



(12) Ausschließungspatent

Ertelt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 273 285 A5

4(51) C 12 N 15/00
C 12 P 21/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 N / 314 106 2	(22)	28.03.88	(44)	08.11.89
(31)	P3710309.1	(32)	28.03.87	(33)	DE
	P3710430.6		28.03.87		
	P3/10364.4		28.01.87		
	P3737367.6		03.11.87		
(71)	siehe (73)				
(72)	Hauptmann, Rudolf, Dr., AT; Maurer-Fogy, Ingrid, Dr., AT; Bodo, Gerhard, Prof. Dr., AT; Swetly, Peter, Prof. Dr., AT; Stratowa, Christian, Dr., AT; Falkner, Edgar, Dr. Dipl.-Ing., AT; Adolf, Günther, Dr., AT; Reuteling-parger, Christian M. P., NL				
(73)	Boehringer Ingelheim International GmbH, 6507 Ingelheim am Rhein, DE				
(74)	Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD				

(54) Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden/Proteinen im wesentlichen mit den Eigenschaften der vascular-antikoagulierenden Proteine und deren Verwendung

(55) Proteine, vascular-antikoagulierend, Herstellung-gentechnisch, blutgerinnungshemmend, antiinflammatorisch, antirheumatisch, Thrombin-inhibierend, blutkonservierend, Lipocortinindikationen, Antikörper monoklonal

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden/Proteinen im wesentlichen mit den Eigenschaften der vascular-antikoagulierenden Proteine, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

- a) eine DNA, die für Polypeptide/Proteine im wesentlichen mit den Eigenschaften der vascular antikoagulierenden Proteine kodiert, hergestellt,
- b) diese DNA in einen Vektor eingefügt,
- c) ein geeigneter Wirtsorganismus mit genetischen Informationen, kodierend für ein VAC-Protein transformiert,
- d) die Information zur Produktion des VAC-Proteins im Wirtsorganismus exprimiert und
- e) das VAC-Protein isoliert wird.

Die Proteine werden als blutgerinnungshemmende, antiinflammatorische, antirheumatische, Thrombin-inhibierende für Lipocortinindikationen geltende und blutkonservierende Mittel sowie zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet.

Berlin, den 4.5.1989

70 327/11/35

- 160

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden/Proteinen und gegebenenfalls deren pharmazeutisch tolerierbaren Salzen, im wesentlichen mit den Eigenschaften der vascular-antikoagulierenden Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) aus einer genomischen DNA-Bibliothek das für Polypeptide/Proteine im wesentlichen mit den Eigenschaften der vascular-antikoagulierenden Proteine kodierende Gen isoliert oder aus der zu diesem Gen gehörenden mRNA eine komplementäre für dieses Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase herstellt oder die für dieses Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe chemisch und/oder enzymatischer Verfahren herstellt;
 - b) in eine mit Restriktionsendonukleasen geschnittene Vektor-DNA, die gegebenenfalls Expressionskontrollsequenzen enthält, eine mit entsprechenden Enden versehene DNA, die für ein Polypeptid mit im wesentlichen den Eigenschaften von vascular-antikoagulierenden Proteinen kodiert, so einfügt, daß gegebenenfalls die Expressionskontrollsequenzen die eingefügte DNA reguliert;
 - c) einen geeigneten Wirtsorganismus mit dem Vektor, der die genetischen Informationen kodierend für ein VAC-Protein enthält, transformiert;
 - d) die Information zur Produktion des VAC-Proteins im Wirtsorganismus exprimiert und
 - e) das VAC-Polypeptid/Protein isoliert und gegebenenfalls in dessen pharmazeutisch tolerierbare Salze überführt.

273 285

- 161 -

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in den Vektor einzufügende DNA der Formel

ATG GCA CAG GTT CTC AGA GGC ACT GTG ACT GAC TTC CCT GGA TTT
GAT GAG CGG GCT GAT GCA XXX ACT CTT CGG AAG GCT ATG AAA GGC
TTG GGC ACA GAT GAG GAG AGC ATC CTG ACT CTG TTG ACA TCC CGA
AGT AAT GCT CAG CGC CAG GAA ATC TCT GCA GCT TTT AAG ACT CTG
TTT GGC AGG GAT CTT CTG GAT GAC CTG AAA TCA GAA CTA ACT GGA
AAA TTT GAA AAA TTA ATT GTG GCT CTG ATG AAA CCC TCT CGG CTT
TAT GAT GCT TAT GAA CTG AAA CAT GCC TTG AAG GGA GCT GGA ACA
AAT GAA AAA GTA CTG ACA GAA ATT ATT GCT TCA AGG ACA CCT GAA
GAA CTG AGA GCC ATC AAA CAA GTT TAT GAA GAA GAA TAT GGC TCA
AGC CTG GAA GAT GAC GTG GTG GGG GAC ACT TCA GGG TAC TAC CAG
CGG ATG TTG GTG GTT CTC CTT CAG GCT AAC AGA GAC CCT GAT GCT
GGA ATT GAT GAA GCT CAA GTT GAA CAA GAT GCT CAG GCT TTA TTT
CAG GCT GGA GAA CTT AAA TGG GGG ACA GAT GAA GAA AAG TTT ATC
ACC ATC TTT GGA ACA CGA AGT GTG TCT CAT TTG AGA AAG GTG TTT
GAC AAG TAC ATG ACT ATA TCA GGA TTT CAA ATT GAG GAA ACC ATT
GAC CGC GAG ACT TCT GGC AAT TTA GAG CAA CTA CTC CTT GCT GTT

GTG AAA TCT ATT CGA AGT ATA CCT GCC TAC CTT GCA GAG ACC CTC
TAT TAT GCT ATG AAG GGA GCT GGG ACA GAT GAT CAT ACC CTC ATC
AGA GTC ATG GTT TCC AGG AGT GAG ATT GAT CTG TTT AAC ATC AAG
AAG GAG TTT AGG AAG AAT TTT GCC ACC TCT CTT TAT TCC ATG ATT
AAG GGA GAT ACA TCT GGG GAC TAT AAG AAA GCT CTT CTG CTG CTC
TGT GGA GAA GAT GAC TAA

entspricht, wobei XXX für GAA oder GAC steht und degenerierte Formen dieser DNA.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in den Vektor einzufügende DNA der Formel

ATG GCC TGG TGG AAA GCC TGG ATT GAA CAG GAG GGT GTC ACA GTG
AAG AGC AGC TCC CAC TTC AAC CCA GAC CCT GAT GCA GAG ACC CTC
TAC AAA GCC ATG AAG GGG ATC GGG ACC AAC GAG CAG GCT ATC ATC
GAT GTG CTC ACC AAG AGA AGC AAC ACG CAG CGG CAG CAG ATC GCC
AAG TCC TTC AAG GCT CAG TTC GGC AAG GAC CTC ACT GAG ACC TTG
AAG TCT GAG CTC AGT GGC AAG TTT GAG AGG CTC ATT GTG GCC CTT
ATG TAT CCG CCA TAC AGA TAC GAA GCC AAG GAG CTG CAT GAC GCC
ATG AAG GGC TTA GGA ACC AAG GAG GGT GTC ATC ATT GAG ATC CTG

GCC TCT CGG ACC AAG AAC CAG CTG CGG GAG ATA ATG AAG GCG TAT
 GAG GAA GAC TAT GGG TCC AGC CTG GAG GAG GAC ATC CAA GCA GAC
 ACA AGT GGC TAC CTG GAG AGG ATC CTG GTG TGC CTC CTG CAG GGC
 AGC AGG GAT GAT GTG AGC AGC TTT GTG GAC CCG GCA CTG GCC CTC
 CAA GAC GCA CAG GAT CTG TAT GCG GCA GGC GAG AAG ATT CGT GGG
 ACT GAT GAG ATG AAA TTC ATC ACC ATC CTG TGC ACG CGC AGT GCC
 ACT CAC CTG CTG AGA GTG TTT GAA GAG TAT BAG AAA ATT GCC AAC
 AAG AGC ATT GAG GAC AGC ATC AAG AGT GAG ACC CAT GGC TCA CTG
 GAG GAG GCC ATG CTC ACT GTG GTG AAA TGC ACC VAA AAC CTC CAC
 AGC TAC TTT GCA GAG AGA CTC TAC TAT GGC ATG AAG GGA GCA GGG
 ACG CGT GAT GGG ACC CTG ATA AGA AAC ATC GTT TCA AGG AGC GAG
 ATT GAC TTA AAT CTT ATC AAA TGT CAC TTC AAG AAG ATG TAC GGC
 AAG ACC CTC AGC AGC ATG ATC ATG GAA GAC ACC AGC GGC GAC TAC
 AAG AAC GCC CTG CTG AGC CTG GTG GGC AGC GAC CCC TGA

entspricht und degenerierte Formen dieser DNA.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in den Vektor einzufügende DNA der Formel

ATG GCA CAG GTT CTC AGA GGC ACT GTG ACT GAC TTC CCT GGA TTT

GAT GAG CGG GCT GAT GCA XXX ACT CTT CGG AAG GCT ATG AAA GGC
 TTG GGC ACA GAT GAG GAG AGC ATC CTG ACT CTG TTG ACA TCC CGA
 AGT AAT GCT CAG CGC CAG GAA ATC TCT GCA GCT TTT AAG ACT CTG
 TTT GGC AGG GAT CTT CTG GAT GAC CTG AAA TCA GAA CTA ACT GGA
 AAA TTT GAA AAA TTA ATT GTG GCT CTG ATG AAA CCC TCT CGG CTT
 TAT GAT GCT TAT GAA CTG AAA CAT GCC TTG AAG GGA GCT GGA ACA
 AAT GAA AAA GTA CTG ACA GAA ATT ATT GCT TCA AGG ACA CCT GAA
 GAA CTG AGA GCC ATC AAA CAA GTT TAT GAA GAA GAA TAT GGC TCA
 AGC CTG GAA GAT GAC GTG GTG GGG GAC ACT TCA GGG TAC TAC CAG
 CGG ATG TTG GTG GTT CTC CTT CAG GCT AAC AGA

entspricht, wobei gegebenenfalls XXX für GAA oder GAC
 steht und/oder nach dem letzten AGA ein Stop-Codon steht
 und degenerierte Formen dieser DNA.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in den Vektor einzufügende DNA der Formel

GAC CCT GAT GCT

GGA ATT GAT GAA GCT CAA GTT GAA CAA GAT GCT CAG GCT TTA TTT
 CAG GCT GGA GAA CTT AAA TGG GGG ACA GAT GAA GAA AAG TTT ATC
 ACC ATC TTT GGA ACA CGA AGT GTG TCT CAT TTG AGA AAG GTG TTT

GAC AAG TAC ATG ACT ATA TCA GGA TTT CAA ATT GAG GAA ACC ATT
GAC CGC GAG ACT TCT GGC AAT TTA GAG CAA CTA CTC CTT GCT GTT
GTG AAA TCT ATT CGA AGT ATA CCT GCC TAC CTT GCA GAG ACC CTC
TAT TAT GCT ATG AAG GGA GCT GGG ACA GAT GAT CAT ACC CTC ATC
AGA GTC ATG GTT TCC AGG AGT GAG ATT GAT CTG TTT AAC ATC AGG
AAG GAG TTT AGG AAG AAT TTT GCC ACC TCT CTT TAT TCC ATG ATT
AAG GGA GAT ACA TCT GGG GAC TAT AAG AAA GCT CTT CTG CTG CTC
TGT GGA GAA GAT GAC TAA

entspricht, wobei gegebenenfalls vor dem ersten GAC ein
Initiationscodon steht und degenerierte Formen dieser DNA.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die
in den Vektor einzufügende DNA der Formel

ATG GCC TGG TGG AAA GCC TGG ATT GAA CAG GAG GGT GTC ACA GTG
AAG AGC AGC TCC CAC TTC AAC CCA GAC CCT GAT GCA GAG ACC CTC
TAC AAA GCC ATG AAG GGG ATC GGG ACC AAC GAG CAG GCT ATC ATC
GAT GTG CTC ACC AAG AGA AGC AAC ACG CAG CGG CAG CAG ATC GCC
AAG TCC TTC AAG GCT CAG TTC GGC AAG GAC CTC ACT GAG ACC TTG
AAG TCT GAG CTC AGT GGC AAG TTT GAG AGG CTC ATT GTG GCC CTT

ATG TAT CCG CCA TAC AGA TAC GAA GCC AAG GAG CTG CAT GAC GGC
 ATG AAG GGC TTA GGA ACC AAG GAG GGT GTC ATC ATT GAG ATC CTG
 GCC TCT CGG ACC AAG AAC CAG CTG CGG GAG ATA ATG AAG GCG TAT
 GAG GAA GAC TAT GGG TCC AGC CTG GAG GAG GAC ATC CAA GCA GAC
 ACA AGT GGC TAC CTG GAG AGG ATC CTG GTG TGC CTC CTG CAG GGC
 AGC AGG

entspricht, wobei gegebenenfalls nach dem letzten AGG ein Stopcodon steht und degenerierte Formen dieser DNA.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in den Vektor einzufügende DNA der Formel

GAT GAT GTG AGC AGC TTT GTG GAC CCG GCA CTG GCC CTC
 CAA GAC GCA CAG GAT CTG TAT GCG GCA GGC GAG AAG ATT CGT GGG
 ACTGAT GAG ATG AAA TTC ATC ACC ATC CTG TGC ACG CGC AGT GCC
 ACT CAC CTG CTG AGA GTG TTT GAA GAG TAT GAG AAA ATT GCC AAC
 AAG AGC ATT GAG GAC AGC ATC AAG AGT GAG ACC CAT GGC TCA CTG
 GAG GAG GCC ATG CTC ACT GTG GTG AAA TGC ACC CAA AAC CTC CAC
 AGC TAC TTT GCA GAG AGA CTC TAC TAT GCC ATG AAG GGA GCA GGG
 ACG CGT GAT GGG ACC CTG ATA AGA AAC ATC GTT TCA AGG AGC GAG

ATT GAC TTA AAT CTT ATC AAA TGT CAC TTC AAG AAG ATG TAC GGC
 AAG ACC CTC AGC AGC ATG ATC ATG GAA GAC ACC AGC GGC GAC TAC
 AAG AAC GCC CTG CTG AGC CTG GTG GGC AGC GAC CCC TGA

entspricht, wobei gegebenenfalls vor dem ersten GAT ein Initiationscodon steht und degenerierte Formen dieser DNA,

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in den Abschnitt der DNA, der für die Linker-Sequenz zwischen der zweiten und dritten Repeat-Struktur kodiert, ein Oligonukleotid eingefügt wird, das für eine Erkennungssequenz einer spezifischen Protease kodiert.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA das für Arginin +161 (VAC- α) bzw. +167 (VAC- β) kodierende Tripletts ersetzt wird durch ein Codon, das für eine Aminosäure kodiert, die nicht von Trypsin als bevorzugte Spaltstelle erkannt wird, beispielsweise für Histidin.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA die für Lysin und/oder Arginin kodierenden Tripletts gezielt ersetzt werden durch Tripletts, die für Histidin kodieren.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und 5 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA das oder gegebenenfalls die für Cystein kodierenden Tripletts ersetzt wird/ werden durch für Serin oder Valin kodierende Tripletts.

12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in den Vektor einzufügende DNA für ein Polypeptid/Protein mit Repeat-Bereichen kodiert.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA für eine der Repeat-Bereiche kodiert.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA die für die vollständigen Repeats kodierenden Bereiche umgeordnet sind.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA die für die 17 Aminosäuren der konservierten Region kodierenden Bereiche modifiziert sind.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA die für die 17 Aminosäuren der konservierten Region kodierenden Bereiche vollständig oder teilweise ersetzt werden
 - a. bei den VAC-Proteinen durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren bei den Lipocortinen kodieren,
 - b. bei VAC-alpha durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren des VAC-beta kodieren und umgekehrt,
 - c. bei Lipocortin I durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren des Lipocortins II kodieren und umgekehrt,
 - d. bei den Lipocortinen durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren bei den VAC-Proteinen kodieren oder
 - e. bei den übrigen Polypeptiden/Proteinen durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren der jeweils anderen Polypeptide/Proteine kodieren.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Bereiche der DNA, die für das N-terminale Peptid kodieren, ausgetauscht werden durch Oligonukleotide, die für das N-terminale Peptid eines der anderen, eine Repeat-Struktur aufweisenden Proteine kodiert.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA dem N-terminalen 5'-Ende eine für den jeweiligen Wirt homologe Signalsequenz vorangestellt ist.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA die Signalsequenz am 3'-Ende eine spezifische Erkennungs-Spaltstelle für eine Protease kodiert.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA dem N-terminalen 5'-Ende eine für einen Fusionsproteinanteil kodierende Sequenz vorangestellt ist.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die für den Fusionsproteinanteil kodierende DNA am 3'-Ende eine spezifische Erkennungs-Spaltstelle für eine Protease kodiert.
22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA ein Allel zu einer der in den vorhergehenden Ansprüchen beschriebenen DNA darstellt.

