentlige er tilstede i fibrinbindende domene til naturlig forekommende human fibronektin, har evne til binding til fibrin, har en molekylvekt over ca. 6 kD med mindre enn ca. 20 kD, har aminosyresekvensen gln-ala-gln-gln eller met-gln-ala-gln-gln ved N-terminal til polypeptidet og der det trombolyttiske midlet er streptokinase.

I en foretrukket utførelsesform er polypeptidet et 12 kD polypeptid og det trombolyttiske midlet er streptokinase.

EKSEMPLER

Alle referansene til kartposisjoner tilsvarer de identiske nummererte posisjonene langs nukleotidsekvensen til human fibronektin cDNA vist i figur 2 (se også figur 3 i Baralle, F.E., Europeisk patentpublikasjon nr. 207,751, publisert 7. januar 1987).

Foreliggende søknad er rettet mot polypeptidfragmenter til N-terminal fibrinbindende domene (FBD). Eksperimentelle resultater med 31 kD polypeptidet blir av sammenligningsårsaker presentert med kortere fragmenter. Noen av proteinene som er beskrevet er fusjonsproteiner som omfatter et FBD fragment knyttet i sin C-terminal til N-terminalen til et fragment av cellebindende domene (CBD).

cDNA sekvensen som tilsvarer CBD som foreliggende søknad har klonet og uttrykt mangler den 270 bp ekstra domene (ED) segmentet som strekker seg fra nukleotid 4811 til og med 5080, på Baralle kartet (se figur 2). cDNA sekvensen som

således sies å strekke seg fra nukleotid 3317 til 5566 på Baralle kartet, inneholder bare 1980 nukleotider, fordi det mangler 270 nukleotider av ED segmentet, nemlig fra nukleotid 4811 til og med 5080; denne regionen er også kjent innenfor fagområdet som ED-A regionen. Fordi nukleotid 5081 er endret fra G til A, er aminosyre 1690 endret fra alanin til treonin. På tilsvarende måte vil polypeptidet som er uttrykt av det DNA fragmentet kode fra aminosyre 1102 til aminosyre 1851 på Baralle kartet, men vil mangle 90 aminosyrer som er kodet av ED regionen, nemlig aminosyrene 1600 til og med 1689, og vil således bare inneholde 660 aminosyrer. Dette er sant for alle CBD fragmenter som er beskrevet i foreliggende søknad som utspenner ED regionen. (Regionen kjent innenfor fagområdet som ED-B regionen mangler både i Baralle sekvens og i foreliggende søknads cDNA).

EcoRI spaltingssetet som er vist i posisjon 3317 ble konstruert av foreliggende søkere under kloningsprosedyren ved anvendelse av EcoRI linkere. Denne GAATTC sekvensen ved posisjonene 3313 til 3318 adskiller seg i 1 nukleotid fra korresponderende Baralle sekvens GATTC. Dette introduserer en enkel nukleotidendring C til A ved nukleotid 3315. Dette endrer det tilsvarende aminosyretall 1100 fra Thr til Asn.

EKSEMPEL 1

Fremstilling av et fibronektin cDNA bibliotek

Et cDNA bibliotek ble fremstilt i λgt11 fra poly A+ mRNA isolert fra human lever i henhold til publiserte prosedyrer (13,14). cDNA fragmentene ble klonet ved å anvende EcoRI linkere og cDNA biblioteket ble screenet for fibronektin (FN) positive plasmider ved å anvende følgende syntetiske DNA gensøkere.

Gensøkere for cellebindingsdomene (CBD):

Gensøker	Nukleotider
(3') CACTCTATAATGTCCTAGTGAATGCCTCTTTGTCCTCC	(4355-4392)

(3') AGAATCTCCTTCTGTCTTTTGTCCAGAACTAAG (3967-3999)

(3') CCGGTTGTTAGTTGTCAAAGACTACAAGGCTCCCTGGACC (4200-4239)

Gensøker for N-terminal fibrinbindende domene (FBD):

(3') GGGGGTCGGAGGGATACCGGTGACACAGTGTCTTAA (817-850)

(3') CGACGGGTGCTCCTTTAGACGTGTTGGTTACTTCCCCAGTAC (1310-1340)

En serie av FN cDNA kloner som dekker hele regionen av fibrin, kollagen, heparin og cellebindende domener ble identifisert og isolert (figur 9). cDNA fragmentene ble subklonet inn i EcoRI setet av pBR322.

mRNA til FN blir alternativt spleiset og derfor har cDNA med forskjellige lengder blitt rapportert i litteraturen. Foreliggende søknads cDNA tilsvarer at cellebindende domene har en 270 basepardelesjon fra base 4811 til base 5080 på det FN fysikalske kartet (komplett ikke-spleiset cDNA).

EKSEMPEL 2

Ekspresjon og rensing av fibrinbindende domene (FBD) polypeptider

A. Ekspresjon av et partielt FBD 20 kD polypeptid

FN cDNA klonene som ble oppnådd som beskrevet i eksempel 1 og som er tegnet i figur 9, inkluderte ikke DNA som koder for aminosyre 1-190 til FN molekylet. Disse aminosyrene er en del av FBD. DNA som tilsvarer nukleotider 14 til 472 og som koder for aminosyre 1-153 (figur 2A) ble konstruert ved ligering av 7 par med kjemisk syntetiserte nukleotider (figurene 3 og 4). Det syntetiske DNA fragmentet ble utformet slik at det inneholdt et ATG initieringskodon ved 5' enden såvel som hensiktsmessige restriksjonsseter for innføring i varierende ekspresjonsvektorer. For å gjøre mulig ytterligere manipulasjon av DNA sekvensen som koder for FBD, ble nukleotidtall 19 tymidin (T) endret til adenin (A), og dermed eliminerer DdeI

restriksjonssetet uten å endre aminosyresekvensen. (Setet for nukleotidendring er betegnet med en stjerne i linker #1 vist i figur 3A). De forskjellige trinnene for kloning av de ovenfor syntetiske DNA fragmentene inn i pBR322 plasmidvektor spaltet med EcoRI og BamHI er beskrevet i figur 4. Plasmidet som ble oppnådd fikk betegnelse pFN 932-18. DNA fragmentet som koder for de første 153 N-terminale aminosyrene av fibronektin fra plasmid pFN 932-18, ble innført inn i pTV 301, en λ P_L ekspresjonsvektor mellom NdeI og BglII setene ved å erstatte DNA sekvensen som koder for human veksthormon (hGH) i plasmid pTV 301 (figur 5).

Det resulterende plasmid pFN 949-2, ble deponert i American Type Culture Collection under aksesjonsnr. 67831. Plasmid pFN 949-2 ble anvendt for å transformere Escherichia coli prototrof A4255. Disse transformerte Escherichia coli cellene ble funnet å uttrykke partiell FBD polypeptid i mengder som omfatter ca. 5% til totale cellulære proteiner. Polypeptidet hr en mobilitet på ca. 20 kD på redusert SDS polyakrylamidgeler bestemt fra mobilitet av størrelsesmarkører. Polypeptidet omfatter de første 153 aminosyrene av fibronektin fulgt av 4 aminosyrer kodet for av en syntetisk linker og deretter flere aminosyrer som er resultat av gjennomlesing inn i pBR322 vektor som skyldes mangel av et TAA termineringskodon, dvs. totalt 153 aminosyrer pluss mindre enn 20 ytterligere aminosyrer, med en ytterligere N-terminal metionin. I beskrivelsen blir polypeptidet referert til som r20 kD polypeptid eller r20 kD FBD.

B. <u>Ekspresjon av et "fullstendig" FBD polypeptid</u>

For å oppnå ekspresjon av hele FBD polypeptidet som inneholder aminosyre 1 til 262 ble følgende plasmider konstruert:

1. Innføring av termineringskodon TAA på 3' ende

Et syntetisk oligonukleotid som inneholder et TAA termineringskodon og et BglII sete har følgende sekvens:

5' CTGTTTAATAAGCA
3' GACAAATTCGTCTAG

ble ligert til 3' ende av en EcoRI-PvuII fragment isolert fra FN cDNA klon p931-5 og til en pBR322 vektor spaltet med EcoRI og BamHI som beskrevet i figur 6. Plasmidet som ble oppnådd ble betegnet pFN935-12.

2. Subkloning av karboksyterminal region av FBD i en λ P_L ekspresjonsvektor

Et EcoRI-HincII DNA fragment som koder for karboksyterminal region av FBD ble isolert fra plasmid pFN935-12 og ligert til plasmid pTV 194-80 spaltet med EcoRI og SmaI som beskrevet i PCT publikasjon nr. WO 90/07577 (figur 46). Det oppnådde plasmidet ble betegnet pFN 946-12.

3. Syntese og kloning av DNA som tilsvarer nukleotider 468-599 av FN

Tre par med kjemisk syntetiserte nukleotider ble ligert til et EcoRI-DdeI FN fragment isolert fra plasmid pFN932-18 (figur 4) i nærvær av pUC19 vektor DNA (innkjøpt fra GIBCO BRL Co.) spaltet med EcoRI og XbaI som beskrevet i detalj i den ovenfor refererte PCT publikasjon (figur 47). Plasmidet som ble oppnådd ble betegnet pFN 948-4.

4. Konstruksjon av et plasmid som koder for fullstendig FBD region

For å konstruere et plasmid som koder for hele FBD, aminosyre 1 til aminosyre 262, ble et EcoRI-XbaI DNA fragment som koder for FN isolert fra plasmid pFN948-4 og innført i plasmid pFN 946-12 spaltet med EcoRI og XbaI som beskrevet i den ovenfor refererte PCT publikasjon (figur 48). Det oppnådde plasmidet ble betegnet pFN-957. Dette plasmidet inneholder den fullstendige kodende sekvensen for FBD men uttrykker ikke FBD polypeptidet da det mangler et ribosomalt bindingssete (RBS).

5. Ekspresjon av FBD under λ P_L promoter og cII RBS

Et NdeI-HindIII fragment som inneholder FBD kodende region og T_1T_2 transkripsjonsterminatorer ble isolert fra plasmid pFN-57 og innført i plasmid pTV 301 spaltet med NdeI og HindIII som beskrevet i den ovenfor refererte PCT publikasjon (figur 49). Det resulterende plasmid med betegnelse pFN 962-3, uttrykker ekspresjon av FBD polypeptid under regulering av λ P_L promoter og cII ribisomalbindingssetet. Escherichia coli stamme A1645 og A4255 transformert med dette plasmidet uttrykker bare mindre mengder FBD polypeptid. Ekspresjon av FBD polypeptid ble detektert bare med Western blot analyse vd å anvende polyklonale antistoffer rettet direkte mot human plasma avledet FN.

6. Ekspresjon av et FBD polypeptid under λ P_L promoter og β-laktamasepromoter og ribosomal bindingssete

Ved at nivået på ekspresjon av FBD polypeptid som ble oppnådd med plasmid pFN 962-3 var lav, ble det tilsatt et DNA fragment som koder for β-laktamasepromoter og β-laktamase RBS (PBLA). DNA fragmentet som koder for PBLA ble isolert fra plasmid pBLA11 (ATCC aksesjonsnr. 39788) og innført i plasmid pFN 962-3 spaltet med NdeI, fyllt med Klenow enzym og spaltet med EcoRI (se den ovenfor refererte PCT publikasjon). Det oppnådde plasmidet med betegnelse pFN 975-25, ble deponert med American Type Culture Collection under ATCC aksesjonsnr. 67832. Dette plasmidet ble anvendt for å transformere Escherichia coli prototrof A4255 (F+).

Disse Escherichia coli cellene ble funnet å uttrykke "fullstendig" FBD polypeptid på nivåer som omfatter ca. 5-8% av samlede cellulære proteiner. Polypeptidet beveget seg på SDS-PAGE geler under reduserende betingelser med en tilsynelatende molekylvekt på 31 kD, således blir det referert til som 31 kD polypeptidet eller r31 kD FBD.

C. Fermentering og vekstbetingelser

Klonet som uttrykker r31 kD FBD polypeptidet ble fermentert i rikt medium (gjærekstrakt og kaseinhydrolysat) som inneholder ampicillin. Vekst ble gjennomført ved 30°C. Ekspresjon ble oppnådd ved induksjon ved 42°C i 2 timer, og etterfølgende bakteriecellekake som inneholder r31 kD FBD polypeptid ble oppnådd. På tilsvarende måte ble klonet som uttrykker r20 kD FBD fermentert og bakteriecellekaken som inneholder r20 kD FBD polypeptid ble oppnådd.

D. Folding på nytt og rensing av rekombinant fibrinbindende domene (r31 kD) polypeptidet

Denne prosessen utgjøres av tre trinn:

1. Råbearbeiding av bakteriekake.
2. Folding på nytt/oksydering på nytt.
3. Rensing.

1. Råmaterialbearbeiding

Kaken blir oppbrudt først i 5 volumer 50 mM Tris-HCl/50 mM Na-EDTA, pH 8 (buffer 1); pelleten blir deretter behandlet med 1,2 volumer buffer 1 som inneholder 100 mg/l lysozym (2 timers risting ved 37°C). Triton X 100 blir tilsatt den resulterende suspensjonen (til 1%), og etter 30 minutter ved romtemperatur blir suspensjonen sentrifugert og pelleten blir suspendert på nytt og vasket to ganger med vann. Alle disse trinnene blir gjennomført ved oppbryting av pelleten og sentrifugering og 31 kD får bli i pelleten slik det fremkommer tydelig fra SDS-PAGE geler.

Den vaskede pelleten blir suspendert i 14 volumer 10 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/2 mM PMSF/2 mM 6-aminokaproat, pH 7,5 (buffer A) og deretter behandlet suksessivt med buffer A som inneholder: 1% decylsulfat, 1% decylsulfat/5% glycerol og 5% glycerol. Endelig behandling er med buffer A uten additiver.

2. Folding på nytt/oksydering på nytt

Prinsipp: For å oppløse pelleten i 6M guanidin-HCl - GuCl - i nærvær av et tiolreduserende middel slik som glutation - GSH - og å folde på nytt/oksydere på nytt ved en lavere GuCl konsentrasjon ved tilsetning av oksydert glutation-GSSG.

Den vaskede pelleten fra trinn 1 over ble oppløst i 150-700 volumer 6M GuCl/3 mM GSH i buffer A. Konsentrasjonen av GuCl blir gradvis senket, dvs. først 2 M deretter 1 M og 0,5 M, mens man holder konsentrasjonen av alle andre komponenter konstant, unntatt for volum, som på dette trinnet bragt til 500-1000 ganger høyere enn den til pelleten. På et av de mellomliggende konsentrasjoner av GuCl, dvs. mellom 0,5 og 2 M, blir folding på nytt startet ved tilsetning av 0,3 mM GSSG og inkubering ved romtemperatur i 24-48 timer. Den gjenfoldede 31 kD blir deretter dialysert mot buffer A uten additiver.

3. Rensing

Konsentrasjon: Det store volum med gjenfoldet 31 kD blir først sentrifugert for å fjerne den uoppløslige pelleten som ikke inneholder noe 31 kD og den blir deretter dialysert mot Tris-HCl, pH 7,8, før den blir konsentrert og til og begynne med renset på en Heparin-Sepharose kolonne.

Forbedrede fremgangsmåter for folding på nytt/oksydering på nytt og rensing av polypeptidfragmentene av FBD er beskrevet i eksempel 5 og 10.

EKSEMPEL 3

Farmakodynamikk av r31 kD, r20 kD, r18,5 kD og r12 kD fibrinbindende domenepolypeptidfragmenter

Intensitet og oppløsning av et koagel (trombus) bilde blir styrt av samspillet mellom hastighet av inkorporering til det radiofarmasøytiske midlet og dens blodklaringshastighet. For å utlede metabolsk oppførsel av r31 kD fibrin-bindende domene, og å sammenligne det med fibronektin (FN), ble r31 kD

fibrinbindende domene og plasmafibronektin begge jodinert med ^{125}I med IC1 metoden (24) og injisert intravenøst inn i rotter. Resultatene er vist i figur 7 sm representerer farmakokinetisk oppførsel av ^{125}I-r31 kD FBD og ^{125}I-FN. Blodprøver ble tatt på de tidspunkter som er vist på grafen.

Figur 7 demonsterer at klaringshastighetene til to radioaktive molekyler er forskjellige og etter 5 timer var bare henholdsvis 3% av r31 kD FBD men 20% av FN i sirkulasjon.

Noen av rottene ble holdt i individuelle metabolske bur, og akkumulert urin og feces ble oppsamlet ved 7 timer og 24 timer. Ca. 30% av injisert ^{125}I-r31 kD radioaktivitet ble utskilt i urinen under de første 7 timene, og mer enn 90% ble skilt ut etter 24 timer. All urinradioaktivitet var triklor-eddiksyreoppløslig, og dette er indikasjon på proteolyttisk nedbryting. Analyse av forskjellige organer (nyre, mage, lever, lunge, uterus, ovarie, adrenal, kolon, ileum, hud, hjerne, øye, muskel, blære, hjerte, milt, trakea, aorta og vena-kava) la ikke for dagen noen spesifikk akkumulering, og forsvinningskinetikken til radioaktiviteten fulgte et mønster som tilsvarer det i blodet. I det fleste organene var den spesifikke radioaktiviteten (cpm/gram vev) lavere enn i serum.

Resultatene indikerer at eksogen rekombinant 31 kD aminoterminal polypeptid av FN blir moderat nedbrudt og skilt ut i legemet. Den farmakokinetiske oppførselen er ikke i overensstemmelse med første-ordens kinetikk, og dette kan indikere at polypeptidet er moderat fordelt i vev og legemedeler annet enn blod. Dette er også tydelig fra funnet av at degraderingsgraden ikke øker i løpet av 4-24 timersperioden, og dette reflekterer en gradvis frigjøring av polypeptid fra legemets deler. Den entydige og relativt tidlige forekomst av metabolitter i urinen indikerer at polypeptidet blir raskt skilt ut gjennom nyrene. Mangel på akkumulering av materiale i leveren kan være en indikasjon på

at dette organet ikke er en hovedlokalitet for nedbryting og er ikke involvert i detoksifisering.

Den relativt korte halveringstiden for r31 kD FBD er viktig når det gjelder dens mulige anvendelse i diagnostisk avbildning av trombi. Rekombinant 31 kD FBD (r31 kD) kan bli merket radioaktivt eller på annen måte og deretter kan den bli innført i blodet når formålet er å avbilde trombi.

Den kortere halveringstiden for molekylet er også viktig når man utnytter den for å hindre koageldannelse. I motsetning lider heparin, det nåværende terapeutiske midlet som velges, av en meget lang halveringstid.

Et tilsvarende eksperiment ble gjennomført ved å anvende jodinert 31 kD fibrinbindende domene av plasmatisk fibronektin og tilsvarende farmakokinetikk og fordeling av radioaktivitet ble observert.

31 kD polypeptidet ble oppnådd ved kløyving av plasmatisk FN som følger: plasmatisk FN ble renset på en gelatin-Sepharose kolonne som den var eluert fra og lagret i 1 M guanidinhydroklorid. Deretter ble 206 mg FN, etter dialyse mot 10 mM Tris-HCl, spaltet med 0,01% TPCK-trypsin ved 37°C i 5 minutter. Det som var spaltet tryptisk ble anbragt på en DE52 kolonne (6 ml) og 1/5 av gjennomstrømmingsfraksjonen (50 ml) ble applisert på en CM-Sepharose kolonne (3 ml) og eluert med en NaCl gradient (0-0,5 M). Ca. 80% av polypeptidet ble utvunnet i den salte gradienten (topp ved ca. 220 mM) og ble etter dialyse for å fjerne saltet ca. halvparten av polypeptidet anbragt på en Heparin-Sepharose kolonne (1,5 ml) og eluert med 0,5 M NaCl. Tilnærmet 75% av polypeptidet ble utvunnet i denne fraksjonen, dvs. ca. 1 mg (ca. 40% av teoretisk utbytte). Denne fraksjonen var >90% ren 31 kD polypeptid, og ble jodinert ved fremgangsmåten som er beskrevet over. I en forbedret utforming blir CM-Sepharose

trinnet utelatt og Heparin-Sepharose trinnet blir gjennomført direkte etter DE52 kolonnen.

Legg merke til at plasmatisk 31 kD FBD inneholder de første 259 aminosyrene av FN, mens rekombinant 31 kD FBD inneholder de første 262 aminosyrene av FN og ytterligere N-terminal metionin.

Farmakokinetikk av r20 kD, r18,5 kD og r12 kD fibrinbindende domenepolypeptider

Tilsvarende eksperimenter ble gjennomført ved å anvende merket r20 kD, r18,5 kD og r12 kD fibrinbindende domenepolypeptider som ble fremstilt som beskrevet i eksempel 2, 4, 5 og 10. Farmakokinetikk av disse polypeptidene ble funnet å være meget lik den til r31 kD polypeptid.

EKSEMPEL 4

Ekspresjon og fermentering av ytterligere fibrinbindende domene (FBD) polypeptider

I eksempel 2 ble ekspresjon av en partiell r20 kD FBD og fullengde r31 kD FBD beskrevet og i PCT publikasjon nr. WO 90/07577, eksempel 24, ble en forbedret fremgangsmåte for å folde på nytt og rensing av 31 kD FBD beskrevet. Konstruksjon av plasmider for ekspresjon av ytterligere polypeptidfragmenter av FBD blir nå beskrevet.

A. Ekspresjon av av r12 kD FBD polypeptid

Plasmid pFN 975-25, ATCC nr. 67832, uttrykker fullengde r31 kD FBD av fibronektin og fra det plasmid pFN 196-2 som uttrykker en partiell FBD ble konstruert som vist i figur 10. Dette plasmidet ble transformert inn i Escherichia coli stamme A1645 og derfra inn i Escherichia coli stamme A4255 og deponert i A4255 i ATCC under aksesjonsnr. 68328. Disse transformerte cellene ble funnet å være gode uttrykkere av partiell FBD polypeptid i mengder som omfatter ca. 5% av samlet cellulær protein. Polypeptidet har en mobilitet på ca. 14,4 kD på SDS polyakrylamidgeler under reduserende betingel-

ser som bestemt ved mobiliteten av størrelsesmarkører. Polypeptidet omfatter de første 109 aminosyrene av fibronektin. En ytterligere metioninresidie er tilstede i N-terminalen til det endelige polypeptidet. Gjennom beskrivelsen blir dette polypeptidet referert til som r12 kD polypeptidfragment eller r12 kD polypeptidfragment eller r12 kD FBD.

B. Ekspresjon av en modifisert 12 kD (12 kD') partiell FBD polypeptid

Plasmid pFN 975-25 (ATCC nr. 67832), som uttrykker fullengde r31 kD FBD, ble anvendt for å konstruere plasmid pFN 197-10 som uttrykker et modifisert r12 kD polypeptid (r12 kD') som vist i figur 11. Fibronektin FBD sekvensen ble modifisert for å fremstille et NdeI sete umiddelbart etter nukleotid 340. Dette plasmidet ble transformert inn i Escherichia coli stamme A1645 og derfra inn i Escherichia coli stamme A4255. Disse transformerte cellene ble funnet å være gode uttrykkere av modifisert r12 kD partial FBD i mengder som omfatter ca. 5% av samlet cellulærprotein. Polypeptidet har en tilsvarende mobilitet som umodifisert 12 kD FBD som bestemt på redusert SDS polyakrylamidgeler. Polypeptidet omfatter de første 109 aminosyrene av fibronektin etterfulgt av de ytterligere aminosyrene histidin og metionin. En ytterligere metioninresidie er tilstede ved N-terminalen til det endelige polypeptidet. Dette polypeptidet er betegnet r12 kD' polypeptid eller r12 kD' FBD.

C. Ekspresjon av en modifisert r12 kD' FBD sammensmeltet til 33 kD cellebindingsdomene

Plasmid pFN 197-10 som inneholder et NdeI sete på 3' terminalen til modifisert 12 kD FBD ble anvendt for å konstruere et plasmid, med betegnelse pFN 202-5, som koder for modifisert 12 kD FBD sammensmeltet til 33 kD cellebindende domene (CBD). Denne konstruksjonen ble gjennomført som vist i figur 12 der 33 kD CBD fragmentet ble tatt fra plasmid pFN 137-2 (deponert i ATCC under ATCC aksesjonsnr. 67910). Plasmid pFN 202-5 ble transformert til Escherichia coli

stamme A1645 og derfra til Escherichia coli stamme A4255 og er en god uttrykker (8% av totalt protein). 45 kD polypeptid består av 12 kD' FBD sammensmeltet til 33 kD CBD (første 109 aminosyrer av FBD etterfulgt av aminosyreresidiene histidin og metionin etterfulgt av CBD som starter med serin. En ytterligere metioninresidie er tilstede ved N-terminalen til det endelige polypeptidet.

D. Ekspresjon av et 31 kD FBD polypeptid sammensmeltet til aminosyresekvensen DGRGDS

For å oppnå ekspresjon av et 31 kD FBD polypeptid sammensmeltet ved karboksyterminalen til sekvensen asp-gly-arg-gly-asp-ser (DGRGDS) ble følgende konstruksjon laget. Plasmid pFN 975-25 som uttrykker 31 kD FBD ble spaltet med PvuII og HindII og ligert til en syntetisk linker som vist i figur 13. Det resulterende plasmidet med betegnelse pFN 195-4 ble anvendt for å transformere Escherichia coli stamme A1645 og derfra Escherichia coli stamme A4255. Disse cellene ble funnet å være gode for ekspresjon av 31 kD DGRGDS polypeptid, på nivåer ved ca. 8% av totalt cellulært protein. Sekvensen av dette polypeptidet er beskrevet i beskrivelsen til figur 13.

E. Ekspresjon av et sammensmeltet 31 kD FBD-33 kD CBD

For å oppnå ekspresjon av en "fullengde" r31 kD FBD polypeptid sammensmeltet til r33 kD CBD ble følgende konstruksjon utført.

Plasmid pFN 975-25 som uttrykker 31 kD FBD ble spaltet med PvuII og HindIII, og det resulterende store fragmentet ble ligert til en syntetisk linker til r33 kD cellebindingsdomene som ble oppnådd fra plasmid pFN 137-2 etter NdeI og HindIII spalting (som vist i figur 14). Det resulterende plasmidet med betegnelse pFN 194-2, som koder for r31 kD FBD knyttet til r33 kD CBD. Plasmid pFN 194-2 ble transformert til Escherichia coli stamme A1645 og deretter til Escherichia coli stamme A4255, og de resulterende cellene var lave

uttrykkere av et 64 kD polypeptid som omfatter 31 kD FBD sammensmeltet til 33 kD CBD. Sekvensen av dette polypeptidet er beskrevet i beskrivelsen til figur 14.

Fermentering og vekstbetingelser

Klonen som uttrykker r12 kD FBD polypeptidet ble fermentert i rikt medium (gjærekstrakt og kaseinhydrolysat) som inneholder ampicillin. Vekst ble gjennomført ved 30°C. Ekspresjon ble oppnådd ved induksjon ved 42°C i 2 timer og den etterfølgende bakteriecellekaken som inneholder r12 kD FBD polypeptid ble oppnådd. På tilsvarende måte ble cellekaken som inneholder andre proteiner som er beskrevet over oppnådd.

F. Ytterligere plasmidkonstruksjoner

1. 18,5 kD FBD polypeptidfragment: Som beskrevet over, (eksempel 2A) inneholder 20 kD FBD fragmentet uttrykt ved plasmid pFN 949-2 (ATCC nr. 68456) opp til 20 ytterligere aminosyrer av pBR 322 vektor som skyldes gjennomlesing forbi enden av FN genet i fravær av riktig lokalisert TAA transkripsjonsterminering skodon. For å skaffe tilveie et mer autentisk "3-fingret" FBD polypeptidfragment enn det 20 kD fragmentet som er beskrevet i eksempel 2A, ble et plasmid som koder for en 18,5 kD FBD polypeptid konstruert.

Konstruksjonen er vist i figur 23 og beskrevet i beskrivelsen til figurene. Det resulterende plasmidet med betegnelse pFN 208-13 uttrykker et 18,5 kD FBD polypeptidfragment under regulering av P_L promoteren og β-laktamaseribosomal bindingssete. Plasmid pFN 208-13 ble deponert i ATCC i E. coli A4255 under aksesjonsnr. 68456. Dette plasmidet uttrykker de første 154 aminosyrene til fibronektin med en ytterligere N-terminal metionin.

2. Forbedret ekspresjon av 12 kD FBD polypeptidfragment:

Plasmid pFN 196-2 (ATCC nr. 68328) som uttrykker et 12 kD FBD polypeptidfragment (2 "fingere") under regulering av λ P_L promoter og β-laktamaseribosomal bindingssete ble beskrevet

over. For ytterligere å forbedre ekspresjonsnivået av 12 kD fragmentet, ble plasmid pFN 203-2 konstruert som vist i figur 26 og 27 og bekrevet i beskrivelsen av figurene. Plasmid pFN 203-2 uttrykker 12 kD fragmentet under regulering av λ P_L promoter, cII ribosomal bindingssete og en 36 basepar trp transkripsjonsterminering ssekvens. Plasmid pFN 203-2 ble deponert i ATCC i E. coli A4255 under aksesjonsnr. 68606. Disse transformerte cellene ble funnet å være gode uttrykkere av 12 kD FBD polypeptidfragment i mengder som omfatter ca. 12-18% av totalt cellulært protein.

3. Høyekspresjon av sammensmeltet 31 kD FBD - 33 kD CBD polypeptid: Plasmid pFN 194-2, en lavnivå uttrykker av et 64 kD sammensmeltet FBD-CBD polypeptid under regulering av λ P_L promoter og β-laktamaseribosomalbindingssete ble beskrevet over. Et plasmid ble konstruert for å muliggjøre høynivåekspresjon av 64 kd polypeptidet under regulering av λ P_L promoteren, CII ribisomalbindingssete og 36 bp trp transkripsjonsterminering ssekvens. Dette plasmidet med betegnelse pFN 205-5 ble konstruert som vist i figur 25 og beskrevet i beskrivelsen av figurene.

Fermentering og vekstbetingelser for alle disse ekspresjonsplasmidene (1-3 over) var idet vesentlige som beskrevet for produksjon av andre FBD polypeptider (se eksempel 2C). Rensing og folding på nytt var som beskrevet i eksempel 5 og eksempel 10.

EKSEMPEL 5

Folding på nytt og rensing av rekombinant 20 kD og 12 kD fibrin-bindende polypeptider av fibronektin

Fremgangsmåten for folding på nytt og rensing av r20 kD og r12 kD polypeptider utgjøres av tre trinn:

1. Råbearbeiding av bakteriekaken.
2. Folding på nytt/oksydering på nytt.
3. Rensing.

1. Råmaterialebearbeiding

1.1. Vasking og ekstrahering av pellet: Bakteriecellekaken som ble oppnådd som beskrevet i eksempel 2 for r20 kD polypeptidet og som beskrevet i eksempel 4 for r12 kD polypeptidet, blir avbrudt og vasket idet vesentlige som for r31 kD polypeptidet (se PCT publikasjon nr. WO 90/07577, side 121 og etterfølgende); endringer ble imidlertid introdusert i ekstraheringsprosedyren som ble anvendt for både r20 kD og r12 kD polypeptidene. Det følgende er et eksempel på vasking- og ekstraheringsprosedyre som ble gjennomført på bakteriecellekaken av r20 kD polypeptidet; r12 kD polypeptidet ble ekstrahert på en tilsvarende måte.

1.2 Fremgangsmåte: Bakteriekake som inneholder r20 kD polypeptidet ble fremstilt som beskrevet i eksempel 2 ved fermentering av Escherichia coli stamme A4255 som innehar plasmid pFN 949-2. En porsjon av denne bakteriekaken (14,8 g) ble suspendert i 10 volumer 50 mM Tris HCl, 50 mM EDTA (buffer B), pH 7,5. Suspensjonen ble homogenisert i 15-30 sekunder ved middels hastighet, sonikert 3 ganger i 4 minutter med pulsering, og sentrifugert ved 15000 rpm i 30 minutter. Pelleten ble suspendert på nytt i 2,4 volumer (36 ml) buffer B. Lysozym (0,1 mg/ml) ble tilsatt og suspensjonen ble inkubert i et vannbad ved 37°C i 2 timer med omrøring. Triton X-100 ble tilsatt til en endelig konsentrasjon på 1%, omrørt ved romtemperatur i 30 minutter og sentrifugert. Pelleten ble suspendert på nytt 3 ganger i 140 ml vann (dvs. 10 ganger volumet av opprinnelig pellet), homogenisert, omrørt i 30 minutter ved romtemperatur og sentrifugert. Den endelige pelleten veide tilnærmet 1,5 g, dvs. bare 10% av opprinnelig vekt; imidlertid var både r20 kD og r12 kD polypeptider i pelleten, og dette er tydelig ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese. Den vaskede og ekstraherte pelleten ble holdt frossen ved -20°C inntil videre bearbeiding.

2. Oppløsliggjøring og folding på nytt av ekstrahert pellet

2.1 Reagensene og fremgangsmåten som ble anvendt for folding på nytt/oksydering på nytt er forskjellig i det tilfelle fra de som ble anvendt for r31 kD polypeptidet. Ekstrahert pellet av r20 kD eller r12 kD polypeptidet blir oppløst i 6 M guanidin-HCl (GuCl) i nærvær av 50 mM β-merkaptoetanol, og etter en ti ganger fortynning får anledning til å oksydere på nytt av luft.

2.2 Fremgangsmåte: Frossen r20 kD pellet (1,5 g) ble gjort oppløslig og homogenisert i 10 volumer 10 mM Tris HCl, 5 mM EDTA (buffer C), pH 8,0, som inneholder ytterligere 6 M guanidin-HCl. Prøven ble redusert ved tilsetning av 57 µl ufortynnet β-merkaptoetanol (endelig konsentrasjon: 50 mM) og omrørt i fravær av luft, dvs. i en forseglet beholder i 30 minutter. Den ble deretter dyppet ved en hastighet på ca. 5 ml/min i 10 volumer (148 ml) av bufferC, pH 8,0 og fikk anledning til å oksydere mens den ble konstant og forsiktig omrørt i et åpent beger i 48-72 timer ved romtemperatur. Alternativt ble oksyderingen gjennomført i en lukket beholder i nærvær av 0,3 mM GSSG. Selv om på dette trinnet noe polypeptidutfelling allerede hadde forekommet, ble suspensjonen inkludert utfellingen dialysert i løpet av 24 timer mot 15 volumer buffer C, pH 8,5 med tre skifte av buffer. Dialysatet var deretter utsatt for sentrifugering i 45 minutter ved 15000 rpm (22500 x g) i en høy-hastighets Beckman sentrifuge utstyrt med en JA-17 rotor. Dette fjerner mange kontaminerende proteiner og aggregerer r20 kD og r12 kD, som har blitt produsert under reoksydering.

3. Rensing og karakterisering

Siden lokaliseringen av heparinbindingssetet i fibrinbindende domene ikke var kjent, kunne det derfor ikke på forhånd være kjent om nye kortere r20 kD og r12 kD polypeptider vil binde til Heparin-Sepharose. Imidlertid ble det funnet at de kortere molekylene faktisk bandt seg til Heparin-Sepharose.

Det ble funnet at det ikke var noe behov for en fenyl-Sepharose kolonne, som i det tilfellet med r31 kD, for å rense og oksydere på nytt r20 kD eller r12 kD polypeptider. Faktisk kunne materialet blitt direkte renset på Heparin-Sepharose, men betydelige forbedringer med hensyn på fjerning av kontaminanter, ukorrekt foldede molekyler og dimerer ble oppnådd når prøven ble kromatografert på en Q-Sepharose kolonne før kromatografi på en Heparin-Sepharose kolonne. I noen tilfeller ble polypeptidet konsentrert på et Pellicon-system (Millipore Corp.), ved å anvende membraner med passende avkuttingspunkter, dvs. 10 kD for r20 kD polypeptidet og 3 kD for r12 kD polypeptidet, forut før det blir anbragt på Q-Sepharose kolonnen. Heparin-Sepharose kolonnen blir også anvendt for konsentrasjon av begge polypeptider. Det følgende er et eksempel på renseprosedyren som ble anvendt i dette tilfelle med r20 kD polypeptidet.

3.1 Q-Sepharose kromatografi: En tredjedel av den gjenoksyderte r20 kD (47 ml) ble applisert på en 10 ml kolonne Q-Sepharose hurtigstrømkolonne, som hadde blitt ekvilibrert i buffer C, pH 8,5 ved 1,2 ml/min. strømningshastighet. Gjennomstrømmingsfraksjonen ble oppsamlet og tatt vare på (70 ml). Polypeptidene som festet seg til kolonnen ble eluert med buffer C, pH 8,5 som inneholder 0,5 M NaCl og kolonnen ble regenerert med 0,5 M NaOH.

3.2 Heparin-Sepharose kromatografi: Gjennomstrømmingen fra Q-Sepharose kolonnen ble applisert på en 10 ml kolonne av Heparin-Sepharose for-ekvilibrert i pH 8,5 buffer ved en strømningshastighet på 0,5 ml/min. Gjennomstrømningsfraksjonen inneholdt for det meste kontaminanter og ukorrekt foldede r20 kD polypeptider. Renset (>95% rent) r20 kD polypeptid ble eluert i buffer C, pH 8,5 som inneholder 0,5 M NaCl og kolonnen ble regenerert i samme buffer som inneholder ytterligere 6M guanidin-HCl. Representative rensingstabeller

for r20 kD (tabell A) og r12 kD (tabell B) polypeptider er bragt til veie.

3.3 Karakterisering: Supernatanter fra bearbeidingen av bakteriekaken for både r20 kD og r12 kD polypeptid, så vel som prøver av etterfølgende kolonnefraksjoner ble analysert for polypeptid og analysert ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese; deres elueringsprofiler ble oppnådd på en superose 12 kolonne tilknyttet enten en FPLC eller en HPLC. Disse profilene ved forskjellige trinn av folding på nytt, såvel som av rensing, er vist for r20 kD (figur 21) og r12 kD (figur 22). Renset r20 kD eller r12 kD polypeptider eluerte som enkle skarpe bånd. Disse profilene bekrefter resultatene som man kan se på SDS-PAGE geler under ikke-reduserende betingelser; båndene av både 20 kD og r12 kD polypeptidprøver er ikke-diffuse, og dette indikerer en enkel molekylær form. I dette tilfelle med r20 kD, vandrer båndet til det ikke-reduserte polypeptidet (som i det tilfellet med r31 kD polypeptid) raskere enn det til den reduserte formen; dette er en tilsvarende effekt som den som man kan se i det tilfelle med r31 kD polypeptid. Man kan imidlertid ikke observere en slik forskjell i det tilfelle med r12 kD polypeptid. Ytterligere detaljer vedrørende karakterisering av FBD polypeptider er bragt tilveie i eksempel 11.

Disse FBD polypeptidene er tilgjengelig for radiomerking for å anvende dem som radiofarmasøytiske midler for avbilding av trombi og aterosklerotiske skader.

Fordelene ved å anvende mindre FBD polypeptider (r20 kD og r12 kD) for de ovenfor-nevnte formålene i motsetning til å anvende større r31 kD polypeptid er at det etter betydelige anstrengelser er utviklet en enklere fremgangsmåte for fremstilling av de mindre molekylene, dvs. fremgangsmåter som er beskrevet over for folding på nytt og rensing av r20 kD og r12 kD polypeptider er raskere og enklere enn fremgangsmåten for å folde på nytt og rense r31 kD polypeptider. I tillegg, resulterer disse fremgangsmåtene i et høyere utbytte enn

fremgangsmåten for r31 kD polypeptidet og en høyere konsentrasjon av polypeptid kan bli oppnådd for kortere FBD polypeptidfragmenter (opptil 10 mg/ml).

I en forbedret utforming av denne fremgangsmåten for å folde på nytt og rense FBD polypeptidfragmenter er beskrevet i eksempel 10.

TABELL A: RENSING AV r20 kD FBD

Trinn	Volum (ml)	Protein-kons. (mg/ml)	Total protein (mg)	Renhet[a] (%)	Mengde FBD (mg)	Utbytte (%)	Grad av rensing
Oppløsliggjort og redusert pellet	14,8	12,4	183,5	35	64,2	100	1
Oksydert supernatant	148	0,72	106,5	45	48,0	74,7	1,3
Oksydert supernatant (1/3)	47		33,8		15,2		
Q-Sepharose gjennom-strømming	70	0,20	14,0	80	11,2	54,9	2,3
Heparin-Sepharose 0,5 M NaCl	9	0,71	6,1	98	6,0	29,4	2,8

[a] Estimert fra enten SDS-PAGE geler under reduserende betingelser eller fra Sepharose 12 elueringsprofiler.

Dette er en representativ rensetabell for folding på nytt og rensing av r20 kD polypeptidet, bearbeidet som beskrevet i eksempel 5, avsnitt 2 og 3.

TABELL B: RENSING AV r12 kD FBD

Trinn	Volum (ml)	Protein-kons. (mg/ml)	Total protein (mg)	Renhet[a] (%)	Mengde FBD (mg)	Utbytte (%)	Grad av rensing
Oppløsliggjort og redusert pellet	100	6,66	666	10	66,6	100	1
Oksydert[b] supernatant	500	0,20	100	58	58,0	87,1	5,8
Q-Sepharose gjennom-strømming	500	0,13	65	80	52	78,1	8,0
Heparin-Sepharose 0,5 M NaCl	14	0,75	10,5	98	10,3	15,4	9,8

[a] Estimert fra enten SDS-PAGE geler under reduserende betingelser eller fra Sepharose 12 elueringsprofiler.

[b] Konsentrert på et Pellicon system.

Dette er en representativ rensetabell for folding på nytt og rensing av r12 kD polypeptid, bearbeidet som beskrevet i eksempel 7, avsnitt 2 og 3.

EKSEMPEL 6

Biologisk aktivitet av r31 kD, r20 kD og r12 kD fibrinbindende domenepolypeptider

Den biologiske aktiviteten til r31 kD FBD ble beskrevet i PCT publikasjon nr. WO 90/07577, side 134 og etterfølgende og dette angår binding til fibrinkoagel in vivo og in vitro, binding til bakterier og binding til ekstracellulær matrisk. I dette eksemplet, blir ytterligere resultater som angår r31 kD polypeptidet presentert og den biologiske aktiviteten til 20 kD og 12 kD FBD polypeptidet blir demonstrert.

I dette eksemplet ble binding av rekombinant fibrinbindende domener til fibrinkoageler målt som følger:

Binding av ^{125}I-rFBD (r31 kD, r20 kD eller r12 kD) til en forhåndslaget fibrinkoagel (to-trinns reaksjon II)

Trinn 1 Dannelse av fibrinkoagel: Dette kan bli gjort på en av følgende to måter:

Enten (a) inkubering ved 37°C av 20 µl sitrert human fullblod med 5 mM $CaCl_2$, 1 enhet/ml trombin og PBS i et sluttvolum på 250 µl. Denne reaksjonen blir avsluttet etter 45 minutter ved sentrifugering og vasking av pellet (to ganger) med 1 ml PBS;

eller (b) Inkubering ved 37°C av 20 µl ikke-sitrert humant fullblod ("naivt" blod). Denne reaksjonen blir avsluttet etter 150 minutter ved sentrifugering og vasking som i (a).

Trinn 2 Binding av ^{125}I-FBD polypeptidet til forhåndslaget fibrinkoagel

Koageler ble inkubert ved 37°≤C i et endelig volum på 250 µl PBS med ^{125}I-rFBD polypeptid. Andre bestanddeler kan bli tilsatt som angitt for hvert eksperiment. Bindingsreaksjonen ble avsluttet etter 45 minutter ved sentrifugering og vasking tre ganger med

PBS. Rørene som inneholder ^{125}I-rFBD - fibrinpellet ble målt for radioaktivitet i en gammateller.

Resultater

A. Metabolsk stabilitet av ^{125}I-merket r31 kD FBD i rotter: eks-vivo binding til fibrin versus TCA uoppløslighet

Som beskrevet i beskrivelsen til figur 18 ble rotter injisert intravenøst med r31 kD FBD merket med ^{125}I og blodprøver som ble tatt ved intervaller ble tilsatt Na citrat. Prøver av blodet ble behandlet som følger: enten (a) behandlet med 20% TCA og TCA uoppløslige tellinger ble målt; eller (b) inkubert med forlaget koagel (ved å anvende 20 µl fullblod fra kontrollrotte); binding av ^{125}I-31 kD FBD tilforhåndslaget koagel ble målt under betingelser som to-trinnsreaksjonen II beskrevet over.

Radioaktiviteten ble målt med en gammateller og aktiviteten i hver prøve ble beregnet som en prosentdel av samlet cpm tilstede i reaksjonsblandingen.

Resultatene som er demonstrert i figur 18 indikerer en god korrelasjon mellom fysiologisk nedbrytning av r31 kD (som målt ved nedgang i TCA oppløslighet) og funksjonell nedbryting (som målt ved nedgang i eks-vivo binding av r31 kD til en forhåndslaget fibrinkoagel). På det begynnende trinnet av de sammenlignende studiene er det imidlertid markerte forskjeller; ved 30 minutter er den funksjonelle nedbrytingen flere ganger høyere enn den fysikalske nedbrytingen. Disse resultatene som antyder en mye raskere nedgang i funksjonell stabilitet enn fysikalsk nedbrytning, kan bli forklart siden hovedsetet for kovalent reaksjon av FBD med fibrinkoagelen er glutaminresidie lokalisert på den ekstreme aminoterminalen til FBD molekylet ved aminosyre nr. 3. Dette glutaminresidie som er lokalisert i en 20 aminosyrestrekning på utsiden av type 1 homologistrukturen, er ikke beskyttet mot degradering av den tertiære strukturen, og dette er typisk for resten av FBD domenen.

B. Spesifisitet av binding av r31 kD til fibrin: effekt av transglutaminase

Den kovalente bindingen av fibrinbindende domene av plasmatisk fibronektin til fibrin i en koagel skyldes hovedsakelig reaksjon av aminosyre nr. 3 av fibronektin (glutamin) med fibrin; denne bindingsreaksjonen er enzymatisk regulert av enzymet transglutaminase som spesifikt gjenkjenner aminosyresekvensen som inneholder dette glutaminresidiet.

Følgende eksperiment ble gjennomført for å undersøke om transglutaminase er involvert i binding av rekombinant r31 kD FBD til koagelet. All eksogen transglutaminase som blir anvendt i eksperimentene som er beskrevet i søknaden er marsvinlevertransglutaminase (Sigma).

Binding av 0,3 μM oppløsning av følgende molekyler til forlagret fibrinkoagel avledet fra forlaget fibrinkoagel avledet fra 20 μl human fullblod ble målt i nærvær eller fravær av transglutaminase ved å anvende to-trinnsreaksjonen II som er beskrevet over: ^{14}C-putrescin-r31 kD FBD, ^{125}I-r31 kD FBD og ^{125}I-rekombinant bovint veksthormon (kontroll). ^{14}C-putrescin-r31 kD proteinkompleks der glutaminresidiet i posisjon 3 er blokkert ved kovalent reaksjon med ^{14}C-putrescin ble fremstilt som følger:

En oppløsning som inneholder 3 μM r31 kD FBD, 10 mM $CaCl_2$, 0,015 enheter/ml transglutaminase og 60 μM ^{14}C-putrescin (spesifikk aktivitet 100 mc/mmol) ble inkubert ved 37°C i 5 timer. Mengden av ^{14}C-putrescin inkorporert i 31 kD FBD ble målt ved TCA utfelling av en prøve av denne reaksjonsoppløsningen og demonstrerte inkorporering av en ekvivalent mengde til 2,8-3 μM oppløsning med 14C-putrescin inn i r31 kD proteinet; dette indikerer at mer enn 90% av glutamin i posisjon nr. 3 av FBD kovalent reagert med ^{14}C-putrescin. ^{14}C-putrescin r31 kD materiale ble lagret ved 0°C og anvendt i løpet av noen få dager uten videre behandling. r31 kD FBD og kontrollrekombinant bovint veksthormonanalog (bGH)

fremstilt som beskrevet i EP publikasjon nr. 131843 ble merket med ^{125}I ved å anvende ICl metoden som er beskrevet i eksempel 3.

Resultater

Tellingene bundet til to-trinnsreaksjon II i nærvær eller fravær av transglutaminase ble oppnådd og forholdet mellom tellinger bundet i nærvær og fravær av transglutaminase ble beregnet for hvert polypeptid som ble undersøkt. Dette forholdet adskiller seg dramatisk når intakt 31 kD FBD blir sammenlignet med putrescin-FBD ("blokkert" FBD) eller til kontroll bGH. I de to sistnevnte tilfelle er forholdet mellom tellinger nær 1 og dette viser at transglutaminase ikke påvirker binding og samlet cpm som er tilstede i koagelen er 10-15% av samlet cpm i reaksjonen. I det tilfellet med intakt 31 kD FBD er forholdet dramatisk høyere enn 1 (forskjellige eksperimenter varierte forholdet mellom 1,7-7 avhengig av kvalitet og friskhet på blodet og transglutaminasen) og samlet cpm tilstede i koagelen er 40-70% av samlet cpm i reaksjonen, dvs. transglutaminase øker i stor grad binding av r31 kD polypeptid til koagelen.

Disse resultatene indikerer sterk effektivitet av ublokket glutamin i posisjon nr. 3 for binding av r31 FBD polypeptid til fibrinkoagelen i nærvær av transglutaminase.

Andre eksperimenter har vist at tilsetning av transglutaminase til to-trinnsreaksjon II øker binding av r20 kD og r12 kD polypeptider til koagelen, og dette kan sammenlignes med effekten som ble observert med r31 kD.

C. Karakterisering av r31 kD FBD-fibrinkompleks med SDS polyakrylamidgelelektroforese

For å bestemme størrelsen på komplekset som ble dannet ved binding av r31 kD til en fibrinkoagel ble følgende serie med eksperimenter gjennomført. Koageler ble avledet enten 20 µl humant fullblod (A) eller 250 µl av en oppløsning med 0,8 µM

human fibrinogen (B). I noen av fibrinogeneksperimentene ble dentalcoiler (som beskrevet i eksempel 7) tilsatt rørene sammen med fibrinogen.

Binding av ^{125}I-r31 FBD til fibrinkoagelen ble målt ved å anvende to-trinnsreaksjon II som beskrevet over i nærvær av 0,15 µM ^{125}-r31 kD FBD og 5 mM $CaCl_2$. Reaksjonen ble avsluttet med tre gangers vasking med PBS. Pelleten ble, etter forskjellige behandlinger som beskrevet under, sentrifugert og 15 µl prøver av supernatanten (dvs. det oppløslige materialet) ble elektroforesebehandlet på polyakrylamidgeler som separerer materialene med molekylvekt $>10^6$ fra molekylvekt $>10^5$ og fra lavere molekylvektmateriale. Et autoradiogram ble fremstilt og dette viser følgende: i nærvær av transglutaminase fremkommer høymolekylvektsformer av r31 kD - fibrinkompleks som er resistent mot koking i nærvær av den sterke ioniske detergenten SDS og β-merkaptoetanol som reduserer S-S bindinger.

I tillegg, når 4M urea er inkludert i kokereaksjonen blir meget høye molekylvektsformer ($>10^6$) kvantitativt omdannet til mellomliggende molekylvektsformer (>100000) som forventet når det gjelder hydrofobiske bundede aggregater med høymolekylvekts fibrinkoageler. Mengden av fri r31 kD polypeptid i koagelene er normalt liten; dette er materiale som blir frigjort ved koking bare med fosfat-saltvannbuffer. Resistensen av mellomliggende molekylvektsformer til ytterligere behandling med urea støtter involvering av en kovalent binding mellom ^{125}I-r31 kD og fibrin.

D. Effekt av fibronektin og heparin på binding av ^{125}I-r31 kD til forhåndsdannede fibrinkoageler

(i) Effekt av fibronektin (FN)

Human plasma inneholder vesentlige nivåer av FN (300 µg/ml) som potensielt kan konkurrere med binding av ^{125}I-r31 kD polypeptid til forhåndslagede koageler. Slik konkurrering kan påvirke effektiviteten av koagelradiomerking og den etter-

følgende avbildingsprosessen. For å undersøke effekt av FN, ble ^{125}I-r31 kD (0,15 μM) tilsatt sammen med renset FN (1 μM) til en forhåndslaget koagel i PBS. Selv om FN ble tilsatt i et molart overskudd på 7 relativt til ^{125}I-r31 kD, var binding av det sistnevnte polypepidet bare svakt påvirket (20% hemming). Observasjonen om at overskudd FN ikke konkurrerer med ^{125}I-r31 kD binding kan forklares på to måter: antallet seter for tverrbinding inn i koagelen er i overskudd for å inneha både FN og ^{125}I-FBD, eller affinitet av FBD til koagelen er mye høyere enn den til FN. Basert på flere observasjoner antas det at både overskudd av bindingsseter og høyere affinitet av ^{125}I-r31 kD muliggjør dens binding til koagelen i nærvær av plasmakonsentrasjoner av FN.

(ii) Effekt av heparin

Noen radioscintigrafiske midler, slik som ^{111}In-merkede plater og merket fibrinogen er ineffektive i nærvær av terapeutisk heparin. Det var derfor viktig å analysere effekt av heparin på inkorporering av ^{125}I-r31 kD til koagelene. Resultatene viste at heparin ikke hadde noen signifikant effekt på binding av r31 kD FBD til forhåndslagede koageler. Andre eksperimenter viste at samme mengde heparin påvirker dramatisk binding av r31 kD til en fibrinkoagel under dens dannelse, dvs. reaksjon I.

E. Sammenligning av binding av forskjellige rekombinante FBD polypeptider og plasmatisk FBD til forhåndslagede koageler

For å sammenligne binding til forhåndslagede koageler av forskjellige rekombinante FBD polypeptider (r31 kD, r20 kD og r12 kD) og plasmatisk 31 kD FBD, ble en serie med eksperimenter som anvender to-trinnsreaksjon II gjennomført som beskrevet i figur 19. Resultatene viser at plasmatisk 31 kD binder til et tilsvarende nivå som r31 kD, mens r20 kD og r12 kD polypeptidene begge binder på ca. det halve nivået av det største (31 kD) molekylet. Bindingsnivået av r20 kD og r12 kD polypeptider er fremdeles tilstrekkelig høyt for å demonstrere potensial av radiomerket r20 kD og r12 kD polypeptider

som radiofarmasøytiske midler for trombusavbilding. Tilsvarende eksperimenter som anvender r31 kD-DGRGDS polypeptid (eksempel 4, D og figur 13) viste at den bindes ved ca. det samme nivå som r31 kD.

F. Binding av ^{125}I-r12 kD til friske eller frosne koageler

For å studere effekt av frysing av koagelene forut for anvendelse i bindingseksperimenter med FBD polypeptidet, ble følgende eksperimenter gjennomført. Fibrinkoageler ble enten anvendt friskt eller etter lagring ved -70°C i en to-trinnsreaksjon II bindingseksperiment med ^{125}I-r12 FBD, fremstilt som beskrevet i eksempel 5.

Eksperimentet ble gjennomført som beskrevet i beskrivelsen til figur 15 i nærvær eller fravær av transglutaminase. Figur 20 viser at det er liten signifikant effekt av frysing på evnen til koagelene å binde r12 kD FBD. Frosne koageler uten tilsatt transglutaminase gir bindingsresultater som normalt tilsvarer friske koageler i nærvær av transglutaminase; det er ingen effekt på bindingsreaksjonen når eksogen transglutaminase blir tilsatt frosne koageler, sansynligvis fordi frigjøring av endogen transglutaminase fra frosne røde blodceller.

Som bemerket i seksjon B over, er det et vidt responsområde til tilsetning av eksogen transglutaminase i reaksjon II.

G. Betingelser for binding av ^{125}I-r31 kD FBD til forhåndslagede koageler

For å undersøke betingelsene for binding av ^{125}I-r31 kD til forhåndsdannede koageler, ble følgende serier med eksperimenter gjennomført. Binding av ^{125}I-r31 kD polypeptid til forhåndsdannede koageler dannet fra citrert eller "naivt" blod ble undersøkt, ved å anvende to-trinnsreaksjon II metoden, og i nærvær eller fravær av forskjellige bestanddeler (kalsium, hirudin, transglutaminase). Mønsterene av

resultatene som anvender "citrert" blod eller "naivt" blodkoageler er tilsvarende selv om binding av r31 kD polypeptidet er høyere i forhold til citrert blod.

Hirudin (Sigma) er en spesifikk hemmer av en hvilken som helst trombinmediert reaksjon og hirudin ble derfor tilsatt for å undersøke effekt av trombin på bindingsreaksjon (trinn 2). Ingen effekt av hirudin ble vist og derfor har trombin ingen effekt på binding av r31 kD polypeptid til koagelen. Den samme mengden av hirudin hemmer imidlertid totalt binding når den blir tilsatt i trinn 1 der fibrin blir dannet fra fibrinogen, og dette var forventet.

Disse resultatene viser også at eksogen transglutaminase øker binding av r31 kD FBD til koageler og videre at denne transglutaminasereaksjonen er avhengig av tilstedeværelse av kalsiumionet. Siden eksogen transglutaminase blir anvendt i vevtransglutaminase (i sin aktive form) antas det at serumtransglutaminase, faktor XIII, som må gjennomgå aktivering av trombin for å danne faktor XIIIa, vil være meget sensitiv til hirudinhemming.

H. Betingelser for binding av ^{125}I-r31 kD FBD til ekstracellulær matriks (ECM)

Binding av ^{125}I-r31 kD til ekstracellulær cellematriks av endotele celler (ECM) ble demonstrert i PCT publikasjon nr. WO 90/07577, side 144. Bindingen er nå videre karakterisert ved undersøkelse av binding av 0,3 µM ^{125}I-r31 kD FBD til ECM i nærvær eller fravær av eksogen transglutaminase; i tillegg ble binding i nærvær av transglutaminase undersøkt i nærvær av hver av heparin, fibronektin eller spermidin.

Resultatene av disse eksperimentene demonstrerer at binding av r31 kD FBD til ECM blir økt ved tilsetning av transglutaminase. Heparin har ingen signifikant effekt på binding mens spermidin, en kjent hemmer av transglutaminase, hemmer binding. Kollagen hemmer også binding, og dette antyder en

mulig involvering av kollagen som et akseptormolekyl på matriks av endotele celler. Fibronektin har liten effekt på bindingsreaksjonen.

Disse resultatene gir støtte til den potensielle anvendelsen av radiomerkede rekombinante FBD polypeptider som radiofarmasøytiske midler for avbilding av begynnende plaquedannelse i denuderte blodkar.

Videre eksperimenter som demonstrerer biologisk aktivitet av forskjellige polypeptidfragmenter av FBD til fibronektin er beskrevet i eksempel 9.

EKSEMPEL 7

Opptak av rekombinant ^{125}I-31 kD FBD og fragmenter derav ved rustfri stålcoil-indusert venøs trombi i rotter

Den rustfrie stålcoilinduserte venøse trombusmodellen i rotter ble anvendt for å studere opptak av merket r31 kD, r20 kD og r12 kD FBD polypeptider. Modellen som ble benyttet er som beskrevet av Maffrand et al. [Trombosis and Haemostasis 59:225-230 (1988)].

Eksperimentelle detaljer

A. Undersøkelse av opptak av ^{125}I-31 kD av rustfri stålcoil-indusert venøs trombus

Wistar-avledede hunnlige rotter (200-250 g) ble anestesibehandlet med Ketamin HCl pluss xylazin HCl. Et midtlinje abdominalt innsnitt ble laget og det indre av vena cava ble eksponert. En rustfri stålwirecoil (en dental pastabærer, kvalitet nr. 31, 21 mm lang) ble innført i lumen til venen ved stedet rett under forbindelsen, og snittet ble sutursydd. Hver innførte innretning ble individuelt oppveid før innføring og hver vekt registrert. 3 timer etter operasjonen ble dyrene gitt en i.v. injeksjon av 1 ml 0,9% NaI oppløsning for å mette tyroidjodpolen. En time senere mottok rottene en i.v. injeksjon av ^{125}I-r31 kD FBD (5 x 10^6 cpm; 100 µg/kg). r31 kD polypeptidet ble merket som beskrevet i eksempel 3.

Etter 24 timer etter adminstrering av det merkede polypeptidet, ble det tatt blod ved kardiakpunktering, og rottene ble deretter tatt livet av. Segmentet av venen som bærer coilen ble fjernet, mens man er forsiktig med å drenere vekk alt resterende blod. I en gruppe ble segmentene som bærer coilen oppveid slik de var og tatt for måling av radioaktivitet (trombus in situ) gruppen. I en annen grupe, ble veneseksjonene snittet longitudenalt og coilene som bærer trombi ble forsiktig fjernet, oppveiet og radioaktiviteten ble målt. Blodradioaktivitetnivåene ble målt ved å anvende periferiblod.

Beregning av resultatene:

I to grupper ble begynnende vekt av hver coil subtrahert fra sin endelige vekt, og den spesifikke radioaktiviteten i hvert tilfelle ble beregnet ved divisjon av cpm verdien med nettovekten. Spesifikk aktivitet av periferiblodprøver ble også beregnet.

Resultater:

Ved 24 timer var blodnivåer av radioaktivitet rundt 5000-10000 cpm/g, mens i den isolerte blodkoagelen var den spesifikke radioaktiviteten rundt 300000 cpm/g, dvs. 30 til 60 ganger høyere (se figur 16). Når hele segmentet av vene som bærer koagel ble inkludert i analysen, og en såkalt "spesifikk radioaktivitet" verdi beregnet, var de resulterende verdiene 4-5 ganger høyere enn de i blodet, og dette indikerer at et godt signal-til-støyforhold kan bli oppnådd for gammakameraavbilding av blodkoageler in vivo ved å anvende merket r31 kD FBD.

Effekt av heparinforbehandling ble studert i denne modellen. Denne eksperimenttypen er essensiell fordi pasienter som er kandidater for trombusavbilding vanligvis blir behandlet med dette antikoaguleringsmidlet. For å studere dette aktuelle spørsmål, ble en gruppe rotter behandlet med heparin (500 enheter/rotte intravenøst) 10 minutter før administrering av

merket polypeptid. Denne behandlingen av heparin påvirket ikke opptak av markør, målt 24 timer senere. Disse resultatene demonstrerer at trombusavbilding som anvender FBD og FN kan bli gjort i nærvær av heparin.

B. Sammenligning av rekombinant 12 kD, 20 kD og 31 kD-FBD polypeptidet i rustfri stålcoil-indusert venøs trombusmodell

De tre rekombinante polypeptidene ble merket med ^{125}I som beskrevet i eksempel 3 og utnyttet i rottemodellen som beskrevet i A over. Resultatene som er vist i figur 17, indikerer at hver av de tre molekylene var spesifikt lokalisert i koagelene sammenlignet med blod, ved å sammenligne spesifikke radioaktiviteter; den spesifikke radioaktiviteten til koageler synes å være høyere med lengre molekyler enn med kortere polypeptider (143000, 78500 og 63000 cpm/g koagel for henholdsvis r31 kD, r20 kD og r12 kD polypeptider), men forskjellene var ikke statistisk signifikante. Spesifikke radioaktivitetsverdier for blod (etter 24 timer) var på tilsvarende måte relatert til molekylstørrelse (7040, 5016 og 3300 cpm/g for henholdsvis r31 kD, r20 kD og r12 kD polypeptider) og kan reflektere forskjeller i blodklaringshastigheter til disse molekylære artene. Beregninger av forhold av koagel til blodspesifikk reaktivitet resulterte således i verdier som var tilsvarende for de tre ulike polypeptidene, og rangert rundt 20. Disse resultatene antyder at alle tre FBD artene (eller andre fragmenter av FBD) kan tjene til trombusavbilding.

EKSEMPEL 8

Merking av fibrinbindende domenepolypeptider for avbilding av aterosklerotiske lesjoner og trombi

Fibrinbindende domenepolypeptider som er beskrevet i søknaden (r31 kD, r20 kD og r12 kD polypeptidet), eller andre polypeptidfragmenter av FBD, kan bli radioaktivt merket for å bære en radiotracer til en trombus for å muliggjøre dens eksterne påvisning ved gammakameraavbilding. Foreliggende

søknad beskriver i eksempel 3 merking av disse tre polypeptidene ved hjelp av jod-125 (^{125}I), som har en lang halveringstid på 60 dager.

En annen radiojod er jod-131 (^{131}I) som kan bli anvendt til å merke FBD polypeptider ved å anvende kjente metoder slik som beskrevet av Uehara et al. (1). ^{131}I har imidlertid også en relativt lang halveringstid på 8 dager.

Optimalt bør et radiofarmasøytisk middel for klinisk avbilding av aterosklerotiske lesjoner og trombi gi positive resultater i løpet av de første 5 timer etter injeksjon (33). For en slik test bør et radiomerke med kortere varighet bli anvendt. Senere studier har foreslått at indium-111 (^{111}In) eller teknetium-99m (^{99m}Tc) kan være mer velegnet som radiotracere, siden de har halveringstid på henholdsvis 67 timer og 6 timer (32); en annen kortlevet lavenergimarkør er jod-123 (^{123}I) med en halveringstid på 13,3 timer.

Merking av FBD polypeptider med ^{99m}Tc kan bli gjennomført ved å anvende kjente fremgangsmåter (21, 33, 34, 35). ^{99m}Tc er et meget velegnet diagnostisk enkelt fotonradionuklide på grunn av dens korte halveringstid, et påvisningsnivå på 140 KeV med gammateller, ingen spesiell stråling og rimelig, hensiktsmessig tilgjengelighet. Dette tillater rutineadministrering av doser på 30m Ci som resulterer i høye foton-fluxnivåer som forenkler lesjonpåvisning ved enkel fotonemisjonscomputerbehandlet tomografi (32, 35).

Andre radiomerker som kan bli anvendt til å merke FBD polypeptider innbefatter krypton-81m (^{81m}Kr) og xenon-133 (^{133}Xe), som har en halveringstid på 5,3 dager, som oppsummert av Knight (4). Et annet potensielt radiomerke er gallium-67 (^{67}Ga) som beskrevet av Yamamoto (36); ^{67}Ga har en halveringstid på 78 timer.

Det er merket r31 kD, r20 kD, r18,5 kD og r12 kD polypeptider og det plasmatiske 31 kD fragmentet vil ved hjelp av ^{111}In ved å anvende fremgangsmåten som er beskrevet for humant serumalbumin av Hnatowich, D.J., Layne, W.W. og Childs, R.L. i J. Appl. Radiat. Inst. 33: 327 (1982). Foreløpige eksperimenter har vist at merkede FBD polypeptider binder til forlagede trombi in vitro, målt i to-trinnsreaksjon II (eksempel 6) og til trombi in vivo målt ved modellen som er beskrevet i eksempel 7, og gir et høyt trombus: blodforhold i området 80-200 etter 24 timer.

Radiomerking av 12 kD og 18,5 kD proteiner

DTPA modifikasjon av 12 kD og 18,5 kD polypeptidfragmenter av FBD ble gjennomført, hovedsakelig i henhold til publiserte metoder (Hnatowich, D.J., Layne, W.W. og Childs, R.L. (1982) Int. J. Appl. Radiat-Isot. 33 327-332; Knight, L.C., Kollman, M., Maurer, A.H. og Budzynski, A.Z. (1987) Biochim, Biophys. Acta 924 45-53), ved å anvende cyklisk anhydrid av DTPA. Prøver av en tørr kloroformoppløsning, som inneholder beregnede mengder av DTPA ekvivalenter, ble inndampet og reagert med proteiner, i enten fosfat- eller bikarbonat-buffret saltvann (henholdsvis pH 7,4 og 8,0 ± 0,2). Overskudd av (hydrolysert) DTPA ble fjernet ved omfattende dialyse. Merkingen ble gjennomført med bærer-fri ^{111}In, i en HCl oppløsning nøytralisert til ca. pH 6 med natriumacetat. I et eksperiment (i PBS) der 12 kD polypeptid fremstilt som beskrevet i eksempel 2 ble merket og dette resulterte i et trombus til blodforhold (i rottemodellen) på 86 (se under), et beregnet molart overskudd av DTPA - over 12 kD protein-av 5 ble benyttet (det er 5-lysyl ε-aminogrupper og 1α aminogruppe i 12 kD proteinet). Ved merking med ^{111}In, ble fri (ubundet) ^{111}In estimert å være under 15% (ved TLC).

I et annet sett med eksperimenter (i BBS), ble et 1:1 forhold mellom DTPA anhydrid og enten 12 kD eller 18,5 kD protein benyttet.

For å estimere antall DTPA residier som er inkorporert pr. molekyl 12 kD, ble DTPA-modifisert protein, før separering av overskudd DTPA) merket med ^{111}In (Knight et al., se over). Antall DTPA residier inkorporert ble funnet å være 0,12 pr. molekyl 12 kD. DTPA-merket 12 og 18,5 kD proteiner hadde identiske Superose 12 (gel-filtrering) elueringsprofiler i forhold til de fra kontrollumodifisert protein (retensjonstider på henholdsvis 19,17 minutter og 18,29 minutter-kontrollverdier er i tabell E). Ved merking med ^{111}In, etter separering av overskudd DTPA, var mengdene av fri (ubundet) ^{111}In funnet å være 28 og 29% for henholdsvis 12 og 18,5 kD proteiner, og dette resulterte i trombus til blodforhold (i rottemodell) på henholdsvis 27 og 25.

NMRI, ultralyd og røntgenavbilding med metallgelater er beskrevet i US patent 4,647,447. I tillegg nevnes antistoff-kobling med metallchelater i kolonne 7, linje 42. Monoklonale antistoffer merket med polymeriske paramagnetiske chelater og anvendelse i NMRI metoder har også blitt beskrevet [Shreve, P. et al., Magnetic Resonance in Medicine 3: 336-340 (1986) og Brady, T. et al. i Proceedings of the Society of Magnetic Resonance in Medicine, Second Annual Meeting, Soc. of Magnetic Resonance in Medicine, Inc., San Francisco, s. 10, 1983 referert av Koutcher, J. et al., J. Nucl. Med. 25: 506-513 (1984)].

EKSEMPEL 9

Ytterligere eksperimenter som demonstrerer biologisk aktivitet av forskjellige FBD polypeptider

Biologisk aktivitet av r31 kD, r20 kD, r12 kD FBD polypeptider har blitt beskrevet i eksempel 6. Dette eksemplet vil beskrive ytterligere resultater som er observert ved anvendelse av FBD polypeptidfragmenter; disse er 12 kD oppnådd som beskrevet i eksempel 4 og 5, og 18,5 kD konstruert, oksydert/foldet på nytt og renset som vist i eksempel 4 og 10.

I. Binding til fibrinkoagel

Koageldannelse og FBD binding ble gjennomført som beskrevet under i en modifisert versjon av to-trinnsreaksjon II beskrevet i eksempel 6. For å unngå artifakter av aggregering og utfelling av FBD polypeptider, blir det endelige sentrifugeringstrinnet eliminert og koagelen blir overført til et nytt rør og deretter vasket grundig.

a. Koagulering av "forhåndsdannet koagel"

Reaksjonsblandingen (300 µl) fremstilt i silikonbehandlede plastglass (7 ml) av gammateller, inneholdt 150 µl av blanding I [0,2 x Tyrode's buffer ("1 x Tyrode's buffer": 1 mM Hepes pH 7,35; Dekstrose 0,2%; 27 mM NaCl; 0,76 mM NaH_2PO_4; 0,54 mM KCl; 0,2 mM $MgCl_2$), 3U/ml trombin (Sigma), 0,6% BSA (Sigma), 15 mM $CaCl_2$, 150 mM NaCl, 20 mM $NaHCO_3$, pH 8,0] og 150 µl friskt citrert humant fullblod.

Protokoll: Inkubering ved 37°C i 3 timer. Serum blir fjernet ved vakuum og rørene som inneholder fibrinkoagel blir holdt frosset ved -70°C. Forhåndsdannede koageler kan bli anvendt i flere måneder.

b. Binding av FBD til "forhåndsdannet koagel"

Til glass som inneholder "forhåndsdannede koageler" (tint ved romtemperatur), tilsatt 300 µl 150 mM NaCl, 20 mM $NaHCO_3$, pH 8,0, inneholdende: 1 x Tyrode's buffer; 0,6% BSA, 5 mM $CaCl_2$ og 0,15 mM ^{125}I-FBD. Bindingsreaksjonen blir gjennomført (i fravær eller tilstedeværelse av 0,03% natriumjodacetat kan bli tilsatt til denne blandingen for å hemme aktivitet av endogen transglutaminase, faktor XIIIa) ved 37°C i 18 timer. Koagelen blir deretter overført til et silikonbehandlet glass, vasket 3 ganger med 1 ml "vaskebuffer" 20 mM $NaHCO_3$, 1% BSA, 1 mM PMSF, 2 mM EDTA, og talt i en gammateller.

Resultatene som sammenligner plasmatisk og rekombinant 31 kD med rekombinant 18,5 kD, 12 kD, 45 kD (12 kD FBD sammensmel-

tet til 33 kD CBD fremstilt som vist i figur 12), og 33 kD CBD er vist i figur 30. Alle FBD polypeptidfragmentene var bundet i en tilsvarende grad, mens CBD polypeptidet var bare bundet til en meget liten grad. 50-75% hemming forårsaket av tilsetning av transglutaminase (faktor XIII) hemmer jodacetat viser at transglutaminase er aktiv i bindingsreaksjonen. Dens mangel på effekt på 33 kD CBD binding til koagel indikerer at CBD binding til koagel er formidlet av en forskjellig, mulig ikke-spesifikk mekanisme. Som tidligere vist i PCT publikasjon nr. WO 90/07577 (se 138, linje 1-24), er FBD kovalent bundet til fibrinkoagelen. Deltagelse av transglutaminase som vist og den biokjemiske karakteriseringen av ^{125}I-FBD-fibrinkompleks indikerer at minst 70% av FBD polypeptidet er kovalent bundet til fibrin.

II. Binding til vaskulære komponenter

I tillegg til spesifikk binding til fibrin, viser også FBD polypeptider en viss grad av ikke-spesifikk binding til andre vaskulære komponenter som de kommer i kontakt med. Eksempler på vaskulære komponenter er endotele celler (EC), ekstracellulær matriks (ECM) og likeledes fibronektin selv (FN). Denne ikke-spesifikke bindingen er en av faktorene som bestemmer bakgrunnsnivået når man gjennomfører diagnostiske avbildingsprosedyrer. Dess lavere ikke-spesifikk binding, dess mer effektiv er avbildingen og dess mindre er nødvendig med samlet radioaktiv reagens for å administrere til pasienten. Derfor ble eksperimenter gjennomført for å sammenligne ikke-spesifikk binding til vaskulære komponenter av 12 kD FBD fragment og 31 kD FBD polypeptid.

1 ml prøver med 0,3 μM ^{125}I-12 kD eller ^{125}I-31 kD (henholdsvis 5 x 10^5 cpm/μg og 7,5 x 10^5 cpm/μg i PBS som inneholder 0,1% BSA), ble tilsatt i duplikat til 35 mm petriskåler (Falcon) som inneholder: sammenløpende endotelceller ("EC"), ekstracellulær matrisk ("ECM"), (Eldor et al., Blood 65:1477 (1985)) eller immobilisert human fibronektin ("FN"), (1 ml pr. plate PBS som inneholder 50 μg/ml FN,

inkubert ved 4°C over natten og deretter inkubert i 2 timer ved romtemperatur med 1 ml PBS som inneholder 1% BSA for blokkering). Når man indikerer "+TG", inneholdt platene også transglutaminase ved 0,02 U/ml (Sigma). Eksperimentelle plater ble inkubert i 60 minutter ved 37°C i en CO_2 inkubator, vasket 3 ganger med 1 ml "vaskeoppløsning" (PBS som inneholder 2 mM PMSF og 2 mM (EDTA). Bundet radioaktivitet ble deretter ekstrahert ved inkubering i 60 minutter med "ekstraheringsoppløsning" (vaskeoppløsning som inneholder 1% deoksycholat, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 2 mM NME, og 2 mM jodeddiksyre). Oppløsningen ble deretter overført til rør og radioaktiviteten målt i en gammateller.

Resultatene som er oppsummert i figur 28 viser at 12 kD FBD polypeptid bindes bare svakt til de vaskulære komponentene endotelceller, ekstracellulær matrisk og fibronektin sammenlignet med binding av 31 kD FBD polypeptid.

III. Bakteriebinding

Involvering av fibronektin i addisjon til, og invasjon av sår med en lang rekke gram-positive bakterier er vel etabelert (18). Fibrinbindende domene til autentisk plasma avledet FN har vist seg å reagere med høy affinitet til spesifikke reseptorer på overflaten av bakteriene. Setene som Staphylococcus aureus typisk initierer infeksjon er rike når det gjelder FN, f.eks. blodkoageler og subendotelium. Videre øker eksogen FN bakterieaddisjon til disse setene. FN bindes til S. aureus gjennom suturbar, spesifikke overflateprotein-reseptorer. Scatchard analyse har lagt for dagen høy affinitetsreseptorer med bindingskonstanter på 5×10^{-9} M, og et område fra 100-20000 reseptorer pr. bakterie (19). Ekspresjon av FN reseptorer korrelerer med invadering og patogenisitet av de kliniske isolatene. Fjerning av FN reseptorer fra S. aureus ved mekaniske anordninger, eller ved vekst av bakteriene i nærvær av antibiotika senker deres evne til å feste til FN. Ved at FN er et toverdig molekyl som består av multippelfunksjonelle domener med cellebinding og

kollagenbindende aktiviteter i tillegg til bakteriebinding, kan den feste bakterien til såret via forskjellige komponenter av ekstracellulær matrisk såvel som via FN reseptor i vevceller.

En annen tilnærmelse å forstå interaksjon mellom FN og S. aureus er ved hemming av binding av S. aureus til endotele celler ved FBD polypeptidfragmenter.

Binding av 31 kD FBD polypeptid til S. aureus har tidligere blitt beskrevet (PCT publikasjon nr. WO/90/07577, side 146-153). Tilsvarende eksperimenter som er beskrevet under viser at i motsetning til 31 kD FBD polypeptidet, vil 12 kD og 18,5 kD FBD polypeptidfragmenter ikke binde S. aureus, og de vil ikke hemme S. aureus i bindingseksperimentet. 20 kD polypeptidet utviser imidlertid binding av S. aureus (se figur 8); dette kan skyldes ytterligere (ikke-autentiske) C-terminale aminosyrer (se eksempel 2) som kan påvirke aktiviteten direkte eller indirekte gjennom noe spesifikk folding på nytt.

De følgende avsnittene blir presentert for å sammenligne 31 kD FBD polypeptid med andre FBD polypeptidfragmenter både på basis av direktebinding til S. aureus og på basis av hemming av binding av S. aureus til endotele celler.