23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eine degenerative Form einer der in den vorhergehenden Ansprüchen beschriebenen DNA darstellt oder daß sie aus Kombinationen verschiedener vollständiger - oder Teil-Sequenzen einer der vorhergehenden Ansprüche besteht, kodierend für Hybridproteine im wesentlichen mit vascular-antikoagulierenden Eigenschaften.
24. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in den Vektor einzufügende DNA mit einem der DNA-Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 23 unter Bedingungen hybridisieren, die eine Homologie größer als 85 %, vorzugsweise größer als 90 %, erkennen lassen, wobei die DNA aus natürlichen, synthetischen oder halbsynthetischen Ursprünge sein kann und mit den DNA-Molekülen nach einem der Ansprüche 1 bis 23 durch Mutation, Nukleotid-Substitutionen, Nukleotid-Deletionen, Nukleotid-Insertionen und Nukleotid-Inversionen verwandt sein kann und für ein Polypeptid/Protein mit im wesentlichen den biologischen Eigenschaften der vascular-antikoagulierenden Proteine kodiert.
25. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Vektor-DNA ein Plasmid ist, replizierbar in Prokaryoten.
26. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Vektor-DNA ein Plasmid ist, replizierbar in Eukaryoten.
27. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Vektor-DNA in Säugetierzellen replizierbar ist.

28. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der transformierte Wirtsorganismus ein Prokaryot, vorzugsweise *E. coli*, ist.
29. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der transformierte Wirtsorganismus ein Eukaryot ist.
30. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der transformierte Wirtsorganismus eine Säugetierzelle ist.
31. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid hergestellt wird, das von einer DNA gemäß einem der Ansprüche 2 bis 23 kodiert wird.
32. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid hergestellt wird, das der Formel

1	5	10	15
Met	Ala	Gln	Val
Leu	Arg	Gly	Thr
Val	Thr	Asp	Phe
Pro	Gly	Phe	
20	25	30	
Asp	Glu	Arg	Ala
Asp	Ala	XX	Thr
Leu	Arg	Lys	Ala
Met	Lys	Gly	
35	40	45	
Leu	Gly	Thr	Asp
Glu	Glu	Ser	Ile
Leu	Thr	Leu	Leu
Thr	Ser	Arg	
50	55	60	
Ser	Asn	Ala	Gln
Arg	Gln	Glu	Ile
Ser	Ala	Ala	Phe
Lys	Thr	Leu	
65	70	75	
Phe	Gly	Arg	Asp
Leu	Leu	Asp	Asp
Leu	Lys	Ser	Glu
Leu	Thr	Gly	
80	85	90	
Lys	Phe	Glu	Lys
Leu	Ile	Val	Ala
Leu	Met	Lys	Pro
Ser	Arg	Leu	

-172-

95	100	105
Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr		
110	115	120
Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu		
125	130	135
Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser		
140	145	150
Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln		
155	160	165
Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Ala		
170	175	180
Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln Ala Leu Phe		
185	190	195
Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile		
200	205	210
Thr Ile Phe Glv Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val Phe		
215	220	225
Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile		
230	235	240
Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val		
245	250	255
Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu		
260	265	270
Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile		

- 173 -

275	280	285
Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg		
290	295	300
Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile		
305	310	315
Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu		
320		
Cys Gly Glu Asp Asp		

entspricht, wobei XX für Glu oder Asp steht und gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 316 vorliegen.

33. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid hergestellt wird, das der Formel

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

-174-

80	85	90
Lys Ser Glu Leu Ser Gly Lys Phe Glu Arg Leu Ile Val Ala Leu		
95	100	105
Met Tyr Pro Pro Tyr Arg Tyr Glu Ala Lys Glu Leu His Asp Ala		
110	115	120
Met Lys Gly Leu Gly Thr Lys Glu Gly Val Ile Ile Glu Ile Leu		
125	130	135
Ala Ser Arg Thr Lys Asn Gln Leu Arg Glu Ile Met Lys Ala Tyr		
140	145	150
Glu Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Glu Asp Ile Gln Ala Asp		
155	160	165
Thr Ser Gly Tyr Leu Glu Arg Ile Leu Val Cys Leu Leu Gln Gly		
170	175	180
Ser Arg Asp Asp Val Ser Ser Phe Val Asp Pro Ala Leu Ala Leu		
185	190	195
Gln Asp Ala Gln Asp Leu Tyr Ala Ala Gly Glu Lys Ile Arg Gly		
200	205	210
Thr Asp Glu Met Lys Phe Ile Thr Ile Leu Cys Thr Arg Ser Ala		
215	220	225
Thr His Leu Leu Arg Val Phe Glu Glu Tyr Glu Lys Ile Ala Asn		
230	235	240
Lys Ser Ile Glu Asp Ser Ile Lys Ser Glu Thr His Gly Ser Leu		
245	250	255
Glu Glu Ala Met Leu Thr Val Val Lys Cys Thr Gln Asn Leu His		

-175-

260	265	270
Ser Tyr Phe Ala Glu Arg Leu Tyr Tyr	Ala Met Lys Gly Ala Gly	
275	280	285
Thr Arg Asp Gly Thr Leu Ile Arg Asn Ile Val Ser Arg Ser	Glu	
290	295	300
Ile Asp Leu Asn Leu Ile Lys Cys His Phe Lys Lys Met Tyr	Gly	
305	310	315
Lys Thr Leu Ser Ser Met Ile Met Glu Asp Thr Ser Gly Asp Tyr		

Lys Asn Ala Leu Leu Ser Leu Val Gly Ser Asp Pro *

entspricht, wobei gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an den Positionen 161 und/oder 206 und/oder 250 und/oder 293 und/oder Aggregationen durch intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den genannten Positionen vorliegen.

34. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid hergestellt wird, das der Formel

1	5	10	15
Met Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe			
20	25	30	
Asp Glu Arg Ala Asp Ala XX Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly			
35	40	45	
Leu Gly Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg			

50	55	60
Ser Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile	Ser Ala Ala Phe Lys Thr	Leu
65	70	75
Phe Gly Arg Asp Leu Leu Asp Asp	Leu Lys Ser Glu Leu Thr	Gly
80	85	90
Lys Phe Glu Lys Leu Ile Val Ala	Leu Met Lys Pro Ser Arg	Leu
95	100	105
Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys His	Ala Leu Lys Gly Ala Gly	Thr
110	115	120
Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile	Ile Ala Ser Arg Thr Pro	Glu
125	130	135
Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val	Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly	Ser
140	145	150
Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly	Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr	Gln
155	160	
Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln	Ala Asn Arg	

entspricht, wobei XX für Glu oder Asp steht und gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen vorliegen.

35. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid hergestellt wird, das der Formel

		5
	X	Asp Pro Asp Ala
10	15	20
Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val	Glu Gln Asp Ala Gln Ala	Leu Phe

25	30	35
Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile		
40	45	50
Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val Phe		
55	60	65
Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile		
70	75	80
Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val		
85	90	95
Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu		
100	105	110
Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile		
115	120	125
Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg		
130	135	140
Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile		
145	150	155
Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu		
160		
Cys Gly Glu Asp Asp *		

entspricht, wobei X für Methionin oder Wasserstoff steht und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 156 vorliegen.

36. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid hergestellt wird, das der Formel

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

Ser Arg

entspricht, wobei gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 161 vorliegen.

37. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid hergestellt wird, das der Formel

	5	10
X	Asp Asp Val Ser Ser Phe Val Asp Pro Ala Leu Ala Leu	
15	20	25
Gln Asp Ala Gln Asp Leu Tyr Ala Ala Gly Glu Lys Ile Arg Gly		
30	35	40
Thr Asp Glu Met Lys Phe Ile Thr Ile Leu Cys Thr Arg Ser Ala		
45	50	55
Thr His Leu Leu Arg Val Phe Glu Glu Tyr Glu Lys Ile Ala Asn		
60	65	70
Lys Ser Ile Glu Asp Ser Ile Lys Ser Glu Thr His Gly Ser Leu		
75	80	85
Glu Glu Ala Met Leu Thr Val Val Lys Cys Thr Gln Asn Leu His		
90	95	100
Ser Tyr Phe Ala Glu Arg Leu Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly		
105	110	115
Thr Arg Asp Gly Thr Leu Ile Arg Asn Ile Val Ser Arg Ser Glu		

120 125 130
 Ile Asp Leu Asn Leu Ile Lys Cys His Phe Lys Lys Met Tyr Gly

135 140 145
 Lys Thr Leu Ser Ser Met Ile Met Glu Asp Thr Ser Gly Asp Tyr

150 155 160
 Lys Asn Ala Leu Leu Ser Leu Val Gly Ser Asp Pro

entspricht, wobei X für Methionin oder Wasserstoff steht und/oder wobei gegebenenfalls intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an den Positionen 40 und/oder 84 und/oder 127 und/oder Aggregationen durch intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den genannten Positionen vorliegen.

38. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid hergestellt wird, das völlig frei von homologen Polypeptiden ist.
39. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid hergestellt wird, das ein Leader-Peptid enthält.
40. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polypeptid hergestellt wird, das
 - a. einen Fusionsproteinanteil enthält und/oder
 - b. aus Teilbereichen der Polypeptide nach einem der vorhergehenden Ansprüche besteht (Hybridproteine) und/oder
 - c. als Dimeres, Trimeres, Tetrameres oder Multimeres vorliegt.
41. Verwendung der nach Anspruch 1 hergestellten Polypeptide/Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß sie zur Herstellung von

- a) blutgerinnungshemmenden Mitteln
oder
- b) antiinflammatorischen Mitteln
oder
- c) antirheumatischen Mitteln
oder
- d) für Lipocortiindikationen geltenden Mitteln
oder
- e) Thrombin-inhibierenden Mitteln
oder
- f) monoklonalen Antikörpern
oder
- g) blutkonservierenden Mitteln

eingesetzt werden.

Hierzu 66 Seiten Zeichnungen

Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden/Proteinen im wesentlichen mit den Eigenschaften der vascular-antikoagulierenden Proteine und deren Verwendung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung wird auf dem Gebiet der Biochemie angewandt.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

In den meisten Säugetieren existieren Proteine, die blutgerinnungsgemmende Eigenschaften aufweisen. Diese Proteine können in drei Gruppen eingeteilt werden, wobei die Einteilung auf den unterschiedlichen Wirkmechanismen beruht.

1. Proteine, die mit dem Gerinnungsfaktor einen Komplex bilden und dadurch den Gerinnungsfaktor unwirksam machen. Dazu gehören die Proteine:
 - a) Antithrombin-III (Throm.Res. 5, 439 - 452 (1974))
 - b) α_1 -Protease Inhibitor (Ann. Rev. Biochem. 52, 655 - 709 (1983))
 - c) α_2 -Makroglobulin (Ann. Rev. Biochem. 52, 655 - 709 (1983))
 - d) C₁-Inhibitor (Biochemistry 20, 2738 - 2743 (1981))
 - e) Protease Nexin (J. Biol. Chem. 258, 10439 - 10444, (1983)).
2. Proteine, die einen Gerinnungsfaktor proteolytisch zerschneiden und dadurch den Gerinnungsfaktor desaktivieren. Als einziges Protein dieser Art ist bisher Protein C beschrieben (J. Biol. Chem. 251, 355 - 363, (1976)).
3. Proteine, die die negativ geladenen Phospholipide ab-

schlimmen und/oder hydrolisieren, so daß die Phospholipid-abhängigen Reaktionen des Blutgerinnungsmechanismus gehemmt werden. Bisher sind nur Phospholipasen, die aus verschiedenen Schlangengiftsorten isoliert wurden, beschrieben worden (Eur. J. Biochem. 112, 25-32 (1980)).

Das stufenweise ablaufende Gerinnungssystem ist in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. Es wird als ein sich verstärkendes Mehrstufensystem verschiedener miteinander verbundener, proteolytischer Reaktionen verstanden, bei dem ein Enzym ein Zymogen in die aktive Form umsetzt (vgl. Jackson C.M., Nemerson Y., Ann. Rev. Biochem. 49, 765-811, (1980)). Die Geschwindigkeit dieser Reaktion wird in entscheidender Weise durch die Anwesenheit von Phospholipiden und anderer Kofaktoren wie Faktor V_a und Faktor $VIII_a$ vergrößert. In vivo werden die Prokoagulationsreaktionen durch verschiedene Inhibitionsmechanismen geregelt, die einem explosiv thrombotischen Trauma nach einer geringen Aktivierung der Gerinnungskaskade vorbeugen.

Die Antigerinnungsmechanismen können wie folgt eingeteilt werden (Rosenberg, R.D., Rosenberg, J.S., J. Clin. Invest. 74, 1-6 (1984)):

1. Der Serin-Protease-Faktor X_a und Thrombin werden infolge ihrer Bindung an Antithrombin III bzw. an den Antithrombin/Heparin-Komplex inaktiviert. Sowohl die Prothrombin-Aktivierung als auch die Bildung von Fibrin kann auf diese Weise gehemmt werden. Neben Anti-thrombin III gibt es noch verschiedene andere Plasma-Protease-Inhibitoren wie beispielsweise α_2 -Makroglobulin und Antitrypsin, deren Wirkung zeitabhängig ist.

2. Die Entdeckung des Protein C's führte zur Aufdeckung eines weiteren Antigerinnungsmechanismus. Ist das Protein C einmal aktiviert worden, wirkt es durch die selektive Proteolyse der Proteinkofaktoren Faktor V_a und VIII_a, durch die die Prothrombinase und das Enzym, das den Faktor X umsetzt, inaktiviert werden, als Antikoagulanz.
3. Plasmin spaltet monomeres Fibrin I, ein Produkt der Einwirkung von Thrombin auf Fibrinogen, wodurch der Bildung eines unlöslichen Fibrins vorgebeugt wird (Nossel, H.L., Nature, 291, 165-167 (1981)).

Von den oben genannten, in den Gerinnungsprozeß eingreifenden körpereigenen Proteinen ist z.Zt. nur das Antithrombin III in klinischem Einsatz. Als erheblicher Nachteil hat sich jedoch die bei der Anwendung dieses Proteins auftretende Erhöhung der Blutungsneigung herausgestellt.

Alle bisher als Antikoagulantien eingesetzten Mittel, ob körpereigener oder synthetischer Natur machen in irgendeiner Weise die Gerinnungsfaktoren unwirksam und führen dadurch zu Nebenwirkungen, die sich nachteilig auf den Gerinnungsprozeß auswirken können.

Überraschenderweise konnten nun neben diesen Proteinen weitere körpereigene Stoffe isoliert werden, die zwar die gewünschten blutgerinnungshemmenden Eigenschaften unter besonderen Bedingungen zeigen, hierbei aber die Blutungsgefahr nicht erhöhen. Bei größeren Blutungen verlieren diese Proteine ihre blutgerinnungshemmenden Eigenschaften und stören dadurch bei deren Verwendung

nicht die in solchen Fällen Überlebensnotwendigen Gerinnungsprozesse. Da sie erstmals isoliert wurden aus stark vaskularisiertem Gewebe, wurden sie "vascular anticoagulating proteins", VAC genannt.

Die aus stark vaskularisierten Geweben wie Nabelschnurgefäßen und Placenta isolierten Proteine weisen Molekulargewichte von ca. 70×10^3 , ca. 60×10^3 , ca. 34×10^3 und ca. 32×10^3 auf, von denen die Substanzen mit den Molekulargewichten 34 respektive 32×10^3 aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen. Die genaue biochemische Charakterisierung dieser Proteine, sowie deren Isolierung und Reinigung findet sich in der EP-A-0 181 465 vom 21. Mai 1986.

Proteine mit VAC Aktivität stellen natürliche Blutgerinnungshemstoffe dar, die bei der Blutgerinnungskaskade an zwei Stellen eingreifen.

Das erste Mal inhibieren sie bei der durch die Faktoren IXa und VIIIa katalysierten Aktivierung des Faktors X zu Xa, das zweite Mal unterbinden sie die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin, die durch die Faktoren Xa und Va vermittelt wird. Beiden Aktivierungsschritten ist gemeinsam, daß sie Kalzium-Ionen und Phospholipide benötigen. Offenbar können VAC-Proteine ebenfalls mit Phospholipiden in Wechselwirkung treten, und durch diese Bindung die Aktivierungsschritte der Gerinnungsfaktoren blockieren.

Ihre Eigenschaften machen die Proteine zu interessanten, pharmakologisch äußerst wertvollen Wirkstoffen. Um sie jedoch in ausreichenden Mengen in hochreiner Form zur Verfügung zu haben ist deren

Herstellung auf anderen als proteinreinigendem Weg aus natürlichem Gewebe erforderlich. Hierzu bietet sich die gentechnische Methode an.

Ziel der Erfindung

Durch die Erfindung wird ein gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden/Proteinen im wesentlichen mit den Eigenschaften der vascular-antikoagulierenden Proteine bereitgestellt, das es ermöglicht, die pharmakologisch äußerst wertvollen Wirkstoffe in ausreichender Menge und hochreiner Form zur Verfügung zu stellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, Proteine mit VAC-Aktivität gentechnisch herzustellen.

Gelöst wurde diese Aufgabe dadurch, daß die Aminosäuresequenz von Teilen der aus stark vaskularisiertem Gewebe isolierten und hochgereinigten Proteine mit VAC-Aktivität (EPA O 181 465) aufgeklärt wurde, anhand dieser Sequenzen synthetische DNA-Sonden hergestellt wurden und hiermit geeignete cDNA-Bibliotheken durchsucht wurden. Nach Isolierung von mit den Sonden hybridisierender cDNA, deren Sequenzbestimmung sowie entsprechender Manipulation wurden diese cDNA in geeigneten Wirtssystemen beispielsweise in Bakterien, Hefen oder Säugetierzellen zur Expression gebracht.

Eines von den gereinigten Proteinen wurde enzymatisch mit Trypsin gespalten. Die entstandenen Peptide wurden aufgetrennt und ausgewählte Fragmente sequenziert. Die Sequenz des N-Terminus widersetzte sich jedoch einer direkten Analyse, da die erste Aminosäure offensichtlich blockiert ist.

Die Sequenzinformationen sind in Fig. 0.1 aufgeführt.