Materialer og metoder

A. Binding av merket FN eller FBD til bakterier

1. Direktebinding i oppløsning

Forskjellige konsentrasjoner av ^{125}I-r31 kD FBD eller ^{125}I-FN, ble tilsatt til 5 x 10^8 S. aureus bakterier i en PBS oppløsning som ytterligere inneholder 0,1% Tween og 1% BSA. Det endelige volumet var 1 ml. Total radioaktivitet i reaksjonen ble analysert ved å anvende en 20 µl prøve tatt umiddelbart etter tilsetning av bakterier.

Blandingen ble inkubert i 2 timer ved 20°C under risting.

Mengden av binding ble analysert ved fjerning av 100 µl av inkuberingsblandingen og legging på toppen av 0,5 ml PBS lagt på 3 ml 10% Percoll-0,15 M NaCl i et 5 ml silikonbehandlet rør. Dette ble deretter sentrifugert ved 1300 x g (4000 rpm i en SW bøttereaktor) i 15 minutter ved 20°C. Supernatanten ble suget av og pelleten analysert for radioaktivitet.

2. Konkurrering med umerkede FN, FBD og beslektede molekyler

Fremgangsmåten som ble fulgt var identisk til fremgangsmåten over med unntagelse av at 3 µg/ml ^{125}I-p31 kD ble anvendt og den spesifiserte mengden med konkurrerende molekyl (FN eller FBD) ble også tilsatt til den begynnende bindingsblandingen.

3. Binding av radioaktivt merkede bakterier til immobilisert FN

Plastglass ble belagt med 0,3 ml 50 µg/ml FN eller 1% BSA.

Rørene ble inkubert med risting ved 4°C over natten. Rørene ble deretter vasket med 5 ml PBS tre ganger. Deretter ble 0,3 ml 1% BSA i PBS tilsatt og rørene ble videre inkubert under risting i 2-3 timer ved 20°C (for blokkering av frie seter).

I indirekte-bindingseksperimenter ble bakteriene forinkubert med hemmer, ved 4°C i 2 timer.

Bakteriene (4 x 10^6 pfu/ml, 3 pfu/cpm) ble tilsatt glassene i konsentrasjoner som angitt i figurbeskrivelsene. Endelig volum av analyseblandingen var 0,3 ml PBS. Blandingen ble langsomt ristet ved 4°C i 90-120 minutter.

Rørene ble deretter dekantert og vasket med 5 ml PBS tre ganger.

5 ml scintillasjons-væske ble tilsatt når man analyserer for binding av 3H-merkede bakterier.

B. Hemming av binding av S. aureus til endotele celler med FBD fragmenter

I. Jodinering av S. aureus

S. aureus SA 113 (ATCC Aksesjonsnr. 35556) ble dyrket i tryptisk soyablanding (Difco Laboratories, U.S.A.) ved 37°C ved å anvende en 1 liters fermentorkultur. Bakteriene ble høstet i den midlere logaritmiske fasen når optisk tetthet nådde 2,30 OD (ved 660 nm). Bakteriepelleten ble suspendert på nytt i 500 ml PBS som inneholder 5 mM PMSF og vasket 3 ganger. Cellene ble deretter suspendert i 100 ml PBS med 1 mM PMSF og 5 mM NEM (N-etylmaleimid, Sigma E-3876), varmeinaktivert ved 88°C i 20 minutter for fiksering, avkjølt i isvann og deretter lagret i små prøver ved -20°C. Før anvendelse, ble bakteriekonsentrasjonen bragt til 5 x 10^9 PFU/ml. En 100 µCi prøve med Bolton-Hunter reagens for proteinjodering (Amersham) ble inndampet i et glassrør på is. Bakteriesuspensjonen (1 ml) ble tilsatt det inndampede reagenset og blandet forsiktig i 10' på is. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 1 ml 0,2M glycin i 50 mM kaliumfosfatbuffer pH 8,5. Reaksjonsblandingen ble deretter suspendert i 20 ml PBS som inneholder 1 mM PMSF. Etter sentrifugering ved 3000 rpm i 10' ved 5°C, ble vasketrinnet gjentatt to ganger. Den endelige pelleten ble suspendert i 2,2 ml PBS som inneholder 1 mM PMSF og lagret ved -20°C. Spesifikk aktivitet var generelt 20-100 PFU/cpm.

II. Vekst av endotele celler

Bovin aortaendotele celler A_5P_7 (oppnådd fra A. Eldor, Hadassa Hospital, Jerusalem), ble holdt i vevskultur som tidligere beskrevet (Ogawa S.K. et al. 1985 Infect. Immunol. 50: 218-224). Kulturmediet inneholdt DMEM/+1% D-glukose og 10% FCS (begge fra Biological Industries, Kibbutz Beth-Haemek, Israel) supplert med L-glutamin og gentamycin (henholdsvis 7 mM og 5 mg/ml, begge fra Sigma Chemicals).

Cellene ble holdt ved 37°C og 5,5% CO_2 i 150 ml vevskulturflasker (Falcon).

Sammenflytende monolag for bindingseksperimenter ble fremstilt i enten 24 brønners vevskulturplater eller 35 mm vevskulturplater (Corning Glassware, Corning N.Y.). Brønnene og platene ble forinkubert i 30 minutter med henholdsvis 0,5 ml eller 1 ml fullstendig medium, forut for tilsetning av cellesuspensjon. I et typisk eksperiment ble brønner og plater henholdsvis sådd med 5 x 10^4 og 10^5 celler, og anvendt etter 3-4 dager når kulturen ble sammenflytende.

III. Binding av ^{125}I-S. aureus til endotele celler

Denne fremgangsmåten er idet vesentlige som beskrevet i referansen som nevnt over (Ogawa et al. 1985). En prøve av merket S. aureus fremstilt som beskrevet over ble fortynnet i PBS til 10^8/ml. 3,5 µl merkede bakterier ble tilsatt en blanding som inneholder 20 µl DMEM +10% FCS, 33 µl 150 mM NaCl som inneholder 20 mM $NaHCO_3$, 17 µl PBS eller konkurrenten som skulle ble undersøkt, og deretter inkubert i 2 timer med forsiktig blanding. Bakteriene ble deretter tilsatt de sammenflytende monolagene med endotele celler forhåndsdyrket som beskrevet over. De endotele cellene ble vasket med saltvann umiddelbart ført man gjennomfører analysen. Blandingen ble inkubert ved 4°C i 1 time med forsiktig risting i 2 timer ved 37°C i 5% CO_2 uten risting. Ubundede merkede bakterier ble fjernet ved vasking 3 ganger med kald PBS som inneholder 2 mM PMSF og 2 mM EDTA. Bundede merkede bakterier ble deretter ekstrahert ved risting ved romtemperatur i 1 time i PBS som inneholder 1% deoksycholat, 20 mM Tris HCl pH 8,3, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 2 mM NEM, og 2 mM jodeddiksyre. Ekstraksjonen ble gjentatt en gang, og de kombinerte ekstraktene ble talt i en gammateller.

Resultater

A. Binding av bakterier til ^{125}I-FN eller FBD i oppløsning

1. Direktebinding

Eksperimenter ble gjennomført for å bestemme binding av ^{125}I-FN eller ^{125}I-rFBD til S. aureus bakterie i suspensjon.

Forskjellige mengder radioaktiv FN eller r31 kD ble tilsatt 5 x 10^8 bakterier inkubert i 2 timer og deretter sentrifugert over en 10% Percoll-saltvannsoppløsning. Radioaktivitet ble registrert i pelleten.

Resultatene viste økt binding av et ^{125}I-rFBD (r31 kD) til bakterier i suspensjon sammenlignet med binding av ^{125}I-FN.

Denne økede binding av ^{125}I-rFBD til S. aureus sammenlignet med ^{125}I-FN binding til S. aureus kan skyldes høyere affinitet av en enverdig domene sammenlignet med toverdige multidomener av intakt plasma avledet FN.

Lignende eksperimenter som ble gjennomført med 12 kD og 18,5 kD FBD fragmenter viste ingen binding.

2. Konkurrering med "nativ" umerket FN, FBD og beslektede molekyler

En bestemt mengde ^{125}I-p31 kD (3 µg/ml) ble inkubert med 5 x 10^8 bakterier i nærvær av økende mengder forskjellige FBD molekyler som konkurrenter.

Resultatene demonstrerer at "nativ" FN, såvel som riktig foldet p31 kD eller r31 kD FBD hemmet binding av ^{125}I-p31 kD til S. aureus på tilsvarende måte, og dette indikerer at rekombinant 31 kD er så aktiv som naturlige plasma-avledede molekyler. Reduserte ("knuste") former av rekombinant eller plasma-avledet FBD hemmet bare minimalt binding av ^{125}I-FBD til bakterie, og dette indikerer at riktig folding er nødvendig for binding. Videre konkurrerte r18,5 kD og r12 kD FBD polypeptidet såvel som et CBD polypeptid (33 kD cellebindingsdomene av FN) ikke med binding av ^{125}I-pFBD til S. aureus, og viser som konklusjon at bare fullstendig 31 kD FBD domene har bakteriell bindingsaktivitet mens kortere FBD fragmenter ikke bandt bakterier.

B. Binding av merket S. aureus til immobilisert FN

For å bestemme kapasiteten til rFBD (r31 kD) for å interferere med festing av bakterier til ekstracellulær matriks i sår, ble det utviklet en konkurrerende analyse. I denne analysen ble festing av S. aureus til plasoverflater belagt med FN, og interferens av FBD med binding målt.

Resultatene demonstrerer at festing av S. aureus til FN belagte plastglass ble hemmet etter pre-inkubering av S. aureus med FN, pFBD (31 kD) eller rFBD (31 kD). Grad av hemming av disse molekylene var tilsvarende. Et ikke-beslektet protein, BSA, som ikke har S. aureus bindingsseter, forårsaket ikke noe hemming i adhesjon av radioaktivt merket S. aureus til FN belagte plastglass.

I tilsvarende eksperimenter som er gjennomført med 12 kD FBD fragmenter, ble det ikke påvist noe hemming av binding av S. aureus til immobilisert FN.

C. Hemming av binding av S.aureus til endotele celler

Figur 29 viser hemming av FBD fragmenter av binding av S. aureus til endotele celler som beskrevet over. 31 kD viser en dramatisk og doseavhengig effekt på S. aureus binding til endotele celler. Hverken 18,5 kD eller 12 kD har imidlertid noen hemmende effekt, og dette viser at bindingssetet på FBD for S. aureus reseptor ikke blir funnet på 12 kD og 18,5 kD fragmentene. Dette er et overraskende resultat siden dette er første demonstrasjon på at bakteriebindende domenen av FBD til fibronektin kan bli separert fra S. aureus bindende domene.

Oppsummering og sammenligning

Tabell C oppsummerer og sammenligner aktivitetene til forskjellige FBD polypeptidfragmenter som beskrevet over.

Tabell C: Sammenligning av aktiviteter og bindingsspesifitet til forskjellige FBD polypeptidfragmenter

Aktivitet	**31 kD**	**18,5 kD**	**12 kD**
Fibrinbinding	Høy	Høy	Høy
Binding til vaskulære komponenter	Høy	Lav	Lav
Bakteriebinding	Ja	Nei	Nei
Hemming av binding av S. aureus til endotele celler	Ja	Nei	Nei

Man kan se at 18,5 kD og 12 kD FBD polypeptidfragmenter har en høy kovalent bindingsspesifisitet for fibrin, sammen med et smalere spektrum av aktiviteter og lavere spesifisitet for andre ligander slik som vaskulære komponenter og bakterier enn 31 kD. Dette er et fordelaktig karaktertrekk for et tromboseavbildende middel, og forsikrer at som et diagnostisk reagens har den en høy affinitet for fibrin-inneholdende trombi, mens den opprettholder lave bakgrunnsnivåer. Et in vivo eksempel av dette er skaffet tilveie i eksempel 13.

EKSEMPEL 10

Forbedret fremgangsmåte for folding på nytt/oksydering og rensing av kortere FBD polypeptidfragmenter

Rekombinante FBD proteiner - r31 kD ("5 fingre"), 18,5 kD (en mer autentisk versjon av "3 fingre" enn tidligere beskrevet 20 kD) og r12 kD ("2 fingre") - er uttrykt i E. coli og foldet på nytt/oksydert på nytt før den blir renset til homogenitet (>98% renhet). Folding på nytt/reoksyderingsprosessen som blir anvendt for full 31 kD FBD polypeptid (5-fingre) og for kortere 12 kD og 18,5 kD FBD polypeptidfragmenter (2- og 3-fingret) er forskjellige og har blitt beskrevet over i eksempel 2 og 5. Fremgangsmåten i eksempel 5

har blitt funnet å være anvendbare til alle 2- og 3-fingrede FBD proteiner, som så langt har blitt foldet på nytt, men ikke det 5-fingrede protein, 31 kD. selv når reduksjon (etterfulgt av oksydering på nytt) blir gjennomført på renset plasma-avledet 31 kD, dvs. "åpning" og folding på nytt av proteinet. Denne prosedyren har i det siste blitt forbedret uten å påvirke prinsippet med refoldingsprosessen, og den forbedrede prosedyren har blitt funnet anvendbar på 12 kD, 18,5 kD og 20 kD polypeptider, og til 45 kD FBD-CBD hybrid-polypeptid (12 kD-33 kD) men ikke til 31 kD polypeptid.

Fremgangsmåten er idet vesentlige som beskrevet i eksempel 5. Følgende beskrivelse angår 12 kD polypeptid og tilsvarende resultater ble oppnådd for 18,5 kD FBD polypeptid og 45 kD FBD-CBD hybridpolypeptider; disse polypeptidene ble uttrykt med henholdsvis plasmid pFN 203-2 (figur 27), pFN 208-13 (figur 23) og plasmid pFN 202-5 (figur 12).

Bakteriekaken ble fremstilt som beskrevet i eksempel 2 ved fermentering av E. coli stamme A4255 som innehar plasmid pFN 203-2 (som beskrevet i figur 27).

A. Råbeareiding av bakteriekaken: Vasking og ekstrahering av pelleten ble gjennomført på en tilsvarende måte som den til 2- og 3-finger FBD proteiner (se eksempel 5). Bakteriekaken ble suspendert i 20 volumer 50 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, pH 7,4. Etter 15 minutters omrøring, ble suspensjonen brudt ved 2 ganger passering gjennom en Dynomill kD 5 perlemølle ved 50 liter/time. Den oppbrudte suspensjonen ble sentrifugert (14000 x g i en Cepa 101 sentrifuge) ved en tilførselshastighet på 80 liter pr. time. Pelleten ble suspendert i bufferen over til et endelig volum 10 ganger det av den opprinnelige bakteriekakens tørrcellevekt. Suspensjonen ble bragt til 37°C og lysozym tilsatt (2500 U/ml). Etter 2 timers omrøring ved 37°C, ble Triton X-100 tilsatt og inkubering med omrøring fortsatt i 30 minutter ved romtemperatur. Suspensjonen ble deretter fortynnet med likt volum avionisert vann,

sonikert med en W 370 sonikator og sentrifugert ved 14000 x g under samme betingelser som over. Pelleten ble vasket to ganger med resuspendering i avionisert vann til et endelig volum 16 ganger det til tørrcellevekten av bakteriekaken, og omrørt i 15 minutter ved romtemperatur ved pH 7,4. Etter omrøring ble suspensjonen sonikert med en W 370 sonikator og sentrifugert ved 14000 x g under samme betingelser som over. Den vaskede og ekstraherte pelleten som inneholder inkluderte legemer av FBD polypeptid blir holdt frossen ved -20°C inntil videre bearbeiding.

B. Folding på nytt/reoksydering: De resulterende vaskede inkluderte legemene (100 g - som representerer 19,2 g tørrvekt) ble gjort oppløslig i 5 volumer 10 mM Tris HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 1 mM fenylmetansulfonylfluorid (PMSF), 10 mM ε-aminokaproinsyre, som inneholder ytterligere 6 M guanidin HCl (endelig volum 600 ml). Prøven ble redusert ved tilsetning av 2,27 ml β-merkaptoetanol (endelig konsentrasjon: 50 mM) og omrøring ved romtemperatur i fravær av luft, dvs. i en forseglet beholder i 90 minutter. Redusert protein ble oksydert på nytt (ved en proteinkonsentrasjon på 0,81 mg/ml) i 0,54 M guanidin HCl, som følger: 6 liter oksyderingsbuffer (10 mM Tris HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM ε-aminokaproinsyre, som ytterligere inneholder 0,3 mM oksydert glutation (GSSG), ble tilsatt oppløsningen med redusert protein under omrøring ved en hastighet på 150 ml pr. minutt. Oksydasjonsprosessen ble fortsatt i 65 timer ved romtemperatur i en lukket beholder, mens den blir omrørt konstant og forsiktig. Oppløsningen med reoksydert protein ble filtrert gjennom Whatman no. 3 filterpapir for å fjerne presipitater og deretter konsentrert 10 ganger på en Pellicon tangensiell strømultrafiltreringsenhet utstyrt med en 3 kD MW avkuttingsmembran og diafiltrert på samme membran, for å fjerne guanidin HCl, β-merkaptoetanol og GSSG. Et ytterligere presipitat som ble utviklet ved henstand ved 4°C over natten, ble fjernet ved sentrifugering ved 22500 x g i 45 minutter. (For 18,5 kD og 45 kD polypeptider, ble ultrafiltrering og

diafiltrering gjennomført med en 10 kD molekylvektavkuttingsmembran).

C. Rensing: Konsentrert og klargjort oppløsning (700 ml) ble anbragt på en Q-Sepharose kolonne (2,5 x 28,5 cm), ekvilibrert i 10 mM Tris HCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM ε-aminokaproinsyre, pH 8,0. Gjennomstrømmingen av kolonnen, som inneholder 45 kD proteinet, ble applisert - i porsjoner på 170-350 mg) på en Heparin-Sepharose kolonne (2 x 6,5 cm), ekvilibrert i 10 mM Tris HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA. Etter vasking av det ubundede proteinet med denne bufferen, ble bundet protein eluert med samme buffer, som ytterligere inneholder 500 mM NaCl. Eluatene ble samlet og holdt frosset ved -20°C.

Som fastslått over, ble denne prosedyren anvendt med mindre modifikasjon på begge 18,5 kD polypeptid og 45 kD FBD-CBD hybridpolypeptid. Resultatene for begge disse polypeptidene var tilsvarende som de som ble oppnådd for 12 kD polypeptid.

Anvendelse av buffer som inneholder 0,5 M NaCl for eluering fra Heparin-Sepharose og lagring ble funnet å være nødvendig for å forsikre stabilitet av polypeptidene, som ellers ville ha tendens til raskt å miste sine aktiviteter, dette angår særlig 31 kD polypeptidet.

EKSEMPEL 11

Karakterisering av FBD polypeptidfragmenter

I. Prosedyre

FBD polypeptidfragmentene fremstilt ved metodene i foreliggende søknad ble vurdert og sammenlignet i en serie med karakteriseringstester ved følgende fremgangsmåter som er kjent innenfor fagområdet.

1. **SDS-PAGE +ME** (ME = β-merkaptoetanol): 12,5% akrylamidgeler ble ladd med protein, som tidligere hadde blitt behandlet

ved 5 minutters koking i prøvebuffer som inneholder 1% SDS- under reduserende betingelser (+ 1% ME). Elektroforese ble gjennomført med 20 µg pr. brønn og gelene farget med Coomassie Brilliant Blue. Målte parametere er: a) mobilitet, som sammenlignet med molekylvektmarkører (94, 67, 43, 30, 20,1 og 14,4 kD) kan bli uttrykt på basis av en tilsynelatende molekylvekt for det studerte proteinet; b) homogenitet og renhet, som kan bli fastslått fra relative intensiteter av hovedbånd og mindre bånd.

2. **SDS-PAGE -ME:** 12,5% akrylamidgeler blir ladd med protein, som tidligere er blitt behandlet - 5 minutters koking i prøvebuffer som inneholder 1% SDS - under ikke-reduserende betingelser (-ME). Elektroforese ble gjennomført med 20 µg/pr. brønn og gelene farget med Coomassie Brilliant Blue. Parametere som ble målt er: a) mobilitet som sammenlignet med molekylvektmarkører (94, 67, 43, 30, 20,1 og 14,4 kD) kan bli uttrykt på basis av en tilsynelatende molekylvekt for proteinene som blir studert; b) homogenitet eller renhet, som kan bli fastslått fra relative intensiteter av hovedbånd og mindre bånd - særlig under disse betingelsene, kan man evaluere mengdene av disulfid-bundede dimerer.

3. **Gelfiltrering på Superose 12:** Den tilsynelatende molekylvekten og homogeniteten til proteinpreparatene ble evaluert fra elueringsprofiler som ble oppnådd på en Superose 12 kolonne (HR10/30, Pharmacia Fine Chemicals), tilknytten enten et FPLC apparatur, utstyrt med en væskekromatografikontroller LCC-500 og en rekorder (Pharmacia Fine Chemicals) eller til et HPLC system (Waters Associates), som består av to pumper (Modell 501), en injektor (Model U6K) og en automatisert gradientkontroller (Model 580) utstyrt med en variabel bølgelengdedetektor - Spectro-Monitor 3000 (LDC/MIlton Roy)- og en Chromato-Integrator (Merck-Hitachi, Model 2000). Kolonnen ble kalibrert med følgende molekylvektsstandarder, hvis retensjonstider ble bestemt: bovint serumalbumin (67 kD), ovalbumin (43 kD), chymotrypsinogen (25 kD) og ribo-

nuklease (13,7 kD). Strømningshastigheten var 0,8 ml/min. ved å anvende standard kjørebuffer, dvs. 150 mM NaCl - 20 mM Tris-HCl, pH 7,8-8,0. To parametere ble registrert: retensjonstid og halvhøyde båndbredde.

4. **UV spektroskopi:** Spektra ble oppnådd ved romtemperatur i BBS eller PBS ved konsentrasjoner på 0,2-1 mg/ml på et Philips UV/synlig scanningspektrofotometer Model PU8720 (båndbredde 2 nm) utstyrt med en skriver/plotter. Spektra ble målt på Pye Unicam UV silikaceller med 10 mm vei-lengde. Både absorbsjonskoeffisient, dvs. $\epsilon_{1\%}$ ved spektrum λ_{max}, og forhold mellom absorbanser ved λ_{max} og λ_{min} ble registrert.

5. **Intern fluorescens:** Data ble oppnådd på et Jasco spektrofluorometer, Model FP-770 ved 25°C±0,1°C. Eksiteringsbølgelengde var 280 nm og både eksitasjon og emisjonsspalter ble satt ved 5 nm. Konsentrasjon av proteiner i analysen var 8-25 µg/ml i enten PBS eller frisk BBS, pH 7,5. Det er en markert pH avhengighet av begge målte parametere, dvs. λ_{max} (bølgelengden til maksimalt spektrum) og spesifikk intensitet (fluorescensintensiteten ved spektrums maksimum normalisert med proteinkonsentrasjon i mg/ml).

6. **Aminosyresammensetning:** Denne testen ble gjennomført til Stein & Moore metodologi for aminosyreanalyse. Proteinhydrolyse blir gjennomført på tørket protein ved å følge behandlingen i en Speed Vac sentrifuge (Savant): 6,0 N HCl ble tilsatt, 1 ml pr. hvert milligram protein; nitrogen erstatter luft ved suksessive uttømminger og rensing med nitrogen. Rør blir forseglet og oppvarmet i 22 timer ved 110 ± 0,1°C. Den for tiden anvendte metoden er idet vesentlige i overensstemmelse med USP Drafts of Biotechnology-Derived Products, 1989 USP Convention, INC. <954> s. 96-98. Analysatoren som blir anvendt er en Biotronic LC 5000, serienummer 515-01. De vurderte parameterene ved denne metoden er antall residier av hver aminosyre, med untagelse for Cys og Trp.

7. **Heparin-Sepharose kromatografi:** Prøver med opptil 200 µl ble injisert inn i en analyttisk Heparin-Sepharose kolonne (5,5 x 0,5 cm), tilknyttet til et HPLC system (Waters Associates), som består av to pumper (Model 501), en injektor (Model U6K) og en automatisert gradientkontroller (Model 580) utstyrt med en variabel bølgelengdedetektor - Spectro-Monitor 3000 (LDC/Milton Roy) - og en Chromato-Integrator (Merck-Hitachi, Model 2000). Kolonnen ble forekvilibrert i 10 mM Na-fosfat pH 6,5, 75 mM NaCl ved en strømningshastighet på 0,5 ml/min. og vasket i 5 minutter i samme buffer. Proteinene ble eluert i en lineær gradient fra 75 til 500 mM NaCl i buffer i 37,5 minutter. To parametere ble evaluert, retensjonstid (ret.tid), som er proporsjonal til saltkonsentrasjonen der proteinet eluerer og halv-høydebåndbredde (halv-h. b.b.), som fastslår toppens homogenitet.

8. **Revers fase-HPLC kromatografi:** Prøver ble injisert på en analyttisk Waters C_{18} Bondapak reversfasekolonne (30 x 0,39 cm), tilknyttet et HPLC system som i seksjon 1.7. Kolonnen ble forekvilibrert i 80% H_2O, 0,1% TFA/20% acetonitril, 0,08% TFA ved en strømningshastighet på 1 ml/min. og vasket i 5 minutter med det samme oppløsningsmidlet. Proteinene ble eluert i en lineær gradient til 40% H_2O/0,1% TFA: 60% acetonitril - 0,08% TFA i 40 minutter. To parametere ble vurdert, retensjonstid (ret. tid) og halv-høyde båndbredde (halv-h. b.b.), som fastslår toppens homogenitet.

9. **Tryptiske kart:** 200 µg prøver av forskjellige satser ble spaltet i 10 minutter ved 37°C ved forskjellige trypsin v/v forhold i %: 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 og 10,0. Reaksjonen ble stoppet med 5 mM PMSF, og etter 30 minutter på is ble det behandlet med prøverbuffere ±ME (se seksjon 1.1. og 1.2.) og kjørt på 20% akrylamidgeler - som over. Grad av ekvivalens mellom båndmønstere ble fastslått etter farging med Coomassie Brilliant Blue.

10. **Ellman's metode for tiolbestemmelse i proteiner:** Bestemmelsen ble gjennomført på denaturerte proteiner, for å muliggjøre full eksponering av tiolgrupper.

Forrådsoppløsninger: 1. Guanidin-HCl (av renset kvalitet som er tilgjengelig) 7,2 M i 10 mM Tris-HCl, pH 8 (GuCl); 2. DTNB (Ellman's reagens) $5x10^{-3}$ M i 100 mM K-fosfatbuffer, pH 7.

Metode: En proteinprøve som inneholder 10-100 µM tiolgrupper blir laget opp til 0,15 ml; en DTNB blindprøve, (dvs. uten inkludert protein); 0,75 ml GuCl 7,2 M blir tilsatt for å gi en endelig konsentrasjon på 6 M. Etter inkubering i 15-30 minutter ved romtemperatur, blir blindprøven av protein-oppløsningen avlest ved 412 nm. 100 µl DTNB blir deretter tilsatt en endelig konsentrasjon på 5 x 10^{-4} M. Etter inkubering i 30 minutter ved romtemperatur, ble prøvene avlest ved 412 nm versus DTNB blindprøven. Konsentrasjonen blir beregnet ved å anvende ε = 13600 M^{-1} cm^{-1}, dvs. 100 µM tiolgrupper gir en absorbansverdi på 1,36.

11. **Utfelling/adsorbsjon**

Eppendorf rør som inneholder frossen ^{125}I-FBD får anledning til å tine ved romtemperatur, og blir deretter blandet ved virvling. To 5 µl prøver blir fjernet for radioaktivitetsmåling. Når høy spesifikk aktivitets ^{125}I-FBD blir anvendt, bør fortynning i silikoniserte rør med høy saltbuffer (0,6 M NaCl - 20 mM, $NaHCO_3$, pH 8-9) bli gjennomført før telling. Forrådsoppløsningen ble deretter sentrifugert ved topphastighet i en Eppendorf sentrifuge og supernatanten fjernet til et annet silikonisert rør. To 5 µl prøver blir talt på nytt. Forskjellene mellom radioaktiviteten oppnådd før og etter sentrifugering representerer "prosent utfelling".

Når ^{125}I-FBD blir holdt frossen (ved -70°C) i silikoniserte rør og i høy saltbuffer (0,6 M NaCl) er proteinet ganske stabilt. Det ble funnet bare minimal utfelling av ^{125}I-FBD av 0-7% i en periode på 2 uker. Når det imidlertid ble beholdt i

ikke-silikoniserte rør og i lav saltbuffer (150 mM NaCl), kunne ^{125}I-FBD utfellingen være så høy som 60-80% i 2-3 dager. Under disse betingelsene er både utfelling og absorbsjon til røret vesentlig.

12. **Reaksjon av FBD med ^{14}C-putrescin**

Reaksjonsmålinger og tilgjengelighet av Gln #3 av FBD til transglutaminasereaksjon av faktor XIIIa).

Metode: Reaksjonsblandingene (100 µl) i silikoniserte Eppendorf rør inneholder: 10 mM $CaCl_2$, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM DTT, 120 µM ^{14}C-putrescin (Sigma), 6 µM FBD og 0,05 U/ml marsvinlevertransglutaminase (Sigma). Etter inkubering ved romtemperatur i 0, 15, 30 og 60 minutter, blir prøver (10 µl) tilsatt rørene som inneholder 200 µl stoppreagens (0,4 mg/ml BSA, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM $NaHCO_3$, pH 8,0) ved 0°C (på is). Kald 20% TCA (250 µl) blir tilsatt og følges av 10 minutter inkubering på is, ytterligere 3 ml kald 20% TCA blir tilsatt og rørinnholdet blir filtrert på et glassfiberfilter (Whatman GF/C). Filterene blir vasket 3 ganger med kald 20% TCA og en gang med 70% etanol. TCA utfellbart radioaktivt materiale ble registrert i en beta teller. Tilgjengelighet av Gln #3 i FBD til transglutaminering ble beregnet basert på spesifikk aktivitet av ^{14}C-putrescin og på konsentrasjon av FBD i reaksjonsblandingen; inkorporering av 5% samlede tellinger er ekvivalent med 100% tilgjengelighet.

13. **Selvassosiasjon**

Reaksjonen blir gjennomført i 300 µl av en 150 mM NaCl-20 mM $NaHCO_3$, pH 8,0, som også inneholder: 0,1 x Tyrode's buffer; 0,6% BSA, 5 mM $CaCl_2$; 0,15 µM ^{125}I-FBD; 6 µl transglutaminase (0,02 U/ml) - se seksjon 12.

Reaksjonsblandingen ble inkubert ved 37°C i 18 timer, etterfulgt av vakuumsuging av reaksjonsoppløsningen, 3 ganger

vasking med 1 ml "vaskebuffer" og måling av radioaktivitet i en gammateller.

II. Resultater

Alle FBD proteiner som inneholder en ekstra metionin i aminoterminalen, og i steden for pyroglutamatresidiet, som er i den blokkerte N-terminalen til p31 kD (oppnådd ved etter-translasjonsmodifikasjon fra kodet Gln), er deres N-terminale Met fulgt av et Gln residie. Den positive identifikasjon av FBD proteiner ble også bekreftet ved Western Blot analyse av geler - fremkalt med anti-20 kD. 45 kD ble identifisert ved å fremkalle dens plot med både anti-20 kD og anti-33 kD av cellebindende domene.

FBD fragmenter og 45 kD FBD-CBD hybrid ble videre karakterisert ved en lang rekke av: a) fysiko-kjemikalske tester som beskrevet over til sammenligning med 31 kD (se tabell C og D).

b) biokjemiske og biologiske tester in vitro: tilgjengelighet av Gln #3 til transglutaminase-katalysert transamidering (se tabell C og D); og selvassosiering. Binding til fordannede fibrinkoageler er beskrevet i eksempel 9.

c) biologiske tester in vivo: binding til venøse trombi i rotter er beskrevet i eksempel 13.

Tabell D detaljerer parametere som ble analysert i den kjemiske og fysiko-kjemikalske karakterisering av FBD polypeptider og FBD-CBD hybrider. 12 kD, 18,5 kD og 45 kD polypeptider ble fremstilt med henholdsvis plasmid pFN 203-2, pFN 208-13 og pFN 202-5.

Tabell E skaffer tilveie virkelig målte verdier for FBD polypeptider som ble analysert.

Tabell D. Karakteriseringsparametere for FBD proteiner

METODE	PARAMETERE
1. SDS-PAGE +ME	molekylvekt (kfr. markører); renhet og homogenitet
2. SDS-PAGE -ME	molekylvekt (kfr. markører); renhet og homogenitet
3. Gelfilt. (Superose 12)	retensjonstid; halv-høyde båndbredde
4. UV spektroskopi	absorbsjon koeff. -λ_{max}-1%; absorbans forhold $\lambda_{max}/\lambda_{min}$
5. Intrinsisk fluorescens	spesifikk intensitet (I/prot. kons.); λ_{max}
6. Aminosyre-sammensetning	residieantall - ekvivalens til teoretisk verdi
7. Heparin-Sepharose	retensjonstid - halv-høyde båndbredde
8. RP-HPLC	retensjonstid; halv-høyde båndbredde
9. Ellman	Frie tioler
10. Reaksjon med ^{14}C-putrescin	Prosent av teoretisk binding - representerer tilgjengelighet av Gln #3 til transglutaminaseavhengig transamidering (<0,5% binding i fravær av enzym)

TABELL E: MÅLTE VERDIER FOR FBD PROTEINER

Protein	r18,5 kD	r12 kD	r45 kD	r31 kD
1. SDS-PAGE +ME	18,5 kD; ≥98%	14,2 kD; ≥98%	42 kD; ≥90%	31 kD; ≥98%
2. SDS-PAGE -ME	17,7 kD; ≥98%	14,4 kD; ≥98%	41 kD; ≥90%	28 kD; ≥98%
3. Gelfilt. (Superose 12)	18,29 min.; 3 mm	19,03 min.; 2,5 mm	16,56 min.; 2 mm	17,41 min.; 3 mm
4. UV spektroskopi	19,2; 1,84	13,5; 2,02	Ikke utført	17,7; 1,55
5. Intrinsisk fluorescens	340 nm; 10,3	339 nm; 14,4	Ikke utført	3,43 nm; 18,1
6. Aminosyresammensetning	Ekvivalent til teoretisk verdi	Ekvivalent til teoretisk verdi	Ikke utført	Ekvivalent til teoretisk verdi
7. Hepharin-Sepharose	32,77 min.; 8 mm	31,14 min.; 8 mm	34,00 min.; 8,5 mm	36,50 min.; 9 mm
8. RP-HPLC	23,02 min.; 1 mm	21,50 min.; 1 mm	Ikke utført	23,76 min.; 2 mm
9. Ellman	≥ 0,2%	≥ 0,2%	Ikke utført	≥ 1%
10. Reaksjon med ^{14}C-putrescin	86,0%	100,0%	Ikke utført	91%

94

EKSEMPEL 12

Rettet trombolyse som utnytter FBD-SK komplekser

I. Introduksjon

Enkel og effektiv fibrin-rettet trombolyttiske midler er et hovedmål innfor farmasøytisk industri. Vår tilnærmelse for utvikling av et slikt medikament er basert på observasjon av at den N-terminale fibrinbindende domene til fibronektin (FBD) kan bli spesifikt tverrbundet til fibrinkoagel med faktor XIIIa. Siden nylig dannede trombi er det eneste miljø som er anriket når det gjelder aktivert faktor XIII, kan FBD utvise fordelaktig binding til nye eller gamle trombi og bli en endelig målbærer. Det ble derfor generert ved kjemisk tverrbinding, chimeriske FBD-streptokinasekonjugater og analysert deres aktivitet i koageloppløsning.

Vevsplasminogenaktivator (TPA) og streptokinase (SK) er kjent som de beste fibrinolyttiske midlene som blir anvendt i kardiovaskulær terapi. TPA og SK degraderer begge fibrin, men de adskiller seg i deres virkemåte. TPA utviser fibrin-selektiv plasminogenaktivering. Selektiviteten av TPA skyldes tilstedeværelse av fibrinbindende seter ved aminoterminal region til molekylet. TPA bindes til fibrin med en K_d på 0,16 µM. Når det er bundet til fibrin, avtar dens K_m for prosessen av plasminogenaktivering fra 83 µM til 0,18 µM og resulterer i en effektiv enzymatisk omdanning av plasminogen til plasmin.

SK reagerer med plasminogen for å danne et aktiveringskompleks som har evne til å katalysere dannelse av plasmin. Denne virkningen er ikke avhengig av fibrinbinding. Aktivert SK-plasminogenkompleks i blodstrømmen kan katalysere en systemisk omdannelse av sirkuleringsplasminogen til plasmin. Aktivert plasmin blir fortrinnsvis hemmet av α_2-antiplasmin. Med en gang hemmingskapasiteten er utøvet, blir fri fibrinogen, fibrin og noen andre plasmaproteiner degradert av plasmin. Den resulterende fibrinogenolyse forårsaker brudd på

normale koaguleringsmekanismer, og øker på den måten risiko for blødning.

På grunn av affinitet av TPA til fibrin er det antatt at den er fordelaktig som et fibrinolyttisk middel relativt til SK som ikke binder fibrin. TPA og SK er blitt sammenlignet når det gjelder deres terapeutiske effekt i flere storskala-humane kliniske utprøvinger. Ifølge akkumulerte data er SK det midlet som blir valgt for de fleste pasienter (Scrip No. 1597, side 22-23, 8. mars 1991). Det er fremdeles en stor interesse når det gjelder utvikling av et forbedret fibrinolyttisk middel med øket fibrinselektivitet. Både kjemisk tverrbinding og rekombinante DNA metoder blir anvendt til å utforme de ønskede molekylene. Flere chimeriske plasminogen-aktivatormolekyler har blitt konstruert og disse inneholder forskjellige høyaffinitetsfibrinbindende domener av flere plasma-avledede proteiner eller anti-fibrinmonoklonale antistoffer bundet til katalytisk domene av TPA. Disse molekylene blir analysert av flere farmasøytiske firmaer når det gjelder terapeutiske effektivitet.

Aktivert faktor XIII (transglutaminase) katalyserer tverrbinding av fibrinmolekyler i det endelige trinnet i blodkoagulering, og øker dermed den mekaniske stabiliteten til koagelen. Som beskrevet i eksempel 6B, blir intakt plasmatisk fibronektin (FN) også tverrbundet til fibrin ved faktor XIIIa.

Som beskrevet i eksempel 2 og 4, har foreliggende søknad klonet og uttrykt FBD polypeptidfragmenter av FN (12 kD, 18,5 kD, 20 kD og 31 kD). Disse polypeptidene har blitt studert in vitro og in vivo for deres evne til å bli kovalent bundet til fibrinkoageler og trombi i nærvær av faktor XIIIa (eksempel 6, 9, 13). Det ble bestemt å utnytte fordelen ved denne intrinsiske evnen til FBD molekylet med hensyn på deres kovalente binding til fibrin og for å generere kjemisk tverrbinding (eller ved rekombinant DNA metode) av chimeriske

FBD-SK molekyler for å målrette SK til trombi, og dermed redusere risiko for blødning.

II. Kjemisk derivatisering og tverrbinding av FBD og SK

FBD polypeptider og fragmenter som utspenner aminoterminal region av FN ble derivatisert med N-suksinimidyl-3-(2-pyridyllditio)propionat (SPDP) - en heterobifunksjonell tverrbinder.

SPDP reagerer ved alkalisk pH med primære aminer ved å introdusere 2-pyridyl-disulfidgruper i proteinet. Ved målinger av absorbans ved 343 nm, som i dette pH området er spesifikk for tio-pyridingruppen som er frigjort etter reduksjon av modifisert FBD, ble antall tverrbundede grupper pr. FBD molekyl beregnet. Med plasmatisk 31 kD FBD molekyl med meget svakt reaksjonsutbytte ble oppnådd at den hadde en tendens til å utfelle under betingelsene med kjemisk modifikasjon. Videre eksperimenter ble gjennomført med rekombinant 12 kD FBD molekyl fremstilt ved plasmid pFN 196-2 (figur 10). Det ble funnet at tilnærmet 2 residier av tverrbinder ble introdusert pr. hvert 12. kD FBD molekyl.

SK, som mangler cysteinresidier ble derivatisert med 2-iminotiolan. Dette reagenset reagerer med primære aminer, ved å innføre en ladet avstandsende med en tiolgruppe. Antallet tiolgrupper som ble introdusert i SK molekylet ble bestemt ved anvendelse av Ellman's reagens. Under modifikasjonsbetingelsene ble det funnet at ca. 2 tiolgrupper ble innført pr. SK molekyl.

Ved å blande de to derivatiserte polypeptidene vil den frie tiolgruppen utveksles med 2-pyridyl-sulfidgruppen, og danne en disulfidbinding mellom de to proteinene og frigjøre pyridin-2-tiol. Konjugering ble funnet å være optimal ved 4 til 8 ganger molart overskudd av derivatisert FBD. Under disse betingelsene hadde idet vesentlige alle derivatisert SK molekylene reagert med FBD molekylet. Konjugeringsprosessen

ble analysert med SDS-PAGE og ved gelfiltrering på FPLC tilknyttet Superose 12. Kompleksdannelsen var fullstendig etter ca. 10 minutter, og dette gir en blanding av molkyler med variable FBD og SK innhold.

Kjemisk modifikasjon av tverrbindingsreaksjoner ble gjennomført i henhold til Runge et al., PNAS, USA, 84: 7659-7662 (1987).

Under optimaliserte betingelser som er etablert for kjemiske modifikasjonsreaksjoner, er det beregnede antallet pyridyldisulfid og tiolgrupper på hver av FBD og SK molekylene ca. 2. Konjugeringsblandingen som således ble dannet inneholdt for det meste det ønskede 1:1 hybridet.

Isolering av FBD-SK kompleks

Separering mellom konjugerte og frie SK og FBD molekyler ble gjennomført i to trinn som følger: I det første, ble gelfiltrering på Superose 6 gjennomført for å fjerne overskudd 12 kD FBD. I det andre, ble kromatografi på Heparin-Sepharose anvendt for å separere fri streptokinase fra konjugatet som bindes til harpiksen ved 25 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, og ble deretter eluert med 0,5 M NaCl i samme buffer. Kontaminering med fri SK som bestemt ved geleelektroforese utgjør mindre enn 5% av endelig preparering.

Funksjonell karakterisering av FBD-SK komplekset

Tverrbundet FBD-SK kompleks, renset ved Heparin-Sepharose kromatografi, ble sammenlignet med nativ SK ved å anvende følgende kriterier:

1. Kinetikk av plasminogenaktivering ved å anvende kromogenisk substrat S-2251 av plasmin (figur 33).

2. Fibrinolyttisk aktivitet ved å utnytte fibrin-plateanalyse

(figur 34), i henhold til Neville Marsch, Fibrinolysis, 1981.

3. Human plasmakoagellyse, ved å anvende ^{125}I-fibrinogen, for koageldannelse.

Resultatene indikerer at komplekset beholdt et nivå av plasminogenaktivatoraktivitet som kunne sammenlignes med den til SK. Fra figur 33 er de tilsynelatende K_m verdiene for plasminogensubstrat K_{plg}, var 3,1 x 10^{-6} M og 1,8 x 10^{-6} M for henholdsvis SK og FBD-SK kompleks, mens det katalyttiske hastighetskonstanten for komplekset K_{plg}, ble funnet å være lavere med en faktor 2 enn den til SK. Videre viser figur 34 ingen signifikant forskjell mellom lyseringssoner som blir dannet etter inkubering over natten av enten SK eller FBD-SK komplekset.

I tillegg ble ^{14}C-putrescin inkorporert inn i komplekser med marsvinlevertransglutaminase til ca. 40% av nivået inkorporert i 12 kD FBD (figur 35); sammenlign med tabell E, eksempel 11. DTT økt inkorporering i komplekset opptil 140%. Ingen inkorporering i SK ble observert. Disse funnene indikerer at FBD-SK konjugat har beholdt potensialet med å bli tverrbundet til trombi ved aktivert faktor XIII.

Foreliggende søknad har i tillegg sett for seg konstruering av et chimera FBD-SK polypeptid kodet av et rekombinant plasmid.

EKSEMPEL 13

In vivo merking av trombi med ^{111}In-merket 12 kD og 18,5 kD-FBD i rotte rustfrie-stålcoilmodell

Modellen som blir benyttet er idet vesentlige den som er beskrevet i eksempel 7. Rekombinant 12 kD-, 18,5 kD- og 31 kD-FBD polypeptidfragmenter ble merket med ^{111}In med DTPA metoden (eksempel 8). De merkede materialene (spesifikk aktivitet tilnærmet 5 x 10^6 cpm/µg) ble administrert

intravenøst (5 x 10^6 cpm/rotte) inn i coil-bærende rotter (eksempel 7) 5 timer etter innføring av coilene. Coilbærende trombi ble fjernet og talt 24 timer etter adminstrering av markøren. Figur 31 presenterer resultatene av spesifikk radioaktivitet i koageler og blod, og figur 32 presenterer respektive trombus til blodforhold. Som det fremgår, ble høye trombusspesifikk radioaktivitetsverdier oppnådd med tre forbindelser. Høyere verdier ble funnet i trombi til 31 kD FBD gruppen, enn de i 12 kD- og 18,5 kD-FBD fragmentene. Trombus/blodforholdene var imidlertid høyere for 12 kD og 18,5 kD-FBD fragmentene, og dette skyldes lavere blodnivåer, sammenlignet med 31 kD-FBD. Dette kan skyldes det smalere spesifisitetsspektrum og aktiviteter til de kortere fragmentene ved å sammenligne med 31 kD polypeptidet (eksempel 9, tabell C).

EKSEMPEL 14

Anvendelse av FBD polypeptider i sårhelning

I det tidlige forløp av sårhelning beveger epitelum seg over et gellag av fibrin og fibronektin, før permanent basismembrankomponenter, slik som laminin og type IV kollagen blir omdannet. Den begynnende plasma-avledede gelen, som inneholder både fibrin og fibronektin, blir raskt invadert av fibroblaster og tjener som hemostatiske og adhesive funksjoner og fremskaffer en midlertidig matrisk for cellebevegelse og et reservoar med kjemotaktiske og vekstfaktorer ("sårhormoner"). Fibrinekstravaskulær gel som raskt danner et gitter, inkorporerer fibronektin. Det er også blitt vist at fibroblaster in vivo tilknyttes fibringittere primært via fibronektin (Grinnell, F. et al. (1980) Cell 19 517-525; Colvin, R.B. et al., (1979) Lab Invest. 41 464-473; Knox, P. et al., (1986), J. Cell Biol. 102 2318-2323). Det er derfor antatt at de begynnende prosessene ved sårhelning krever både fibrinbinding og cellebindende domener av fibronektin. Siden tilknytning av fibronektin til fibrin forekommer antagelig via transglutaminase - katalysert transamidering av Gln-3 av fibronektin til fibrinlysinresidier, bør et hvert fibrinbin-

dende domenepolypeptid som inneholder en intakt struktur av området som omgir Gln-3 ha evnen til å virke i dette systemet. 12 kD og 18,5 kD polypeptidfragmentene av FBD i foreliggende søknad kan også bli anvendt sammen med et CBD polypeptid for å øke sårhelning. Legg merke til at rekombinant CBD polypeptid kan bli anvendt, slik som r33 kD og r40 kD beskrevet i PCT patentsøknad nr. WO 90/07577.

For å fastslå potensialet til FBD av human fibronektin i å bedre sårhelning, ble det undersøkt i en cellespredningsanalyse. I denne analysen får fibroblaster anledning til å spre seg på dekkglass som et CBD polypeptid har blitt absorbert i fravær eller nærvær av et FBD polypeptid. FBD domenepolypeptid blir således undersøkt for sin evne til å virke som en forbedrer at cellulær fokal adhesjon, som et ko-substrat med fibronektincellebindende domene. Når det blir anvendt i kombinasjon med 75 kD cellebindende domene (CBD) avledet fra bovint plasmafibronektin, ble plasma-avledet FBD, p31 kD, og rekombinant FBD, r31 kD, begge av human opprinnelse, begge funnet å ikke kunne skilles fra hverandre når det gjelder deres evne til å fremme fokal adhesjon av NRK fibroblaster. Begge humane proteindomenene var mye mer effektiv enn korresponderende fragment fra bovin opprinnelse når det blir anvendt i samme konsentrasjoner, dvs. 100 µl av 10 µg/ml av en 1:1 blanding av FBD og CBD proteiner (se under for eksperimentelle detaljer). Forskjellen mellom effektene av 75 kD CBD alene og i kombinasjon med FBD var slående. Interferensrefleksjonsmikroskopi (IRM) av cellespredninger på 75 kD CBD alene, viste bare amorfe "grå" lapper og flekker (som fra elektronmikroskopi - EM - av ventralmembrane replikater er kjent å være assosiert med klatrin-baserte strukturer), men inkorporering av FBD (rekombinant eller plasma-avledet) som ko-substrat induserte dannelse av klar-definerte fokale addisjonsstrukturer, visualisert i IRM som tette mørke streker (tetthet i farge viser nærmere kontakt av ventraloverflate til substratet). IRM/EM korrelasjoner viste at

disse tette, ordnede addisjonene tilsvarer avslutningene til cytosjelettstressfibre.

For videre undersøkelser av kombinerte effekter av FBD og CBD på sårhelning ble 45 kD polypeptid (12 kD FBD - 33 kD CBD) og 64 kD polypeptid (31 kD FBD - 33 kD CBD) konstruert (henholdsvis figur 12 og 25). Tilsvarende hybridpolypeptider kan man forestille seg ved å anvende 12 kD eller 18,5 kD FBD i steden for 31 kD FBD og ved å anvende 40 kD CBD polypeptid i steden for 33 kD CBD polypeptid.

Eksperimentelle detaljer

Både p75 kD CBD (fra bovin opprinnelse) og 31 kD FBD (fra rekombinant human opprinnelse) polypeptider ved en konsentrasjon på 10 µg/ml i PBS, totalvolum 100 µl, fikk anledning til å absorbere i en fuktig atmosfære i 1 time ved romtemperatur til 13 mm dekkglass (Chance Propper Ltd. Warley, UK), som hadde blitt behandlet over natten med konsentrert H_2SO_4 og skylt grundig med destillert vann. Etter vasking med PBS pH 7,1 ble dekkglassene inkubert med ovalbumin (1 mg/ml i PBS, Sigma Chemical Co.) i 10 minutter ved romtemperatur for å redusere ikke-spesifikk tilknytning. Spredningsanalysen blir gjennomført med NRK celler, subdyrket i 18 timer før de blir adskilt med 0,1 mg/ml TPCK-trypsin (Sigma Chemical Co.) og suspendert på nytt i Ca^{2+}-inneholdende Eagle's minimumessensiell medium (EMEM) i 20 minutter ved 37°C. Disse cellene ble oppnådd i en enkel cellesuspensjon ved forsiktig suging inni en 5 ml sprøyte utstyrt med en hypodermisk nål, etterfulgt av 3 vask med EMEM som inneholder 2% v/v ovalbumin. Spredningen av cellene ble registrert ved suspendering på nytt av de vaskede NRK cellene på dekkglasset med proteinsubstratet ved en tetthet på 1 x 10^4 celler/cm². De ble undersøkt ved interferensrefleksjon og fasekontrastmikroskopi, ved å anvende et Leitz Ortholux II mikroskop utstyrt med x50/1,0 og x100/1,32 PHACO RK objektiver og fotografier ble tatt (Kodak technical Pan 2415 35 mm film). Etter 2 timer ble de levende cellene fiksert med 2,5% v/v

glutaraldehyd (TAAB Labs, Reading, Berks, U.K.) i 0,1 M natriumkakodylatbuffer og de fikserte cellene ble undersøkt med EM.

EKSEMPEL 15

Anvendelse av ^{111}In-DTPA modifiserte FBD proteiner med høy radiokjemisk renhet for å oppnå høye trombus til blodforhold i en rottemodell

1. Modifikasjon og radiomerking av DTPA-modifiserte FBD proteiner

Metodologien ved DTPA modifikasjon og radiomerking av DTPA modifiserte FBD proteiner som beskrevet i eksempel 8 har blitt forbedret. Disse forbedringene har muliggjort at man oppnår høye trombus til blodforhold i coilmodellen i rotter.

1.1. **DTPA-modifikasjon:** Alle tre rekombinante molekyler, r31 kD, r18,5 kD og r12 kD ble modifisert med et 20 gangers overskudd DTPA i 0,1 M HEPES buffer pH 7,0, og overskudd DTPA ble fjernet ved gelfiltrering.

1.2. **Radiomerking:** En av de introduserte endringene var å gjennomføre radiomerking med $^{111}InCl_3$ ved lav pH (0,2 M citratbuffer, pH 5,7) for å redusere til et minimum mengden radiokolloider. En ytterligere forholdsregel ble tatt for å sikre fjerning av kontaminerende tungmetallioner som kan fortrenge chelatert ^{111}In fra DTPA modifisert protein ved å bytte buffere med radiomerket FBD oppløsning med Chelex-100 behandlede buffere.

2. Protokoll for modifikasjon og radiomerking av FBD proteiner

Den detaljerte, forbedrede fremgangsmåten for DTPA modifikasjon og radiomerking av r31 kD, r18,5 kD og r12 kD polypeptidfragmenter av FBD er gitt under.

2.1. **Avsalting:** Proteiner (alle i 0,5 M NaCl, inkludert millimolar konsentrasjoner av EDTA og andre proteasehemmere) ble avsaltet og overført til HEPES buffer (0,1 M pH 7). 31 kD FBD (27 ml, 0,6 mg/ml) ble avsaltet med dialyse, mens både 18,5 kD FBD (5 ml, 8,7 mg/ml) og 12 kD FBD (5 ml, 5,6 mg/ml) ble avsaltet på PD-10 gelfiltreringskolonner.

2.2. **DTPA modifikasjon:** Dette ble gjennomført med et 20 gangers overskudd av DTPA anhydrid i 1 time ved romtemperatur i et volum på 27 ml i det tilfelle med 31 kD FBD og 7 ml i begge tilfeller når det gjelder 12 kD og 18,5 kD FBD proteiner. Prøver (100 µl) av modifikasjonsblandingen ble satt tilside for bestemmelse av antall DTPA residier som hadde blitt inkorporert i proteinene og fri DTPA ble fjernet fra resten av materialet ved gelfiltrering på 2,6 x 60 cm Sephadex G-25 kolonne, som hadde blitt for-ekvilibrert og utviklet med HEPES buffer. Proteininneholdende fraksjoner (30 ml) ble oppsamlet og proteinkonsentrasjoner som ble oppnådd var 0,35 mg/ml, 0,8 mg/ml og 0,9 mg/ml for r31 kD, r18,5 kD og r12 kD FBD proteiner. Grad av modifikasjon, som ble bestemt ved TLC på silikagel (fremkalt i 85% metanol), ble funnet å være henholdsvis 1,1, 0,8 og 1,6 for FBD proteinene over. DTPA-modifiserte FBD proteiner ble lagret frosset ved-20°C og tinte prøver ga reproduserbare resultater ved radiomerking med ^{111}In.

2.3. **Radiomerking:** Merkingen ble gjennomført med $^{111}InCl_3$, som hadde blitt bragt til 0,2 M natriumcitrat, pH 5,7, ved tilsetning av 125 µl 1 M natriumcitrat pH 5,7 til 500 µl bærerfri $^{111}InCl_3$ forrådsoppløsning (^{111}In: 3,2 mCi/ml). Reaksjonsblandingen for radiomerking som inneholder (slutt-konsentrasjoner): FBD protein 0,2 µg/µl, HEPES 60 mM, HCl 10 mM, natriumcitrat 0,2 M og ^{111}IN 0,8 µCi/µl. Reaksjonen fikk anledning til å foregå i 1 time ved romtemperatur. Radio-kjemisk renhet ble anlysert ved TLC på silikagel (fremkalt i 85% metanol) og for alle polypeptidfragmentene av FBD var den i området fra 91-95%. Spesifikk aktivitet av radiomerket FBD

proteiner er således ca. 3,6 μCi/μg (~8 x 10^6 cpm/μg). Siden tunge metallioner, potensielt tilstede som sporkontaminanter i bufferne som ble anvendt under radiomerkingen, kan fortrenge ^{111}In som er bundet til DTPA-modifiserte proteiner, ble de radiomerkede FBD proteinene sendt gjennom et sjikt med 10 ml Sephadex G-25, som hadde blitt forhånds-ekvilibrert, og som ble utviklet med en BSA-inneholdende BBS buffer, som hadde blitt forbehandlet med Chelex-100 (for å fjerne metallionkontaminanter).

3. Biologisk aktivitet

Den biologiske aktiviteten ble undersøkt med in vitro ved binding av ^{111}In-merket DTPA-modifisert FBD til forlagede koageler og in vivo i stålcoil-indusert venøs trombimodell i rotter.

3.1. Binding til forlagede koageler

Dette ble gjennomført nøyaktig som beskrevet i eksempel 6 for iodiert FBD. Spesifikk aktivitet av tre ^{111}In-merkede DTPA-modifiserte FBD proteiner var 6 x 10^6 cpm/μg protein. Resultater av eksperimentene er gitt i tabell F (andre kolonne).

3.2. Venøs trombi i rotter

Modellen som blir anvendt (coil-indusert venøs trombi i rotter) er blitt beskrevet i eksempel 7. I eksperimentene i dette eksemplet besto hver gruppe av 7 rotter som 5 x 10^6 cpm (med en spesifikk aktivitet på 6 x 10^6 cpm/μg protein) av ^{111}In merket DTPA modifisert FBD protein ble injisert. Resultater av disse eksperimentene er gitt i tabell F (3 siste kolonner).

Tabell F: Binding FBD proteintrombi in vitro og in vivo

	In vitro koagelanalyse	Venøs trombi i rotter		
		Spesifikk radioaktivitet (cpm/g)		Trombus til blod forhold
FBD protein	Prosent av innførte tellinger[a]	Trombus	Blod	
r12 kD	24%	24264±2700	375±77	78,2±17,3
r18,5 kD	26%	28548±5028	289±41	98,3±13,3
r31 kD	24%	19796±4144	1198±83	15,6±2,4

[a] Tilnærmet 50% av disse verdiene blir oppnådd i nærvær av jodacetat, en hemmer av transglutaminase.

REFERANSER

1. Uehara, A., et al., J. Nuclear Med. 29: 1264-1267 (1988).

2. Zoghbi, S.S., et al., Invest, Radio. 20: 198-202 (1985).

3. Kakkar, V.V., et al., Lancet 1: 540-542 (1970).

4. Knight, L.C., Nuclear Med. Commun. 9: 849-857 (1988).

5. Knight, L.C. Nuclear Med. Commun. 9: 823-829 (1988).

6. Som. P., et al., J. Nuc. Med. 27: 1315-1320 (-1986).

7. Palabrica, T.M., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 1036-40 (1989).

8. Akiyama, S.K. og Yamada, K.M., Adv. Enzymol. 57: 1-57 (1987).

9. Pierschbacher, M.D., et al., J. Biol. Chem. 257: 9593-9597 (1982).

10. Pande, H. og Shively, J.E., Arch. Biochem. Biophys. 213: 258-265 (1982).

11. Hayashi, M. og Yamada, K.M., J. Biol. Chem. 258: 3332-3340 (1983).

12. Sekiguchi, K. og Hakomori, S.-I., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2661-2665 (1980).

13. Ruoslahti, E., et al., J. Biol. Chem. 256: 7277-7281 (1981).

14. Owens, R.J. og Baralle, F.E., EMBO J. 5:2825-2830 (1988).

15. Obara, M., et al., FEBS Letters 213: 261-264 (-1987).

16. Obara, M., et al., Cell 53: 699 (1988).

17. Ichihara-Tanaka, K., et al., J. Biol. Chem. 265: 401-407 (1990).

18. Mandel, et al., Principal and Practice of Infectious Disease 2: 1531-1552 (1979).

19. Proctor, R.A., et al., J. Biol. Chem. 255: 1181-1188 (1980).

20. Eldor, A., et al., Thrombosis and Haemostatis 56(3): 333-339 (1986).

21. Fritzberg, A.R., Nucl. Med. 26: 7-12 (1987).

22. Young, R.A. og Davis, R.W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1194-1198 (1983).

23. Hugh, T., et al., In DNA Cloning: A Practical Approach (D. Glover, ed.), IRL Press, Oxford (1984).

24. Vogel, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 3180-3184 (1972).

25. Bagly, D., et al., Methods in Enzymol. 45: 669-678 (1976).

26. Wagner and Hynes, J. Biol. Chem. 254: 6746-6754 (1979).

27. McDonagh, R.P., et al., FEBS Lett. 127: 174-178 (1981).

28. Mosher, et al., J. Biol. Chem. 255: 1181-1188 (1980).

29. Russel, P.B., et al., J. Clin. Micro. 25: 1083-1087 (1987).

30. Bolton, A.E. og Hunter, W.M., Biochem. J. 133: 529 (1973).

31. Obara, et al., Cell 53: 649-657 (1988).

32. Fritzberg, A.R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 4025-4029 (1988).

33. Knight, L.C., et al., Radiology 173: 163-169 (-1989).

34. Wasser, M.N.J.M., et al., Blood 74: 708-714 (-1989).

35. Burger, J.J., et al., Methods in Enzymology 112: 43-56 (1985).

36. Yamamoto, K., et al., Eur. J. Nucl. Med. 14: 60-64 (1988).

37. Peterson, et al., i Fibronectin, utgitt av Moshen, Academic Press, USA, 1989: side 1-24, særlig figur 2 på side 5.

Patentkrav

1.
Avbildingsmiddel, karakterisert ved at det omfatter et polypeptid merket med en avbildbar markør der polypeptidet har en aminosyresekvens som i det vesentlige er identisk med en sekvens som er tilstede i det N-terminale fibrinbindingsdomene av naturlig forekommende humant fibronektin, som er istand til å binde til fibrin, som har en molekylvekt over 6 kD, men mindre enn 20 kD, og som har aminosyresekvensen gln-ala-gln-gln eller met-gln-ala-gln-gln i N-terminalen til polypeptidet.

2.
Avbildingsmiddel ifølge krav 1, karakterisert ved at polypeptidet har en molekylvekt på 12 kD eller over, eller 18,5 kD eller under.

3.
Middel ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at markøren er en radioaktiv isotop, et element som er ugjennomsiktig for røntgenstråler, eller et paramagnetisk ion, eller hvori markøren er en radioaktive isotop fortrinnsvis selektert fra gruppen bestående av indium-111, teknetium-99m, jod-123, jod-125, jod-131, krypton-81m, xenon-133 og gallium-67.

4.
Middel ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at polypeptidet er et 12 kD-polypeptid eller et 18,5 kD-polypeptid, hvori aminosyresekvensen i det vesentlige er identisk med en sekvens tilstede i det N-terminale fibrinbindingsdomenet i humant fibronektin, som er aminosyresekvensen fra aminosyrene 1-109 eller 1-154, respektivt, som vist i figur 2.

5.

Renset polypeptid istand til å binde fibrin, i det vesentlige fri for andre substanser av human opprinnelse, k a r a k t e r i s e r t v e d at den har en aminosyresekvens som i det vesentlige er tilstede i det aminoterminale fibrinbindingsdomene i det naturlig forekommende humane fibronektinet, som har en molekylvekt over 6 kD, men mindre enn 20 kD, og som har aminosyresekvensen gln-ala-gln-gln eller met-gln-ala-gln-gln N-terminalt i polypeptidet.

6.

Polypeptid ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at polypeptidet er et 12 kD-polypeptid eller et 18,5 kD-polypeptid, som har den respektive aminosyresekvensen til aminosyrene 1-109 eller 1-154 som vist i figur 2, og som har aminosyresekvensen gln-ala-gln-gln eller met-gln-ala-gln-gln N-terminalt i polypeptidet.

7.

Anvendelse av polypeptidet ifølge krav 5 eller 6, for fremstilling av en diagnostisk sammensetning for avbildning av en fibrininneholdende substans ved å bringe i kontakt den fibrininneholdende substansen under betingelser slik at polypeptidet binder til den fibrininneholdende substansen.

8.

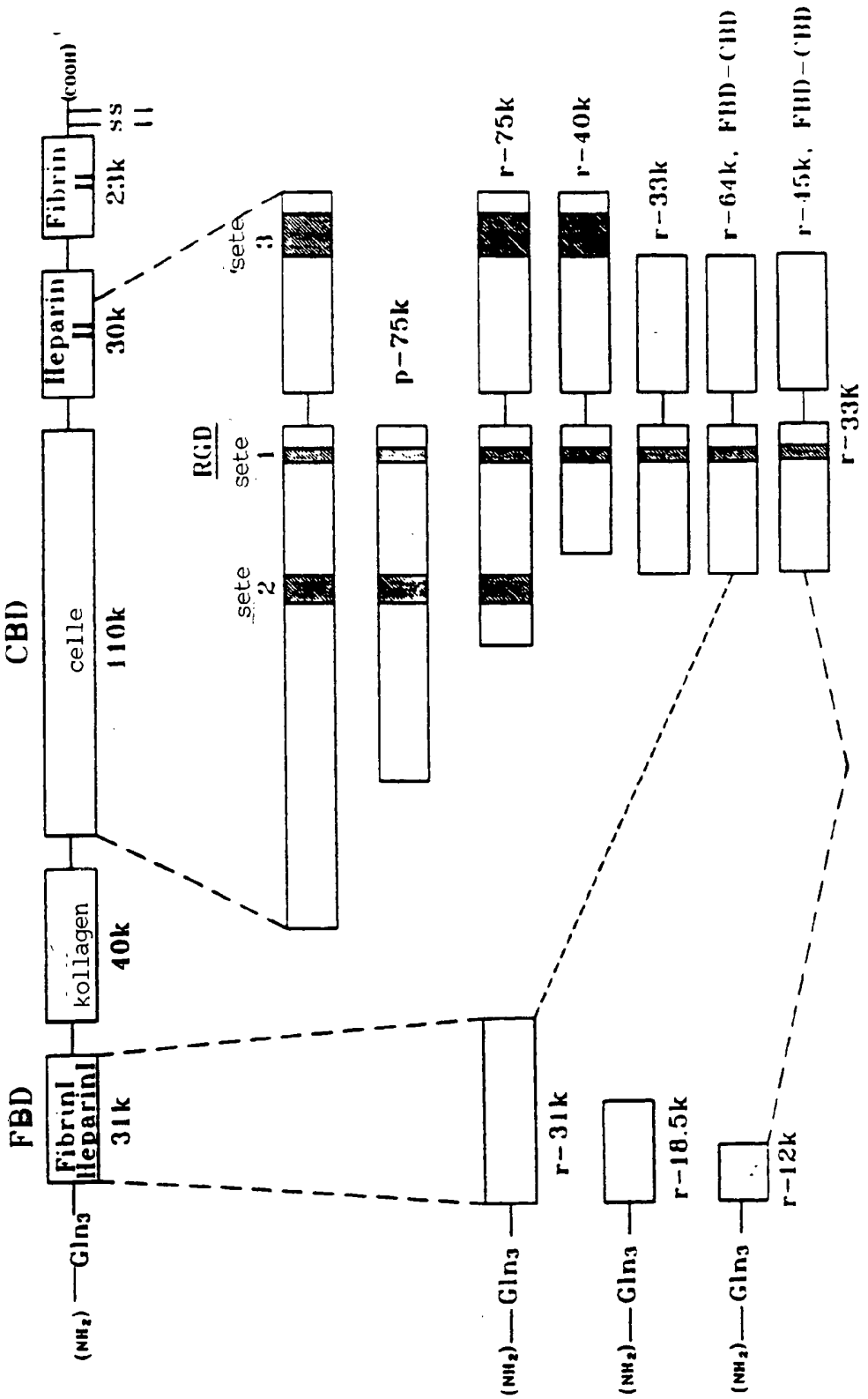
Anvendelse av polypeptid ifølge krav 5 eller 6, for fremstilling av en sammensetning for å inhibere blodproppdannelse, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte sammensetning omfatter en mengde av polypeptidet som er effektiv i å inhibere blodproppdannelse, og hvori polypeptidet eventuelt er bundet til et trombolytisk middel.

9.

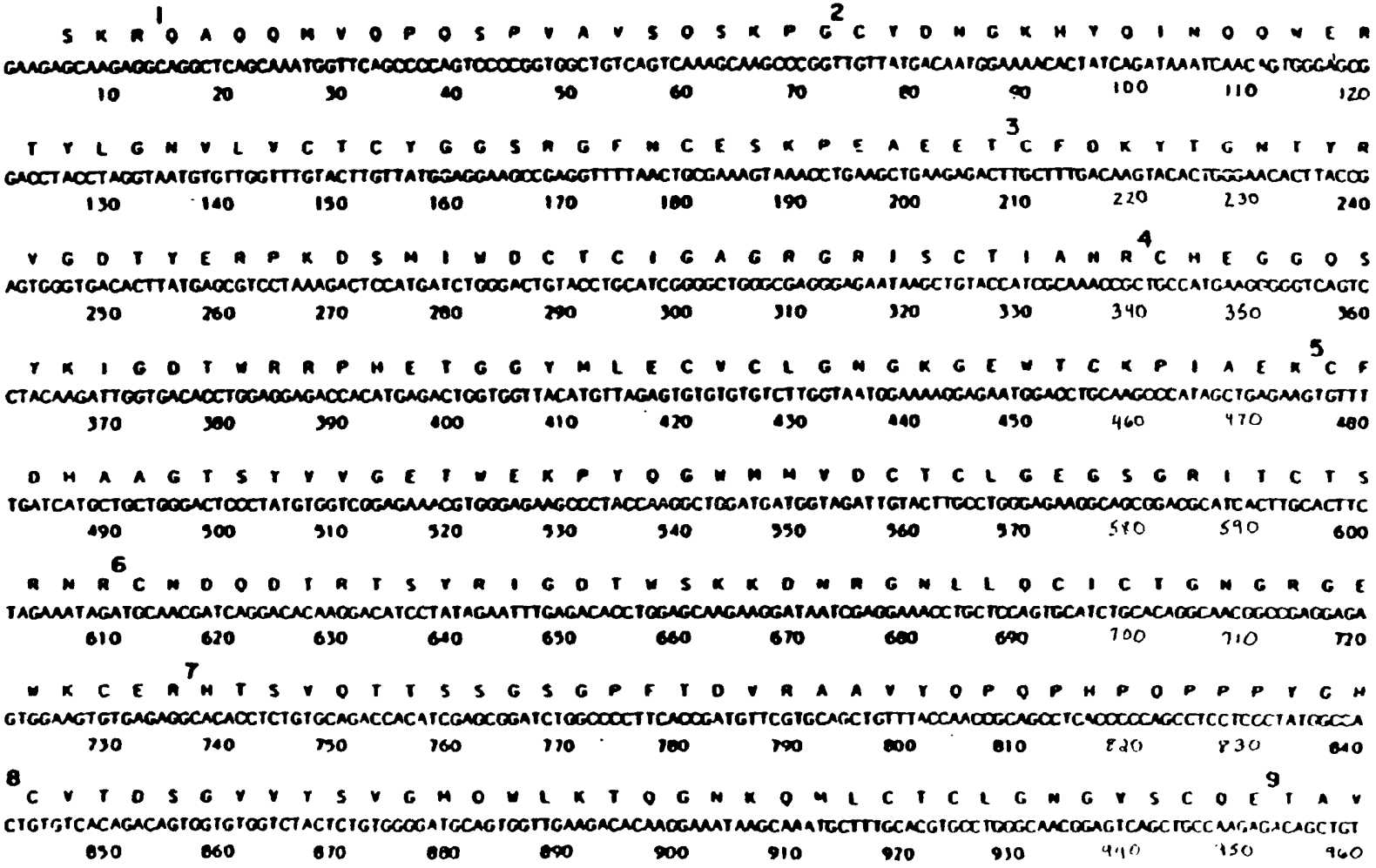
Anvendelse ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at det trombolytiske midlet er selektert fra gruppen bestående av vevsplasminogenaktivator (TPA), urokinase,

streptokinase, prourokinase, Anisoylated Plasminogen-Streptokinase Activator Complex (Eminase™), TPA-analoger og en protease.

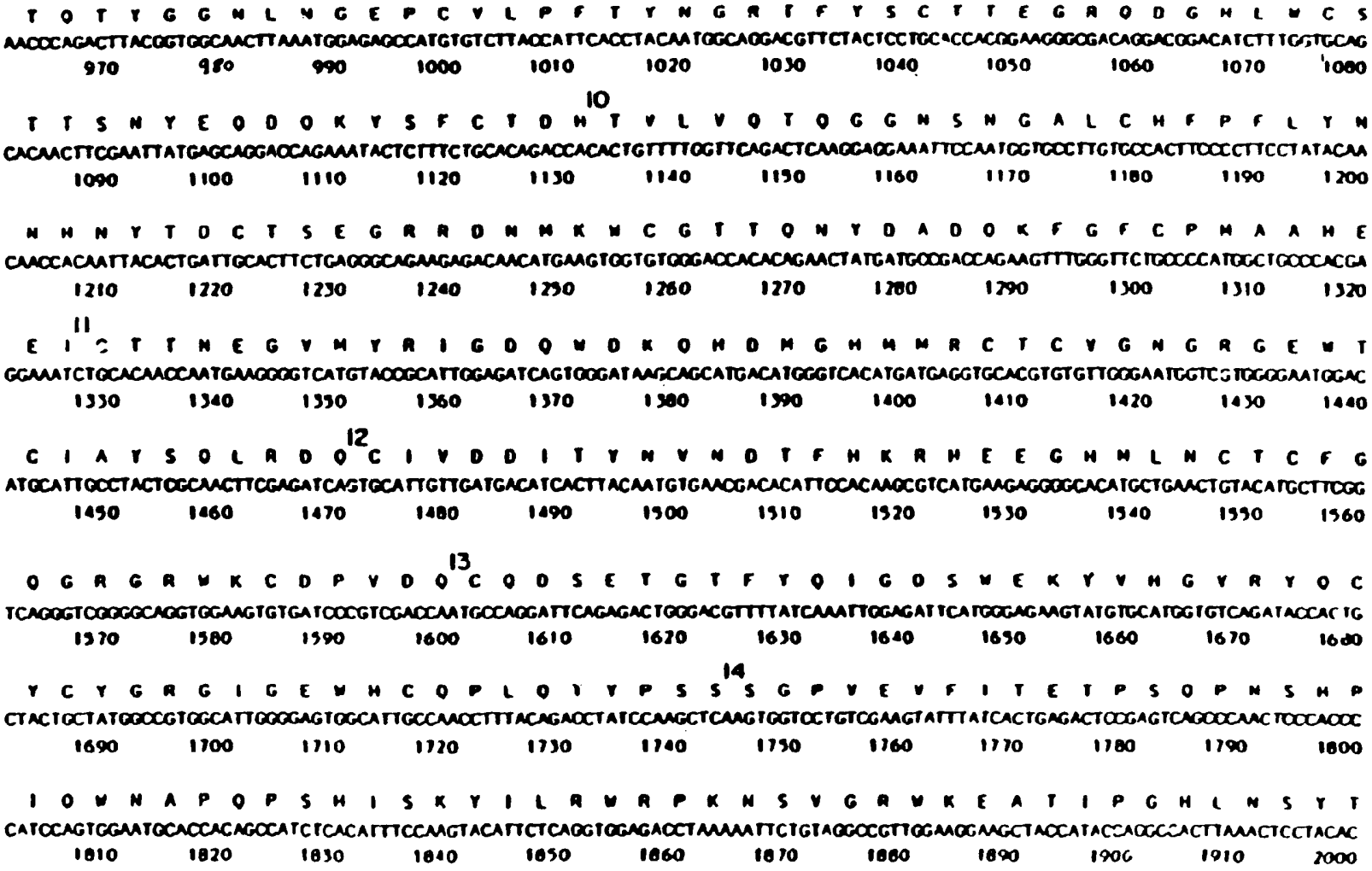
Figur 1


FBD
Fibrinl
Heparinl
31k
kollagen
40k
CBD
celle
110k
Heparin
II
30k
Fibrin
II
23k
ss
II
(COOH)
RGD
sete
1
sete
2
sete
3
p-75k
r-75k
r-40k
r-33k
r-64k, FBD-CBD
r-45k, FBD-CBD
r-33K
r-31k
r-18.5k
r-12k
(NH2)—Gln3