Zur Herstellung einer geeigneten DNA-Sonde sind prinzipiell drei Wege möglich. Ist ein längerer Abschnitt des Proteins, etwa 30 oder mehr Aminosäuren lang, bekannt, besteht die Möglichkeit, unter Beachtung der bevorzugt verwendeten Codons bei Säugern eine

wahrscheinlichste Sequenz für den korrespondierenden mRNA Abschnitt zu erstellen. Eine solche Sonde ist im schlechtesten Fall etwa 66% homolog zur tatsächlichen Sequenz. Dies ist auch der Grund, weshalb die Sonde relativ lang sein müßte, um unter nicht stringenten Bedingungen hybridisieren zu können.

Die zweite Möglichkeit besteht darin, für einen kurzen Peptidabschnitt, ca. sechs bis sieben Aminosäuren lang, alle erdenklichen Variationen an Oligonukleotiden zu synthetisieren. Werden solch komplexe Mischungen beim Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken verwendet, können relativ viel "falsch" positiv reagierende Klone isoliert werden. Außerdem kann das Hybridisierungssignal sehr schwach ausfallen, da das perfekt passende Einzeloligonukleotid nur einen geringen Anteil an der Gesamtmischung ausmacht.

Der dritte Weg umgeht zwar nicht die Variabilität einer Oligonukleotidsonde, sorgt aber durch die Wahl eines speziellen Nukleosidtriphosphats (ITP) dafür, daß an die gesuchte (oder auch "falsche") cDNA alle Moleküle der Sonde binden können. So wurden zu dem Tryptischen Peptid [P30/I] passende 23 Basen lange Oligonukleotide unter Verwendung von Inosintriphosphat synthetisiert.

Wie bereits erwähnt, können VAC-Proteine aus stark vaskularisiertem Gewebe isoliert werden. Gewebe der Wahl sind Nabelschnurgefäße oder Placenta. Daher und da bekannt ist, daß in der Placenta im Gegensatz zu anderen Spezial-Geweben fast alle Gene exprimiert werden, wurden die oben erwähnten DNA-Sonden verwendet, um eine placentale cDNA-Bibliothek die aus placentalen Gewebe in an sich bekannter Weise hergestellt worden war nach cDNA-Molekülen, die für VAC-Proteine kodieren, zu durchsuchen.

Zum Durchsuchen der cDNA-Bibliothek nach für VAC-protein kodierender cDNA wurden entsprechend der Sequenzen des tryptischen Peptides P16/II zwei und des Staph A Peptides P20/I/6 ein Oligonukleotid synthetisiert (Fig.1). Diese Oligonukleotide stellen jeweils eine Mischung aller Varianten dar, die jede Kodierungsmöglichkeit der entsprechenden mRNA berücksichtigen. EBI-386 weist bei einer Kettenlänge von 20 Nukleotiden 512 Variationen auf und paßt zu dem Staph-A Peptid P20/I/6. Um die Variation bei dem Oligonukleotid für das tryptische Peptid P16/II niedriger zu halten, wurden zwei Oligonukleotide (20-mere) synthetisiert: EBI-387: 128 Variationen, EBI-388: 64 Variationen.

Weiters wurden zu dem tryptischen VAC-Peptid P30/I passend zwei Oligonukleotide unter Verwendung von Desoxyinosin als Base bei "Wobble" Positionen synthetisiert (Fig.2): EBI-118 und EBI-119. Diese Substitution wurde von E. Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260/5 (1985), pp.2605-2608, sowie Y. Takahashi et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (1985) pp.1931-1935, beschrieben. Inosin basenpaart gut mit Cytosin, stört jedoch kaum die Ausbildung der Doppel-helix, wenn andere Nukleotide als Partner angeboten werden.

Nachdem jedes dieser Oligonukleotide in bekannter Weise radioaktiv markiert worden war, wurden Abzüge von Phagen-Platten hiermit nach bekannten Verfahren hybridisiert.

Aus der Hybridisierung mit EBI-386, -387 und -388 resultierten die Phagen Lambda-P11/3, Lambda-P6/5, Lambda-P6/6. Die Hybridisierung mit EBI-118 und -119 resultierte in den Phagen Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22.

Die aus den Phagen isolierten DNAs wurden mit EcoRI geschnitten und die entstehenden Fragmente isoliert. Die cDNA Inserts der Klone Lambda-P11/3, Lambda-P6/5 und Lambda-P6/6 hatten Größen von etwa 1300 bis 1400 bp. Die Sequenzanalyse zeigte, daß alle drei Klone von ein und derselben mRNA abgeleitet waren. Das 5'Ende der mRNA fehlte jedoch in den cDNAs. Die Inserts der Phagen Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22 hatten Längen von ca. 1600, 1100 und 1000 bp. Die Sequenzanalyse ließ eine annähernd vollständige cDNA vermuten.

Die cDNAs der beiden Phagengruppen Lambda-P11/3, Lambda-P6/5 und Lambda-P6/6 sowie Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22 sind von zwei verschiedenen mRNAs abgeleitet, wie die Sequenzanalyse ergab. Die EcoRI Inserts der drei Klone Lambda-P11/3, Lambda-P6/5 und Lambda-P6/6 wurden isoliert und in den EcoRI-geschnittenen Bluescribe M13⁺ Vektor ligiert (Vector Cloning Systems, 3770 Tansy Street, San Diego, CA 92121, USA). Die resultierenden Klone wurden pP6/5, pP6/6 und pP11/3 genannt.

Die EcoRI Inserts der drei Klone Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22 wurden isoliert und in den EcoRI-geschnittenen Bluescribe M13⁺ Vektor ligiert. Die resultierenden Klone wurden pRH201, pRH202 und pRH203 genannt.

Um weitere cDNA Klone zu erhalten, wurde die humane, plazentale Lambda-gt10 Bibliothek nochmals durchsucht, diesmal mit dem radioaktiv markierten EcoRI-Insert des pP11/3 als Sonde.

Insgesamt wurden 69 positiv reagierende Klone erhalten (Lambda-VAC1 bis Lambda-VAC69).

12 dieser Klone wurden im kleinen Maßstab wie oben beschrieben präpariert, die cDNA Inserts mit Eco RI freigesetzt und isoliert. Dabei zeigte sich, daß das Insert des Klon Lambda-VAC10 den gesamten für VAC Protein kodierenden Leserahmen enthält. Zur Charakterisierung der für VAC-alfa und VAC-beta kodierenden cDNAs wurden ein Northernblot-Experiment, Sequenzanalysen und eine genomische Southernblot-Analyse durchgeführt.

Das Ergebnis ist in Fig.3 abgebildet. Die cDNA des Klon p11/3 hybridisiert an eine mRNA der Größe von etwa 1700 Basen ("VAC-alfa"), die cDNA des Klon PRH 203 an eine mRNA der Größe von etwa 2200 Basen ("VAC-beta").

Da erstens die eingesetzte Radioaktivitätsmenge sowie die aufgetragene Menge mRNA pro Spur etwa gleich war und zweitens die Hybridisierung eines Genom-Blots in derselben Lösung Banden gleicher Intensität mit beiden cDNAs ergab (siehe unten), ist zu schließen, daß die kürzere mRNA ("VAC-alfa") in größeren Mengen als die längere ("VAC-beta") mRNA in Plazenta vertreten ist.

Zur Sequenzanalyse der VAC-alfa cDNA wurden die cDNA Klone pP6/5, pP6/6 und pP11/3 total, sowie die der Klon Lambda-VAC1 bis -12 partiell sequenziert. Das Resultat ist in Fig.4 abgebildet. Es wurden insgesamt 1465 Basen sequenziert. Die cDNA weist einen langen, offenen Leserahmen auf, der für 320 Aminosäuren kodieren kann. Wird die DNA Sequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt, so können alle sequenzierten Peptide der tryptischen Fragmente in dieser Sequenz untergebracht werden (Fig.5). Es handelt sich daher bei dieser cDNA um jene, deren

korrespondierende mRNA für VAC-protein kodiert. Da die Sequenzen der zweiten isolierten cDNA für ein ähnliches, aber von VAC verschiedenes Protein kodiert, wird hier der Name VAC-alfa eingeführt.

Dem ersten ATG-Codon (Basen 35-37) geht im selben Leserahmen ein Stop-Codon voran. Die Basen 30 bis 38 erfüllen ziemlich gut die Kozakregel (M. Kozak, Nature 308 (1984), pp. 241-246), die die Konsensussequenz in der Nähe des Translationsstartcodons mit CC(A/G)CCAUGG angibt, die entsprechende Sequenz hier lautet

3GCTATGG. Die 3' nichttranslatierte Region ist 471 Basen lang. 15 Basen vor Beginn des poly-A Abschnitts befindet sich die Polyadenylierungssequenz AATAAA (N.J.Proudfoot et al., Nature 263 (1976), pp. 211-214). Wird eine Kettenlänge von 150 bis 200 Basen für den Poly-A Abschnitt der mRNA gerechnet, beträgt die Gesamtlänge der mRNA auf Grund der cDNA Sequenz 1600-1650 Basen. Da im Northern Blot Experiment ein höherer Wert bestimmt wurde, ist die 5'nichttranslatierte Region in keiner cDNA komplett enthalten.

(Die cDNA des Klons pP6/5 weist im Gegensatz zu allen anderen cDNA Klonen an Position 100 C statt A auf. Dadurch würde sich das Triplet 98-100 (22. Codon) von GAA nach GAC ändern und für Asp anstelle von Glu kodieren. Diese Abweichung kann mehrere Ursachen haben: a) die Reverse Transkriptase baute ein falsches Nukleotid ein, b) es handelt sich um die Transkripte zweier alleler, an dieser Stelle verschiedener Gene oder c) es gibt zwei nicht allele Gene, die sich an dieser Position unterscheiden.

Der lange, offene Leserahmen kodiert für ein Protein mit 320 Aminosäuren, von dem das Met-1 wahrscheinlich abgespalten, und das folgende Alanin an der Aminogruppe, möglicherweise durch Acylierung, blockiert wird. Das errechnete Molekulargewicht beträgt 35.896 D und ist höher als der Wert nach SDS-PAGE. Allerdings ist der Anteil geladener Aminosäuren (Asp, Glu, Lys, Arg, His) mit 30,6 % (98/320) überdurchschnittlich hoch verglichen mit dem durchschnittlichen Wert von 25,1 %. Dies würde das veränderte Wanderungsverhalten des Proteins bei der SDS-PAGE erklären. Innerhalb der stark geladenen Aminosäuren überwiegen die sauren Aminosäuren (Asp und Glu) mit 54 gegenüber den basischen (Lys und Arg) mit 41. Dies erklärt den sauren, isoelektrischen Punkt des VAC- α Proteins ($pI=4,4$ bis $4,8$) VAC- α enthält nur ein für Cystein codierendes Triplet (Aminosäure-Position 316); eine typische N-Glykosylierungsstelle (Asn-XXX-Ser/Thr) ist nicht vorhanden.

Eine Strukturanalyse der Aminosäuresequenz (modifiziert nach Pustell, J. et al., Nucleic Acids Res. 10 (1982) pp 4765-4782) ergibt eine vierfache Wiederholung einer 67 Aminosäure langen Sequenz (Fig.6), im folgenden "Repeats" genannt. Innerhalb dieser Sequenz sind 7 Aminosäuren (10,4 %) in allen vier Repeats konserviert, 15 Aminosäuren (22,4 %) kommen in drei von vier Repeats vor, an 28 Positionen (41,8 %) enthalten jeweils zwei Repeats dieselbe Aminosäure.

Ein Vergleich mit publizierten Literaturdaten (M.J.Geisow, FEBS Letters 203 (1986), pp. 99-103, M.J.Geisow et al., TIBS 11 (1986), pp. 420-423) ergab überraschenderweise, daß VAC- α damit zu einer

größeren Gruppe Ca^{++} abhängiger Phospholipidbindungsproteine gehört. Es wird eine Konsensussequenz beschrieben (Lys-Gly-fob-Gly-Thr-Asp-Glu-var-var-Leu-Ile-fil-Ile-Leu-Ala-fob-Arg; fob=hydrophob, fil=hydrophil, var=variabel), die an der Ca^{++} Bindung beteiligt sein könnte (M.J.Geisow et al., Nature 320 (1986), pp. 636-638). Diese Sequenz findet sich in jeder der vier wiederholten 67 Aminosäure langen Subsequenzen der erfindungsgemäßen Proteine (Fig.6).

Auffällig ist auch der 6 Aminosäuren lange Abschnitt am Ende jeder Repeat, der fast ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren besteht ("oooooo" in Fig.6).

Die Sequenzanalyse der Klone Nr15, Nr19 und Nr22 ergab für die VAC-beta cDNA 1940 bp, die in einen poly-A Abschnitt übergeht (Fig.7). 16 Basen vor dem poly-A Abschnitt findet sich das Polyadenylierungssignal AATAAA. Allerdings kommt diese Konsensussequenz bereits an der Nukleotidposition 1704-1709 vor. Weshalb diese Sequenz nicht als Polyadenylierungssignal verwendet wird, ist unbekannt. Die zusätzlich erforderliche Sequenz an der 3'Seite der AATAAA Sequenz, YGTGTTY (Gill A. et al., Nature 312 (1984), pp. 473-474) kommt erst relativ weit entfernt vor (TGTGTTAT, Position 1735-1742); möglich, daß dies die Erklärung für ein Nichtakzeptieren dieser ersten Polyadenylierungssequenz darstellt.

Die cDNA enthält einen langen, offenen Leserahmen, der vom Beginn der cDNA bis Position 1087 reicht. Er würde ein Kodierungspotential für 362 Aminosäuren beinhalten. Aus Analogiegründen zu VAC-alfa und aufgrund der Tatsache, daß auch ein 34.000 D Protein

bei der Reinigung von VAC anfällt (siehe E.P.A. 181.465) wurde das erste Methioninkodon (ATG, Position 107-109) als Translationsstart angenommen. Die Kozakregel ist hier nicht so gut erfüllt wie bei VAC-alfa (AAGAGATGG auf Position 102-110). Das resultierende Protein (VAC-beta) ist 327 Aminosäuren lang. Es besitzt 4 Cysteinreste (Aminosäureposition 161, 206, 250 und 293) und eine potentielle N-Glykosylierungsstelle (Asn-Lys-Ser, Aminosäureposition 225-227). Das errechnete Molekulargewicht beträgt 36.837 (Fig.9). Auch in VAC-beta gibt es überdurchschnittlich viele geladene Reste: 97/327 (29,6%), wobei die sauren Aminosäuren (Asp+Glu: 49) über die basischen (Lys+Arg 42) überwiegen; eine Erklärung für das nach SDS-PAGE ermittelte niedrigere Molekulargewicht.

Auch VAC-beta zeigt eine interne Wiederholung einer 67 Aminosäuren langen Sequenz (Fig.8). Innerhalb dieser Sequenz sind 7 Aminosäuren (10,4 %) in allen vier Repeats konserviert, 17 Aminosäuren (25,4 %) kommen in drei von vier Repeats vor, an 25 Positionen (37,7 %) enthalten jeweils zwei Repeats dieselbe Aminosäure. Auch VAC-beta zeigt gute Übereinstimmung mit der 17 Aminosäuren langen Konsensussequenz. Die Ausführungen zum VAC-alfa gelten analog für VAC-beta. Durch gezielte Mutationen in diesem Bereich könnte versucht werden, die biologische Aktivität der Proteine zu verändern. Erfindungsgemäßen Mutationen sehen beispielsweise den vollständigen oder teilweisen Ersatz der für die 17 Aminosäuren der konservierten Region kodierenden Bereiche vor.

Bei dem Vergleich der Proteine stellt man fest, daß der auffälligste Unterschied zwischen den Proteinen bei den N-terminalen Peptiden vorliegt.

Erfindungsgemäße Modifikationen sehen daher den gegenseitigen Austausch dieser N-terminalen Peptide vor. Herstellen lassen sich diese modifizierten Proteine dadurch, daß die für diese N-terminalen Peptide kodierenden DNA-Moleküle, beispielsweise durch Oligonukleotidsynthese in an sich bekannter Weise hergestellt werden und mit der "Rest-DNA", die für die verbleibenden Repeats und die Linker-Abschnitte kodiert, ligiert wird. Mit dieser DNA versehene Expressionsvektoren können in bekannter Weise in geeigneten Wirtsorganismen zur Expression gebracht werden; das exprimierte Protein wird isoliert und gereinigt.

Die Analyse chromosomaler DNA aus humaner Plazenta nach Southern zeigt ein komplexes Bild. Die DNA wurde mit EcoRI, HindIII, BamHI und PstI geschnitten. Die auf Nitrozellulose transferierte DNA wurde sowohl mit einer VAC-alfa DNA (pP11/3) als auch mit einer VAC-beta DNA (pRH203) hybridisiert. Obwohl das Waschen der Filter unter stringenten Bedingungen erfolgte, ergaben sich bei jedem Verdau relativ viele Banden (Fig.10). Der Vergleich der beiden Blots zeigt, daß die Kreuzreaktion von VAC-alfa und -beta DNA unter diesen Bedingungen eher auszuschließen ist. Die Vielzahl der Banden ist entweder durch die Existenz jeweils ähnlicher Gene zu dem VAC-alfa bzw. VAC-beta Gen zu erklären, oder aber es handelt sich um jeweils ein Gen, das durch viele und/oder lange Introns unterbrochen ist.