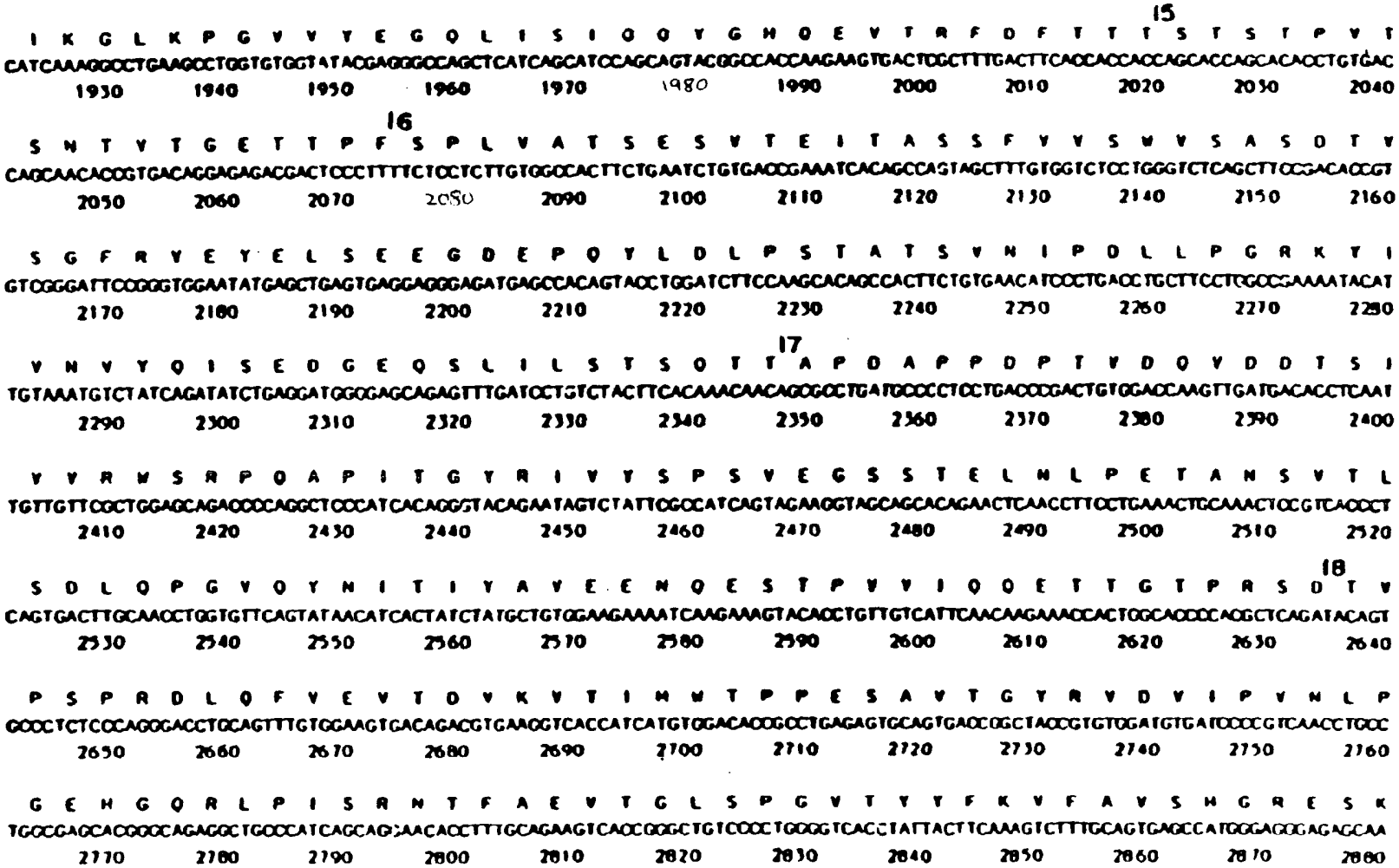
Figur 2A


Første sekvens nr. =
1
2
3
4
5
6
7
8
9
S K R Q A Q Q M V Q P Q S P V A V S Q S K P G C Y D N G K H Y Q I N Q Q W E R
GAAGAGCAAGAGGCAGCCTCAGCAAATGGTTCAGCCCCAGTCCCCGGTGGCTGTCAGTCAAAGCAAGCCCGGTTGTTATGACAATGGAAAACACTATCAGATAAATCAACAGTGGGAGCG
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
T Y L G N V L V C T C Y G G S R G F N C E S K P E A E E T C F Q K Y T G N I Y R
GACCTACCTAGGTAATGTGTTGGTTTGTACTTGTTATGGAGGAAGCCGAGGTTTTAACTGCGAAAGTAAACCTGAAGCTGAAGAGACTTGCTTTCAACAAGTACACTGGGAACACTTACCG
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
V G D T Y E R P K D S M I W D C T C I G A G R G R I S C T I A N R C H E G G Q S
AGTGGGTGACACTTATGAACGTCCTAAAGACTCCATGATCTGGGACTGTACCTGCATCGGGGCTGGGCGAGGGAGAATAAGCTGTACCATGCAAACGGCTGCCATGAAGGGGGTCAGTC
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
Y K I G D T W R R P H E T G G Y M L E C V C L G N G K G E W T C K P I A E R C F
CTACAAGATTGGTGACACCTGGAGGAGACCACATGAGACTGGTGGTTACATGTTAGAGTGTGTGTGTCTTGGTAATGGAAAAGGAGAATGGACCTGCAAGCCCATAGCTGAGAAGTGTTT
370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
D H A A G T S Y V V G E T W E K P Y Q G W M M V D C T C L G E G S G R I T C T S
TGATCATGCTGCTGGGACTCCCTATGTGGTCGGAGAAACGTGGGAGAAGCCCTACCAAGGCTGGATGATGGTAGATTGTACTTGCCTGGGAGAAGGCAGCGGACGCATCACTTGCACTTC
490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
R N R C N D Q D T R T S Y R I G D T W S K K D N R G N L L Q C I C T G N G R G E
TAGAAATAGATGCAACGATCAGGACACAAGACATCCTATAGAATTTGAGACAGCTGGAGCAAGAAGGATAATCGAAGGAAACCTGCTCCAGTGCATCTGCACAGGCAACGGCGGACGAGAGA
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
W K C E R H T S V Q T T S S G S G P F T D V R A A V Y Q P Q P H P Q P P P Y G H
GTGGAAGTGTGAGAGGCACACCTCTGTGCAGACCACATCGAGCGGATCTGGCCCCTTCACCGATGTTCGTGCAGCTGTTTACCAACCGCAGCCTCACCCCCAGCCTCCTCCCTATGGCCA
730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
C V T D S G V V Y S V G M Q W L K T Q G N K Q M L C T C L G N G V S C Q E T A V
CTGTGTCACAGACAGTGGTGTGGTCTACTCTGTGGGGATGCAGTGGTTGAAGACACAAGGAAATAAGCAAATGCTTTGCACGTGCCTGGGCAACGGAGTCAGCTGCCAAGAGACAGCTGT
850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960

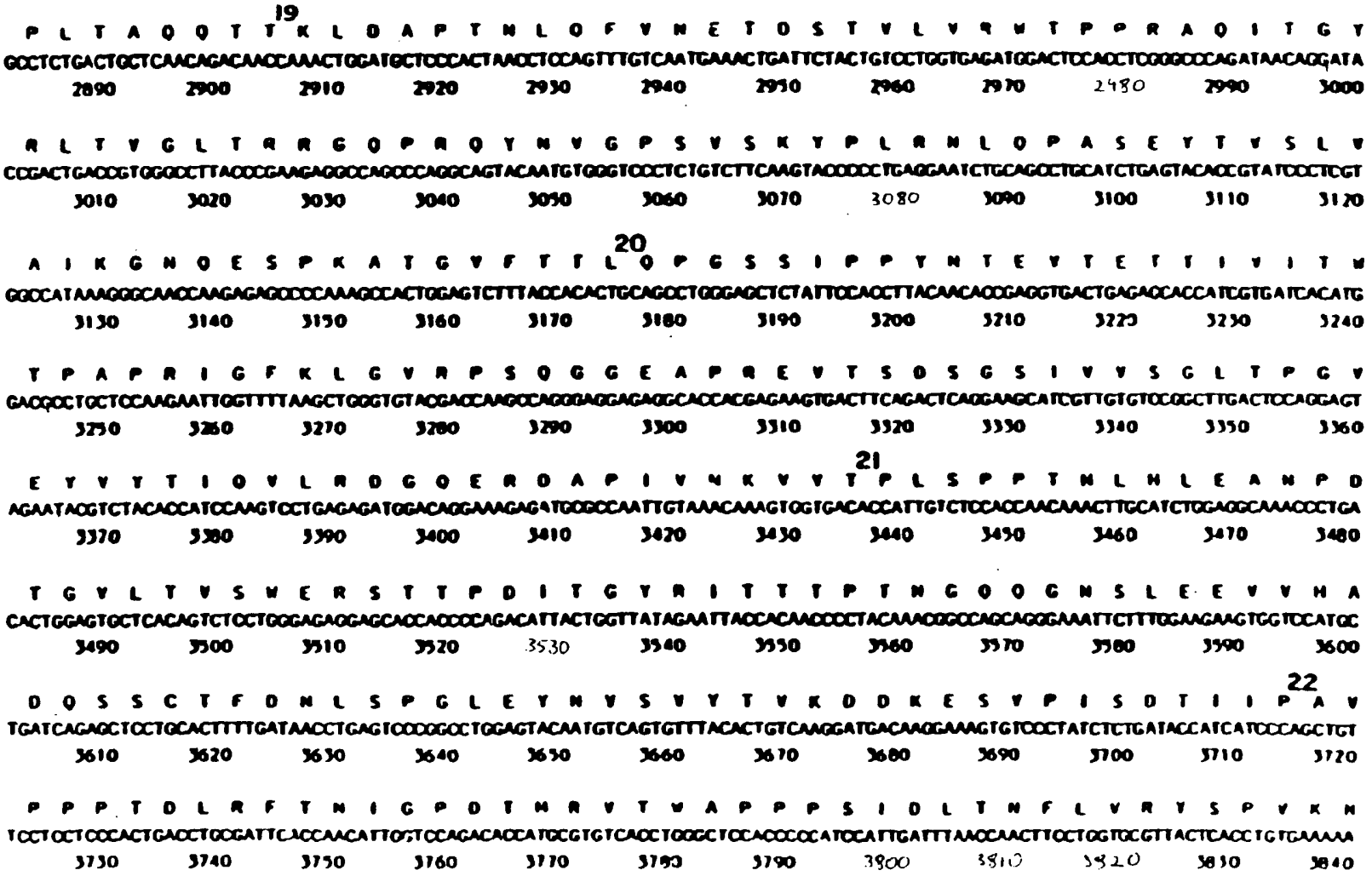
Figur 2B


T Q T Y G G N L N G E P C V L P F T Y N G R T F Y S C T T E G R Q D G H L W C S
AACCCAGACTTACGGTGGCAACTTAAATGGAGAGCCATGTGTCTTACCATTCACCTACAATGGCAGGACGTTCTACTCCTGCACCACGGAAGGGCGACAGGACGGACATCTTTGGTGCAG
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
10
T T S N Y E Q D Q K Y S F C T D H T V L V Q T Q G G N S N G A L C H F P F L Y N
CACAACTTCGAATTATGAGCAGGACCAGAAATACTCTTTCTGCACAGACCACACTGTTTTGGTTCAGACTCAAGGAGGAAATTCCAATGGTGCCTTGTGCCACTTCCCCTTCCTATACAA
1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
N H N Y T D C T S E G R R D N M K W C G T T Q N Y D A D Q K F G F C P M A A H E
CAACCACAATTACACTGATTGCACTTCTGAGGGCAGAAGAGACAACATGAAGTGGTGTGGGACCACACAGAACTATGATGCCGACCAGAAGTTTGGGTTCTGCCCCATGGCTGCCCACGA
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
11
E I C T T N E G V M Y R I G D Q W D K Q H D M G H M M R C T C V G N G R G E W T
GGAAATCTGCACAACCAATGAAGGGGTCATGTACCGCATTGGAGATCAGTGGGATAAGCAGCATGACATGGGTCACATGATGAGGTGCACGTGTGTTGGGAATGGTCGTGGGGAATGGAC
1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
12
C I A Y S Q L R D Q C I V D D I T Y N V N D T F H K R H E E G H M L N C T C F G
ATGCATTGCCTACTCGCAACTTCGAGATCAGTGCATTGTTGATGACATCACTTACAATGTGAACGACACATTCCACAAGCGTCATGAAGAGGGGCACATGCTGAACTGTACATGCTTCGG
1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
13
Q G R G R W K C D P V D Q C Q D S E T G T F Y Q I G D S W E K Y V H G V R Y Q C
TCAGGGTCGGGGCAGGTGGAAGTGTGATCCCGTCGACCAATGCCAGGATTCAGAGACTGGGACGTTTTATCAAATTGGAGATTCATGGGAGAAGTATGTGCATGGTGTCAGATACCAC TG
1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
14
Y C Y G R G I G E W H C Q P L Q S Y P S S S G P V E V F I T E T P S Q P N S H P
CTACTGCTATGGCCGTGGCATTGGGGAGTGGCATTGCCAACCTTTACAGACCTATCCAAGCTCAAGTGGTCCTGTCGAAGTATTTATCACTGAGACTCCGAGTCAGCCCAACTCCCACCC
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
I Q W N A P Q P S H I S K Y I L R W R P K N S V G R W K E A T I P G H L N S Y T
CATCCAGTGGAATGCACCACAGCCATCTCACATTTCCAAGTACATTCTCAGGTGGAGACCTAAAAATTCTGTAGGCCGTTGGAAGGAAGCTACCATACCAGGCCACTTAAACTCCTACAC
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 2000

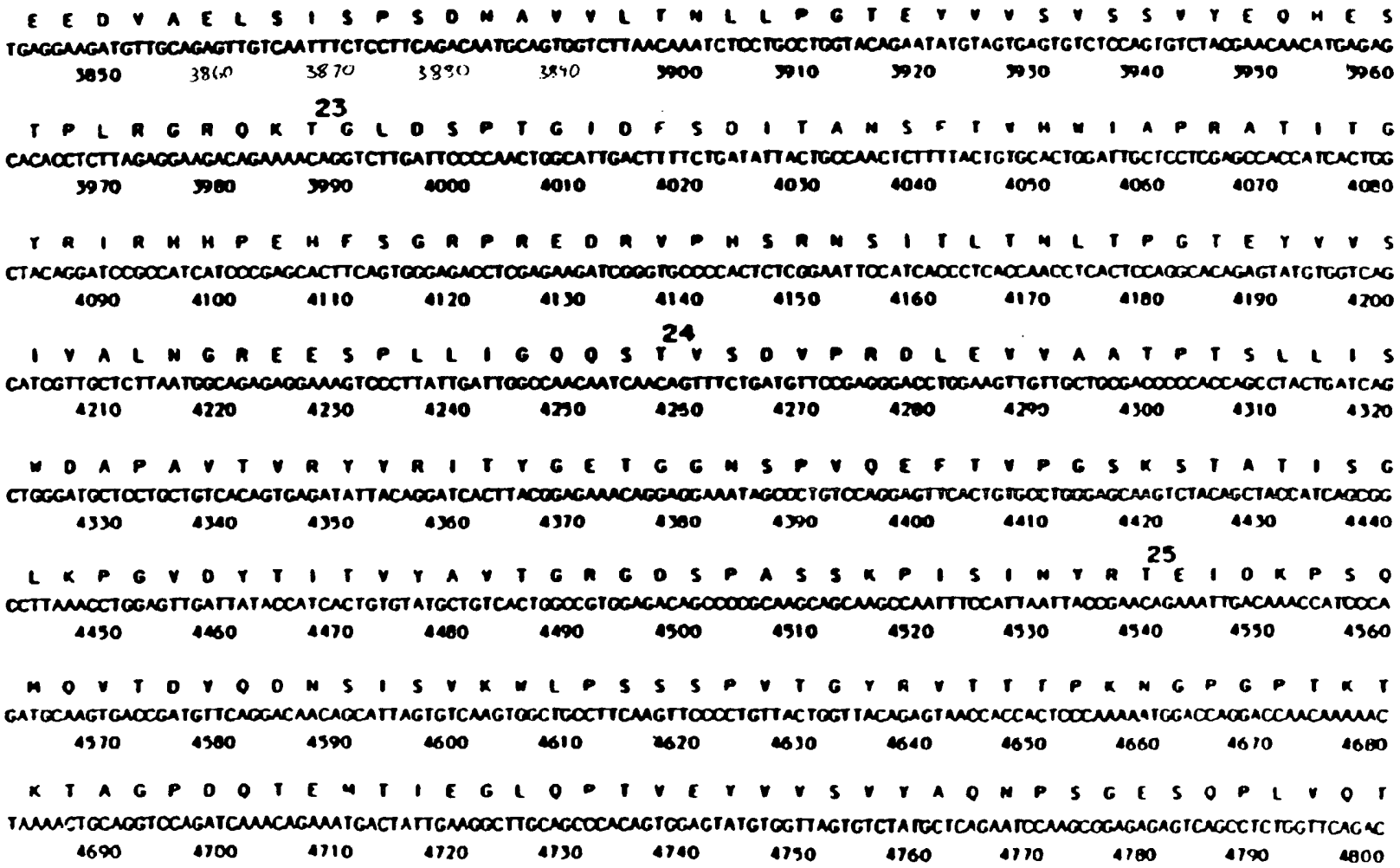
Figur 2C


15
16
17
18
1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040
2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280
2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520
2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640
2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760
2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880

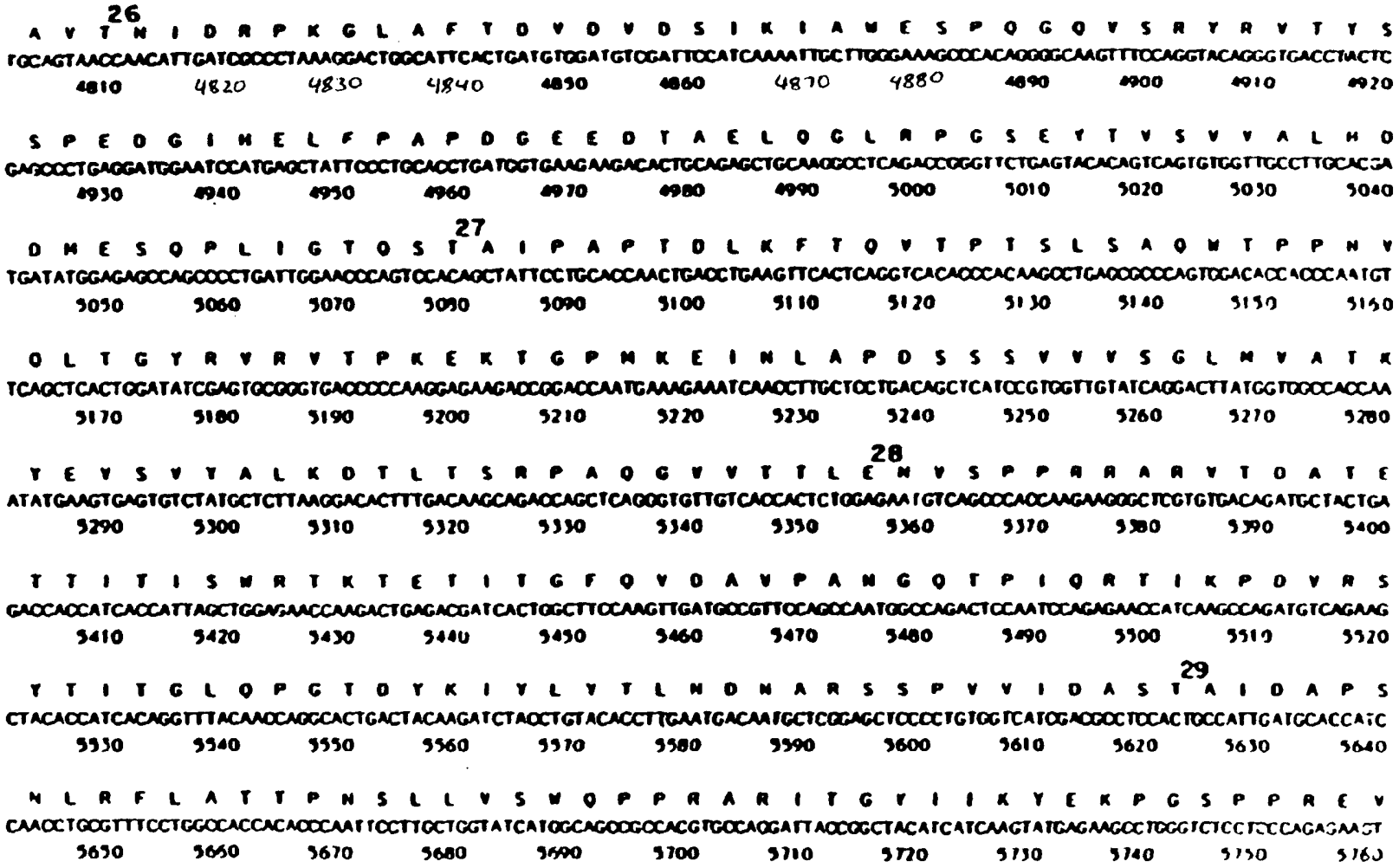
Figur 2D


19
P L T A Q Q T T K L D A P T N L Q F V N E T D S T V L V R W T P P R A Q I T G Y
GCCTCTGACTGCTCAACAGACAACCAAACTGGATGCTCCCACTAACCTCCAGTTTGTCAATGAAACTGATTCTACTGTCCTGGTGAGATGGACTCCACCTCGGGCCCAGATAACAGGATA
2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2480 2990 3000
R L T V G L T R R G Q P R Q Y N V G P S V S K Y P L R N L Q P A S E Y T V S L V
CCGACTGACCGTGGGCCTTACCCGAAGAGGCCAGCCCAGGCAGTACAATGTGGGTCCCTCTGTCTTCAAGTACCCCCTGAGGAATCTGCAGCCTGCATCTGAGTACACCGTATCCCTCGT
3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120
20
A I K G N Q E S P K A T G V F T T L Q P G S S I P P Y N T E V T E T T I V I T W
GGCCATAAAGGGCAACCAAGAGAGCCCCAAAGCCACTGGAGTCTTTACCACACTGCAGCCTGGAGCTCTATTCCACCTTACAACACCGAGGTGACTGAGACCACCATCGTGATCACATG
3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240
T P A P R I G F K L G V R P S Q G G E A P R E V T S D S G S I V V S G L T P G V
GACGCCTCCTCCAAGAATTGGTTTTAAGCTGGGTGTACGACCAAGCCAGGGAGGAGAGGCACCACGAGAAGTGACTTCAGACTCAGGAAGCATCGTTGTGTCCGGCTTGACTCCAGGAGT
3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360
21
E Y V T T I Q V L R D G Q E R D A P I V N K V V T P L S P P T N L H L E A N P D
AGAATACGTCTACACCATCCAAGTCCTGAGAGATGGACAGGAAAGAGATGGGCCAATTGTAAACAAAGTGGTGACACCATTGTCTCCACCAACAAACTTGCATCTGGAGGCAAACCCTGA
3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480
T G V L T V S W E R S T T P D I T G Y R I T T T P T N G Q Q G N S L E E V V H A
CACTGGAGTGCTCACAGTCTCCTGGGAGAGGAGCACCACCCCAGACATTACTGGTTATAGAATTACCACAACCCCTACAAACGGCCAGCAGGGAAATTCTTTGGAAGAAGTGGTCCATGC
3490 3500 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
22
D Q S S C T F D N L S P G L E Y N V S V Y T V K D D K E S V P I S D T I I P A V
TGATCAGAGCTCCTGCACTTTTGATAACCTGAGTCCCGGCCTGGAGTACAATGTCAGTGTTTACACTGTCAAGGATGACAAGGAAAGTGTCCCTATCTCTGATACCATCATCCCAGCTGT
3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720
P P P T D L R F T N I G P D T M R V T W A P P P S I D L T N F L V R Y S P V K N
TCCTCCTCCCACTGACCTGCGATTCACCAACATTGGTCCAGACACCATGCGTGTCACCTGGGCTCCACCCCCATCCATTGATTTAACCAACTTCCTGGTGCGTTACTCACCTGTGAAAAA
3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840

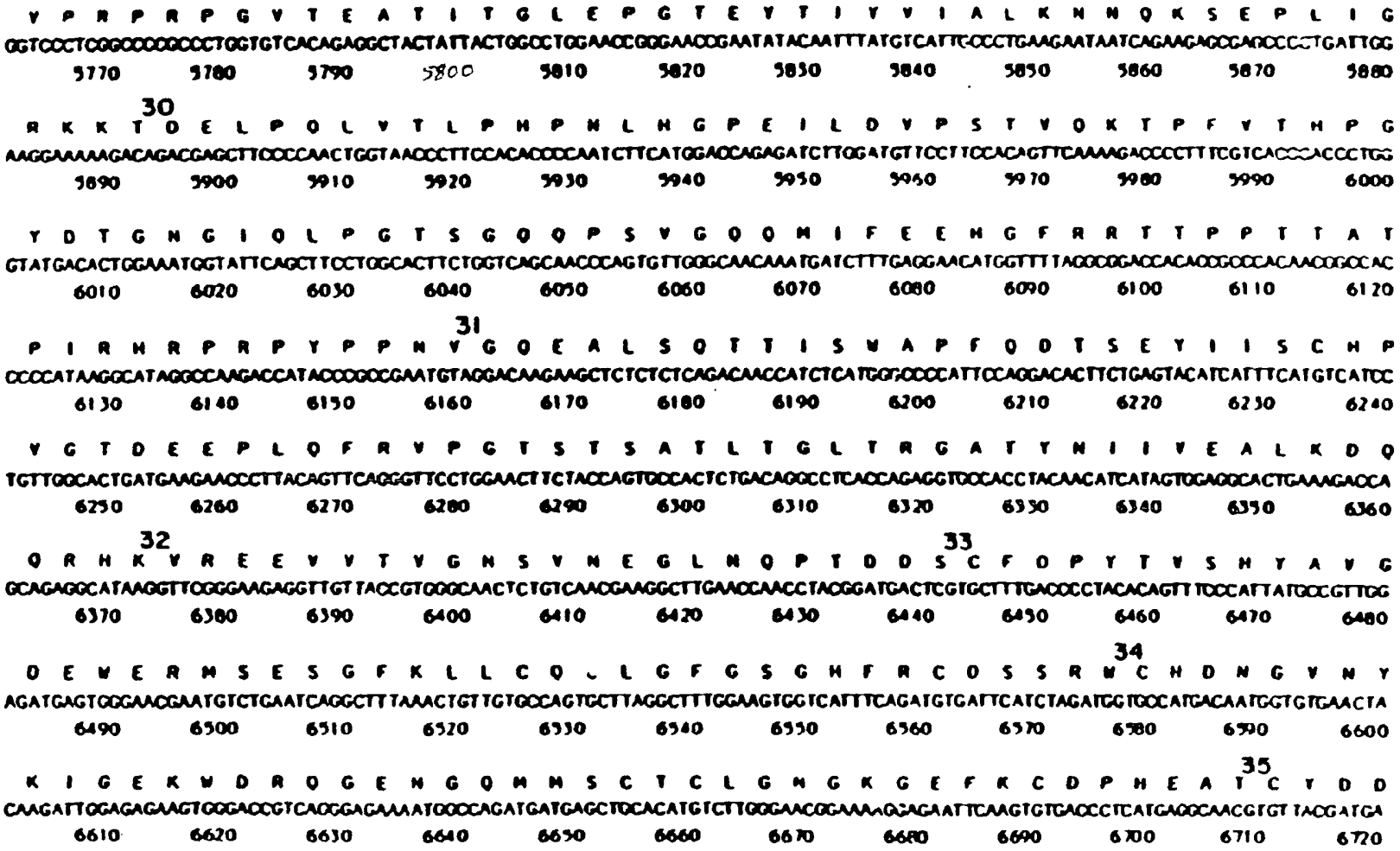
Figur 2E


E E D V A E L S I S P S D N A V V L T N L L P G T E Y V V S V S S V Y E Q H E S
TGAGGAAGATGTTGCAGAGTTGTCAATTTCTCCTTCAGACAATGCAGTGGTCTTAACAAATCTCCTGCCTGGTACAGAATATGTAGTGAGTGTCTCCAGTGTCTACGAACAACATGAGAG
3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960
23
T P L R G R Q K T G L D S P T G I Q F S D I T A N S F T V H W I A P R A T I T G
CACACCTCTTAGAGGAAGACAGAAAACAGGTCTTGATTCCCCAACTGGCATTGACTTTTCTGATATTACTGCCAACTCTTTTACTGTGCACTGGATTGCTCCTCGAGCCACCATCACTGG
3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080
T R I R H H P E H F S G R P R E D R V P H S R N S I T L T N L T P G T E Y V V S
CTACAGGATCCGCCATCATCCCGAGCACTTCAGTGGGAGACCTGAGAAGATCGGGTGCCCCACTCTCGGAATTCCATCACCCTCAACAACCTCACTCCAGGCACAGAGTATGTGGTCAG
4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200
24
I V A L N G R E E S P L L I G Q Q S T V S D V P R D L E V V A A T P T S L L I S
CATCGTTGCTCTTAATGGCAGAGAGGAAAGTCCCTTATTGATTGGCCAACAATCAACAGTTTCTGATGTTCCGAGGGACCTGGAAGTTGTTGCTGCGACCCCCACCAGCCTACTGATCAG
4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320
W D A P A V T V R Y Y R I T Y G E T G G N S P V Q E F T V P G S K S T A T I S G
CTGGGATGCTCCTGCTGTCACAGTGAGATATTACAGGATCACTTACGGAGAAACAGGAGGAAATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCAAGTCTACAGCTACCATCAGCGG
4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420 4430 4440
25
L K P G V D Y T I T V Y A V T G R G D S P A S S K P I S I N Y R T E I D K P S Q
CCTTAAACCTGGAGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCCGTGGAGACAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGAACAGAAATTGACAAACCATCCCA
4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560
M Q V T D V Q D N S I S V K W L P S S S P V T G Y R V T T T P K N G P G P T K T
GATGCAAGTGACCGATGTTCAGGACAACAGCATTAGTGTCAAGTGGCTGCCTTCAAGTTCCCCTGTTACTGGTTACAGAGTAACCACCACTCCCAAAAATGGACCAGGACCAACAAAAAC
4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680
K T A G P D Q T E M T I E G L Q P T V E Y V V S V Y A Q N P S G E S Q P L V Q T
TAAAACTGCAGGTCCAGATCAAACAGAAATGACTATTGAAGGCTTGCAGCCCACAGTGGAGTATGTGGTTAGTGTCTATGCTCAGAATCCAAGCGAGAGAGTCAGCCTCTGGTTCAGAC
4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800

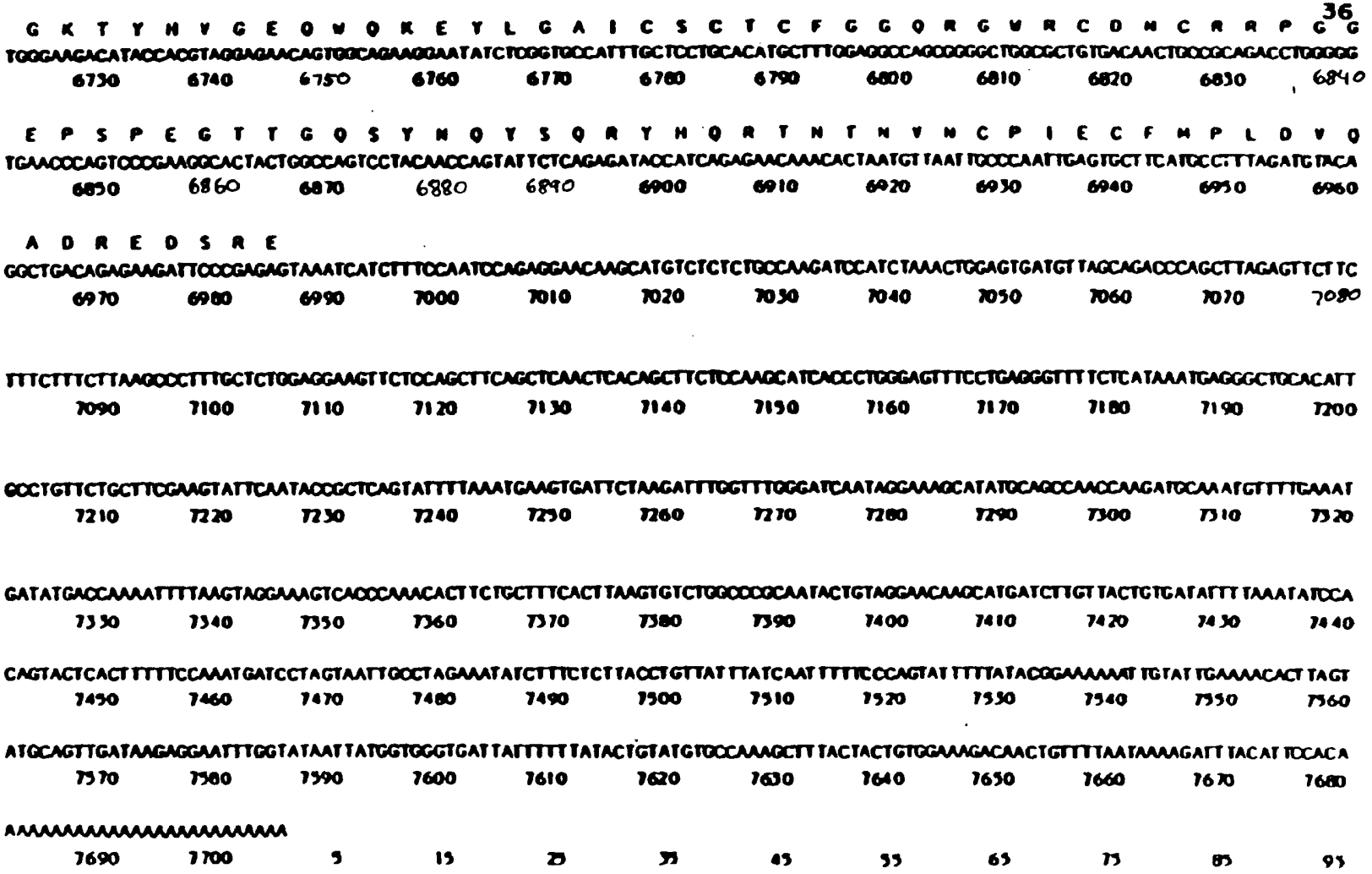
Figur 2F


26
A V T N I D R P K G L A F T D V D V D S I K I A M E S P Q G Q V S R Y R V T Y S
TGCAGTAACCAACATTGATCGCCCTAAAGGACTGGCATTCACTGATGTGGATGTCGATTCCATCAAAATTGCTTGGGAAAGCCCACAGGGCAAGTTTCCAGGTACAGGGTGACCTACTC
4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910 4920
S P E D G I H E L F P A P D G E E D T A E L Q G L R P G S E Y T V S V V A L H D
GAGCCCTGAGGATGGAATCCATGAGCTATTCCCTGCACCTGATGGTGAAGAAGACACTGCAGAGCTGCAAGGCCTCAGACCGGGTTCTGAGTACACAGTCAGTGTGGTTGCCTTGCACGA
4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040
27
D M E S Q P L I G T Q S T A I P A P T D L K F T Q V T P T S L S A Q W T P P N V
TGATATGGAGAGCCAGCCCCTGATTGGAACCCAGTCCACAGCTATTCCTGCACCAACTGACCTGAAGTTCACTCAGGTCACACCCACAAGCCTGAGCGCCCAGTGGACACCACCCAATGT
5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120 5130 5140 5150 5160
Q L T G Y R V R V T P K E K T G P M K E I N L A P D S S S V V V S G L M V A T K
TCAGCTCACTGGATATCGAGTGCGGGTGACCCCCAAGGAGAAGACCGGACCAATGAAAGAAATCAACCTTGCTCCTGACAGCTCATCCGTGGTTGTATCAGGACTTATGGTGGCCACCAA
5170 5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280
28
Y E V S V Y A L K D T L T S R P A Q G V V T T L E N V S P P A R A R V T D A T E
ATATGAAGTGAGTGTCTATGCTCTTAAGGACACTTTGACAAGCAGACCAGCTCAGGGTGTTGTCACCACTCTGGAGAATGTCAGCCCACCAAGAAGGGCTCGTGTGACAGATGCTACTGA
5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400
T T I T I S W R T K T E T I T G F Q V D A V P A N G Q T P I Q R T I K P D V R S
GACCACCATCACCATTAGCTGGAGAACCAAGACTGAGACGATCACTGGCTTCCAAGTTGATGCCGTTCCAGCCAATGGCCAGACTCCAATCCAGAGAACCATCAAGCCAGATGTCAGAAG
5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520
29
Y T I T G L Q P G T D Y K I Y L Y T L N D N A R S S P V V I D A S T A I D A P S
CTACACCATCACAGGTTTACAAGCAGGCACTGACTACAAGATCTACCTGTACACCTTGAATGACAATGCTCGGAGCTCCCCTGTGGTCATCGACGCCTCCACTGCCATTGATGCCACCATC
5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600 5610 5620 5630 5640
N L R F L A T T P N S L L V S W Q P P R A R I T G Y I I K Y E K P G S P P R E V
CAACCTGCGTTTCCTGGCCACCACAGCCAATTCCTTGCTGGTATCATGGCAGCCGCCACGTGCCAGGATTACCGGCTACATCATCAAGTATGAGAAGCCTGGGTCTCCTCCCCAGAGAAGT
5650 5660 5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760

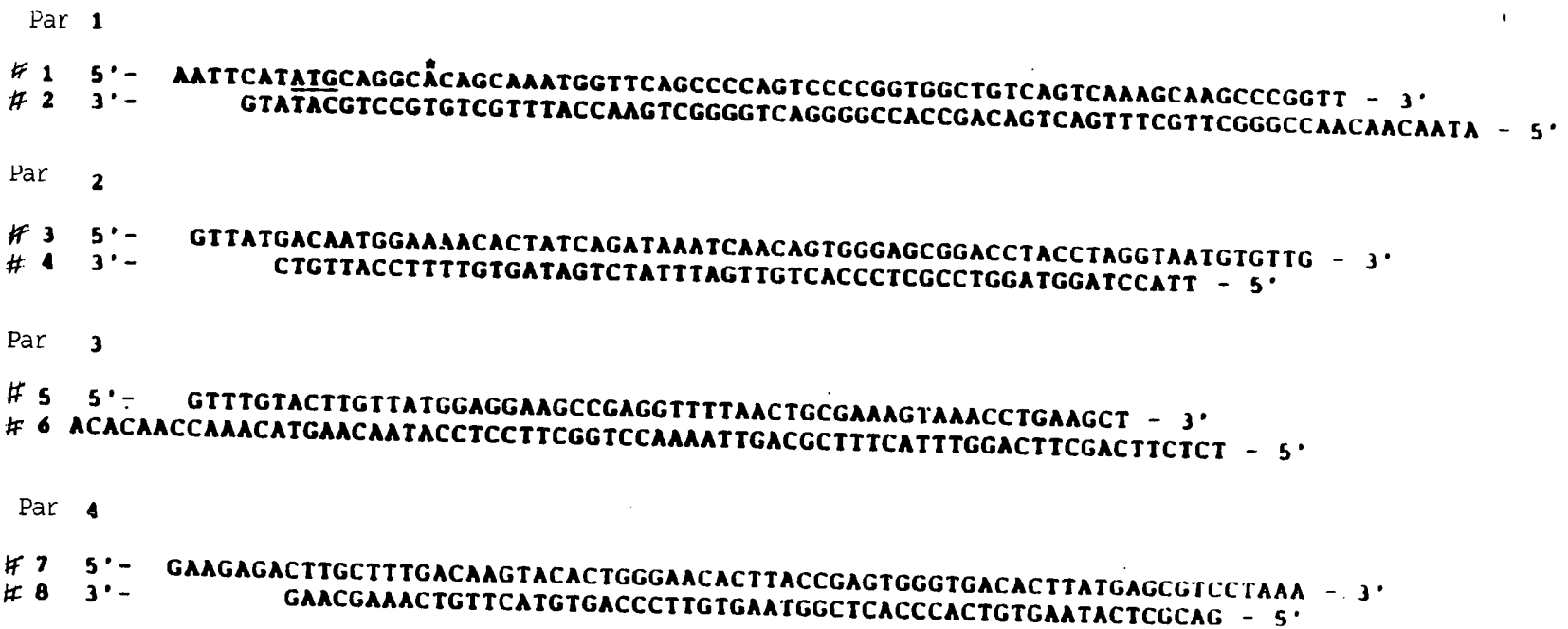
Figur 2G


V P R P R P G V T E A T I T G L E P G T E Y T I Y V I A L K N N Q K S E P L I G
GGTCCCTCGGCCCCGCCCTGGTGTCACAGAGGCTACTATTACTGGCCTGGAACCGGGAACCGAATATACAATTTATGTCATTGCCCTGAAGAATAATCAGAAGAGCGAGCCCCTGATTGG
5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880
30
R K K T D E L P Q L V T L P H P N L H G P E I L D V P S T V Q K T P F V T H P G
AAGGAAAAAGACAGACGAGCTTCCCCAACTGGTAACCCTTCCACACCCCAATCTTCATGGACCAGAGATCTTGGATGTTCCTTCCACAGTTCAAAAGACCCCTTTCGTCACCCACCCTGG
5890 5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000
Y D T G N G I Q L P G T S G Q Q P S V G Q Q M I F E E H G F R R T T P P T T A T
GTATGACACTGGAAATGGTATTCAGCTTCCTGGCACTTCTGGTCAGCAACCCAGTGTTGGGCAACAAATGATCTTTGAGGAACATGGTTTTAGGCGGACCACACCGCCCACAACCGCCAC
6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110 6120
31
P I R H R P R P Y P P H V G Q E A L S Q T T I S W A P F Q D T S E Y I I S C H P
CCCCATAAGGCATAGGCCAAGACCATACCCGCCGAATGTAGGACAAGAAGCTCTCTCTCAGACAACCATCTCATGGTCCCCATTCCAGGACACTTCTGAGTACATCATTTCATGTCATCC
6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240
V G T D E E P L Q F R V P G T S T S A T L T G L T R G A T Y N I I V E A L K D Q
TGTTGGCACTGATGAAGAACCCTTACAGTTCAGGGTTCCTGGAACTTCTACCAGTGGCCACTCTGACAGGCCTCACCAGAGGTGCCACCTACAACATCATAGTGGAGGCACTGAAAGACCA
6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320 6330 6340 6350 6360
32
33
Q R H K V R E E V V T V G N S V N E G L N Q P T D D S C F Q P Y T V S H Y A V G
GCAGAGGCATAAGGTTCGGGAAGAGGTTGTTACCGTGGGCAACTCTGTCAACGAAGGCTTGAACCAACCTACGGATGACTCGTGCTTTCAGCCCTACACAGTTTCCCATTATGCCGTTGG
6370 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480
34
D E W E R M S E S G F K L L C Q L G F G S G H F R C D S S R W C H D N G V N Y
AGATGAGTGGGAACGAATGTCTGAATCAGGCTTTAAACTGTTGTGCCAGTGCTTAGGCTTTGGAAGTGGTCATTTCAGATGTGATTCATCTAGATGGTGCCATGACAATGGTGTGAACTA
6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600
35
K I G E K W D R Q G E N G Q M M S C T C L G N G K G E F K C D P H E A T C Y D D
CAAGATTGGAGAGAAGTGGGACCGTCAGGAGAAAATGGCCAGATGATGAGCTGCACATGTCTTGGGAACGGAAAAGGAGAATTCAAGTGTGACCCTCATGAGGCAACGTGTTACGATGA
6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720

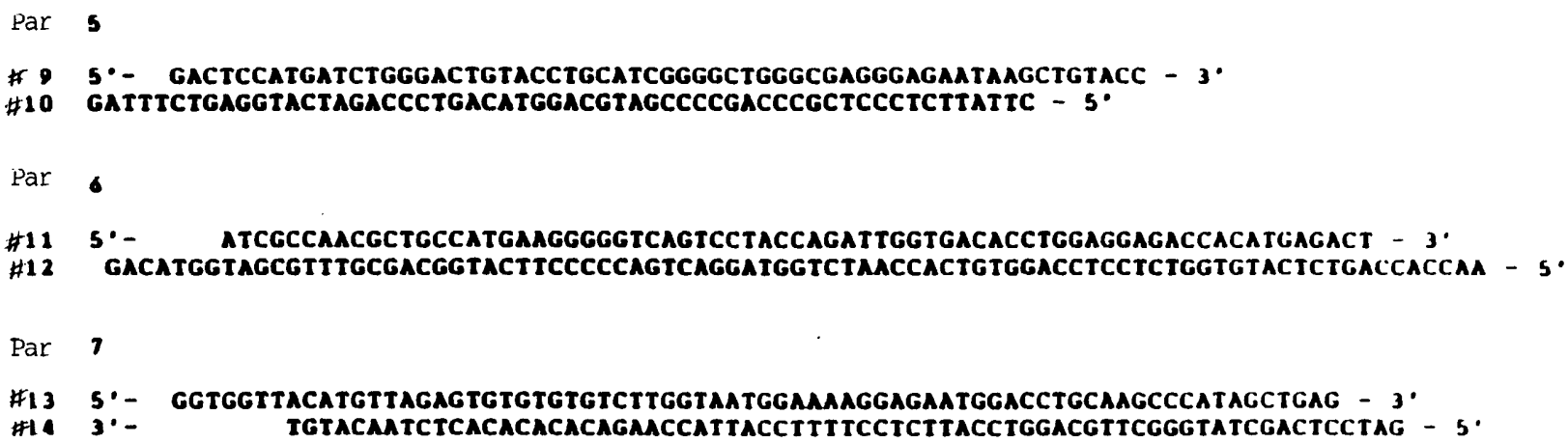
Figur 2H


36
G K T Y N V G E Q W Q K E Y L G A I C S C T C F G G Q R G W R C D N C R R P G G
TGGGAAGACATACCACGTAGGAGAACAGTGGCAGAAGGAATATCTGGGTGCCATTTGCTCCTGCACATGCTTTGGAGGCCAGGGGGCTGGCGCTGTGACAACTGCCGCAGACCTGGGGG
6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840
E P S P E G T T G Q S Y N Q Y S Q R Y H Q R T N T N V N C P I E C F M P L D V Q
TGAACCCAGTCCCGAAGGCACTACTGGCCAGTCCTACAACCAGTATTCTCAGAGATACCATCAGAGAACAAACACTAATGTTAATTGCCCAATTGAGTGCTTCATGCCTTTAGATGTACA
6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960
A D R E D S R E
GGCTGACAGAGAAGATTCCCGAGAGTAAATCATCTTTCCAATCCAGAGGAACAAGCATGTCTCTCTGCCAAGATCCATCTAAACTGGAGTGATGTTAGCAGACCCAGCTTAGAGTTCTTC
6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080
TTTCTTTCTTAAGCCCTTTGCTCTGGAGGAAGTTCTCCAGCTTCAGCTCAACTCACAGCTTCTCCAAGCATCACCCTGGGAGTTTCCTGAGGGTTTTCTCATAAATGAGGGCTGCACATT
7090 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200
GCCTGTTCTGCTTCGAAGTATTCAATACCGCTCAGTATTTTAAATGAAGTGATTCTAAGATTTGGTTTGGGATCAATAGGAAAGCATATGCAGCCAACCAAGATGCAAATGTTTTGAAAT
7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 7310 7320
GATATGACCAAAATTTTAAGTAGGAAAGTCACCCAAACACTTCTGCTTTCACTTAAGTGTCTGGCCCGCAATACTGTAGGAACAAGCATGATCTTGTTACTGTGATATTTTAAATATCCA
7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440
CAGTACTCACTTTTTCCAAATGATCCTAGTAATTGCCTAGAAATATCTTTCTCTTACCTGTTATTTATCAATTTTTCCCAGTATTTTTATACGGAAAAAATTGTATTGAAAACACTTAGT
7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560
ATGCAGTTGATAAGAGGAATTTGGTATAATTATGGTGGGTGATTATTTTTTATACTGTATGTGCCAAAGCTTTACTACTGTGGAAAGACAACTGTTTTAATAAAAGATTTACATTCCACA
7570 7580 7590 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
7690 7700 5 15 25 35 45 55 65 75 85 95

Figur 3A

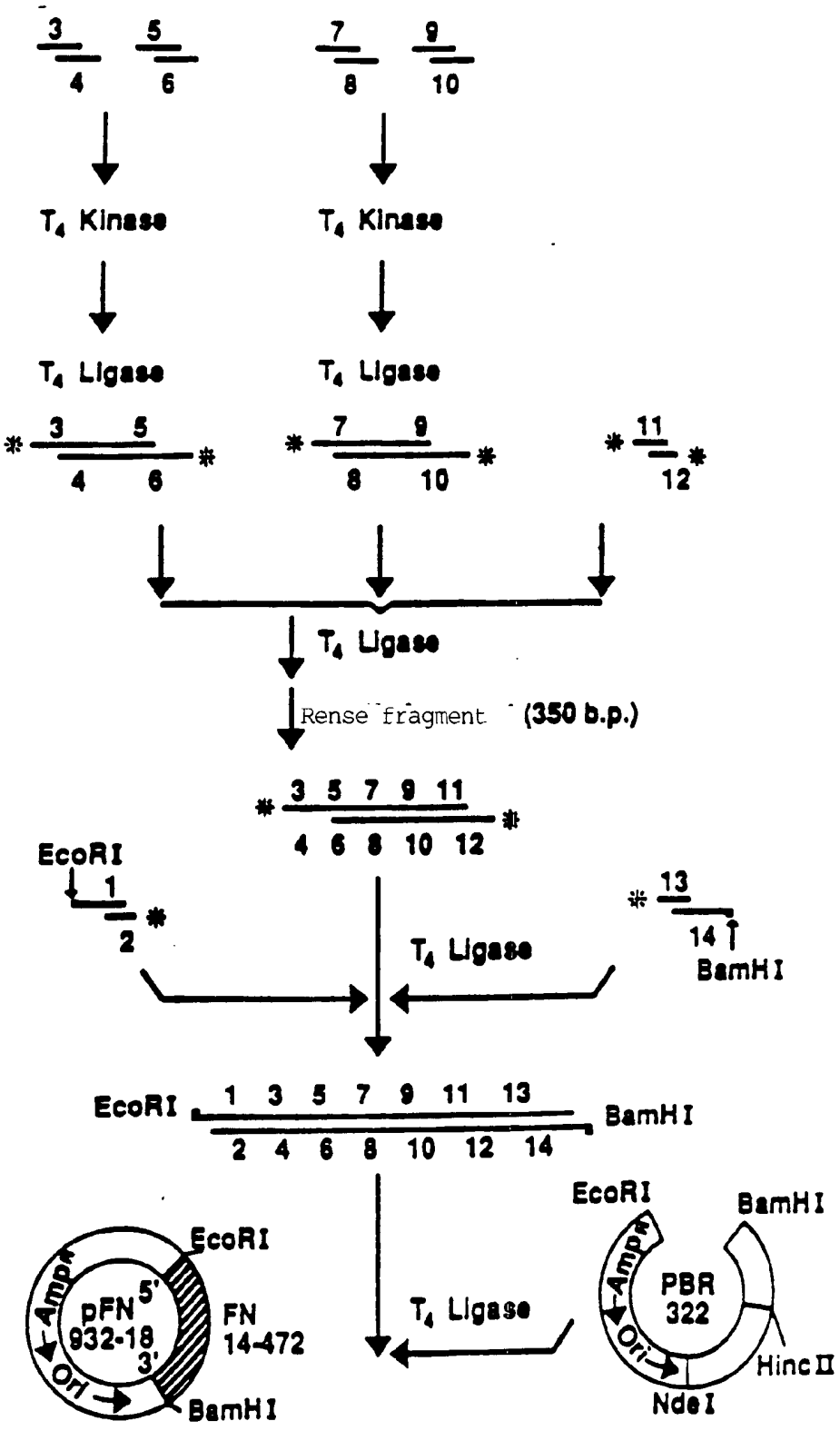

Par 1
1 5'- AATTCATATGCAGGCACAGCAAATGGTTCAGCCCCAGTCCCCGGTGGCTGTCAGTCAAAGCAAGCCCGGTT - 3'
2 3'- GTATACGTCCGTGTCGTTTACCAAGTCGGGGTCAGGGGCCACCGACAGTCAGTTTCGTTCGGGCCAACAACAATA - 5'
Par 2
3 5'- GTTATGACAATGGAAAACACTATCAGATAAATCAACAGTGGGAGCGGACCTACCTAGGTAATGTGTTG - 3'
4 3'- CTGTTACCTTTTGTGATAGTCTATTTAGTTGTCACCCTCGCCTGGATGGATCCATT - 5'
Par 3
5 5'- GTTTGTACTTGTTATGGAGGAAGCCGAGGTTTTAACTGCGAAAGTAAACCTGAAGCT - 3'
6 ACACAACCAAACATGAACAATACCTCCTTCGGTCCAAAATTGACGCTTTCATTTGGACTTCGACTTCTCT - 5'
Par 4
7 5'- GAAGAGACTTGCTTTGACAAGTACACTGGGAACACTTACCGAGTGGGTGACACTTATGAGCGTCCTAAA - 3'
8 3'- GAACGAAACTGTTCATGTGACCCTTGTGAATGGCTCACCCACTGTGAATACTCGCAG - 5'

Figur 3B

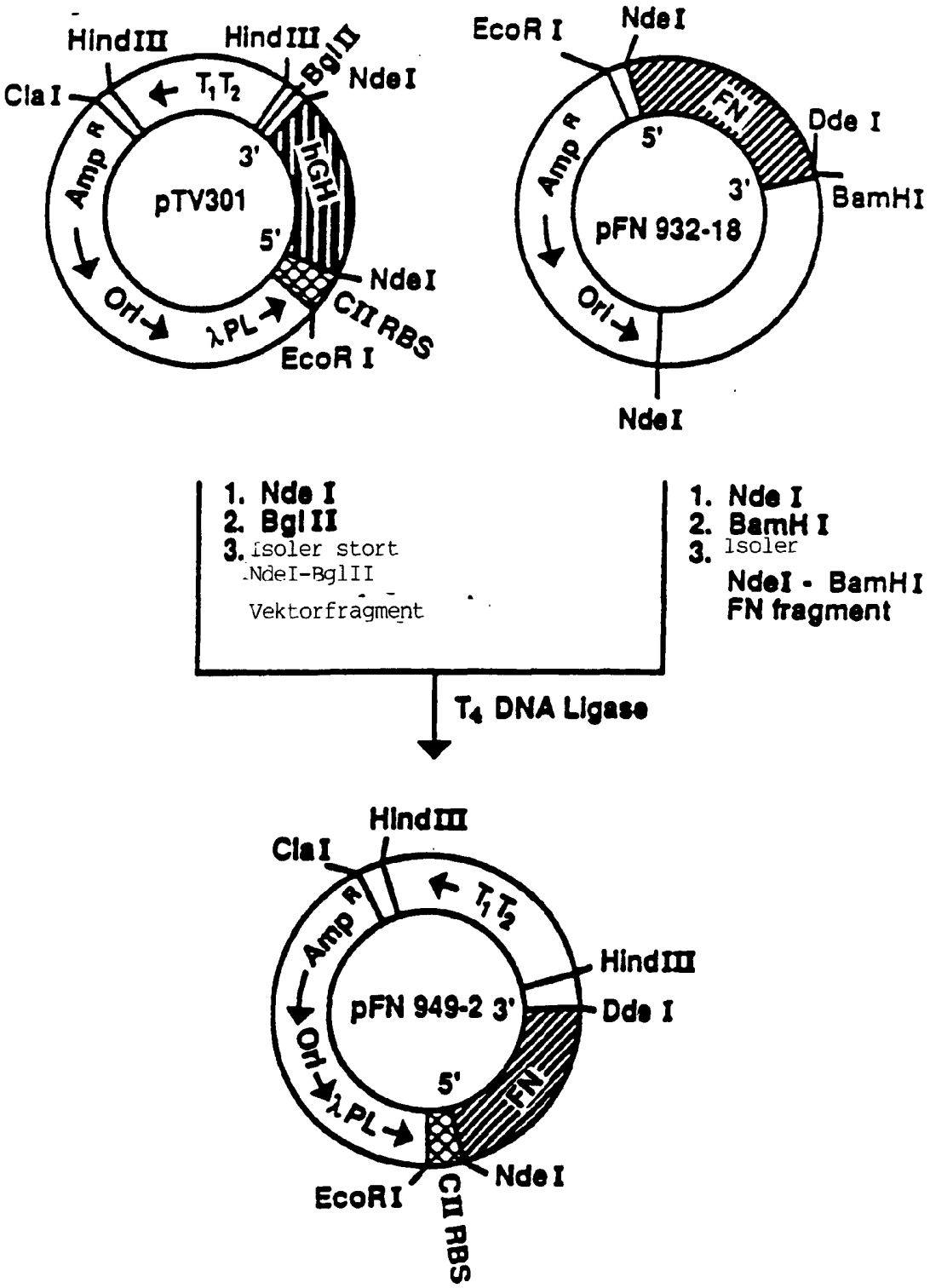

Par 5
#9 5'- GACTCCATGATCTGGGACTGTACCTGCATCGGGGCTGGGCGAGGGAGAATAAGCTGTACC - 3'
#10 GATTTCTGAGGTACTAGACCCTGACATGGACGTAGCCCCGACCCGCTCCCTCTTATTC - 5'
Par 6
#11 5'- ATCGCCAACGCTGCCATGAAGGGGGTCAGTCCTACCAGATTGGTGACACCTGGAGGAGACCACATGAGACT - 3'
#12 GACATGGTAGCGTTTGCGACGGTACTTCCCCCAGTCAGGATGGTCTAACCACTGTGGACCTCCTCTGGTGTACTCTGACCACCAA - 5'
Par 7
#13 5'- GGTGGTTACATGTTAGAGTGTGTGTGTCTTGGTAATGGAAAAGGAGAATGGACCTGCAAGCCCATAGCTGAG - 3'
#14 3'- TGTACAATCTCACACACACAGAACCATTACCTTTTCCTCTTACCTGGACGTTCGGGTATCGACTCCTAG - 5'

Figur 4

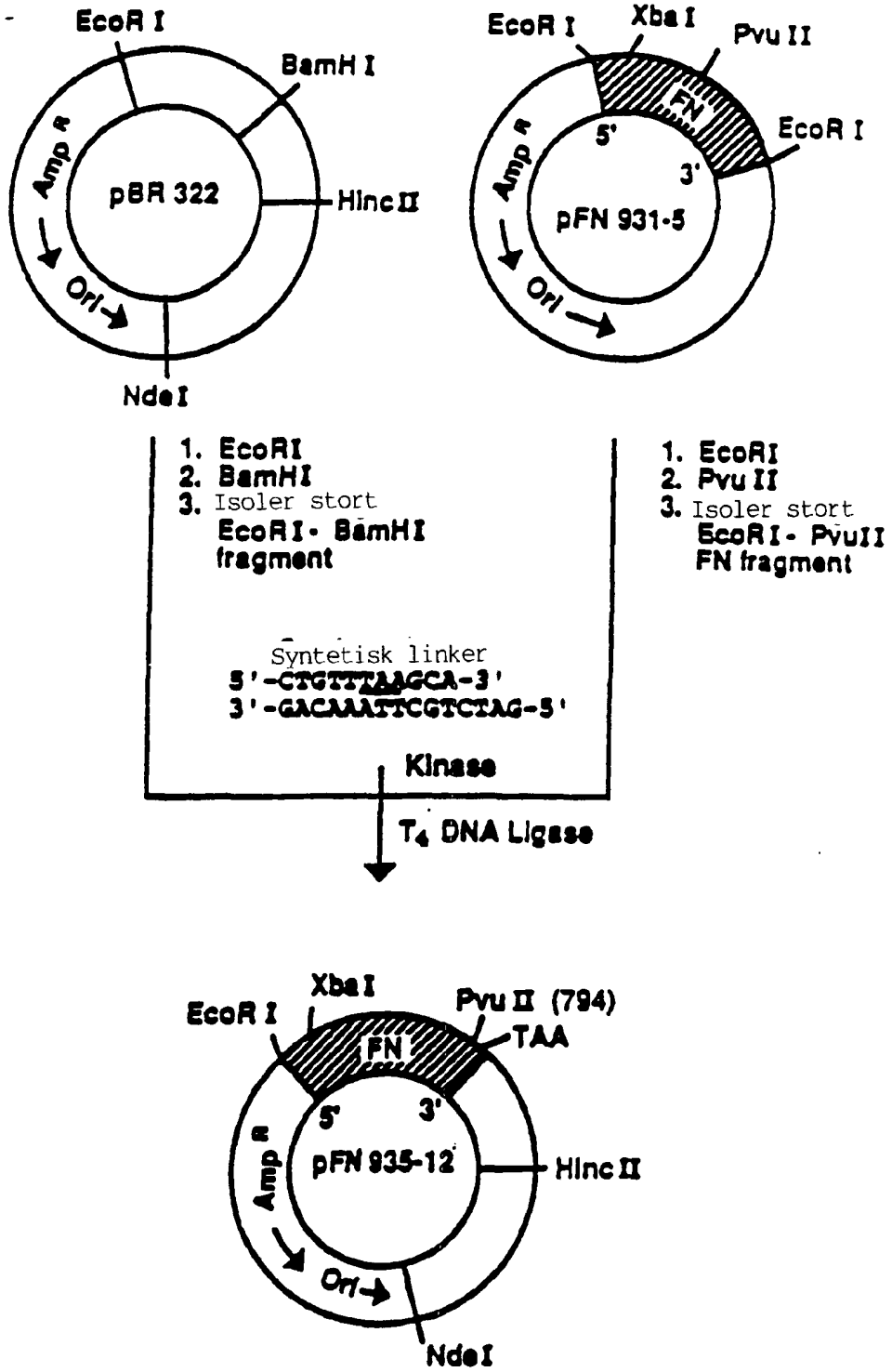
Syntese av FN gen (14-472 bp)



Figur 5

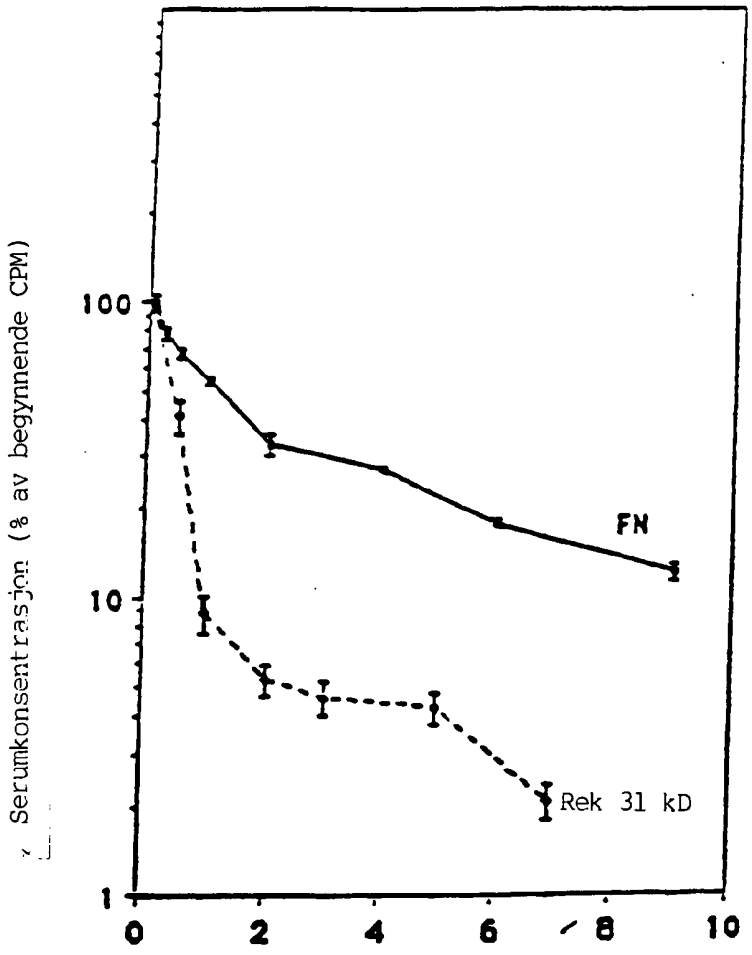

HindIII
HindIII
BglII
ClaI
T1T2
NdeI
Amp R
3'
pTV301
hGH
5'
NdeI
Ori
λPL
CII RBS
EcoR I
EcoR I
NdeI
FN
Dde I
Amp R
5'
3'
BamHI
pFN 932-18
Ori
NdeI
1. Nde I
2. BglII
3. Isoler stort NdeI-BglII Vektorfragment
1. Nde I
2. BamH I
3. Isoler NdeI - BamHI FN fragment
T4 DNA Ligase
HindIII
ClaI
Amp R
T1T2
HindIII
pFN 949-2 3'
Dde I
5'
FN
Ori
λPL
NdeI
EcoRI
CII RBS

Figur 6


EcoR I
BamH I
Amp R
pBR 322
HincII
Ori
NdeI
EcoR I
Xba I
Pvu II
FN
5'
3'
EcoR I
Amp R
pFN 931-5
Ori
1. EcoRI
2. BamHI
3. Isoler stort
EcoRI - BamHI
fragment
1. EcoRI
2. Pvu II
3. Isoler stort
EcoRI - PvuII
FN fragment
Syntetisk linker
5'-CTGTTTAAGCA-3'
3'-GACAAATTCGTCTAG-5'
Kinase
T4 DNA Ligase
EcoR I
Xba I
Pvu II (794)
TAA
FN
5'
3'
Amp R
pFN 935-12
HincII
Ori
NdeI

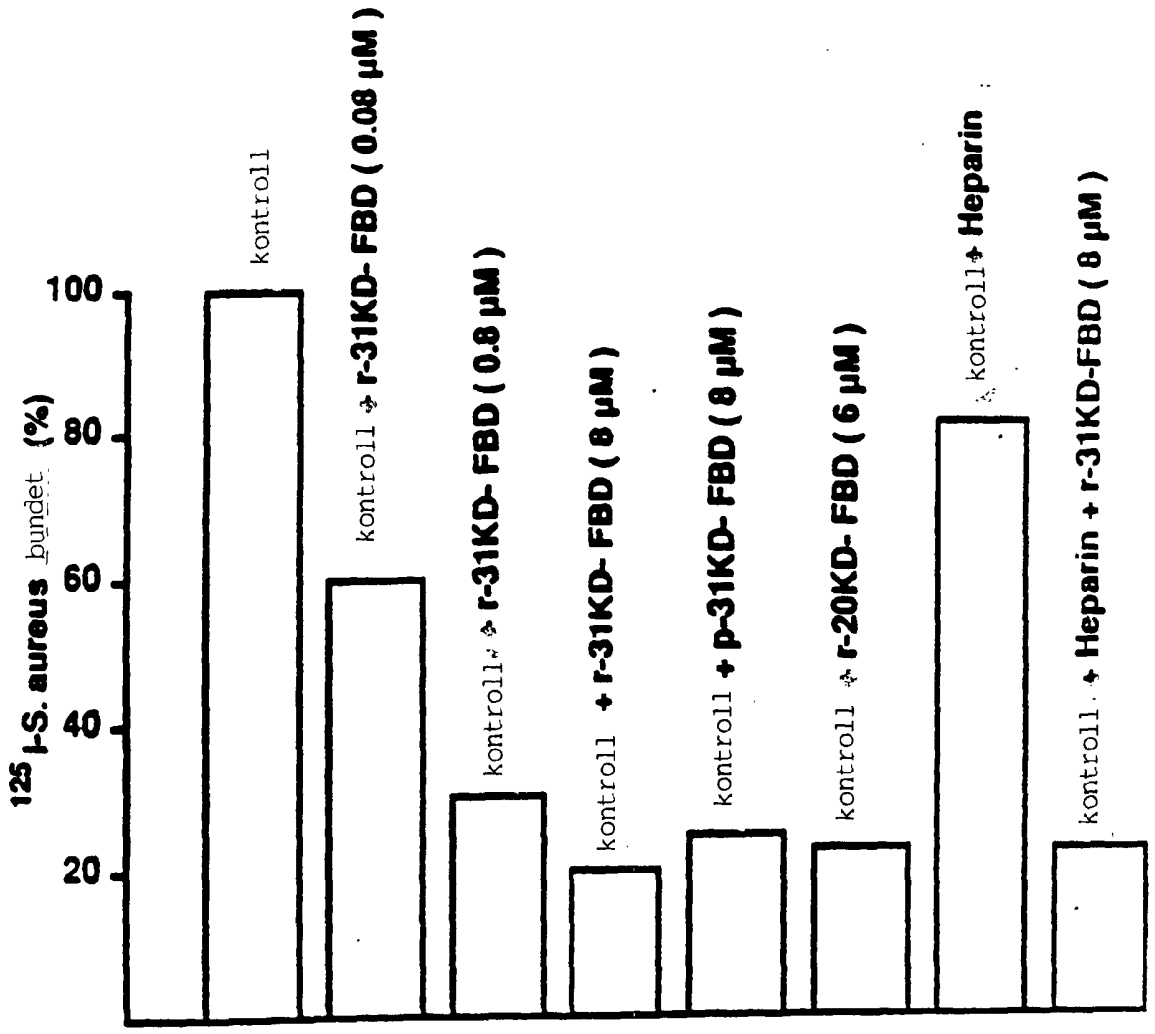
Figur 7

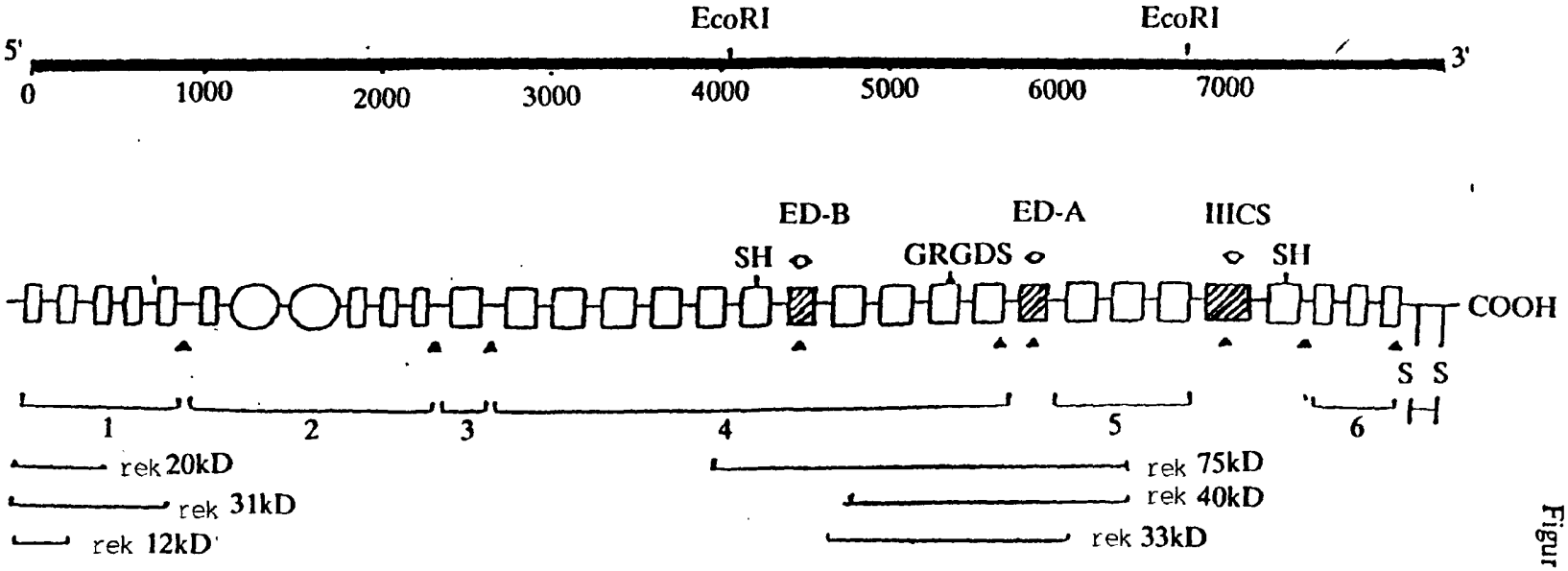
Farmakinetisk oppførsel av fibronektin og rekombinant 31 kD FBD i rotte



Figur 8

Binding av S. aureus til bronkialekatetere;
Effekt av FBD og Heparin





Figur 9

17/43

HEPARIN
S. AUREUS
FIBRIN

KOLLAGEN

[HEPARIN
DNA]

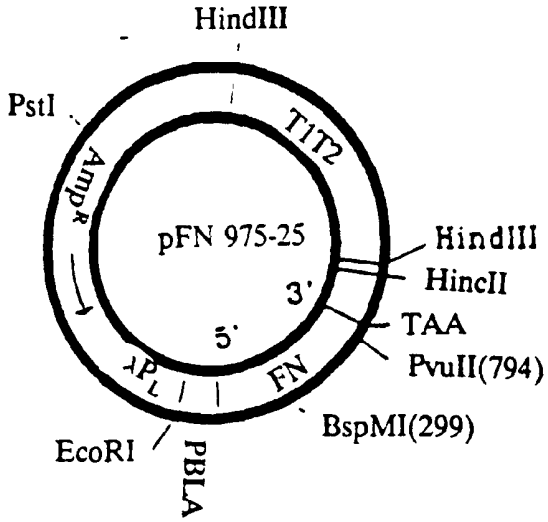
CELLE
HEPARIN
DNA

HEPARIN [CELL] FIBRIN

		Nukleotider
FBD	rek12 kD:	14-340
	rek20 kD:	14-472
	rek31 kD:	14-799
CBD	rek40 kD:	4151-5566
	rek-75 kD:	3317-5566
	rek-33 kD:	3998-5179

310559

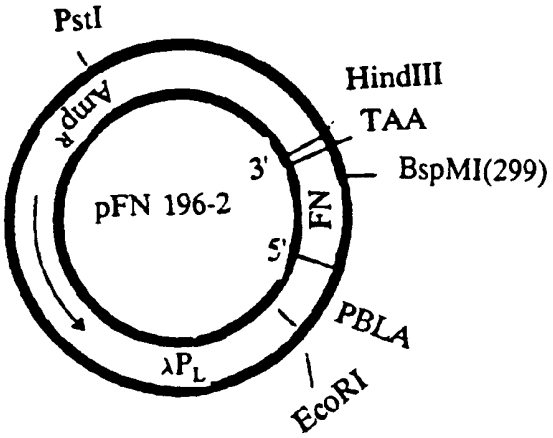
Figur 10



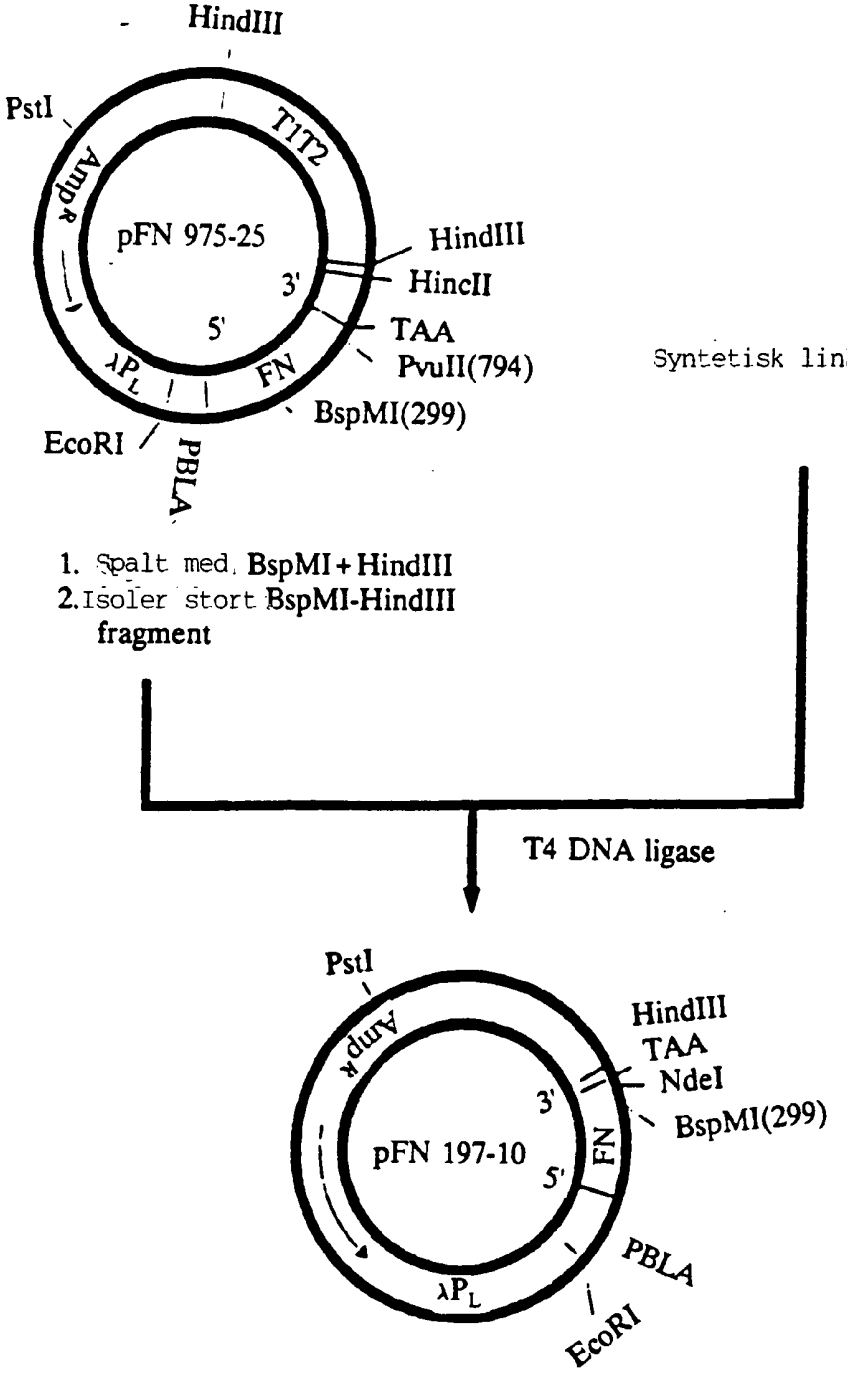
Syntetisk linker: A

1. Spalt med BspMI + HindIII
2. Isoler stort BspMI-HindIII fragment

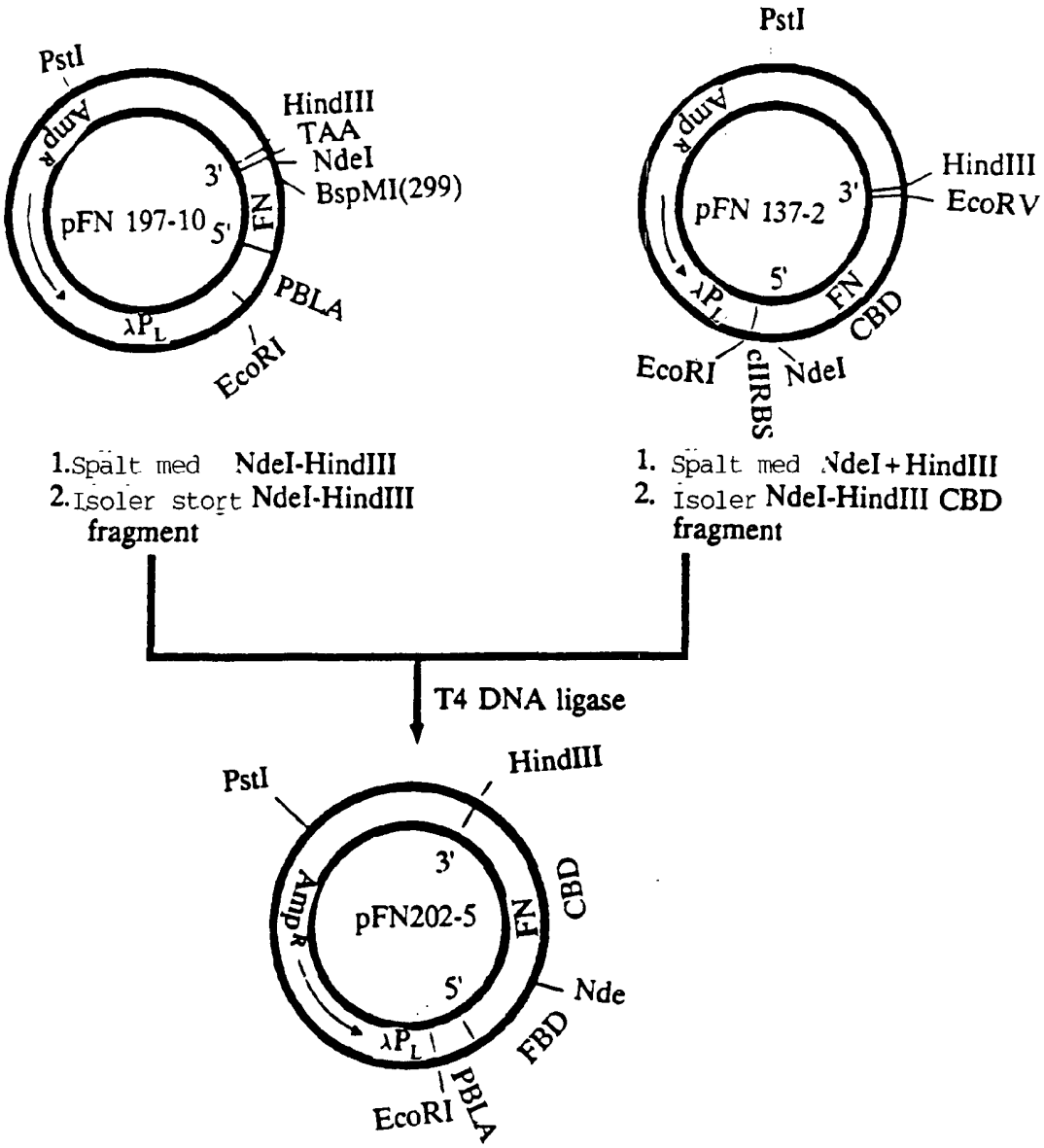
T4 DNA ligase



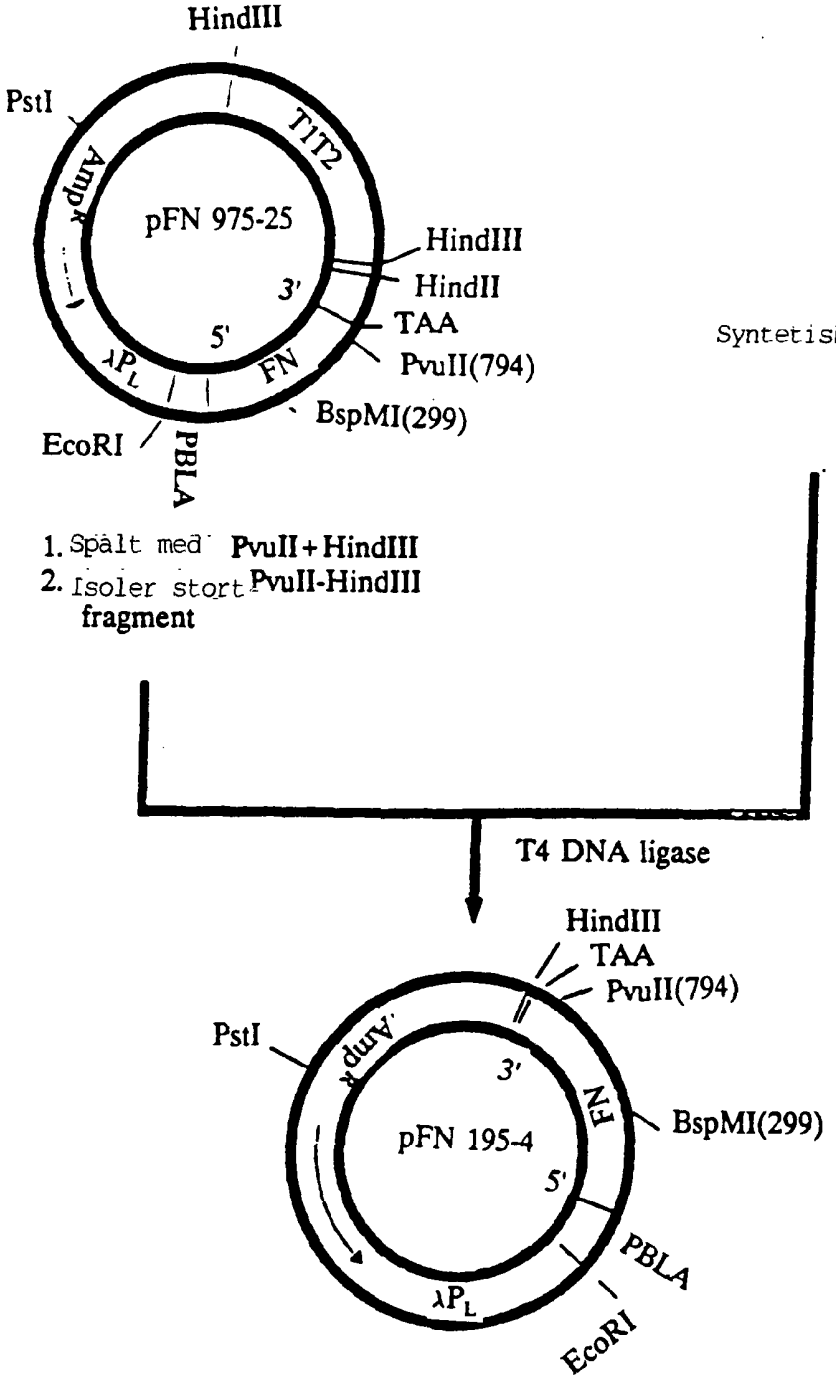
Figur 11


HindIII
PstI
T1T2
Amp R
pFN 975-25
HindIII
HincII
3'
5'
TAA
PvuII(794)
λP L
FN
BspMI(299)
EcoRI
PBLA
Syntetisk linker: B
1. Spalt med. BspMI + HindIII
2. Isoler stort BspMI-HindIII fragment
T4 DNA ligase
PstI
Amp R
HindIII
TAA
NdeI
3'
BspMI(299)
pFN 197-10
FN
5'
PBLA
λP L
EcoRI