In Fig.11 ist der Vergleich der Aminosäuresequenzen von VAC-alfa mit VAC-beta wiedergegeben. Die wiederholten Strukturen lassen sich in beiden Proteinen gleich anordnen. Die Verbindungspeptide sind ebenfalls gleich lang mit Ausnahme jener zwischen der 2. und 3. Repeat. In dieses Verbindungspeptid muß bei VAC-alfa eine Lücke eingeführt werden, um eine optimale Anpassung der beiden Sequenzen zu erlauben. Das N-terminale Peptid der beiden Proteine ist unterschiedlich lang, 19 Aminosäuren bei VAC-alfa, 25 Aminosäuren bei VAC-beta. Dieses Peptid weist auch die geringste Homologie auf. Die beiden Proteine sind an 176 von 320 Aminosäurepositionen ident, was einem Homologiegrad von 55,0% entspricht.

An dieser Stelle sei auch der Vergleich der Nukleotidsequenzen der VAC-alfa und -beta cDNAs eingefügt. Werden zwei Gene und deren Produkte miteinander verglichen, sieht man auf der DNA (=RNA) Ebene eine größere Homologie als auf der Aminosäureebene, was durch die Tatsache erklärt ist, daß bei der Nukleinsäure bereits eine Veränderung in einem Basentriplett ausreicht, um eine neue Aminosäure zu kodieren.

In Fig.12 ist der Vergleich der kodierenden Regionen von VAC-alfa und VAC-beta cDNA wiedergegeben. Überraschenderweise zeigen die DNAs nur einen Homologiegrad von 54,2%, also etwas weniger als die beiden Proteine.

In Fig.13 sind die Hydrophilizitätsprofile der beiden Proteine abgebildet. Dabei wurde der Algorithmus von Hopp und Wood verwendet (T.P.Hopp et al., Proc.Natl.Acad.Sci. 78 (1981) pp.3824-3828). Die vier

Repeatbereiche sind durch die Balken angedeutet, die Verbindungspeptide in der darunter angegebenen Sequenz eingerahmt. Überraschenderweise ist das Verbindungspeptid zwischen der zweiten und dritten Repeat besonders hydrophil. In diesem Peptid befindet sich sowohl bei VAC-alfa als auch bei VAC-beta ein Arginin an identer Position. Es wäre daher möglich, daß dieses Arginin einen bevorzugten Angriffspunkt für eine Protease mit trypsinartiger Spezifität darstellt. Dabei müßte das Molekül in zwei etwa gleich große Hälften zerfallen. Es wäre denkbar, daß bereits ein solches "Halbmolekül" eine biologische, beispielsweise eine antikoagulierende Wirkung entfalten kann. Neben dem gezielten Verdau des Proteins beispielsweise mit einer Protease trypsinartiger Spezifität lassen sich diese Halbmoleküle oder Halbmoleküle mit geringen Modifikationen auf vielfältige Weise darstellen. So ist es möglich, die für diese Halbmoleküle kodierenden DNA-Moleküle, die nach an sich bekannten Verfahren herstellbar sind in geeignete Expressionsvektoren so einzufügen, daß diese DNA von den Expressionskontrollsequenzen reguliert wird und durch Kultivierung eines mit diesen Vektoren transformierten Wirtsorganismus die Halbmoleküle zu exprimieren, zu isolieren und zu reinigen.

Halbmoleküle mit geringen Modifikationen erhält man beispielsweise durch Einfügung von Spaltstellen, die dem vollständigen Protein die für bestimmte Proteasen erforderliche Spezifität verleihen. So läßt sich beispielsweise ein Protein mit einer Spaltstelle mit Faktor Xa-artiger Spezifität herstellen, indem in dem Abschnitt, der für die Linker-Sequenz zwischen der zweiten und dritten Repeat-Struktur kodiert, ein Oligonukleotid eingefügt wird, das für das

Erkennungs-Tetrapeptid der Faktor-Xa-Protease kodiert. Hierdurch erhält man zunächst ein vollständiges Protein, das möglicherweise veränderte Eigenschaften, beispielsweise veränderte Stabilität gegenüber proteolytischem Angriff aufweist, andererseits aber eine hochspezifische Spaltstelle für die Faktor Xa-Protease enthält, wodurch gezielt zwei Halbmoleküle hergestellt werden und zum therapeutischem Einsatz gelangen können.

Durch gezielte Mutation der für Proteine mit VAC-Aktivität kodierenden DNA lassen sich außerdem Proteine herstellen, die einem proteolytischen Angriff besser widerstehen. So führt möglicherweise der Austausch des VAC-alfa und VAC-beta gemeinsamen Arginins zwischen der zweiten und dritten Repeat-Struktur durch z.B. Histidin zu besserer Stabilität der Proteine. Auch der gezielte Ersatz der übrigen Arginine und der Lysine durch Histidin, möglich durch Ersatz der entsprechenden Codone führt zu Proteinen, die erschwert durch Trypsin hydrolysiert werden können. Diese gezielten Mutationen lassen die biologischen, beispielsweise antikoagulierenden Eigenschaften der Proteine/Polypeptide im wesentlichen unbeeinflusst, führen andererseits jedoch zur Veränderung, beispielsweise zur Verbesserungen der Stabilität der Proteine, d.h. zu einer Veränderung der Halbwertszeit der Proteine.

In manchen Fällen ist es, beispielsweise für die Expression von Proteinen vorteilhaft, dem reifen, gewünschten Protein/Polypeptid eine Signalsequenz oder auch eine dem Wirtsorganismus eigene Proteinsequenz vorzuschalten, so daß als Expressionsprodukt ein Fusionsprotein entsteht. Die für ein Signalpeptid

kodierende Signalsequenz kann microbieller Herkunft sein oder aus Säugetierzellen stammen; vorzugsweise ist das Signalpeptid homolog zu dem Wirtsorganismus. Um diese Produkte in das gewünschte reife Protein überführen zu können, bedarf es einer spezifischen Spaltstelle zwischen dem Signal-/Fusionsanteil und dem reifen Protein. Hierzu kann man beispielsweise, wie oben beschrieben, an dieser Stelle ein Oligonukleotid einfügen, das für das Erkennungs- Tetrapeptid der Faktor-Xa-Protease kodiert. Hierdurch läßt sich das exprimierte Fusionsprotein gezielt mit der Faktor-Xa-Protease spalten. Man erhält das reife Protein.

Ersetzt man gezielt die für Methionin verantwortlichen Codone, außer dem an Aminosäureposition 1, durch Codone, die für Leucin, Isoleucin oder Valin kodieren, so läßt sich ein eventuell erhaltenes unreifes- oder Fusionsprotein durch BrCN-Spaltung in das reife Protein überführen.

Sollte sich erweisen, daß derart modifizierte Proteine gleiche oder gegebenenfalls verbesserte biologische Eigenschaften aufweisen, so wäre dies ein möglicher Weg zur Ausbeutesteigerung und gegebenenfalls ein Verfahren zur Herstellung von Proteinen mit besseren Eigenschaften als die natürlichen VAC-Proteine.

Als weitere gezielte Mutation ist der gezielte Austausch von einem, gegebenenfalls mehreren Cysteinen durch Serin oder Valin zu nennen, indem die entsprechenden Codone ausgetauscht werden. Beeinflußt dieser Austausch die biologische Aktivität nicht nachteilig, so könnte dieser Weg eine Verbesserung der Isolierung und/oder Ausbeute der Proteine bewirken. Nicht auszuschließen ist auch hierbei eine Verbesserung der Eigenschaften der Proteine. Als

weitere Mutation ist die Kombination verschiedener vollständiger- oder Teil- Sequenzen der für die erfindungsgemäßen Proteine kodierenden DNAs vorgesehen, wodurch Hybridproteine mit vascular-antikoagulierenden Eigenschaften erhalten werden. Alle durch diese oder ähnliche Mutationen erhältlichen Proteine, die für diese kodierenden DNAs, deren Herstellung und Verwendung sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Aus Fig. 13 ist weiterhin leicht zu erkennen, daß weder VAC-alfa noch VAC-beta einen längeren, hydrophoben Bereich aufweisen, der entweder die Sekretion durch, oder das Einlagern der Proteine in eine Membran erlauben würde. Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei VAC-alfa und VAC-beta um intrazelluläre Proteine handelt.

Wallner et al (Nature 320 (1986), pp.77-81) berichten die Struktur des humanen Lipocortin I, Saris et al. (Cell 46 (1986), pp.201-212) und Huang et al. (Cell 46 (1986), pp. 191-199) die Struktur des murinen bzw. humanen Calpactin I, das auch Lipocortin II genannt wird. Diese Proteine gehören ebenfalls zu der Klasse der Ca^{++} abhängigen Phospholipidbindungsproteinen. Ihre Struktur läßt sich analog zu VAC-alfa und -beta anschreiben (Fig.14). Die Homologien zwischen VAC-alfa und VAC-beta sind jedoch ausgeprägter als jene zwischen VAC und Lipocortin:

VAC-alfa - VAC-beta	: 55,0%
VAC-alfa - Lipocortin I	: 41,9%
VAC-alfa - Lipocortin II	: 43,8%
VAC-beta - Lipocortin I	: 41,7%
VAC-beta - Lipocortin II	: 44,6%

Anzunehmen ist daher, daß auch die Lipocortine aufgrund ihrer analogen Struktur antikoagulierende Wirkung haben, und demzufolge als Antikoagulanzen einzusetzen sind und

weiterhin, daß dies eine generelle Eigenschaft dieser Klasse von Ca^{++} abhängiger Phospholipidbindungsproteine ist. Aufgrund der analogen Strukturen läßt sich auch erklären, daß die erfindungsgemäßen Proteine neben der antikoagulierenden Wirkung auch die Eigenschaften der bereits bekannten Ca^{++} abhängigen Phospholipidbindungsproteine aufweisen. Beispielhaft genannt seien hier die antiinflammatorischen Eigenschaften der Lipocortine. Die diesen Proteinen eigene Phospholipase Inhibitor-Wirkung konnte auch für die erfindungsgemäßen Proteine nachgewiesen werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Proteine als antiinflammatorische Mittel sowie die Verwendung der erfindungsgemäßen Proteine bei der Behandlung sämtlicher für die Lipocortine geltenden Indikationen wie beispielsweise rheumatische Erkrankungen. Auch für diesen Einsatzzweck lassen sich die, den natürlichen Proteinen entsprechenden erfindungsgemäßen Produkte in der bereits erwähnten Weise abändern und deren Eigenschaften gegebenenfalls verbessern.

Bei dem Vergleich der Proteine VAC-alfa, VAC-beta, Lipocortin I und Lipocortin II stellt man fest, daß der auffälligste Unterschied zwischen den Proteinen bei den N-terminalen Peptiden vorliegt, insbesondere zwischen den VAC-Proteinen auf der einen und den Lipocortinen auf der anderen Seite. Eine erfindungsgemäße Modifikation sieht daher den gegenseitigen Austausch dieser N-terminalen Peptide vor. Herstellen lassen sich diese modifizierten Proteine dadurch, daß die für diese N-terminalen Peptiden kodierenden DNA-Moleküle, beispielsweise durch Oligonukleotidsynthese in an sich bekannter Weise hergestellt werden und mit der "Rest-DNA", die für die

verbleibenden Repeats und die Linker-Abschnitte kodiert, ligiert wird. Mit dieser DNA versehene Expressionsvektoren können in bekannter Weise in geeigneten Wirtsorganismen zur Expression gebracht werden; das exprimierte Protein wird isoliert und gereinigt.

Viele Mitglieder der Ca^{++} abhängigen Phospholipidbindungsproteine binden an gereinigte sekretorische Vesikel oder andere Bestandteile des Cytoskeletts (siehe R.H.Kretsinger et al., Nature 320 (1986), p.573 für eine Zusammenfassung). Bei der Sekretion kapseln sich die Vesikel vom Golgi-Apparat der Zelle ab, wandern zur Zellmembran und fusionieren mit ihr. Dabei wird der Inhalt der Vesikel von der Zelle freigesetzt. In Analogie zur Kupplung von Erregung mit der Muskelkontraktion wurde vorgeschlagen (W.W.Douglas, Br.J.Pharmac. 34 (1968), 451), daß auch der Stimulus und die Sekretion über Ca^{++} gekoppelt ist. Dabei könnten die Ca^{++} abhängigen Phospholipidbindungsproteine eine wichtige Rolle spielen. In der konservierten, 17 Aminosäuren langen Region jeder Repeat besitzt VAC-alfa 5 bis 6 Hydroxylgruppen-enthaltende Aminosäuren (Asp, Glu, Thr, Ser), jeweils drei davon an identischer Position. Bei VAC-beta finden sich in jeder Repeat vier dieser Aminosäuren. Obwohl keines der Proteine die in Calmodulin, Troponin C, S-100 und Parvalbumin beobachtete EF-Hand Struktur aufweist (R.H.Kretsinger et al., CRC Crit. Rev.Biochem. 8 (1980), p119), die in diesen Molekülen für die Ca^{++} Bindung verantwortlich ist, verleitet die Konservierung dieses Unterabschnitts in jeder Repeat zu dem Schluß, daß diese Region für die Ca^{++} Bindung verantwortlich ist.

Durch gezielte Mutationen in diesem Bereich könnte versucht werden, die biologische Aktivität der Proteine zu verändern. Erfindungsgemäßen Mutationen sehen

beispielsweise den vollständigen oder teilweisen Ersatz der für die 17 Aminosäuren der konservierten Region kodierenden Bereiche vor:

- a. aus den VAC-Proteinen durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren der Lipocortine kodieren,
 - b. aus VAC-alfa durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren des VAC-beta kodieren und umgekehrt,
 - c. aus Lipocortin I durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren des Lipocortins II kodieren und umgekehrt,
 - d. aus den Lipocortinen durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren der VAC-Proteine kodieren oder
 - e. bei den übrigen Polypeptiden/Proteinen durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren der jeweils anderen Polypeptiden/Proteine kodieren,
- indem die entsprechenden für diese Aminosäuren kodierenden Bereiche ausgetauscht werden.

Die oben erwähnte analoge Struktur läßt außerdem erwarten, daß Proteine, die diese Analogie aufweisen, sowohl antiinflammatorische als auch antikoagulierende Wirkung zeigen und daher entsprechend therapeutisch und/oder prophylaktisch einsetzbar sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher insbesondere die Verwendung der Polypeptide als antiinflammatorische Mittel, als antirheumatische Mittel, in den für die Lipocortine geltenden Indikationen, die Verwendung der Polypeptide/Proteine, die Repeat-Bereiche aufweisen, als blutgerinnungs- hemmende Mittel, als Thrombin-inhibierende Mittel, als antiinflammatorische Mittel, als antirheumatische Mittel, Verwendung der Lipocortine als blutgerinnungshemmende Mittel, als Thrombin-inhibierende Mittel und in den für die VAC-Proteine geltenden Indikationen, wobei die bekannten Verwendungen der zum Teil in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Proteine mit solchen Repeat-Bereichen ausdrücklich ausgenommen sind.

Weiterhin sind Mittel zur therapeutischen Behandlung, die neben pharmazeutisch inerten Trägerstoffen eine wirksame Menge eines dieser Polypeptide enthält, Gegenstand der Erfindung.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch DNA-Moleküle, die für ein Polypeptid/Protein mit Repeat-Bereichen kodieren, DNA-Moleküle, die für einen der Repeat-Bereiche kodieren, DNA-Moleküle, dadurch gekennzeichnet, daß die für die vollständigen Repeats kodierenden Bereiche umgeordnet sind, die von diesen kodierten Proteine, deren Herstellung und Verwendung.

Alle durch diese oder ähnliche Mutationen erhältlichen Proteine, die für diese kodierenden DNAs, deren Herstellung und Verwendung sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung, wobei die bekannten zum Teil in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Proteine, die für diese kodierenden DNAs, deren bekannte Herstellung und Verwendung ausdrücklich ausgenommen sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch DNA-Moleküle nicht-humanen Ursprungs, die von diesen kodierten Proteine, deren Herstellung und Verwendung, die in einer, der vorliegenden Erfindung analogen Weise herstellbar sind.

Gegenstand der Erfindung sind nicht nur Gen-Sequenzen, die spezifisch für die erfindungsgemäßen Proteine codieren, sondern ebenfalls Modifikationen, die leicht und routinemäßig durch Mutation, Abbau, Transposition oder Addition erhalten werden können. Jede Sequenz, die für die erfindungsgemäßen Proteine codiert (d.h. die das biologische Aktivitätsspektrum aufweist, das hier beschrieben ist) und im Vergleich mit den gezeigten

degeneriert ist, ist ebenfalls eingeschlossen; Fachleute auf diesem Gebiet sind in der Lage, DNA-Sequenzen der codierenden Regionen zu degenerieren. Ebenso ist jede Sequenz, die für ein Polypeptid mit dem Aktivitätsspektrum der erfindungsgemäßen Proteine codiert, und die mit den gezeigten Sequenzen (oder Teilen davon) unter stringenten Bedingungen hybridisiert (beispielsweise Bedingungen, die für mehr als 85 %, bevorzugt mehr als 90 % Homologie selektieren) beinhaltet.

Die Hybridisierungen werden in 6xSSC/5x Denhardt's Lösung/0,1% SDS bei 65°C durchgeführt. Der Grad der Stringenz wird im Waschschrift festgelegt. So sind für eine Selektionierung auf DNA-Sequenzen mit ca. 85 % oder mehr Homologie die Bedingungen 0,2xSSC/0,01% SDS/65°C und für eine Selektionierung auf DNA-Sequenzen mit ca. 90 % oder mehr Homologie die Bedingungen 0,1x SSC/0,01% SDS 65°C geeignet.