Figur 12

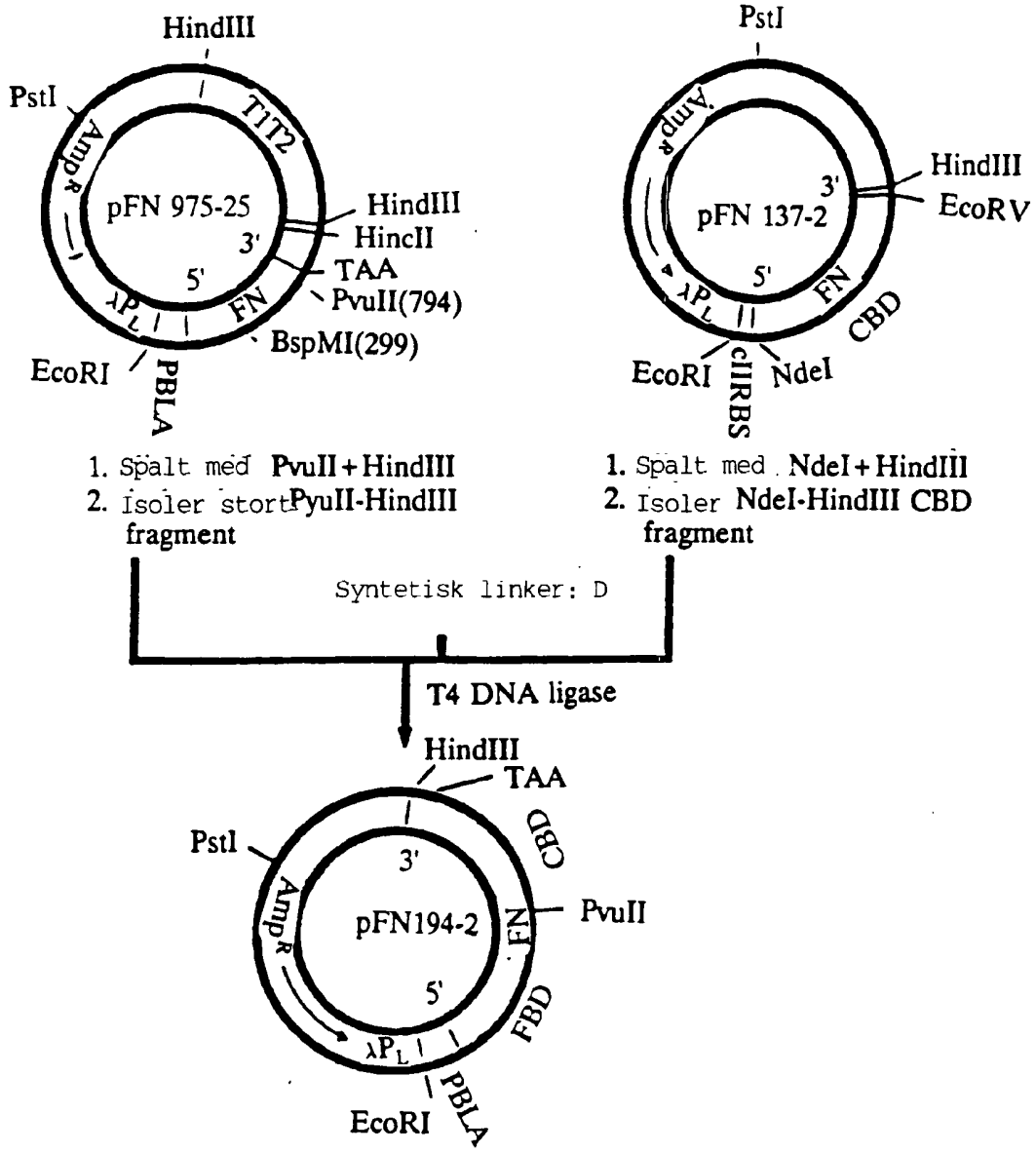

PstI
Amp^R
HindIII
TAA
NdeI
BspMI(299)
3'
pFN 197-10
5'
FN
PBLA
λP_L
EcoRI
1.Spalt med NdeI-HindIII
2.Isoler stort NdeI-HindIII fragment
PstI
Amp^R
HindIII
EcoRV
3'
pFN 137-2
5'
λP_L
FN
CBD
EcoRI
clIRBS
NdeI
1. Spalt med NdeI+HindIII
2. Isoler NdeI-HindIII CBD fragment
T4 DNA ligase
PstI
HindIII
3'
pFN202-5
5'
Amp^R
λP_L
FN
CBD
Nde
FBD
EcoRI
PBLA

Figur 13



Syntetisk linker: C

Figur 14


HindIII
PstI
T1T2
Amp R
pFN 975-25
3'
5'
HindIII
HincII
TAA
PvuII(794)
BspMI(299)
FN
λP L
EcoRI
PBLA
1. Spalt med PvuII + HindIII
2. Isoler stort PvuII-HindIII fragment
PstI
Amp R
pFN 137-2
3'
5'
HindIII
EcoRV
λP L
FN
CBD
EcoRI
cIIRBS
NdeI
1. Spalt med NdeI + HindIII
2. Isoler NdeI-HindIII CBD fragment
Syntetisk linker: D
T4 DNA ligase
HindIII
TAA
PstI
3'
CBD
Amp R
pFN194-2
FN
PvuII
5'
FBD
λP L
EcoRI
PBLA

Figur 15

A

```
5'  GGGCTGGGCGAGGGAGAATAAGCTGTACCATCGCAAACCGCTAACAGCTGA     3'
3'      ACCCGCTCCCTCTTATTCGACATGGTAGCGTTTGGCGATTGTCGACTTCGA 5'
```

B

```
5'  GGGCTGGGCGAGGGAGAATAAGCTGTACCATCGCAAACCGCCATATGTAAA     3'
3'      ACCCGCTCCCTCTTATTCGACATGGTAGCGTTTGGCGGTATACATTTTCGA 5'
```

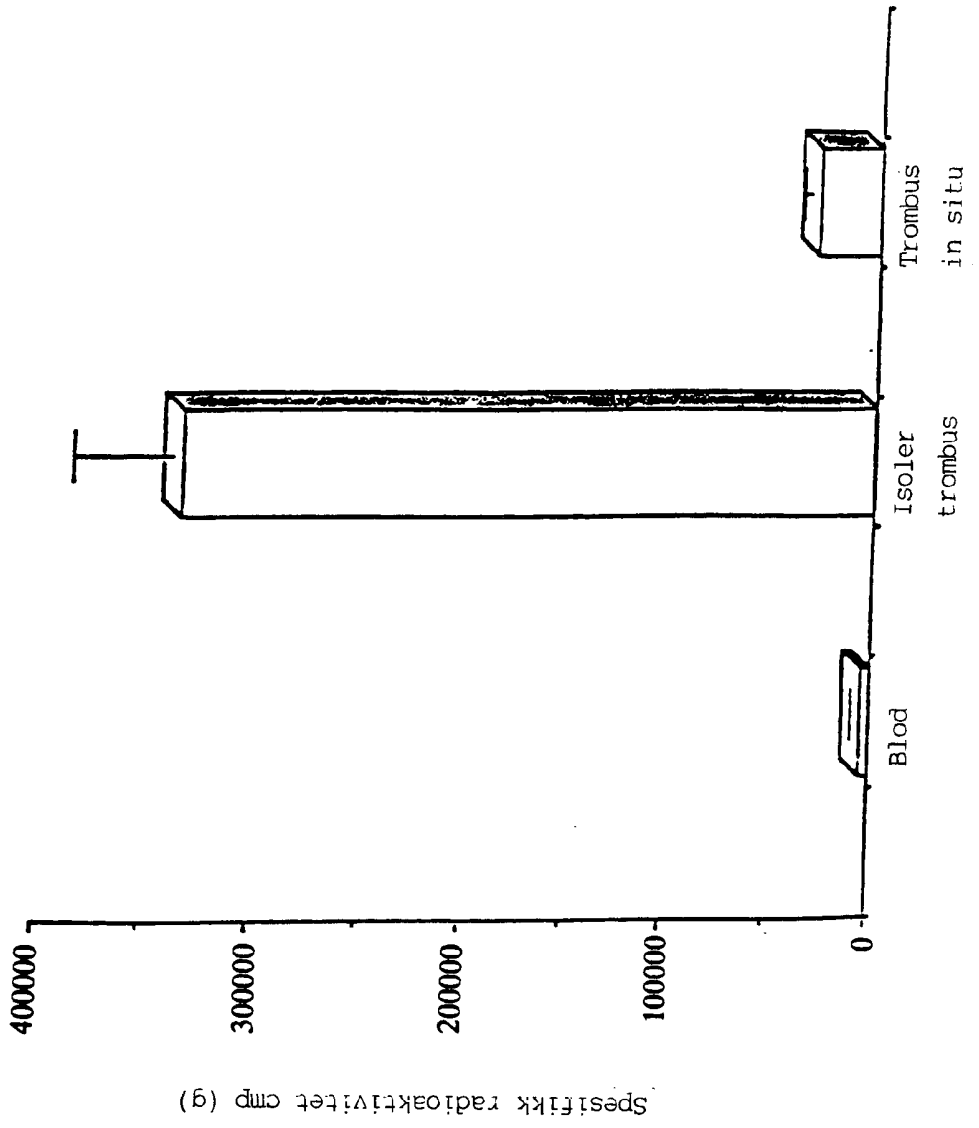
C

```
5'  ATGGCCGTGGAGACAGCTAACAGCTGA     3'
3'  TACCGGCACCTCTGTCGATTGTCGACTTCGA 5'
```

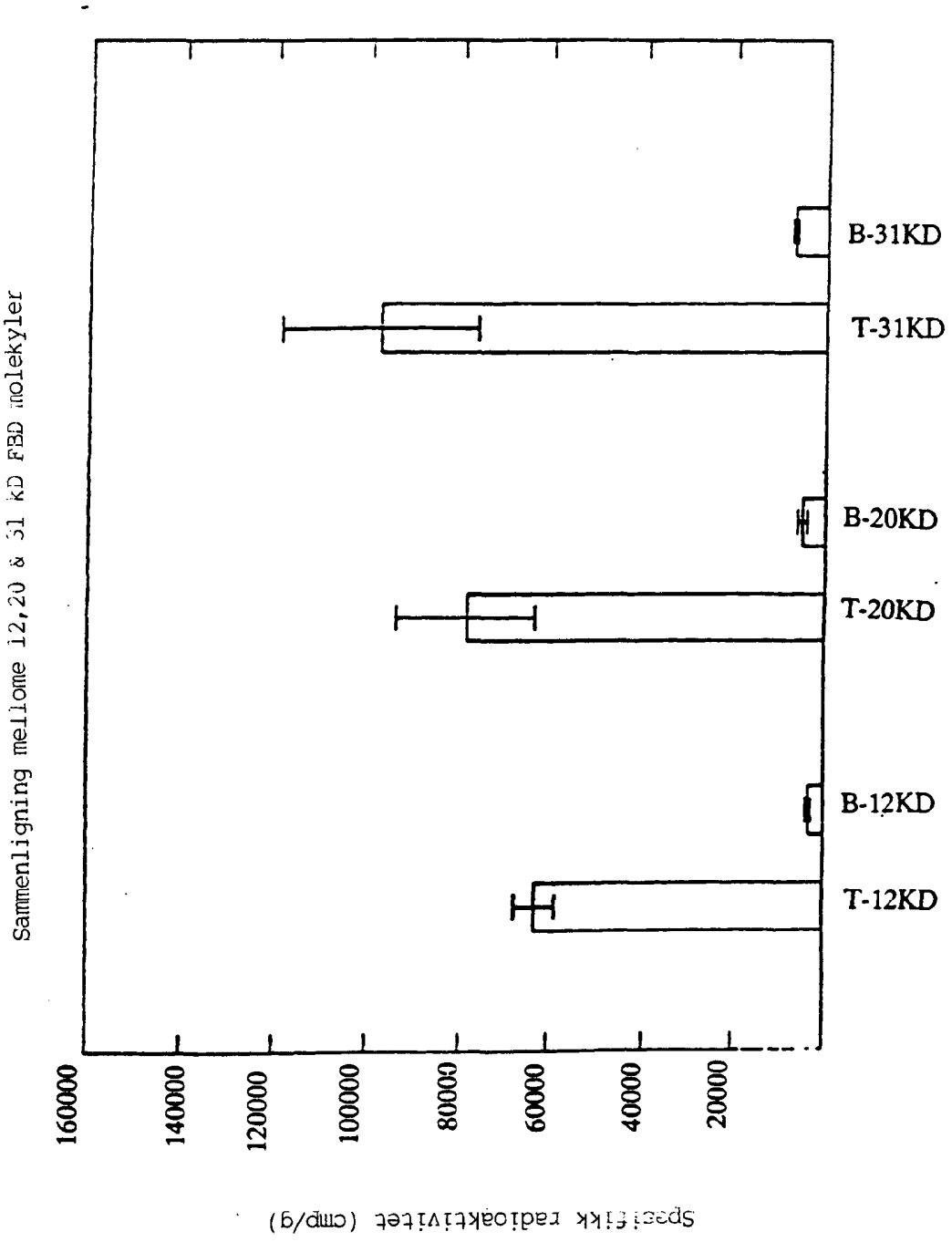
D

```
5'  CTGTATACCAACC   3'
3'  GACATATGGTTGGAT 5'
```

Figur 16

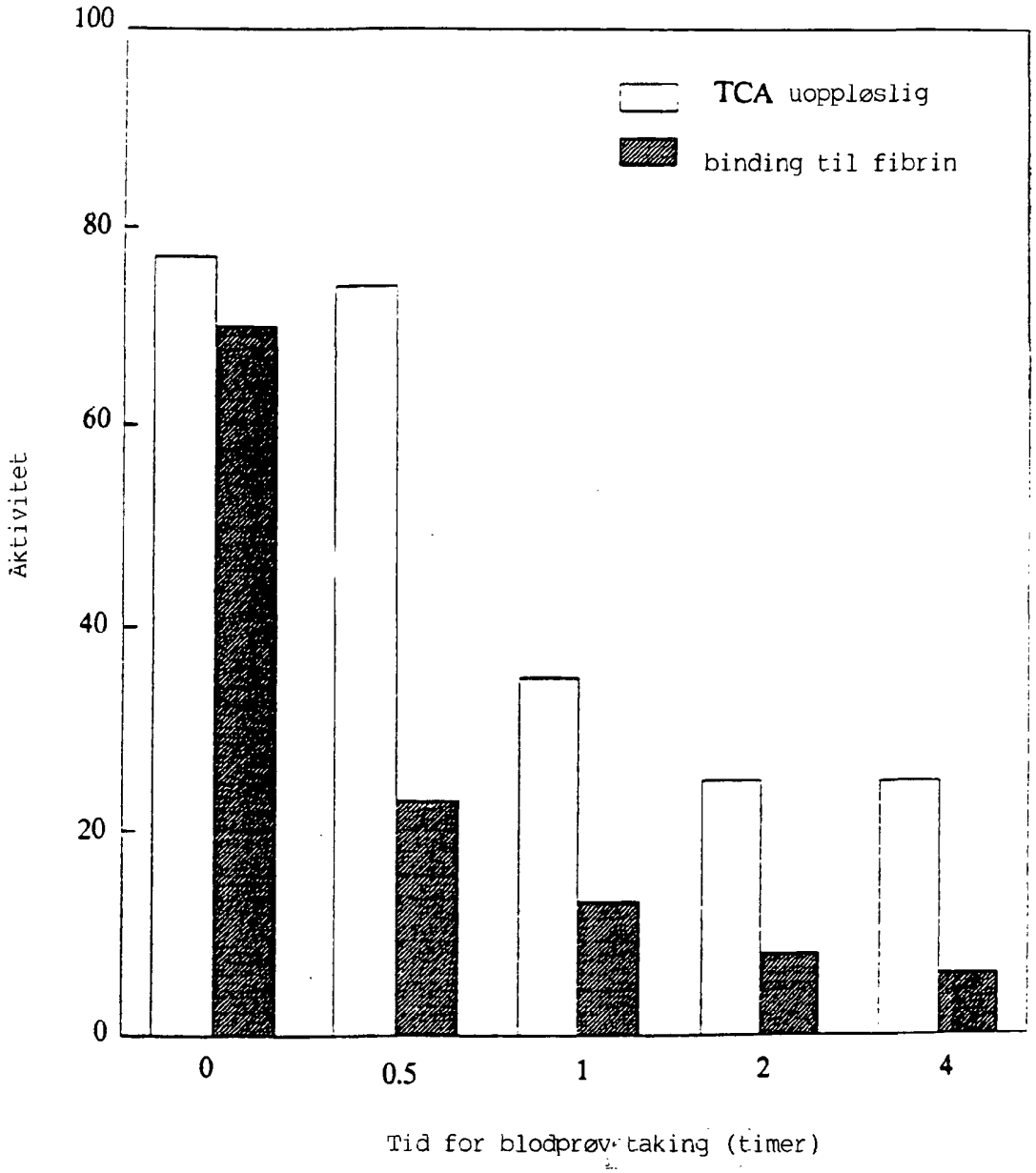

Opptak av merket 31kD rFBD av blodkoageler
i rotte coilmodell
Spesifikk radioaktivitet cmp (g)
400000
300000
200000
100000
0
Blod
Isoler trombus
Trombus in situ

Figur 17


Sammenligning mellome 12,20 & 31 kD FBD molekyler
B-31KD
T-31KD
B-20KD
T-20KD
B-12KD
T-12KD
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
Specifikk radioaktivitet (cmp/g)

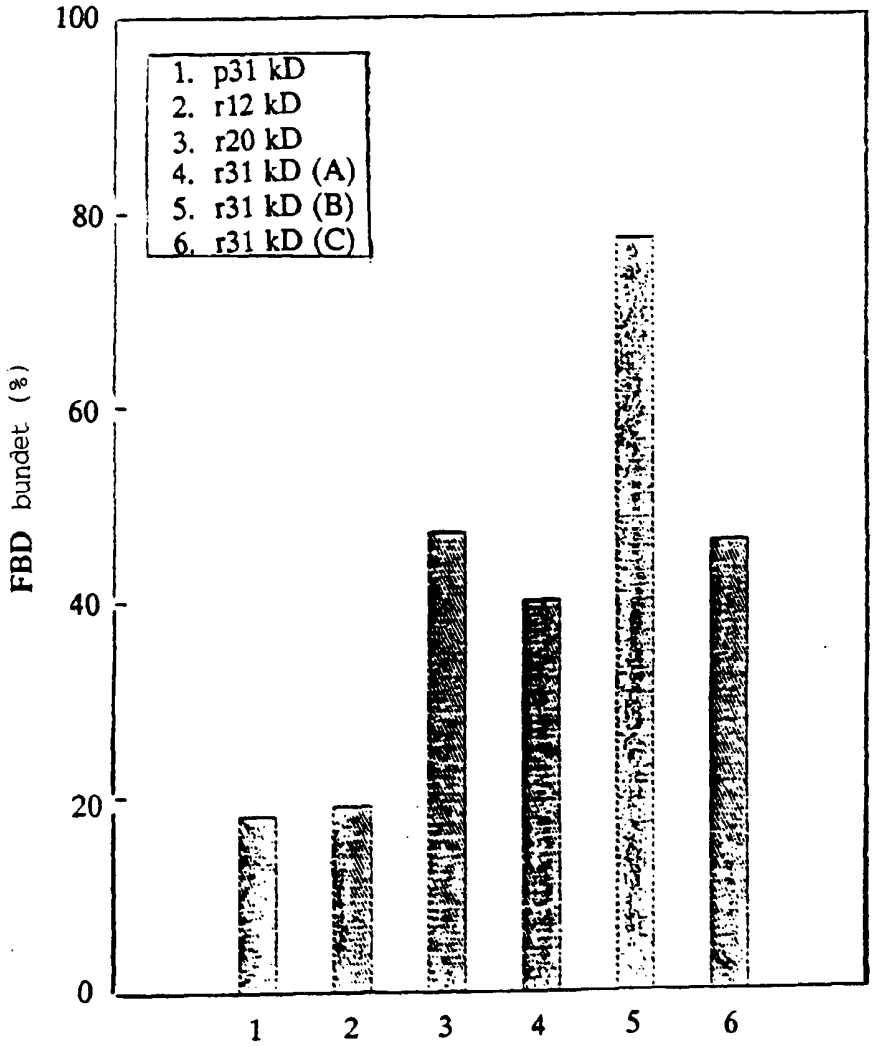
Figur 18

Metabolsk stabilitet av rFBD i rotter;
Eks-vivobinding til fibrin vs TCA uoppløslighet

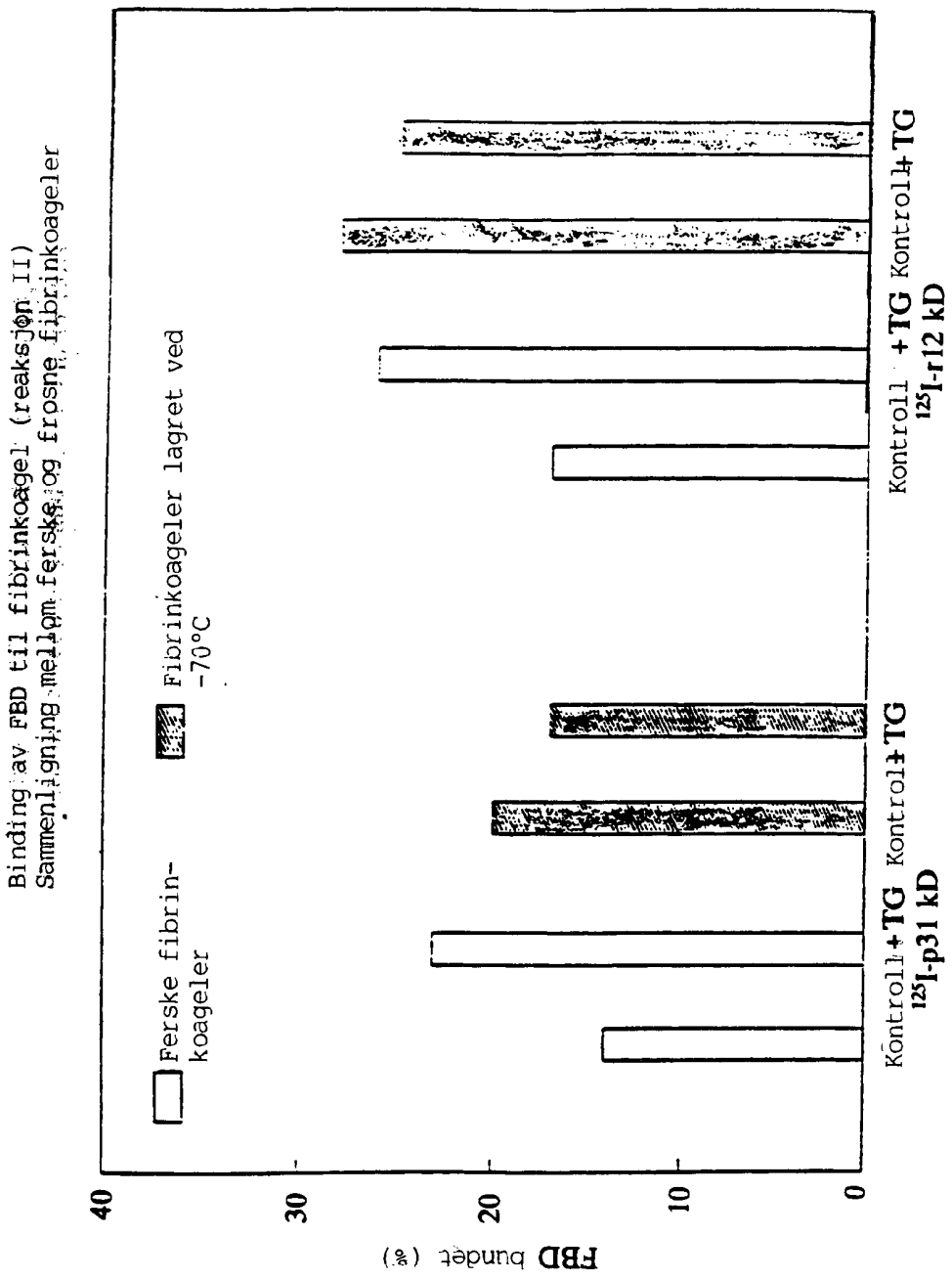


Figur 19

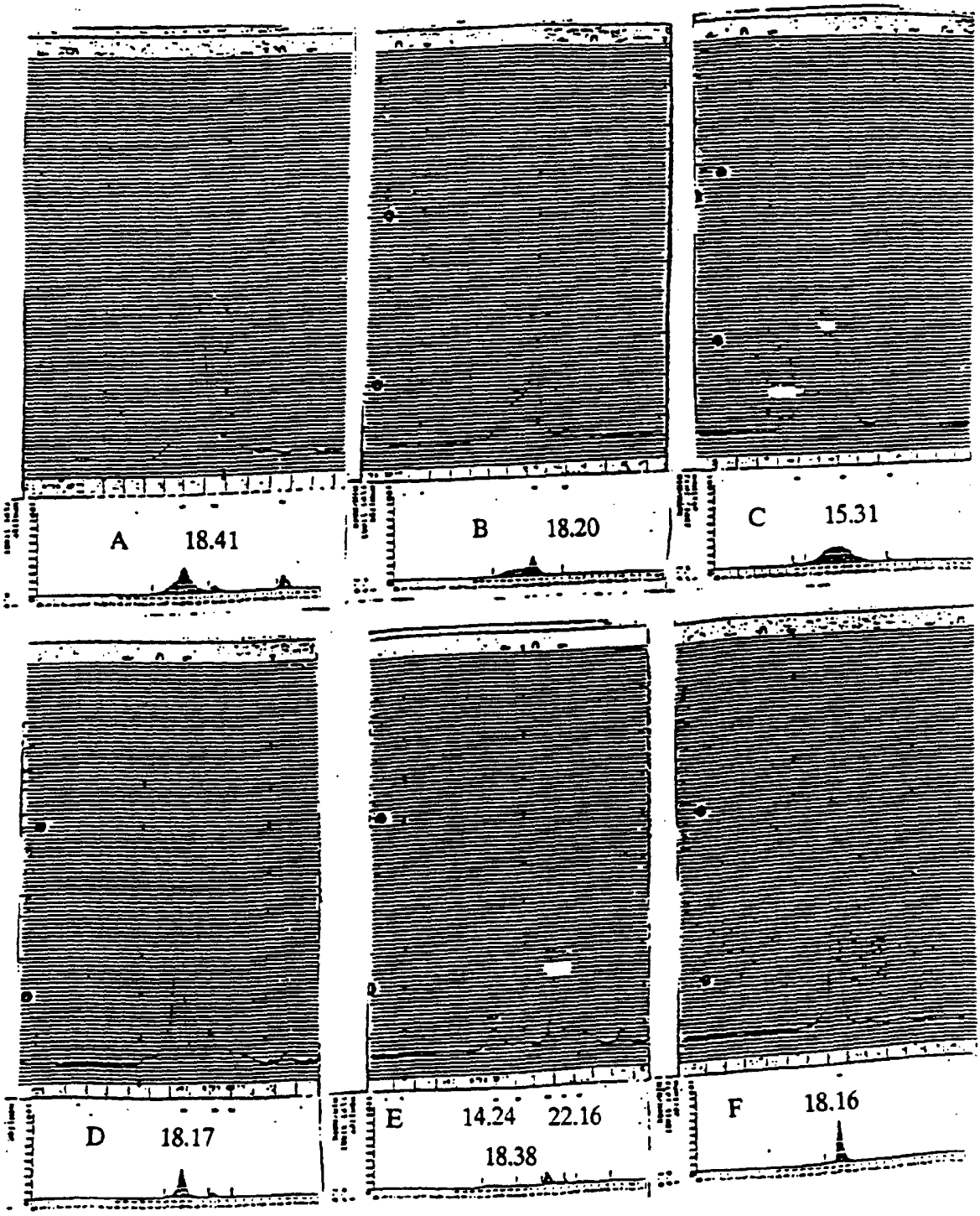
Binding av FBD til fibrinkoagel (reaksjon II)
Sammenligning mellom forskjellige rekombinante og plasmatiske FBD molekyler



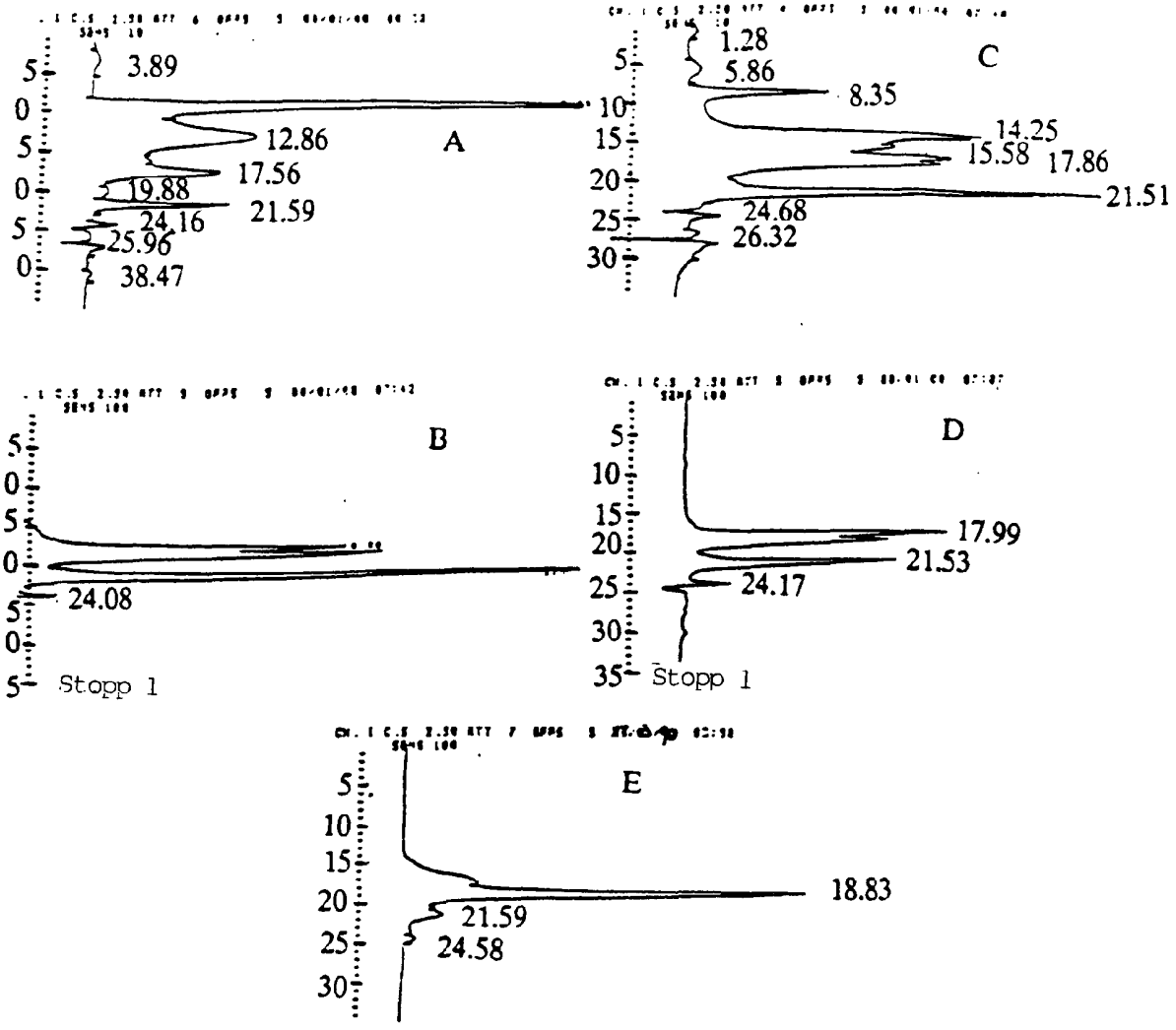
Figur 20


Binding av FBD til fibrinkoagel (reaksjon II)
Sammenligning mellom ferske og frosne fibrinkoageler
Ferske fibrin-koageler
Fibrinkoageler lagret ved -70°C
FBD bundet (%)
0
10
20
30
40
Kontroll
+TG
Kontroll
+TG
Kontroll
+TG
Kontroll
+TG
125I-p31 kD
125I-r12 kD