Die Erfindung betrifft weiterhin Expressionsvektoren, die eine für VAC kodierende DNA-Sequenz enthalten, die von einer Expressionskontrollsequenz derart reguliert wird, daß in einer mit diesem Expressionsvektoren transformierten Wirtszelle Polypeptide mit VAC-Aktivität exprimiert werden.

Die Expressionsvektoren der vorliegenden Erfindung werden z.B. hergestellt, indem man in eine Vektor-DNA, welche eine Expressionskontrollsequenz enthält, eine VAC kodierende DNA-Sequenz derart einfügt, daß die Expressionskontrollsequenz besagte DNA-Sequenz reguliert.

Die Wahl eines geeigneten Vektors ergibt sich aus der zur Transformation vorgesehenen Wirtszelle. Geeignete Wirte sind beispielsweise Mikroorganismen, wie Hefen,

z.B. Saccharomyces cerevisiae, und insbesondere Bakterienstämme, die über kein Restriktions- oder Modifikationsenzym verfügen, vor allem Stämme von Escherichia coli, z.B. E.coli X1776, E.coli HB101, E.coli W3110, E.coli HB101/LM1035, E.coli JA221(30) oder E.coli K12 Stamm 294, Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus, Pseudomonas, Haemophilus, Streptococcus und andere, ferner Zellen höherer Organismen, insbesondere etablierte humane oder tierische Zelllinien. Bevorzugte Wirtszellen sind die gesamten Stämme von E.coli, insbesondere E.coli HB101, E.coli JM101 und E.coli W3110.

Grundsätzlich sind alle Vektoren geeignet, welche die erfindungsgemäßen heterologen, für die VAC kodierenden DNA-Sequenzen in dem gewählten Wirt replizieren und exprimieren.

Beispiele für Vektoren, die zur Expression des VAC-Gens in einem E.coli-Stamm geeignet sind, sind Bacteriophagen, z.B. Derivate des Bacteriophagen λ , oder Plasmide, wie insbesondere das Plasmid colE1 und seine Derivate, z.B. pMB9, pSF2124, pBR317 oder pBR322. Die bevorzugten Vektoren der vorliegenden Erfindung leiten sich von Plasmid pBR322 ab. Geeignete Vektoren enthalten ein vollständiges Replicon und ein Markierungsgen, welches die Selektion und Identifizierung der mit den Expressionsplasmiden transformierten Mikroorganismen auf Grund eines phänotypischen Merkmals ermöglicht. Geeignete Markierungen verleihen dem Mikroorganismus beispielsweise Resistenz gegenüber Schwermetallen, Antibiotika und dergleichen. Weiterhin enthalten bevorzugte Vektoren der vorliegenden Erfindung außerhalb der Replicon- und Markierungsgen- Regionen

Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen, so daß an diesen Stellen die für die Aminosäuresequenz von VAC kodierende DNA-Sequenz und gegebenenfalls die Expressions-Kontrollsequenz eingefügt werden können. Ein bevorzugter Vektor, das Plasmid pBR322, enthält ein intaktes Replicon gegen Tetracyclin und Ampicillin Resistenz verleihende Markierungsgene (tet^R und amp^R) und eine Reihe von nur einmal vorkommenden Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen, z.B. PstI (schneidet im amp^R -Gen, das tet^R -Gen bleibt intakt), BamHI, HindIII, SalI (schneiden alle im tet^R -Gen, das amp^R -Gen bleibt intakt), NruI und EcoRI.

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

Neben diesen besonders gebräuchlichen Promotoren sind auch andere mikrobielle Promotoren entwickelt und benutzt worden. Die Gen-Sequenz für die erfindungsgemäßen Proteine kann beispielsweise unter der Kontrolle des Leftward-Promotors des Bakteriophagen Lambda (P_L) eingesetzt werden. Dieser Promotor ist ein besonders effektiver steuerbarer Promotor. Die Steuerung wird möglich durch den Lambda-Repressor, von dem benachbarte Restriktionsschnittstellen bekannt sind. Ein temperaturempfindliches Allel dieses Repressor-Gens kann in einen Vektor, der eine Protein-Gen-Sequenz enthält, eingefügt werden. Wird die Temperatur auf 42°C erhöht, wird der Repressor inaktiviert und der Promotor aktiviert. Durch die Verwendung dieses Systems ist es möglich, eine Clon-Bank zu etablieren, in der eine funktionelle Protein-Gen-Sequenz in Nachbarschaft zu einer Ribosom-Bindungsstelle in variierenden Abständen zu dem Lambda- P_L -Promotor plaziert wird. Diese Klone können dann überprüft und der mit der höchsten Ausbeute selektiert werden.

Die Expression und Translation einer Sequenz codierend für die erfindungsgemäßen Proteine kann auch unter Kontrolle anderer Regulationssysteme, die als "homolog" zu dem Organismus in seiner untransformierten Form gelten können, ablaufen. So enthält z.B. chromosomale DNA von einem Lactose-abhängigen E.coli ein Lactose oder Lac-Operon, das durch Ausschüttung des Enzyms Beta-Galactosidase den Lactose-Abbau ermöglicht.

Die Lac-Kontrollelemente können aus dem Bakteriophagen Lambda-plac5, der infektiös für E. coli ist, erhalten werden. Das Lac-Operon des Phagen kann durch Transduktion aus derselben Bakterien-Spezies stammen.

Regulationssysteme, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren Verwendung finden können, können auch aus plasmidischer DNA stammen, die dem Organismus eigen ist. Das Lac-Promotor-Operator-System kann durch IPTG induziert werden.

Andere Promotor-Operator-Systeme oder Teile hiervon können genauso gut verwendet werden: beispielsweise Colicine E₁-Operator, Galactose-Operator, Xylose-A-Operator, tac- Promotor u.ä..

Zusätzlich zu Prokaryoten können auch eukaryotische Mikroorganismen, wie Hefekulturen verwendet werden. Saccharomyces cerevisiae ist die am meisten verwendete von den eukaryotischen Mikroorganismen, obwohl eine Anzahl anderer Spezies allgemein erhältlich ist.

Zur Replikation und Expression in Hefe geeignete Vektoren enthalten einen Hefe-Replikationsstart und einen selektiven genetischen Marker für Hefe. Hybridvektoren, die einen Hefe-Replikationsstart enthalten, z.B. das chromosomale autonom replizierende Segment (ars), bleiben nach der Transformation innerhalb der Hefezelle extra-chromosomal erhalten und werden bei der Mitose autonom repliziert. Zur Expression in Saccharomyces wird beispielsweise das Plasmid YRp7 (Stinchcomb et al. Natur 282, 39 (1979); Kingsman et al., Gene 7, 141 (1979); Tschumper et al., Gene 10, 157 (1980)) und das Plasmid YEp13 (Bwach et al., Gene 8, 121-133 (1979)) verwendet. Das Plasmid YRp7 enthält das TRP1-Gen, das eine Selektionierungsmarkierung für eine Hefemutante, die unfähig ist, in tryptophanfreiem Medium zu wachsen, bereitstellt; beispielsweise ATCC Nr. 44076.

Das Vorhandensein des TRP1 Schadens als Charakteristikum des Hefe-Wirts Genoms stellt dann ein wirksames Hilfsmittel dar, um Transformation nachzuweisen, wenn ohne Tryptophan kultiviert wird. Ganz ähnlich verhält es sich bei dem Plasmid YEpl3, das das Hefe-Gen LEU 2, das zur Ergänzung einer LEU-2-minus-Mutante verwendet werden kann, enthält.

Weitere geeignete Markierungsgene für Hefe sind im Fall von auxotrophen Hefemutanten, im allgemeinen Gene, die Wirtsdefekte komplementieren. Entsprechende Gene sorgen für Prototrophie in einer auxotrophen Hefemutante, z.B. das URA3- und HIS3- Gen. Vorzugsweise enthalten Hefe-Hybridvektoren weiterhin einen Replikationsstart und ein Markierungsgen für einen bakteriellen Wirt, insbesondere E.coli, damit die Konstruktion und die Klonierung der Hybridvektoren und ihrer Vorstufen in einem bakteriellen Wirt erfolgen kann. Weitere für die Expression in Hefe geeignete Expressionskontrollsequenzen sind beispielsweise diejenigen des PHO3- oder PHO5-Gens, ferner in glykolytischen Abbau involvierte Promotor, z.B. der PGK- und GAPDH-Promotor.

Andere geeignete Promotor-Sequenzen für Hefe Vektoren beinhalten die 5'-flankierende Region der Gene des ADH I (Ammerer G., Methods of Enzymology 101, 192-201 (1983)), 3-Phosphoglycerate-Kinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980)) oder andere glykolytische Enzyme (Kawaski und Fraenkel, BBRC 108, 1107-1112 (1982)) wie Enolase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvat-Decarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, Phosphoglucose-Isomerase und Glucokinase. Bei der Konstruktion geeigneter

Expressionsplasmide können die mit diesen Genen assoziierten Terminationssequenzen ebenfalls in den Expressions-Vektor am 3'-Ende der zu exprimierenden Sequenz eingesetzt werden, um Polyadenylierung und Termination der mRNA zu ermöglichen.

Andere Promotoren, die zudem noch den Vorteil der durch Wachstumsbedingungen kontrollierten Transkription besitzen, sind die Promotor-Regionen der Gene für Alkohol-Dehydrogenase-2, Isocytochrom C, Saure-Phosphatase, abbauende Enzyme, die mit dem Stickstoff-Metabolismus gekoppelt sind, die oben erwähnte Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Enzyme, die für die Verarbeitung von Maltose und Galaktose verantwortlich sind. Promotoren, die durch den Hefe Mating Typ Locus reguliert werden, beispielsweise Promotoren der Gene BARI, MFa1, STE2, STE3, STE5 können bei temperaturregulierten Systemen durch die Verwendung von temperaturabhängigen sir Mutationen eingesetzt werden. (Rhine Ph.D. Thesis, University of Oregon, Eugene, Oregon (1979), Herskowitz and Oshima, The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, part I, 181-209 (1981), Cold Spring Harbor Laboratory). Diese Mutationen beeinflussen die Expression der ruhenden Mating-Typ Kassetten von Hefen und dadurch indirekt die Mating-Typ abhängigen Promotoren. Generell ist jedoch jeder Plasmid Vektor, der einen Hefe-kompatiblen Promotor, originäre Replikations- und Terminationssequenzen enthält, geeignet.

So können auch Hybridvektoren, die der Hefe-2 μ -Plasmid-DNA homologe Sequenzen enthalten, verwendet werden. Solche Hybridvektoren werden durch Rekombination innerhalb der Zelle bereits vorhandenen 2 μ -Plasmiden einverleibt oder replizieren autonom. 2 μ -Sequenzen sind besonders für Plasmide mit großer Transformationshäufigkeit geeignet und gestatten eine hohe Kopienzahl.

Zusätzlich zu Mikroorganismen sind Zellkulturen multizellulärer Organismen ebenfalls geeignete Wirtsorganismen. Im Prinzip ist jede dieser Zellkulturen einsetzbar, ob von Wirbeltier- oder wirbellosen Tierzellkulturen. Größtes Interesse besteht jedoch an Wirbeltierzellen, so daß die Vermehrung von Wirbeltierzellen in Kultur (Gewebe-Kultur) in den letzten Jahren zu einer routinemäßigen Methode wurde (Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, Editors (1973)). Beispiele solch nützlicher Wirtszelllinien sind VERO- und HeLa-Zellen, CHO-Zellen und WI38, BHK, COS-7 und MDCK-Zelllinien. Expressionsvektoren für diese Zellen enthalten üblicherweise (wenn nötig) einen Replikationsstartpunkt, einen Promotor, der vor dem zu exprimierenden Gen lokalisiert ist, gemeinsam mit allen notwendigen Ribosomenbindungsstellen, RNA-Splicing-Stelle, Polyadenylierungsstelle und transkriptionelle Terminations-Sequenzen.

Bei der Verwendung in Säugetierzellen stammen die Kontrollfunktionen auf den Expressions-Vektoren oftmals aus viralem Material. Beispielsweise stammen die üblicherweise verwendeten Promotoren aus Polyoma-, Adenovirus 2, und besonders häufig aus Simian Virus 40 (SV 40). Die frühen und späten Promotoren des SV 40 sind besonders nützlich, da beide leicht aus dem Virus als Fragment zu erhalten sind, das auch noch die virale Replikationsstelle des SV 40 enthält. (Fiers et al., Nature 273, 113 (1978)). Auch können kleinere oder größere Fragmente des SV 40 verwendet werden, vorausgesetzt, sie enthalten die annähernd 250 bp lange Sequenz, die von der HindIII Schnittstelle bis zur BglI Schnittstelle in dem viralen Replikationsstartpunkt reicht. Außerdem ist es ebenfalls möglich und oft empfehlenswert, Promotor- oder Kontroll-Sequenzen zu

verwenden, die normalerweise mit den gewünschten Gensequenzen verknüpft sind, vorausgesetzt, diese Kontroll-Sequenzen sind kompatibel zu den Wirtszellsystemen.

Ein Replikationsstartpunkt kann entweder durch entsprechende Vektorkonstruktion vorgesehen werden, um einen exogenen Startpunkt einzubauen, beispielsweise aus SV 40 oder anderen viralen Quellen (z.B. Polyoma, Adeno, VSV, PBV, etc.) oder kann durch die chromosomalen Replikationsmechanismen der Wirtszelle vorgesehen werden. Wird der Vektor in das Wirtszellenchromosom integriert, reicht die zuletztgenannte Maßnahme meistens aus.

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

Um eine effektive Expression zu erreichen, muß das VAC-Gen richtig (in "Phase") mit der Expressionskontrollsequenz angeordnet sein. Es ist vorteilhaft, die Expressionskontrollsequenz in den Bereich zwischen dem Haupt-mRNA-Start und dem ATG der Genkodiersequenz, welche natürlich mit dem Expressionskontrollsequenz verknüpft ist (z.B. die

β -lac-Kodiersequenz bei Verwendung des β -lac-Promotors), mit dem VAC-Gen, welches vorzugsweise sein eigenes Translationsstartsignal (ATG) und Translationsstoppsignal (z.B. TAG) mitbringt, zu verknüpfen. Dadurch wird eine effektive Transkription und Translation gewährleistet.

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

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein von pBR322 abgeleiteter Vektor, welcher eine Expressionskontrollsequenz, insbesondere diejenige vom Tryptophan-Operon (trp po), enthält, die am 3'-Ende (zwischen dem Haupt-mRNA-Start und dem ersten ATG) die Erkennungssequenz für eine,

vorzugsweise kohäsive Enden bildende, Restriktionsendonuclease, z.B. EcoRI, trägt, mit der genannten Restriktionsendonuclease und im Vektor-DNA-Teil mit einer zweiten Restriktionsendonuclease, welche flache oder bevorzugt kohäsive Enden bildet, z.B. BamHI, verdaut, wonach der so linearisierte Vektor mit der entsprechenden Enden aufweisenden VAC-DNA (z.B. mit einem EcoRI-Ende vor dem ATG-Start und einem BamHI-Ende nach dem Translationsstop-Codon) verknüpft wird. Die Verknüpfung erfolgt in bekannter Weise durch Paarung der komplementären (kohäsiven) Enden und Ligierung, z.B. mit T₄-DNA-Ligase.

Vorzugsweise können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen auch in dem Expressionsplasmid pER103 (E. Rastl-Dworkin et al., Gene 21, 237-248 (1983) und EP-A-0.115-613 - hinterlegt bei der DSM unter der Nummer DSM 2773 am 20. Dezember 1983), in dem Plasmid parpER33 (EP-A-0.115-613) oder dem Plasmid pRH100 exprimiert werden, da diese Vektoren alle Regulationselemente enthalten, die zu einer hohen Expressionsrate der klonierten Gene führen.

Erfindungsgemäß wird als Expressionsvektor für das synthetische Protein Gen das Plasmid pRH100 verwendet, das den regulierbaren Tryptophanpromotor aus *Serratia marcescens* und eine artifizielle Ribosomenbindungsstelle enthält. Zur Herstellung des Expressionsplasmides pRH100 wurde das Plasmid pER103 (Eva Dworkin-Rastl et al., Gene 21 (1983) 237-248, EP-A-0.115-613) mit der Restriktionsendonuklease HindIII linearisiert und die Oligonukleotidsequenz

5'	AGCTTAAAGATGAGCTCATCTTTA	3'
3'	ATTCTACTCGAGTAGAAATTCGA	5'

eingefügt.

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

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Teilstücke der VAC-DNA synthetisiert. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von transformierten Wirtszellen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Wirtszelle mit einem Expressionsvektor, der eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für die Aminosäuresequenz von VAC kodierende DNA-Sequenz enthält, transformiert.

Geeignete Wirtszellen sind beispielsweise die oben genannten Mikroorganismen, wie Stämme von Saccharomyces cerevisiae, Bacillus subtilis und insbesondere Escherichia coli. Die Transformation mit dem erfindungsgemäßen Expressionsplasmiden erfolgt beispielsweise wie in der Literatur beschrieben, so für S. cerevisiae (12), B. subtilis (13) und E. coli (14). Die Isolierung der transformierten Wirtszellen erfolgt vorteilhaft aus einem selektiven Nährmedium, dem das Biocid zugesetzt wird, gegen welches das im Expressionsplasmid enthaltende Markierungs-Gen Resistenz verleiht. Wenn, wie bevorzugt, die Expressionsplasmide das amp^{R} -Gen enthalten, wird dem

Nährmedium demgemäß Ampicillin zugesetzt. Zellen, welche das Expressionsplasmid nicht enthalten, werden in einem solchen Medium abgetötet.

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

Die transformierten Wirtszellen können zur Herstellung von Verbindungen mit VAC-Aktivität verwendet werden. Das Verfahren zur Herstellung dieser Verbindung ist dadurch gekennzeichnet, daß die transformierten Wirtszellen kultiviert und das Produkt aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird.

Die Erfindung betrifft daher vor allem ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen mit VAC-Aktivität und von Salzen solcher Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß mit einem Expressionsplasmid, welches eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für die Aminosäuresequenz von VAC kodierende DNA-Sequenz enthält, transformierte Wirtszellen in einem flüssigen Nährmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, kultiviert werden und das Produkt aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird, und, falls erforderlich, ein verfahrensgemäß erhältliches Produkt mit einem zur Aufspaltung der Disulfidbindungen geeigneten Reduktionsmittel versetzt und das erhältliche reduzierte Polypeptid gegebenenfalls mit einem zur Neuknüpfung von Disulfidbindungen geeigneten Oxidationsmittel behandelt wird, und gewünschtenfalls, eine erhältliche VAC-Verbindung in eine andere VAC-Verbindung überführt wird, ein verfahrensgemäß erhältliches Gemisch von Verbindungen mit VAC-Aktivität in die einzelnen Komponenten aufgetrennt wird und/oder,

gewünschtenfalls, ein erhaltenes Salz in das Polypeptid und ein erhaltenes Polypeptid in das entsprechende Salz desselben überführt wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von VAC-Verbindungen.

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

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

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

Wenn die Zelldichte einen ausreichenden Wert erreicht hat, wird die Kultivierung abgebrochen und das Produkt, falls erforderlich, aus den Zellen des Mikroorganismus freigesetzt. Zu diesem Zweck werden die Zellen zerstört, z.B. durch Behandlung mit einem Detergens, wie SDS oder Triton, oder mit Lysozym oder einem gleichartig wirkenden Enzym lysiert. Alternativ oder zusätzlich kann man mechanische Kräfte, wie Scherkräfte (z.B. X-Press, French-Press, Dyno-Mill) oder Schütteln mit Glasperlen oder Aluminiumoxid, oder abwechselndes Einfrieren, z.B. in flüssigem Stickstoff, und Auftauen, z.B. auf 30° bis 40°C, sowie Ultraschall zum Brechen der Zellen anwenden. Die resultierende Mischung, die Proteine, Nucleinsäuren und andere Zellbestandteile enthält, wird nach der Zentrifugation in an sich bekannter Weise an Proteinen angereichert. So wird z.B. der größte Teil der Nicht-Protein-Bestandteile durch Polyäthylenimin-Behandlung abgetrennt und die Proteine einschließlich der VAC-Verbindungen z.B. durch Sättigen der Lösung mit Ammoniumsulfat oder mit anderen Salzen ausgefällt. Weitere Reinigungsschritte umfassen beispielsweise chromatographische Verfahren, wie Ionenaustauschchromatographie, HPLC, Reverse-Phase-HPLC und dergleichen. So erfolgt die Auftrennung der

Mischbestandteile durch Dialyse, nach Ladung mittels Gel- oder trägerfreier Elektrophorese, nach Molekülgröße mittels einer geeigneten Sephadex-Säule, durch Affinitätschromatographie, z.B. mit Antikörpern, insbesondere monoklonalen Antikörpern, oder mit Thrombin gekuppelt an einen geeigneten Träger zur Affinitätschromatographie, oder durch weitere, insbesondere aus der Literatur bekannte Verfahren.

Beispielsweise umfaßt die Isolierung der exprimierten VAC-Verbindungen die folgenden Stufen:

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

Weitere Reinigungsschritte schließen Gelfiltrationen an Sephadex G50 (oder G75) und Reverse-Phase-HPLC ein. Entsalzung wieder an Sephadex G25.

Zum Nachweis der VAC-Aktivität kann der Test mit Anti-VAC-Antikörpern (z.B. aus Kaninchen/Maus erhältliche, oder aus Hybridomazellen erhältliche monoklonale Antikörper) oder können die in der EPA 0 181 465 beschriebenen Tests herangezogen werden.

Wie bereits erwähnt, ist der alkalische Phosphatasepromotor besonders geeignet für die Expression der erfindungsgemäßen Proteine.

Das Gen für die alkalische Phosphatase (PhoA) aus *E.coli* unterliegt einer strengen Regulation. In Gegenwart von Phosphat wird das Gen komplett abgeschaltet, bei Abwesenheit von Phosphat im Medium erfolgt Genexpression. H.Shuttleworth et al., *Nucleic Acids Res.* 14 (1986), p.8689 sowie C.N.Chang et al., *Gene* 44 (1986), pp.121-125 beschreiben die Nukleotidsequenz dieses Gens. Zur Konstruktion eines geeigneten Expressionsvektors wurde aus mehreren Oligonukleotiden die Promotorregion des PhoA Gens zusammengesetzt und in EcoRI-ClaI geschnittenes pAT153 (Amersham) eingesetzt. Vor der ribosomalen Bindungsstelle wurde eine XhoI Stelle eingeführt. Die originale EcoRI Stelle wird beim Einligieren des synthetischen DNA-Fragmentes zerstört. Nach der ribosomalen Bindungsstelle wurde ein Translationsstart-ATG vorgesehen, dessen G das erste Nukleotid einer SacI (=SstI) Stelle ist. Der Expressionsvektor läßt sich durch Schnitt mit SacI an dieser Stelle linearisieren und der 3'Überhang durch Behandlung mit DNA-Polymerase I - Klenow Fragment in Gegenwart von dGTP in ein gerades Ende überführen. Dadurch kann jedes beliebige Gen an dieser Stelle eingefügt werden, für korrekte Expression muß es mit der ersten Base der kodierenden Region beginnen.

Das HindIII-SalI Fragment des pAT-Anteils wurde entfernt und durch den alkalischen Phosphatase-Transkriptionsterminator ersetzt. Die originale SalI Stelle wurde zerstört. Dafür wurde sie vor dem Terminator zusammen mit der ebenfalls aus pAT153 deletierten BamHI Stelle wieder eingebracht.

Die Sequenz der synthetisch hergestellten DNA ist in Fig.15 abgebildet. Der resultierende Vektor wurde pRH284T genannt.

Zur Herstellung eines Vektors, der zur Expression von VAC-alfa geeignet ist, wurde in den pRH284T ein für VAC-alfa kodierendes DNA Molekül eingefügt. Hierzu wurde beispielsweise der cDNA Klon pP6/5 mit BglII und PstI geschnitten und das 980 bp lange Fragment isoliert, das den Hauptteil der kodierenden und ca. 200 bp 3'nichttranslatierte Region enthält. Mittels Oligonukleotiden wurde das fehlende 5'Ende der kodierenden Region ersetzt. Dabei wurde durch zwei Mutationen (GGC -> GGT, Gly-7 und ACT -> ACC, Thr-8) gleichzeitig eine KpnI-Schnittstelle in die VAC-cDNA eingeführt.

Die Oligonukleotide hatten folgendes Aussehen:

```

      |EBI-678                                     ||EBI-677
5'   GCACAGGTTCTCAGAGGTACCGTGACTGACTTCCCTGGATTGATGAGCGGGCT
      CGTGTCCAAGAGTCTCCATGGCACTGACTGAAGGGACCTAACTACTCGCCCGA
      |                                           EBI-680||

GATGCAGAACTCTTCGGAAGGCTATGAAAGGCTTGGGCACAGATGAGGAGAGC
CTACGTCTTTGAGAAGCCTTCCGATACTTTCCGAACCCGTGTCTACTCCTCTCG
                                           EBI-

      ||EBI-682                                     |
ATCCTGACTCTGTGACATCCCGAAGTAATGCTCAGCGCCAGGAAATCTCTGCA 3'
TAGGACTGAGACAACTGTAGGGCTTCATTACGAGTCGCGGTCTCTTAGAG      5'
679||                                           EBI-681|

```

Der so hergestellte Vektor wurde pRH291 genannt (Fig. 16).

Zur Expression von VAC-beta wurde vorzugsweise als Expressionsvektor das Plasmid pER103 verwendet (E.Rastl-Dworkin et al., Gene 21 (1983), 237-248). Der Vektor wurde mit HindIII linearisiert. Das 5'überhängende Ende wurde mit dATP und DNA-Polymerase I / Klenowfragment partiell eingefüllt, und der verbleibende Einzelstrangrest mit S1 Nuklease verdaut. Der Vektor wurde mit BamHI nachgeschnitten und das große Fragment isoliert (Fig.17). In den so vorbereiteten Vektor wurde das für VAC-beta kodierende DNA-Molekül ligiert. Hierzu wurde beispielsweise aus dem Klon pRH203 das 440 bp lange MaeIII-BamHI Fragment isoliert, das die Codons 13 bis 157 enthält. Das fehlende 5'Ende wurde durch Oligonukleotide ergänzt:

EBI-307

5' CCATGGCTTGGTGGAAAGCTTGGATCGAACAGGAAGGT 3'

3' GGTACCGAACCACCTTTTCGAACCTAGCTTGTCTTCCACAGTG 5' EBI-306

Dabei wurden für E.coli optimale Codons verwendet (zB. R.Grantham et al., Nucleic Acids Res. 8 (1980), 1893-1912). Dieser Codonaustausch resultierte in einer neuen HindIII-Stelle bei Codon 5 bis 7. Nach dem Nachschnitt mit BamHI wurde das 5'terminale VAC-Fragment in den vorbereiteten pER103 Vektor ligiert. Der entstehende Vektor wurde pRH211 benannt. Um die für VAC-beta kodierende Region zu ergänzen, wurde aus dem Klon pRH201 das 1230 bp lange BamHI-SphI Fragment isoliert. Der ca. 200 bp lange pBR322 Abschnitt von BamHI bis SphI aus dem Plasmid pRH211 wurde entfernt und durch den entsprechenden VAC-cDNA Teil ersetzt. Es resultierte der Vektor pRH212. Das EcoRI-BamHI Fragment, das den Trp-Promotor (S.marcescens), die ribosomale Bindungsstelle und den synthetisch hergestellten Beginn des VAC-beta Gens enthält, wurde durch Sequenzieren überprüft. Der

Nachweis des plasmidkodierten VAC-beta erfolgte im Maxizell-system (A.Sancar et al., J. Bacteriol. 137 (1979), pp.692-693.).

Besonders bevorzugt für die Expression des VAC-beta ist die Konstruktion eines Expressionsvektors ausgehend von pRH284T. Hierzu wurde in den Expressionsvektor in geeigneter Weise das für VAC-beta kodierende Insert ligiert. Als Ausgangsmaterial für dieses Insert kann beispielsweise der Vektor pRH212 dienen:

Der Expressionsvektor pRH284T wurde mit SacI linearisiert und die 3' überhängenden Ende mit DNA-Polymerase I / Klenowfragment und dGTP in gerade Enden übergeführt. Der Vektor wurde mit SalI nachgeschnitten, und das große Fragment isoliert. Das HindIII-SalI Insert des Klons pRH212 wurde isoliert. Das Oligonukleotidpaar

5' GCTTGGTGGAA 3' EBI-684
3' CGAACCACCTTTCTGA 5' EBI-685

wurde mit dem VAC-beta Insert und dem vorbereiteten pRH284T ligiert. E.coli HB101 wurde mit der Ligaselösung transformiert. Der resultierende Klon wurde pRH292 benannt (Fig.18).

Da in den Expressionsvektoren pRH291 (VAC-alpha) und pRH292 (VAC-beta) das Tetracyclinresistenzgen vom Promotor bis zur SalI-Stelle deletiert worden ist, können diese Vektoren keine Tetracyclinresistenz vermitteln. Tetracyclin-resistente Expressionsvektoren erhält man beispielsweise durch die Konstruktion nach dem Schema in Fig. 36. VAC-alpha und VAC-beta cDNA weisen jeweils in der 3' nicht translatierten Region eine SphI Stelle auf. Im beta-Lactamase Gen des Vektors

findet sich eine PvuI Stelle. Beide Erkennungssequenzen sind singulär. Daher kann durch Schnitt mit PvuI und SphI ein Teil des beta-Lactamase-Gens, der phoA-Promotor und die den gesamten kodierenden Teil der VAC-alpha oder -beta plus etwas 3' nicht translatierter cDNA aus den beiden Expressionsvektoren freigesetzt werden. Andererseits kann aus dem Plasmid pAT153 durch Schnitt mit PvuI und EcoRI der Rest des beta-Lactamase Gens, der Replikationsursprung und das gesamte Tetracyclinresistenzgen inklusive des Promotors freigesetzt werden. Werden die SphI- bzw. EcoRI Enden durch enzymatische Behandlung gerade gemacht, erhält man hier kompatible Enden. Werden nun Vektor-Fragment und das VAC-alpha oder VAC-beta cDNA enthaltende Fragment ligiert, entstehen Expressionsvektoren, die das komplette Tetracyclin enthalten: pGN25 (VAC alpha), pGN26 (VAC-beta).

Kompetente Wirtsorganismen, beispielsweise E.coli, besonders bevorzugt E.coli HB101 wurden mit den so hergestellten Expressionsvektoren transformiert und in geeigneten Medien kultiviert.

Ein für die Expression von VAC-alfa und VAC-beta gut geeignetes Medium sei im folgenden mit seinen Komponenten angeführt.

0,2	-	2,0 g/l	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
0,1	-	1,5 g/l	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
0,1	-	5 g/l	KCl
0,1	-	10 g/l	NaCl
0	-	5 g/l	NH_4Cl
0,1	-	5 g/l	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,001	-	0,1 g/l	CaCl_2
1	-	50 mg/l	Thiamin.HCl
0,5	-	100 mg/l	$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,1	-	5 mg/l	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,1	-	10 mg/l	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,2	-	5 mg/l	$\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
0,1	-	5 mg/l	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0,05	-	1 mg/l	H_3BO_3
0,1	-	5 mg/l	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,1	-	5 mg/l	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,1	-	5 mg/l	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,1	-	5 mg/l	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
10	-	30 g/l	Caseinhydrolysat (Merck Art.# 2238)
0	-	100 g/l	Caseinhydrolysat (Sigma C9386)
0,10	-	1 mg/l	Cystein
0	-	10 g/l	Hefeextrakt (Difco)
0	-	2 g/l	Citronensäure
0	-	50 g/l	Glucose (Start)
5	-	50 g/l	Glucose (Zufütterung während der

Fermentation)

Besonders geeignet ist das Medium der Zusammensetzung:

Medien: 1) Vorkultur

10	g/l	Trypton
5	g/l	Hefeextrakt
4	g/l	Glucose
9	g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1	g/l	NH_4Cl
1	g/l	KCl
1	ml/l	1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
100	mg/l	Ampicillin

Start-pH = 7,2

2) Hauptkultur

0,68	g/l	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
0,62	g/l	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
2,33	g/l	KCl
0,5	g/l	NaCl
0,53	g/l	NH_4Cl
1,23	g/l	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,011	g/l	CaCl_2
10	mg/l	Thiamin.HCl
3,92	mg/l	$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,72	mg/l	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,71	mg/l	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
1,5	mg/l	$\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
0,75	mg/l	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0,19	mg/l	H_3BO_3
0,51	mg/l	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,79	mg/l	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,73	mg/l	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,86	mg/l	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
21	g/l	Caseinhydrolysat (Merck Art.# 2238)
25	g/l	Caseinhydrolysat (Sigma C9386)
100	mg/l	Cystein
2	g/l	Hefeextrakt
1	g/l	Citronensäure
11	g/l	Glucose. H_2O (Start bzw. Feed)

Zur Fermentation wurde beispielsweise das Vorkulturmedium mit E.coli, transformiert mit dem entsprechenden Expressionsvektor, angeimpft und unter Rühren und Sauerstoffzufuhr inkubiert. Ein Teil dieser Vorkultur wurde dann in einen Fermenter mit dem Hauptkulturmedium überführt und unter Rühren und Belüften kultiviert. Während der Fermentationszeit wurde die Glucosekonzentration und der Sauerstoffpartialdruck beobachtet und entsprechend optimiert. Nach etwa 20 Stunden Fermentationszeit wurde der Ansatz abgekühlt, das Nährmedium von der Biomasse abgetrennt und eingefroren.

Der Nachweis der exprimierten Proteine erfolgte beispielsweise durch Western Blot. Das Ergebnis ist in Fig. 19 weitergegeben.

"-Phosphat" ist die Kontrolle ohne Expression, "-Phosphat" zeigt die Expression von VAC-alfa (Klon HB101/pRH291) bzw. VAC-beta (Klon HB101/pRH292) Protein unter der Kontrolle des alkalischen Phosphatase Promotors. Sowohl VAC-alfa als auch VAC-beta Protein sind bereits auf dem gefärbten Gel zu erkennen. Die gebildete Menge an VAC-Proteinen beträgt überraschenderweise mindestens 20 mg/l/OD_{600nm} Bakterienkultur.

Der Western Blot zeigt deutlich die angefärbte VAC-alfa Bande. Zusätzlich sind einige Proteine niedrigeren Molekulargewichts im Bereich bis 30 kD erkennbar, die möglicherweise durch proteolytische Spaltung am N- und/oder C-Terminus des VAC-alfa Proteins entstanden sind. Auffällig ist außerdem ein durch das Antiserum erkanntes Protein im Bereich kleiner 20 kD, das ein durch Proteolyse entstandenes Halbmolekül des VAC-alfa Proteins darstellen könnte. Überraschenderweise wurde

auch VAC-beta durch Anti-VAC-Antiserum erkannt. Da diese Bande wesentlich schwächer als die VAC-alfa Bande gefärbt ist, andererseits aber die VAC-beta Bande im Coomassie Blau gefärbten Gel in ihrer Intensität dem VAC-alfa entspricht, ist daraus zu schließen, daß die Erkennung des VAC-beta Proteins durch das Anti-VAC-Antiserum wesentlich schlechter als jene des VAC-alfa Proteins erfolgt.