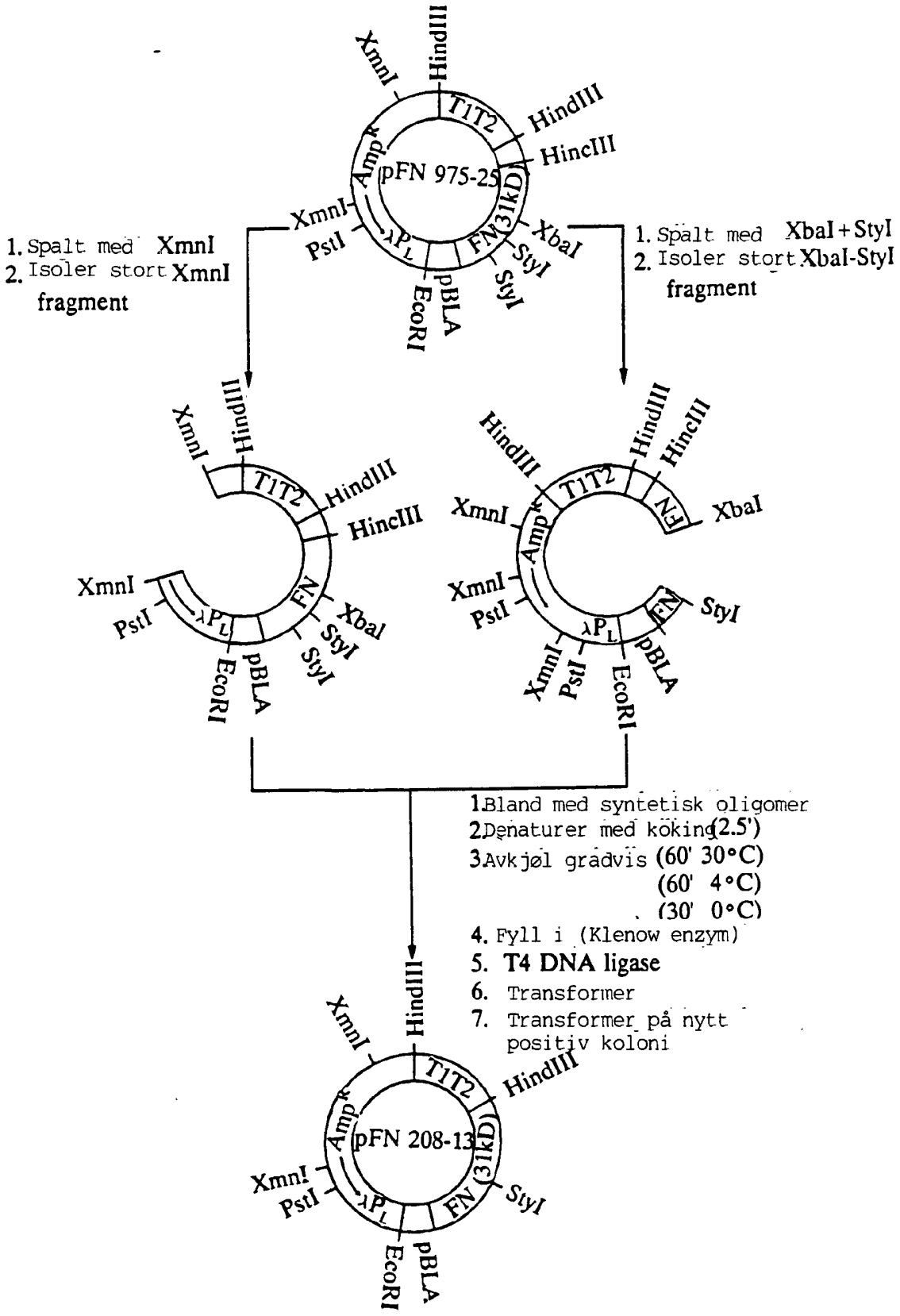
Figur 21



Figur 22


A
3.89
12.86
17.56
19.88
21.59
24.16
25.96
38.47
C
1.28
5.86
8.35
14.25
15.58
17.86
21.51
24.68
26.32
B
24.08
Stopp 1
D
17.99
21.53
24.17
Stopp 1
E
18.83
21.59
24.58

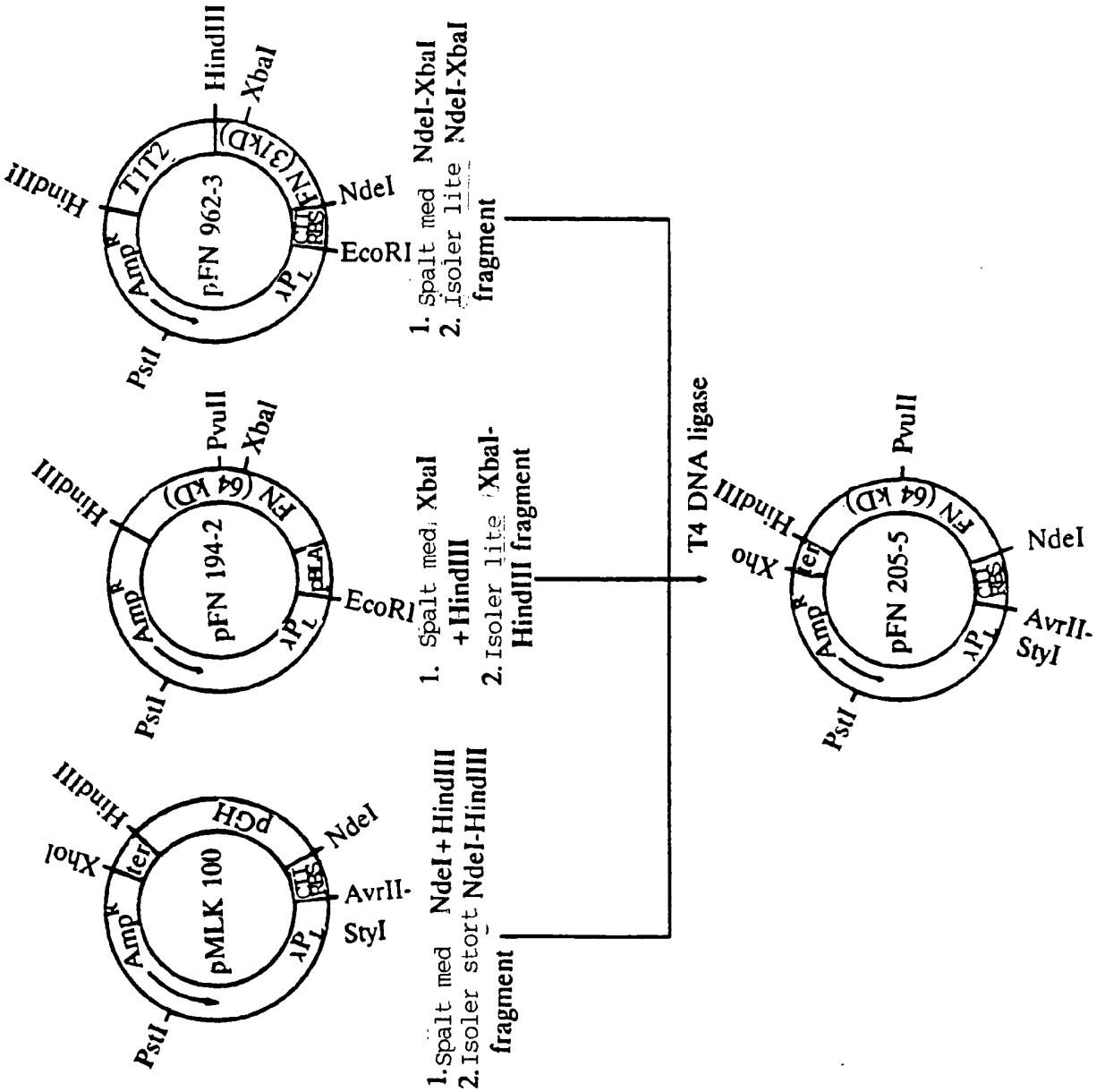
Figur 23


pFN 975-25
1. Spalt med XmnI
2. Isoler stort XmnI fragment
1. Spalt med XbaI+StyI
2. Isoler stort XbaI-StyI fragment
1. Bland med syntetisk oligomer
2. Denaturer med koking (2.5')
3. Avkjøl gradvis (60' 30°C)
(60' 4°C)
(30' 0°C)
4. Fyll i (Klenow enzym)
5. T4 DNA ligase
6. Transformer
7. Transformer på nytt positiv koloni
pFN 208-13

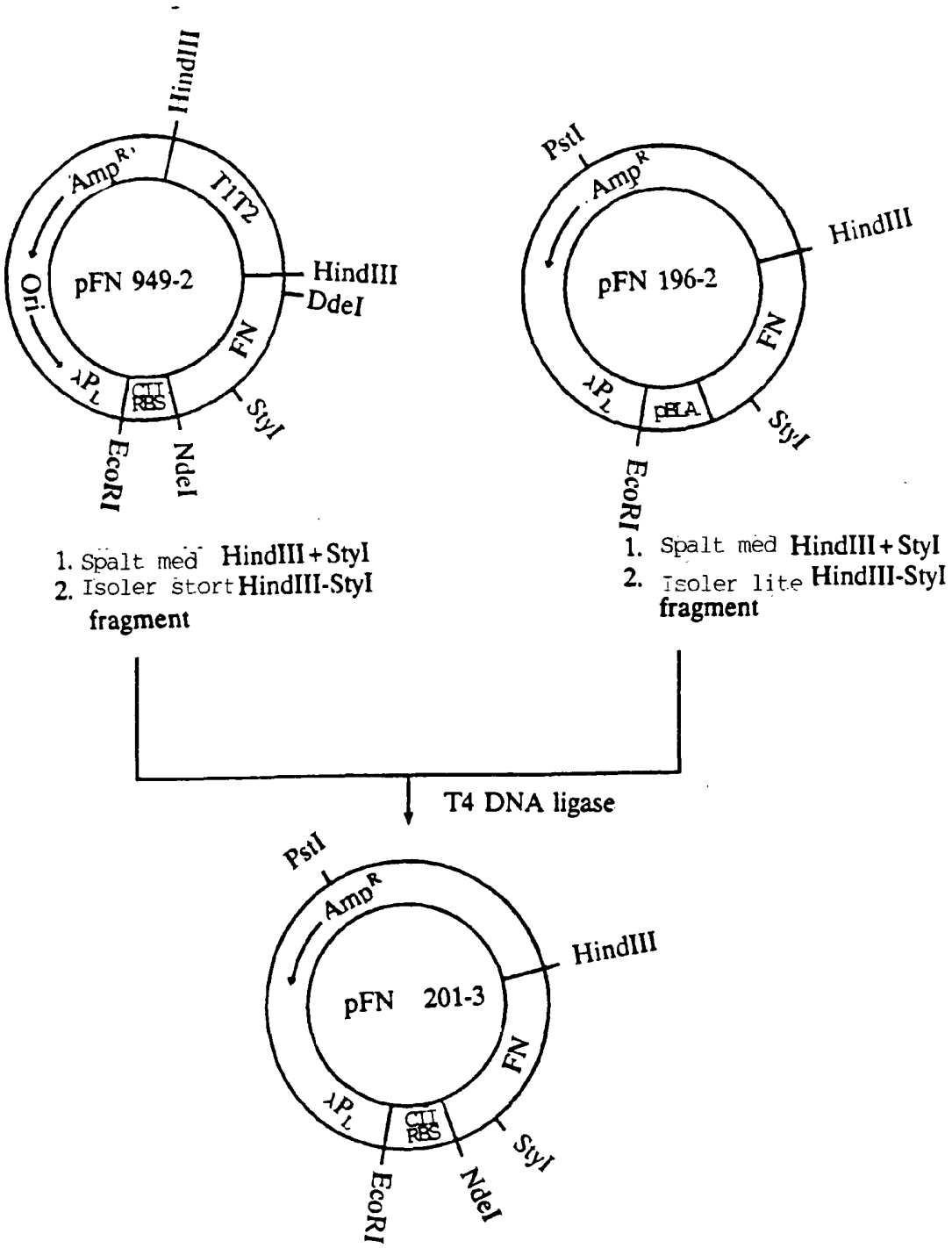
Figur 24

5' GCCCATAGCTGAAAAGTAATTTGATCATGCTGC 3'

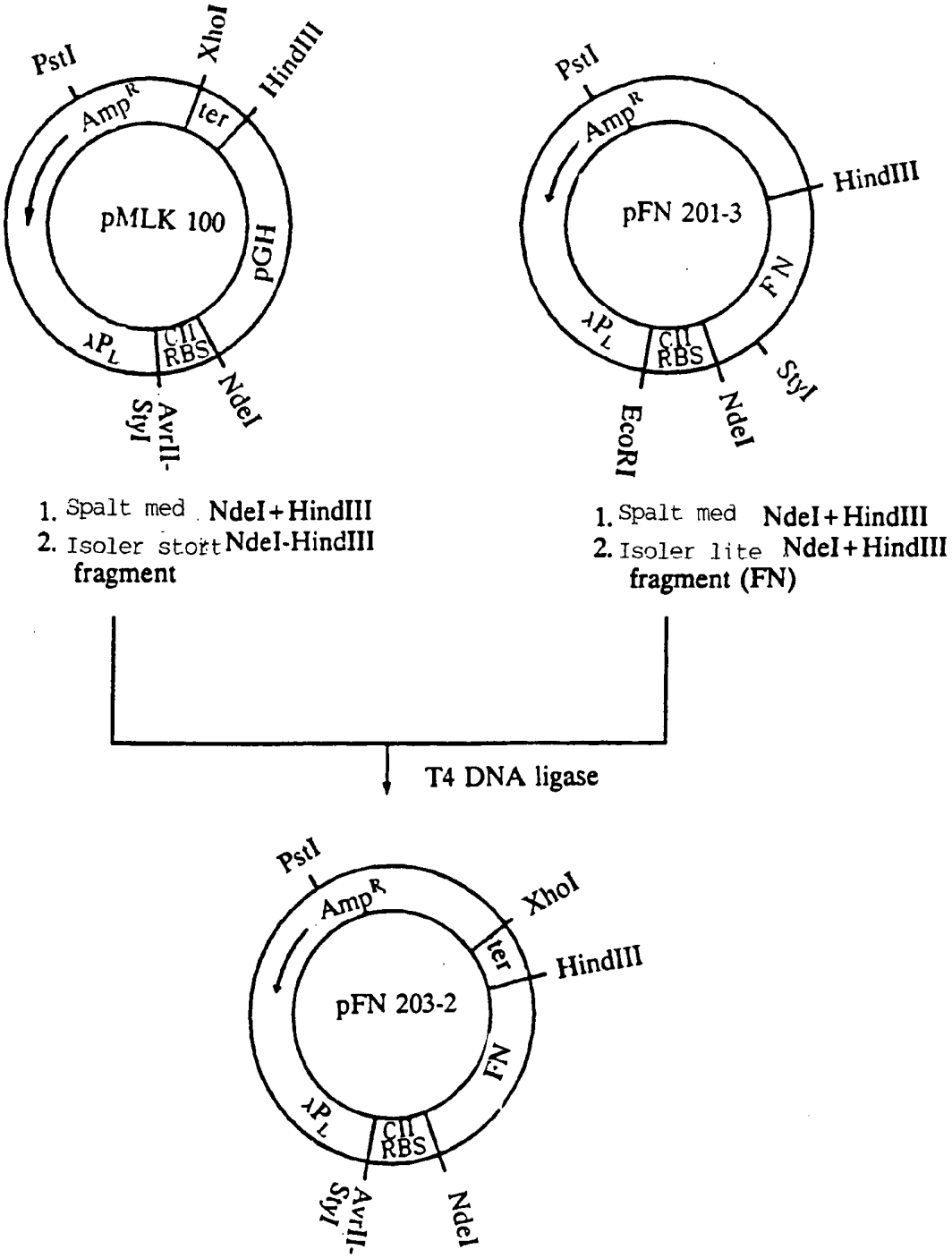
Figur 25

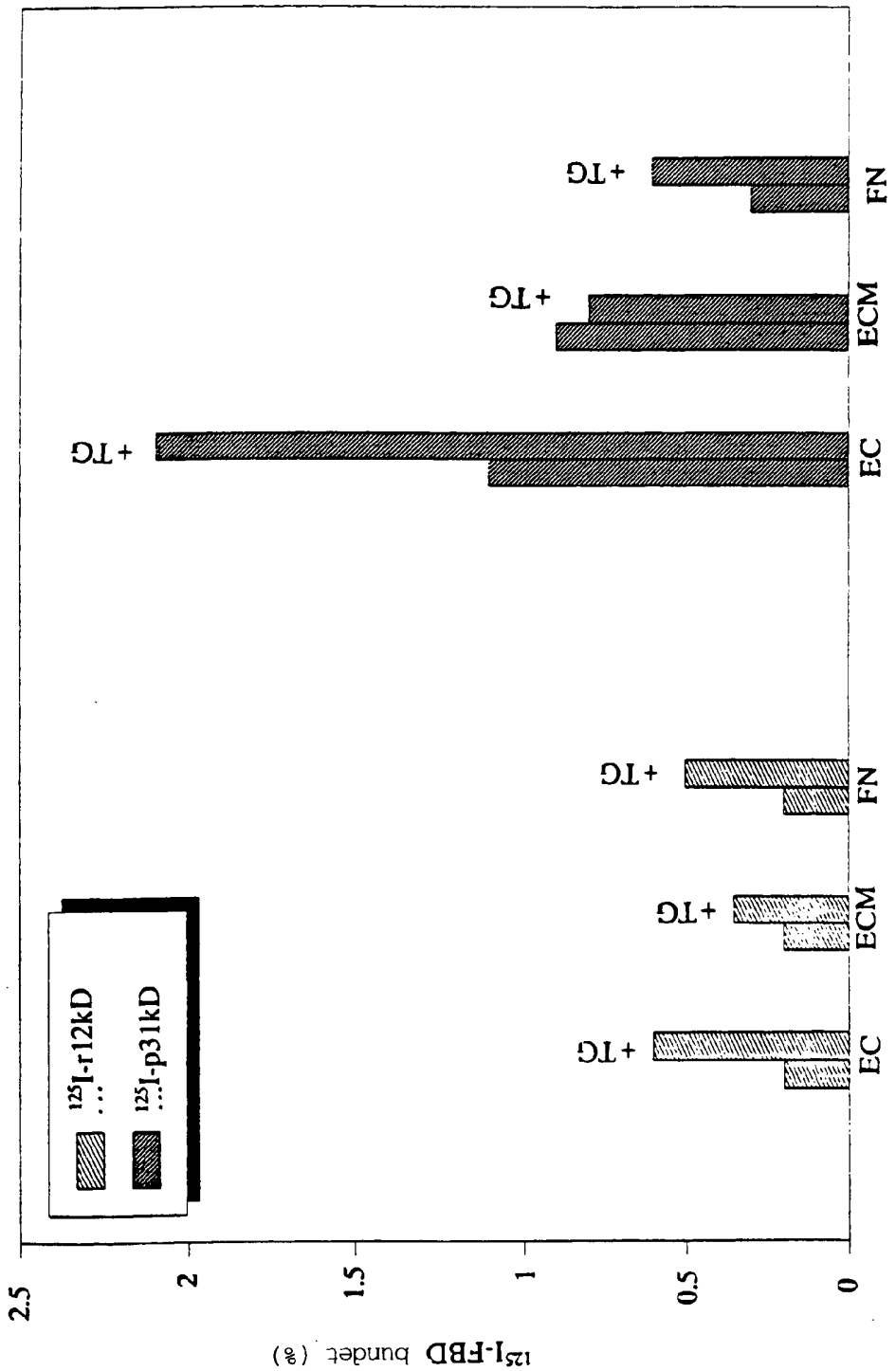

pFN 962-3
HindIII
XbaI
NdeI
EcoRI
PstI
Amp
T1T2
FN (31kD)
1. Spalt med NdeI-XbaI
2. Isoler lite NdeI-XbaI fragment
pFN 194-2
PvuII
XbaI
EcoRI
PstI
Amp
FN (64 kD)
1. Spalt med XbaI +HindIII
2. Isoler lite XbaI-HindIII fragment
pMLK 100
HindIII
XhoI
NdeI
AvrII-StyI
PstI
Amp
pGH
1. Spalt med NdeI+HindIII
2. Isoler stort NdeI-HindIII fragment
T4 DNA ligase
pFN 205-5
PvuII
HindIII
Xho
NdeI
AvrII-StyI
PstI
Amp
FN (64 kD)

Figur 26


HindIII
Amp^R
T1T2
pFN 949-2
HindIII
DdeI
Ori
FN
λP_L
cII RBS
StyI
EcoRI
NdeI
1. Spalt med HindIII + StyI
2. Isoler stort HindIII-StyI fragment
PstI
Amp^R
pFN 196-2
HindIII
FN
λP_L
pBLA
StyI
EcoRI
1. Spalt med HindIII + StyI
2. Isoler lite HindIII-StyI fragment
T4 DNA ligase
PstI
Amp^R
pFN 201-3
HindIII
FN
λP_L
cII RBS
StyI
EcoRI
NdeI

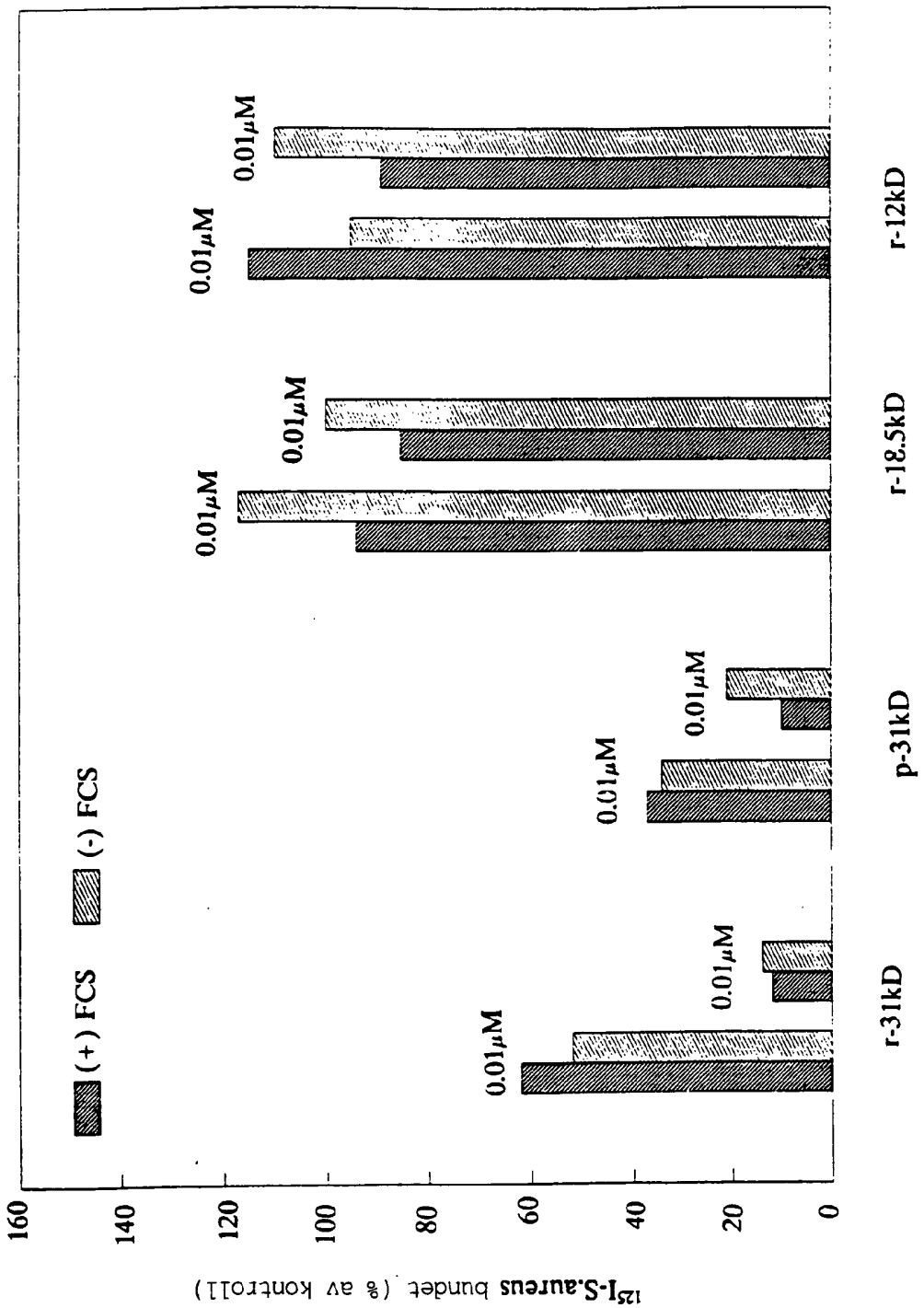
Figur 27


PstI
XhoI
HindIII
Amp^R
ter
pMLK 100
pGH
λP_L
CII RBS
NdeI
AvrII-StyI
PstI
Amp^R
HindIII
pFN 201-3
FN
λP_L
CII RBS
StyI
EcoRI
NdeI
1. Spalt med NdeI+HindIII
2. Isoler stort NdeI-HindIII fragment
1. Spalt med NdeI+HindIII
2. Isoler lite NdeI+HindIII fragment (FN)
T4 DNA ligase
PstI
Amp^R
XhoI
ter
HindIII
pFN 203-2
FN
λP_L
CII RBS
AvrII-StyI
NdeI

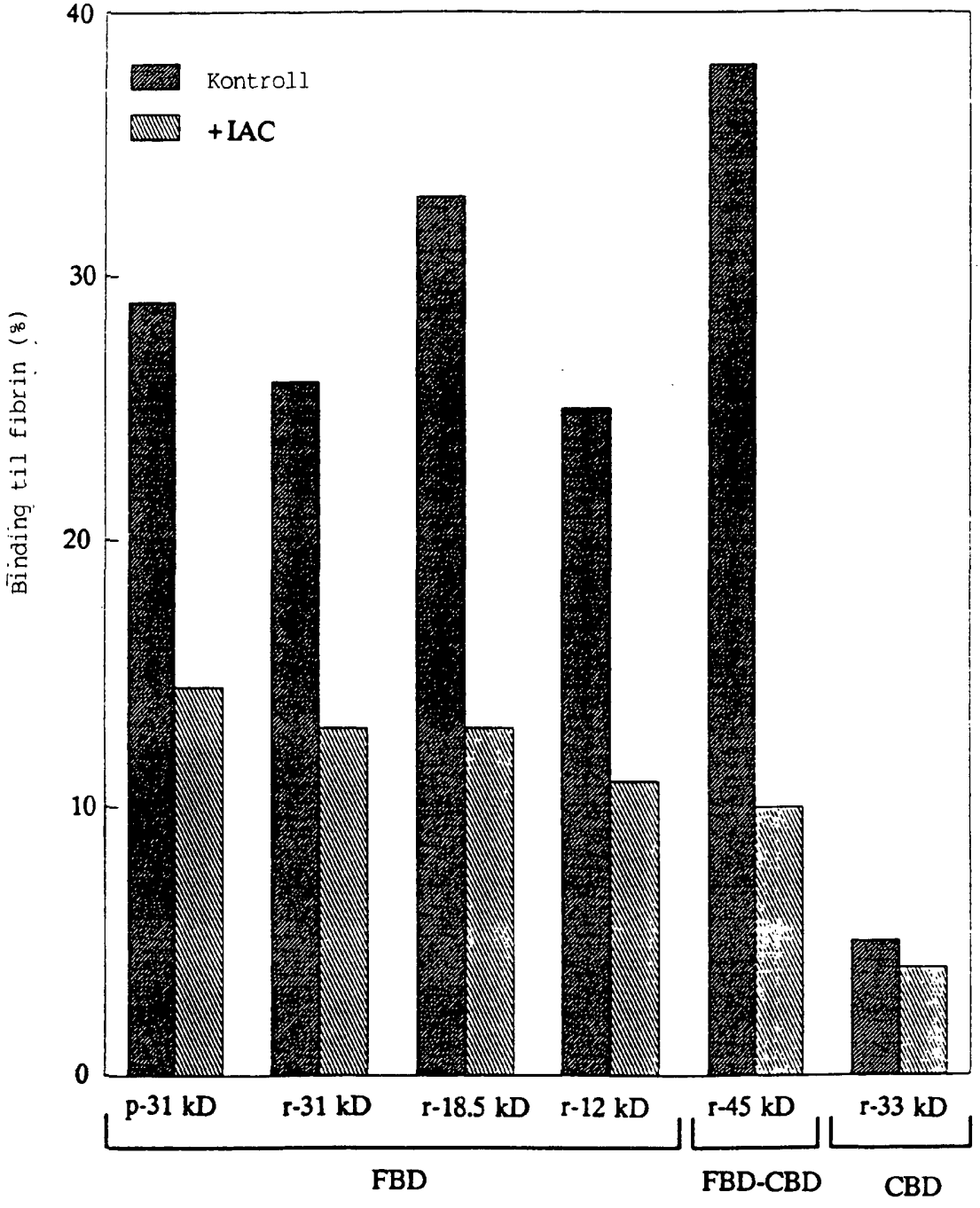

^{125}I-r12kD
^{125}I-p31kD
^{125}I-FBD bundet (%)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
EC
ECM
FN
+TG
+TG
+TG
+TG
+TG
+TG

Figur 28

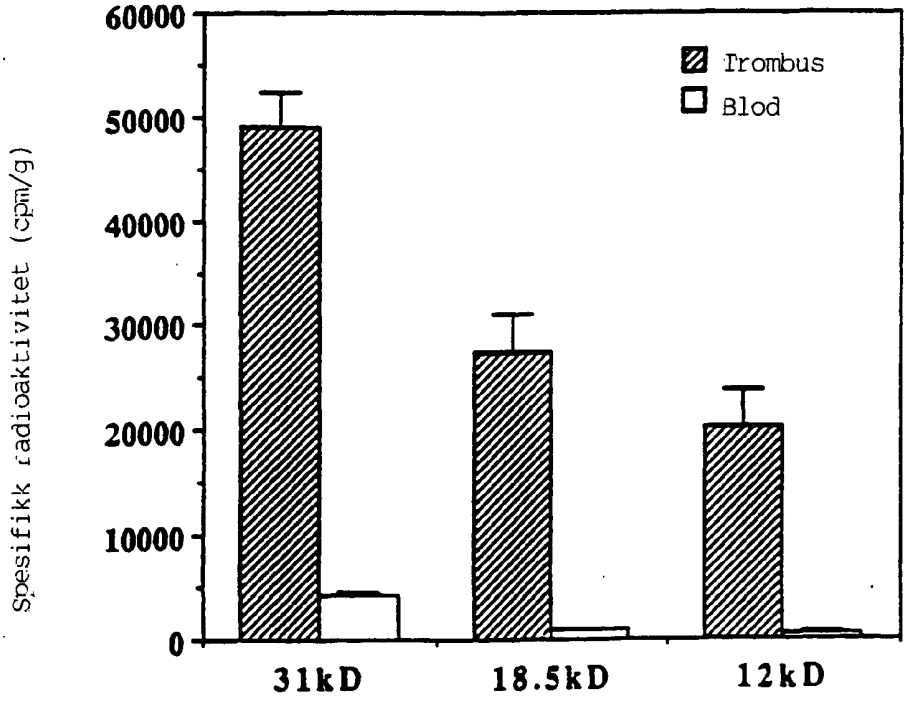
Figur 29


160
140
120
100
80
60
40
20
0
(+) FCS
(-) FCS
0.01µM
r-31kD
p-31kD
r-18.5kD
r-12kD

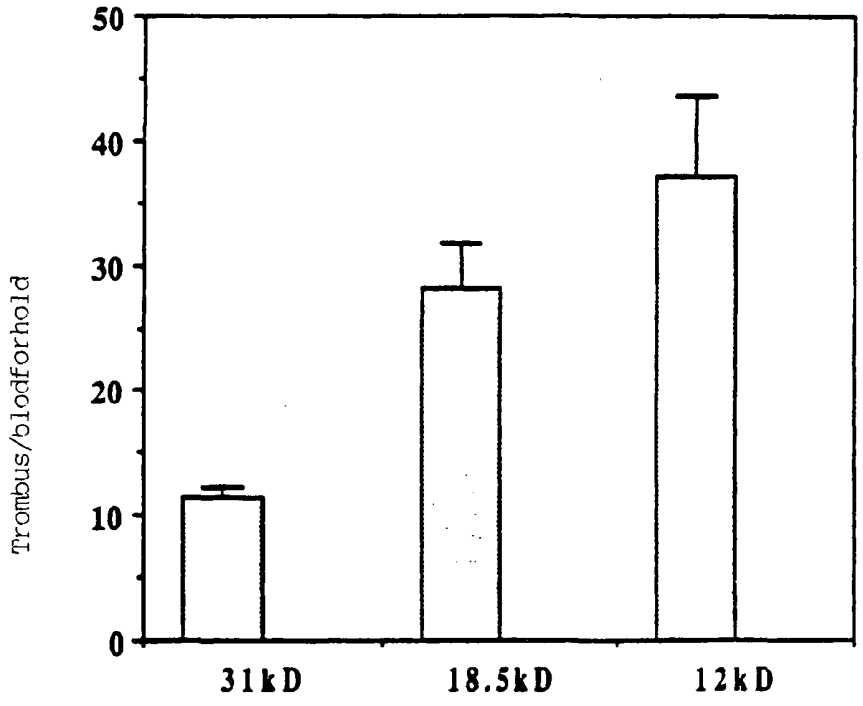
Figur 30


40
30
20
10
0
Binding til fibrin (%)
Kontroll
+IAC
p-31 kD
r-31 kD
r-18.5 kD
r-12 kD
r-45 kD
r-33 kD
FBD
FBD-CBD
CBD

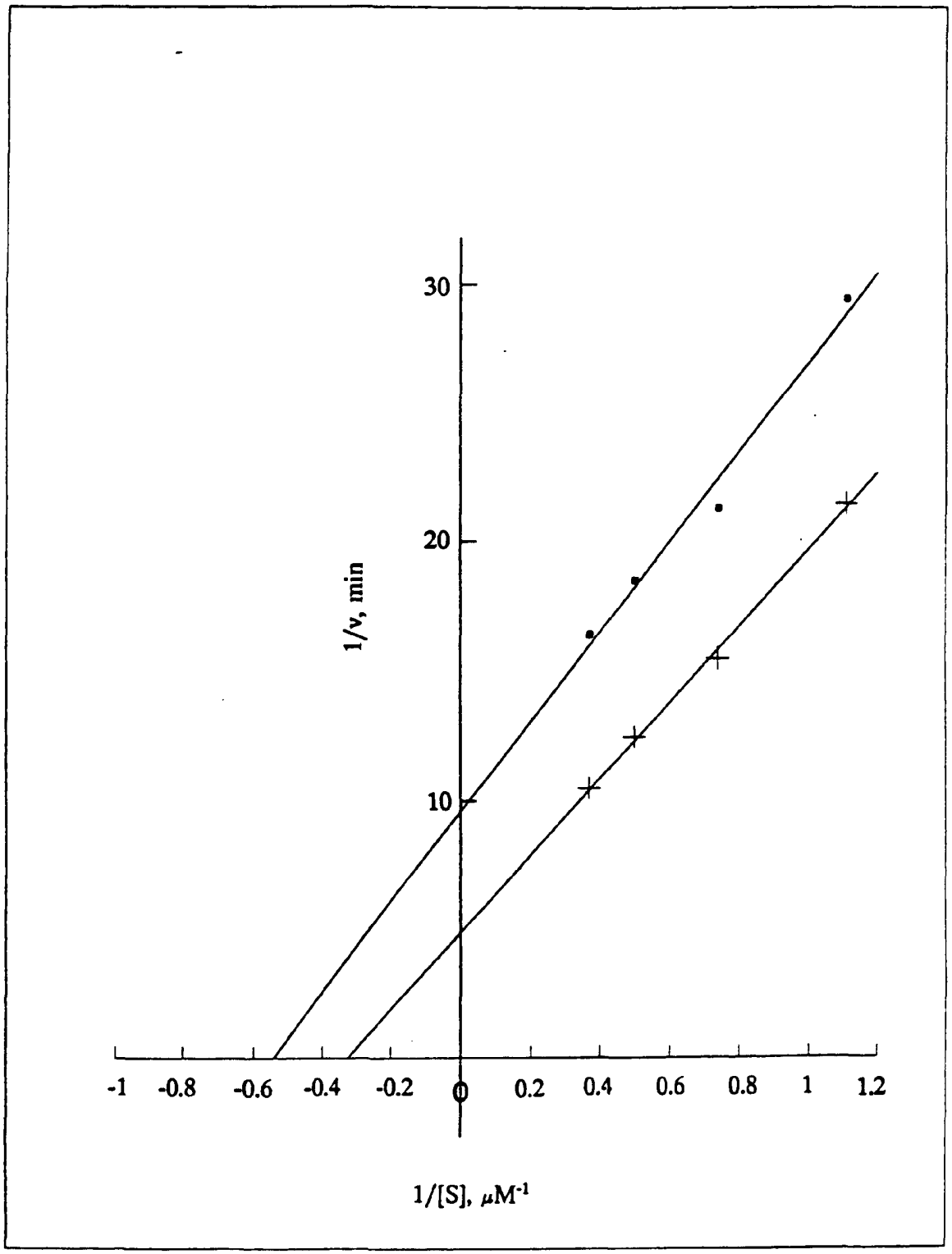
Figur 31


60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Spesifikk radioaktivitet (cpm/g)
Trombus
Blod
31kD
18.5kD
12kD

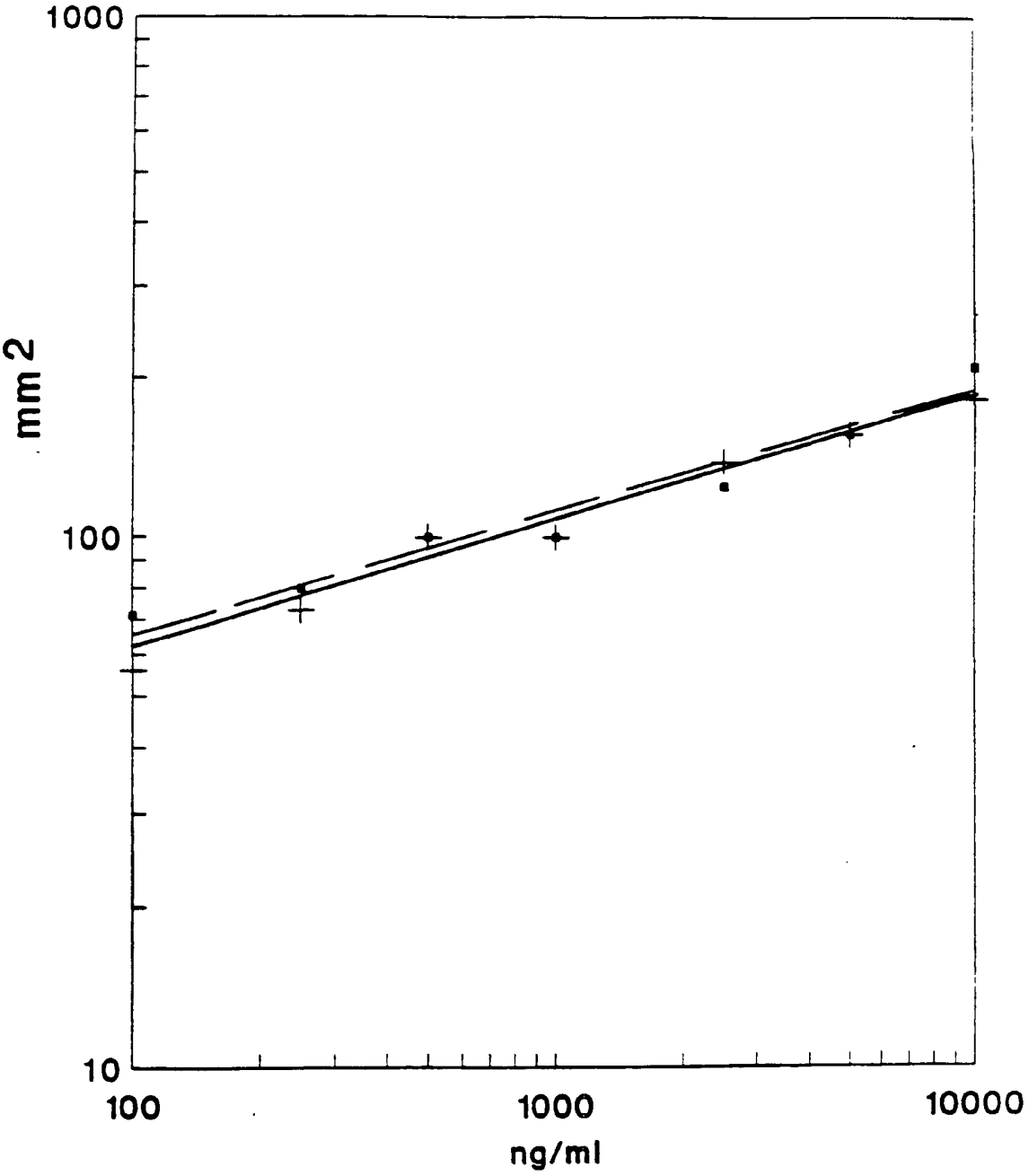
Figur 32



Figur 33



Figur 34



Figur 35