Zur Isolierung und Reinigung der exprimierten Proteine wurde die gefrorene Biomasse in einem geeigneten Lyse-Puffer suspendiert. Die Zellen wurden anschließend mechanisch, beispielsweise durch eine Manton-Gaulin Presse zerstört. Nach Zugabe eines Fällungsmittels für Nicht-Protein-Bestandteile, wie Polyethylenimin, wurden die festen Bestandteile beispielsweise durch Zentrifugation entfernt. Nach Ausfällung der Proteine, vorzugsweise durch Ammoniumsulfatfraktionierung, Auflösung des Präzipitates, Entfernung des Fällungsmittels und Klärung der Lösung wurde der so erhaltene Extrakt verschiedenen chromatographischen Reinigungsschritten unterworfen. Anstelle der Ausfällung der Proteine läßt sich der rohe VAC-Extrakt auch durch eine chromatographische Vorreinigung soweit reinigen, daß er anschließend einem Reinigungszyklus unterworfen werden kann. Als geeignetes Säulenmaterial für die Vorreinigung hat sich beispielsweise SiO_2 herausgestellt, doch sind auch andere Materialien mit ähnlichen Eigenschaften geeignet. Erfindungsgemäß wurde Silica Catalyst, Carrier, Grade 953 W der Firma Grace verwendet.

Ein für die Reinigung der erfindungsgemäßen Proteine geeigneter chromatographischer Reinigungszyklus bestand beispielsweise aus einer DEAE-Fast-Flow-Sephacryl S-200 High

Resolution- und einer Q-Sepharose-Fast-Flow-Chromatographie. Die Reinheit der so erhältlichen erfindungsgemäßen Proteine wurde mittels SDS-PAGE, Western Blot, Gelpermeations HPLC, Reverse HPLC und isoelektrischer Fokussierung bestimmt.

Die für sämtliche Kultivierungs-, Isolierungs- und Reinigungsschritte erforderlichen einzuhaltenden Parameter wie Temperatur, Mengenverhältnisse, Reihenfolge der einzelnen Schritte, pH-Werte, besondere Reagentien etc. sind dem Fachmann bestens bekannt. Die unten angegebenen Beispiele können, falls gewünscht, in geeigneter, dem Fachmann bekannter Weise abgewandelt werden.

Von besonderer Bedeutung ist die Frage, ob ein durch gentechnische Methoden hergestelltes VAC-Protein, im folgenden kurz r-VAC genannt, mit dem aus natürlichem Material erhältlichen VAC-Protein (s. EPA 0 181 465), im folgenden VAC genannt, identisch ist; identisch sowohl in seiner Struktur als auch in seinen biologischen Eigenschaften.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden folgende Methoden verwendet:

1. Gelpermeations-HPLC
2. Reverse Phase HPLC
3. N-terminale Sequenzierung
4. Tryptische Peptid Karte
5. SDS-Gelelektrophorese
6. Western Blot
7. Isoelektrische Fokussierung

Die Gelpermeations-HPLC weist für VAC ein Molekulargewicht von 34.000, für r-VAC von 33.000 auf, was innerhalb der Genauigkeit der Methode als gleichwertig zu betrachten ist. Es ist zu beachten, daß die verwendete Säule streng genommen nicht nach dem Molekulargewicht sondern nach der Molekülgröße differenziert.

Bei der Reverse Phase HPLC eluieren beide Proteine nach einer Retentionszeit von etwa 29 Minuten.

Die N-terminale Sequenzierung des r-VAC bis zur Aminosäure 39 ergab 100%ige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz. N-terminales Methionin, oft bei gentechnisch hergestellten Proteinen zusätzlich anzutreffen, konnte überraschenderweise nicht nachgewiesen werden. Wie zu erwarten war, liegt der N-Terminus des r-VAC unblockiert vor.

Bei dem Vergleich der tryptischen Fragmentierung ergab sich ein praktisch identisches Peptidmuster.

Auch der Vergleich der beiden Proteine mittels SDS-PAGE zeigte praktisch gleichartiges Verhalten. Beide beinhalten dimere Formen, die offensichtlich über Disulfidbrücken gebunden sind und mit Dithiothreitol reduziert werden können.

Ebenso bestätigte der immunologische Vergleich durch Western Blot die Identität der beiden Proteine.

Der bei der Ermittlung des isoelektrischen Punktes festzustellende Unterschied von +0,1 pH-Einheiten bei r-VAC läßt sich durch den freien N-Terminus erklären.

Zur Überprüfung der biologischen Aktivität des r-VAC wurden verschiedene Koagulationstest durchgeführt und die Ergebnisse mit denen verglichen, die mit VAC aus natürlichem Material erhalten wurden. Alle durchgeführten Tests, der modifizierte Prothrombin Zeit Test, ebenso wie der Thrombin Test, ebenso wie die Faktor X_a -Generation in Gewebefaktor-aktiviertem Plasma belegen eindeutig, daß r-VAC biologische Aktivität aufweist, und daß diese nicht zu unterscheiden ist von der des VAC aus natürlichem Material.

Die aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz für VACB zeigt eine 54% Homologie zu VAC- α . Aufgrund dieses Befundes wurden einige biologische Aktivitäten von VAC-B mit denen von VAC- α verglichen.

1. Der Effekt von VAC- α und VAC-B auf die Prothrombinase-Aktivität: Fig. 47 zeigt, daß beide Proteine VAC- α und VAC-B den gleichen inhibitorischen Effekt auf die Prothrombinase-Aktivität ausüben, was den gleichen Mechanismus für die Koagulationsinhibition vermuten läßt.
2. Phospholipase Inhibitionsaktivität: wie bereits erwähnt, lassen sich VAC- α aufgrund ihrer Primärstruktur und VAC-B in die Familie der Amexine einordnen. (Gusow, M.J. (1987) Festsletters 203, 99-103). Einige andere Mitglieder dieser Familie, z.B. Calpactin I und II haben sich als Phospholipase Inhibitoren herausgestellt. Ihre Aktivität beruht auf einer Calcium-abhängigen Bindung an die Phospholipide wodurch sie den Angriff der Phospholipase auf ihr Substrat blockieren (Davidson et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1698-1705).

Da nun VAC- α und VAC- β Calcium-abhängig an Phospholipide binden, wurde überprüft, ob die beiden Proteine ebenso auch mögliche Antiphospholipase-Aktivitäten aufweisen. Ein Testverfahren mit ^{3} -H-Ölsäure markiertem E.coli wurde hierzu verwendet.

Die Figuren 48 und 49 zeigen, daß sowohl VAC- α als auch VAC- β Phospholipase A₂ Aktivität inhibieren. Weiterhin sind beide Proteine unter den gewählten Bedingungen gleich aktiv. 50% Inhibition wurde bei ca. 65 mM VAC- α oder VAC- β beobachtet. Verminderung der Substrat Konzentration auf die Hälfte resultierte in einer Reduzierung der ID₅₀ von VAC auf die Hälfte. Dies ist ein Hinweis darauf, daß VAC auf der Substratebene agiert. Folglich findet VAC wahrscheinlich an die Phospholipidmembranen und inhibiert hierdurch die Phospholipase Aktivität.

Calpactin I bindet an Phospholipidmembranen auf dem mikromolaren Ca⁺⁺ Level (Drust, D.S. & Cremitz, C.E. (1988) Nature 331, 88-91). Daher wurde untersucht, ob VAC in der Lage ist, Phospholipase-Aktivität bei geringer Calcium Konzentration zu inhibieren. Da die pankreatische Phospholipase A₂ bei Ca⁺⁺ Konzentrationen unter 50 mM inaktiv war, was das die niedrigste verwendete Konzentration. Die Figuren 50 und 51 zeigen die Calcium-Abhängigkeit der VAC induzierten Inhibition der Phospholipase Aktivität. Bei allen Ca⁺⁺ Konzentrationen zeigte sowohl VAC- α als auch VAC- β Inhibitor-Aktivitäten. Doch scheint ein funktioneller Unterschied zwischen VAC- α als auch VAC- β Inhibitor-Aktivitäten. Doch scheint ein funktioneller Unterschied zwischen VAC- α und VAC- β zu bestehen. Bei der niedrigsten Ca⁺⁺-Konzentration war VAC- β signifikant aktiver als VAC- α . Dies könnte implizieren, daß VAC- β weniger Ca⁺⁺ zur Membranbindung benötigt.

Verfahrensgemäß erhältliche VAC-Proteine können in an sich bekannter Weise in andere VAC-Proteine (Peptide) überführt werden.

Untersuchungen haben gezeigt, daß Disulfidbrücken für die gerinnungshemmende Aktivität von natürlichem VAC ohne Bedeutung ist. Je nach Wahl der Wirtszelle kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine Verknüpfung der Cystein-Reste im primären Translationsprodukt unter Bildung von Disulfidbrücken in einer Weise erfolgt, die sich vom natürlich ablaufenden Vorgang unterscheidet. Es ist möglich, daß die sich einstellende "falsche" Tertiärstruktur des Produktes eine Verminderung oder sogar den Verlust, evtl. aber auch eine Verbesserung, der wertvollen pharmakologischen Eigenschaften, insbesondere der gerinnungshemmenden Aktivität, zur Folge hat, was sich mit Hilfe der oben genannten VAC-Assays feststellen läßt. In einem solchen Fall ist es gegebenenfalls zweckmäßig, die Disulfidbindungen mit einem geeigneten Reduktionsmittel zu spalten und das reduzierte Polypeptid zur Neuknüpfung der Disulfidbindungen mit einem geeigneten Oxidationsmittel zu behandeln. Anhand der VAC-Aktivität des gebildeten Produktes läßt sich feststellen, ob die gewählten Bedingungen (Reduktions- und/oder Oxidationsmittel) zur gewünschten Steigerung der biologischen Aktivität geführt haben oder ob die Bedingungen in bekannter Weise modifiziert werden müssen.

Zur Aufspaltung von Disulfidbrücken geeignete Reduktionsmittel sind beispielsweise Thiol-Verbindungen, wie Thiophenol, 4-Nitrothiophenol, 1,4-Butandithiol und insbesondere 1,4-Dithiothreitol.

Die Reduktion wird vorteilhaft in einem wässrig-alkalischen Medium, beispielsweise in der verdünnten wässrigen Lösung eines Alkalimetallhydroxids, z.B. Natriumhydroxid, Alkalimetallcarbonats, z.B. Natriumcarbonats, oder einer organischen Base, insbesondere eines Triniederalkylamins, z.B. Triäthylamin, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Oxidationsmittel, welche zur Neuknüpfung von Disulfidbindungen in den reduzierten Polypeptiden geeignet sind, sind beispielsweise Luftsauerstoff, welcher durch eine wässrige Lösung des Polypeptids, der gegebenenfalls eine katalytische Menge eines Übergangsmetallsalzes, z.B. Eisen-(III)-sulfat, Eisen-(III)-chlorid oder Kupfer-(II)-sulfat, beigelegt wurde, geleitet wird; Jod, auch in Form des Kaliumjodid-Adduktes KJ_3 , welches vorzugsweise in alkoholischer, z.B. methanolischer, oder wässrig-alkoholischer, z.B. wässrig-methanolischer Lösung eingesetzt wird; Kaliumhexacyanoferrat-(III) in wässriger Lösung; 1,2-Dijodäthan oder Azodicarbonsäuredimethylester oder -diäthylester, welche in Wasser oder in einer Mischung bestehend aus Wasser und einem mit Wasser mischbaren Alkohol, z.B. Methanol, zur Reaktion gebracht werden. Die Oxidation wird insbesondere bei Raumtemperatur ausgeführt.

Die Abtrennung der Reagentien, insbesondere der Salze und der Oxidations- bzw. der Reduktionsmittel und ihrer Folgeprodukte, von der gewünschten VAC-Verbindung erfolgt nach an sich bekannten Methoden, beispielsweise durch Molekulargewichtsfiltration, z.B. an Sephadex oder Biogel.

Ein verfahrensgemäß erhältliches Gemisch von Verbindungen mit VAC-Aktivität kann in an sich bekannter Weise in die einzelnen Komponenten aufgetrennt werden. Geeignete Trennverfahren sind beispielsweise chromatographische Verfahren, z.B. Adsorptions-Chromatographie, Ionenaustauschchromatographie, HPLC oder Reverse-Phase HPLC, ferner multiplikative Verteilung oder elektrophoretische Methoden, z.B. Elektrophorese an Celluloseacetat oder Gelelektrophorese, insbesondere Polyacrylamid- Gelelektrophorese ("PAGE").

Die erfindungsgemäß herstellbaren Verbindungen können nicht nur in freier Form, sondern auch in Form ihrer Salze, insbesondere ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, vorliegen. Da sie mehrere Aminosäurereste mit freien Aminogruppen enthalten, können die erfindungsgemäßen Verbindungen z.B. in Form von Säureadditionssalzen vorliegen. Als Säureadditionssalze kommen insbesondere physiologisch verträgliche Salze mit üblichen, therapeutisch anwendbaren Säuren in Betracht; als anorganische Säuren sind die Halogenwasserstoffsäuren, wie die Chlorwasserstoffsäure, aber auch Schwefelsäure und Phosphor- bzw. Pyrophosphorsäure zu nennen; als organische Säuren sind in erster Linie Sulfonsäuren, wie die Benzol- oder p-Toluosulfonsäure oder Niederalkansulfonsäuren, wie Methansulfonsäure, sowie Carbonsäuren, wie Essigsäuren, Milchsäure, Palmitin- und Stearinsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Ascorbinsäure und Citronensäure geeignet. Da die VAC-Verbindungen auch Aminosäurereste mit freien Carboxylgruppen enthalten, können sie auch als Metallsalz, insbesondere als Alkalimetall- oder Erdalkalimetallsalz, z.B. Natrium-, Calcium- oder Magnesiumsalz, oder auch als

Ammoniumsalz, abgeleitet von Ammoniak oder einer physiologisch verträglichen, organischen stickstoffhaltigen Base, vorliegen. Da sie aber zugleich freie Carboxylgruppen und freie Aminogruppen enthalten, können sie auch als innere Salz vorliegen.

Je nach Arbeitsweise erhält man die erfindungsgemäßen Verbindungen in freier Form, in Form von Säureadditionssalzen oder Salzen mit Basen. Aus den Säureadditionssalzen und den Salzen mit Basen können in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Einstellen des pH-Wertes auf den isoelektrischen Punkt, die freien Verbindungen gewonnen werden. Von letzteren wiederum lassen sich durch Umsetzen mit Säuren bzw. Basen, z.B. mit solchen, die die oben genannten Salze bilden, und Eindampfen oder Lyophilisieren therapeutisch annehmbare Säureadditionssalze bzw. Salze mit Basen gewinnen.

Die Eigenschaft von Antikörpern, spezifische Antigene zu binden, findet außerhalb des Körpers praktische Anwendung bei der qualitativen und quantitativen Bestimmung (Immuno-Assay) und bei der Reinigung der Antigene (Immunoaffinitätschromatographie). Serum immunisierter Tiere enthält normalerweise eine Vielzahl verschiedener Antikörper, die mit dem gleichen Antigen an verschiedenen Bindungsstellen mit verschiedener Affinität reagieren, dazu aber auch Antikörper gegen andere Antigene, die die früheren Erfahrungen des Individuums widerspiegeln. Die erfolgreiche Anwendung von Antikörpern zur Bestimmung und Reinigung von Antigenen erfordert aber hohe Spezifität und Reproduzierbarkeit.

Homogene Antikörper, die diese Anforderungen erfüllen, sind durch die von Köhler und Milstein (17) beschriebene Hybridoma-Technik zugänglich geworden. Prinzipiell besteht die Technik darin, daß Antikörper ausscheidende B-Lymphozyten, z.B. aus der Milz, immunisierter Tiere mit Tumorzellen verschmelzen ("fusioniert") werden. Die gebildeten Hybridoma-Zellen kombinieren die Fähigkeit zur unbegrenzten Vermehrung durch Teilung mit der Fähigkeit, einen einheitlichen Typ Antikörper zu bilden und auszuschcheiden. Durch Kultivierung in einem selektiven Medium, in dem nicht fusionierte Tumorzellen absterben, Hybridoma-Zellen sich aber vermehren, und durch geeignete Manipulationen können Klone, d.h. Zellpopulationen, die sich von einer einzigen Hybridoma-Zelle ableiten und genetisch identisch sind, gewonnen und kultiviert und die durch die Zellen produzierten monoklonalen Antikörper isoliert werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen VAC, Hybridomazellen, die solche Antikörper produzieren und Verfahren zu ihrer Herstellung. Bevorzugt sind Hybridomazelllinien und die von diesen ausgeschiedenen monoklonalen Antikörper, die spezifisch mit VAC reagieren. Das Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Anti-VAC- α und Anti-VAC- β -Antikörpern ist dadurch gekennzeichnet, daß man Mäuse mit VAC immunisiert, B-Lymphozyten derart immunisierter Tiere mit Myelomazellen fusioniert, die gebildeten Hybridomazellen kloniert, dann in vitro oder durch Injektion in Mäusen kultiviert und aus den Kulturen Antikörper isoliert.

Die Erfindung betrifft ferner Immuno-Affinitäts-chromatographie-Säulen und Test-Kits für Immunoassays, die diese Antikörper enthalten.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren werden Mäuse, z.B. Balb/c-Mäuse, auf an sich bekannte Weise immunisiert. In einer bevorzugten Ausführungsform wird VAC etwa wöchentlich oder auch in größeren Abständen während mehreren Wochen, beispielsweise 5 bis 12 Wochen, injiziert, bis sich eine genügende Zahl Antikörper-produzierender B-Lymphozyten gebildet hat.

Zur Steigerung der Immunogenität des eingesetzten VAC wurde es an stark immunogene Träger wie beispielsweise heterologes Albumin oder "keyhole limpet hemocyanin" (KLH) gekoppelt. Bevorzugt wurden verschiedene VAC/KLH Präparationen eingesetzt, wobei nach einem Immunisierungsschema so lange immunisiert wurde, bis sich genügend Antikörper-produzierende Zellen gebildet hatten, beispielsweise bis zu ca. 40 Wochen.

B-Lymphozyten enthaltende Organe, z. B. Milzzellen, der immunisierten Mäuse werden entnommen und mit solchen Myelomazellen fusioniert, die aufgrund einer Mutation in einem selektiven Kulturmedium nicht wachsen. Solche Myelomazellen sind bekannt und sind beispielsweise jene mit der Bezeichnung X63-Ag8, X63-Ag8.6.5.3, MPC-11, NS1-Ag4/1, MOPC-21 NS/1 oder SP 2/0. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Milzzellen immunisierter Mäuse mit Myelomazellen der Zell-Linie X63-Ag8.6.5.3 fusioniert.

Die Fusion wird nach an sich bekannten Verfahren durch Mischen der B-Lymphozyten und der Myelomazellen unter Zugabe eines Zellfusionsagens, wie Polyethylenglykol, Sendai-Virus, Calciumchlorid oder Lysolecithin durchgeführt. Vorzugsweise wird in Gegenwart von Polyethylenglykol, beispielsweise mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 4000, fusioniert.

Nach der Fusion werden die entstandenen Hybride nach einem an sich bekannten Verfahren in einem selektiven Kulturmedium, das mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium) komplementiert ist, kultiviert. Nicht fusionierte Myelomazellen können in diesem Medium nicht wachsen und sterben ebenso wie normale Lymphozyten.

Die Überstände der Hybridoma-Kulturen können mit an sich bekannten Verfahren auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern geprüft werden, beispielsweise mit Radio-Immunoassay, ELISA oder Agglutinierung. Dabei wird überraschenderweise festgestellt, daß mit dem beschriebenen Verfahren Hybridoma-Zellen gewonnen werden können, die Antikörper spezifisch gegen VAC ausscheiden. Die Hybridomazellen, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren, werden aus dem aus der Fusionierung hervorgegangenen Gemisch verschiedenster Hybridomazellen durch Klonieren herausselektioniert. Dazu werden nach einem an sich bekannten Verfahren, das "limiting dilution" genannt wird, Kulturen ausgehend von einer einzigen wachsenden Zelle angesetzt.

Zur Massenproduktion werden die Hybridoma-Zellklone, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren, entweder in an sich bekannten Medien in vitro kultiviert oder zur Vermehrung in Mäuse injiziert. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Hybridomazellen in mit Pristan vorbehandelte Mäuse injiziert, Aszites-Flüssigkeit entnommen und daraus durch Fällung mit Ammoniumsulfat-Lösung Antikörper isoliert.

Die mit Hilfe dieser Hybridomazellen gewonnenen VAC spezifischen Antikörper können auf an sich bekannte Weise für die Herstellung von Immuno-Affinitätschromatographie- Säulen verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein geeignetes Trägermaterial (suspendiert in einer Pufferlösung) mit einer Antikörper-Lösung versetzt, ungebundene Anteile werden anschließend ausgewaschen und unbesetzte Stellen des Trägermaterials blockiert.

Die mit Hilfe der Hybridomazellen gewonnenen VAC spezifischen Antikörper können auf an sich bekannte Weise für die Herstellung von Test-Kits verwendet werden. Diese Test-Kits können auf verschiedenen Methoden beruhen, beispielsweise auf Radio-Immuno-Assay, Latex-Agglutininierung, Tüpfel-Tests, Kompetitive oder Sandwich-Radio-Immunoassay, Enzym-Immunoassay, Immuno-Fluoreszenz oder immunochemischen Enzym-Tests. Solche Kits können neben gewöhnlichen Antikörpern verschiedener Herkunft Antikörper-Konjugate mit Enzymen oder Fluoreszenzträgern enthalten, dazu VAC markiert mit radioaktiven Isotopen wie J^{125} , oder konjugiert mit Enzymen, beispielsweise mit Meerrettich-Peroxidase oder alkalischer Phosphatase, ferner Enzymsubstrate, geeignete Puffer, Gele, Latex, Polystyrol oder andere Füllmaterialien und Träger.

Die gemäß der vorliegenden Erfindung erhältlichen bekannten Proteine (Peptide) weisen wertvolle pharmakologische Eigenschaften auf und können prophylaktisch oder insbesondere therapeutisch angewendet werden.

Die erfindungsgemäßen neuen VAC Verbindungen können daher in Analogie zu natürlichem VAC zur Therapie und Prophylaxe von Thrombosen und Thromboembolien, einschließlich zur Prophylaxe von postoperativen Thrombosen, zur akuten Schock-Therapie (z. B. bei septischem oder polytraumatischem Schock), zur Therapie von Verbrauchskoagulopathien, bei Hämodialysen, Hämostaseparationen, Blutkonserven und im extrakorporalen Kreislauf verwendet werden.

Die Erfindung betrifft ebenfalls pharmazeutische Zusammensetzungen, welche wenigstens eine der erfindungsgemäßen Verbindungen oder deren pharmazeutisch annehmbaren Salze, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger und/oder Hilfsstoffen, enthalten. Diese Zusammensetzungen können insbesondere bei den oben angegebenen Indikationen Verwendung finden, wenn sie z. B. parenteral, wie intravenös, intracutan, subcutan oder intramuskulär, oder topisch verabreicht werden.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung der erfindungsgemäßen neuen Verbindungen und diese enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen für die prophylaktische und therapeutische Behandlung des menschlichen und tierischen Körpers, insbesondere bei den oben angegebenen Krankheitsbildern, in erster Linie zur Hemmung der Gerinnung des Blutes innerhalb und außerhalb des menschlichen und tierischen Körpers.

Die Dosierung hängt in erster Linie von der spezifischen Verabreichungsform und vom Zweck der Therapie bzw. Prophylaxe ab. Die Größe der Einzeldosen sowie das Verabreichungsschema kann am besten anhand einer individuellen Beurteilung des jeweiligen

Krankheitsfalles bestimmt werden: die dazu erforderlichen Methoden zur Bestimmung von relevanten Blutfaktoren sind dem Fachmann geläufig. Im Normalfall liegt bei einer Injektion die therapeutisch wirksame Menge der erfindungsgemäßen Verbindungen im Dosisbereich von etwa 0,005 bis etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht. Bevorzugt wird der Bereich von etwa 0,01 bis etwa 0,05 mg/kg Körpergewicht. Die Verabreichung erfolgt durch intravenöse, intramuskuläre oder subcutane Injektion. Dementsprechend enthalten pharmazeutische Präparate zur parenteralen Verabreichung in Einzeldosis-Form in Abhängigkeit von der Applikationsart pro Dosis etwa 0,4 bis etwa 7,5 mg der erfindungsgemäßen Verbindung. Neben dem Wirkstoff enthalten diese pharmazeutischen Zusammensetzungen üblicherweise noch einen Puffer, z. B. einen Phosphatpuffer, der den pH-Wert zwischen etwa 3,5 und 7 halten soll, und ferner Natriumchlorid, Mannit oder Sorbit zur Einstellung der Isotonie. Sie können in gefriergetrockneter oder gelöster Form vorliegen, wobei Lösungen ein antibakteriell wirkendes Konservierungsmittel, z. B. 0,2 bis 0,3 % 4-Hydroxybenzoesäuremethylester oder -ethylester, enthalten können. Ein Präparat für die topische Anwendung kann als wässrige Lösung, Lotion oder Gelee, ölige Lösung oder Suspension, oder fetthaltige oder insbesondere Emulsions-Salbe vorliegen. Ein Präparat in Form einer wässrigen Lösung erhält man beispielsweise dadurch, daß man die erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder ein therapeutisch annehmbares Salz davon in einer wässrigen Pufferlösung von pH 4 bis 6,5 löst und gewünschtenfalls einen weiteren Wirkstoff, z. B. ein Antiinflammatorikum, und/oder ein polymeres Haftmittel, z. B. Polyvinylpyrrolidon, und/oder ein Konservierungsmittel zufügt. Die Konzentration des

Wirkstoffs beträgt etwa 0,1 bis etwa 1,5 mg, vorzugsweise 0,25 bis 1,0 mg, in 10 ml einer Lösung bzw. 10 g eines Geles.

Eine ölige Applikationsform für die topische Verabreichung erhält man beispielsweise durch Suspendieren der erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder eines therapeutisch annehmbaren Salzes davon in einem Öl, gegebenenfalls unter Zusatz von Quellmitteln, wie Aluminiumstearat, und/oder grenzflächenaktiven Mitteln (Tensiden), deren HLB-Wert ("hydrophilic-lipophilic-balance") unter 10 liegt, wie Fettsäuremonoester mehrwertiger Alkohole, z. B. Glycerinmonostearat, Sorbitanmonolaurat, Sorbitanmonostearat oder Sorbitanmonocoleat. Eine fetthaltige Salbe erhält man z. B. durch Suspendieren der erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder deren Salze in einer streichbaren Fettgrundlage, gegebenenfalls unter Zusatz eines Tensids vom HLB-Wert unter 10. Eine Emulsionssalbe erhält man durch Verreiben einer wässrigen Lösung der erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder deren Salze in einer weichen, streichbaren Fettunterlage unter Zusatz eines Tensids, dessen HLB-Wert unter 10 liegt. Alle diese topischen Applikationsformen können auch Konservierungsmittel enthalten. Die Konzentration des Wirkstoffes beträgt 0,1 bis 1,5 mg, vorzugsweise 0,25 bis 1,0 mg, in etwa 10 g der Grundmasse.

Neben den oben beschriebenen und ihren analogen pharmazeutischen Zusammetzungen, welche für einen direkten medizinischen Einsatz am Körper des Menschen oder eines Säugetieres bestimmt sind, betrifft die vorliegende Erfindung auch pharmazeutische Zusammensetzungen und Präparate zur medizinischen Anwendung außerhalb des lebenden Körpers des Menschen

oder der Säugetiere. Solche Zusammensetzungen und Präparate verwendet man in erster Linie als gerinnungshemmenden Zusatz zu Blut, welches außerhalb des Körpers einer Zirkulation oder Behandlung (z.B. extrakorporaler Kreislauf oder Dialyse in künstlichen Nieren), Konservierung oder Modifizierung (z.B. Hämostaseparation) unterzogen wird. In ihrer Zusammensetzung sind derartige Präparate, wie Vorratslösungen oder auch Zubereitungen in Einzeldosis-Form, den oben beschriebenen Injektionspräparaten ähnlich; zweckmäßigerweise wird aber die Wirkstoffmenge bzw. -konzentration auf das Volumen des zu behandelnden Blutes bezogen. Je nach dem spezifischen Zweck beträgt die geeignete Dosis etwa 0,01 bis etwa 1,0 mg Wirkstoff/l Blut, wobei die obere Grenze ohne Gefahr noch überschritten werden darf.

Insbesondere betrifft die Erfindung die in den Belegbeispielen beschriebenen, für die für VAC-Proteine kodierenden DNA-Moleküle, solche DNA-Moleküle enthaltende Expressionsplasmide, mit solchen Expressionsplasmiden transformierte Mikroorganismen, monoklonale Antikörper gegen VAC, Hybridoma-Zellen, die solche Antikörper produzieren, und Test-Kits für Immunoassays, die solche Antikörper enthalten, die in den Beispielen beschriebenen Verfahren zu ihrer Herstellung und das in den Beispielen beschriebene Verfahren zur Herstellung von Proteinen/Polypeptiden mit VAC-Aktivität mit Hilfe der transformierten Mikroorganismen, sowie die in den Beispielen beschriebenen neuen VAC-Verbindungen.

Wird in der vorliegenden Anmeldung von vascular-antikoagulierenden Proteinen oder in der Kurzform VAC-Protein gesprochen, so bedeutet das wenn nicht anders angegeben, daß hiermit Polypeptide/

Proteine gemeint sind, die im wesentlichen die Eigenschaften aufweisen, die den Proteinen eigen sind, die in der EPA 181 465 erstmals beschrieben wurden. Diese Eigenschaften lassen sich durch die dort angegebenen Test- und Charakterisierungsverfahren feststellen und überprüfen (VAC-Aktivität).

Weiterhin fallen unter diese Definition auch die Polypeptide/Proteine, die Aggregationen wie beispielsweise Dimere, Trimere oder Tetramere darstellen, auch wenn diese in der aggregierten Form per se nicht oder nur eingeschränkte biologische Aktivitäten aufweisen, unter der Voraussetzung, daß diese in vivo oder in vitro in zumindest eine aktive Komponente zu überführen sind.

Werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Polypeptide/ Proteine erhalten, die per se nicht oder nur eingeschränkte biologische Aktivitäten aufweisen, beispielsweise Fusionsproteine oder sogenannte "pro-drugs", Polypeptide/Proteine, die für den Fachmann in an sich bekannter Weise in die aktiven Komponenten . überführbar sind, beispielsweise durch in vitro oder in vivo Prozessierung oder Polypeptide/Proteine, die erst in vivo ihre Aktivität entfalten, so sollen auch diese unter die Definition vascular-antikoagulierende-, kurz VAC-Proteine gefaßt sein und damit zum Gegenstand der vorliegenden Erfindung gehören.

Unter "Verbindungen mit VAC-Aktivität" werden auch solche, von den genannten transformierten Wirtszellen exprimierte Polypeptide verstanden, welche eine VAC-Wirkung und eine positive Reaktion mit anti-VAC-Antikörpern zeigen und welche die Primärstruktur von VAC oder eine davon abgeleitete

Struktur aufweisen. Unter VAC-Verbindungen mit einer von der Primärstruktur von VAC abgeleiteten Struktur werden modifizierte VAC-Verbindungen verstanden, wobei die Modifizierung in einer Verkürzung der Primärstruktur des VAC, in einer Umordnung der Repeat-Struktur oder in einer Modifizierung, die zu einer Veränderung der Stabilität bzw. Aktivität führt.

VAC-DNA/Gen steht in der vorliegenden Erfindung für die DNA-Moleküle, die für die oben definierten VAC-Proteine kodieren.

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

Um die nachfolgenden Beispiele zu vereinfachen, werden oft wiederkehrende Methoden kurz beschrieben.

Plasmide werden mit einem kleinen "p" bezeichnet, gefolgt von Großbuchstaben und Ziffern.

Ausgangsplasmide sind käuflich oder ohne Einschränkung öffentlich erhältlich. Sie können auch aus solchen Plasmiden mittels publizierter Methoden konstruiert werden.

"Schneiden" oder "Verdauen" von DNA bezieht sich auf die katalytische Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) an für diese spezifischen Stellen, Restriktionsstellen genannt. Restriktionsendonukleasen sind käuflich erhältlich und werden unter den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen (Puffer, Rinderserumalbumin (BSA) als Trägerprotein, Dithiothreitol (DTT) als Oxidationsschutz) eingesetzt.

Restriktionsendonukleasen werden mit einem Großbuchstaben, meist gefolgt von Kleinbuchstaben und normalerweise einer römischen Ziffer bezeichnet. Die Buchstaben hängen von dem Mikroorganismus ab, aus dem die betreffende Restriktionsendonuklease isoliert wurde (z.B.: Sma I: *Serratia marcescens*).

Üblicherweise wird etwa 1 µg DNA mit einer oder mehreren Einheiten des Enzyms in etwa 20 µl Pufferlösung geschnitten. Normalerweise wird eine Inkubationsdauer von 1 Stunde bei 37°C verwendet, kann aber laut den Verwendungsvorschriften des Herstellers variiert werden. Nach dem Schneiden wird manchmal die 5'Phosphatgruppe durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm (CIP) entfernt. Dies dient zur Verhinderung einer ungewünschten Reaktion der spezifischen Stelle in einer nachfolgenden Ligasereaktion (z.B. Zirkularisierung eines linearisierten Plasmids ohne Insertierung eines zweiten DNA-Fragmentes). Wenn nicht anders angegeben, werden DNA-Fragmente nach dem Schneiden mit Restriktionsendonukleasen normalerweise nicht dephosphoryliert. Reaktionsbedingungen für die Inkubation mit alkalischer Phosphatase sind z.B. dem M13 Cloning und Sequencing Handbuch (Cloning and Sequencing handbook, Fa Amersham, PI/129/83/12) zu entnehmen.

Nach der Inkubation wird Protein durch Extraktion mit Phenol und Chloroform entfernt, und die DNA aus der wässrigen Phase durch Zusatz von Äthanol präzipitiert.

"Isolierung" eines bestimmten DNA Fragments bedeutet die Auftrennung der geschnittenen DNA auf einem z.B. 1% Agarosegel. Nach der Elektrophorese und dem Sichtbarmachen der DNA im UV-Licht durch Anfärben mit Äthidiumbromid (EtBr) wird das gewünschte Fragment

anhand mitaufgetragener Molekulargewichtsmarker lokalisiert und durch weitere Elektrophorese an DE 81 Papier (Schleicher und Schuell) gebunden. Die DNA wird durch Spülen mit Niedrigsalzpuffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris pH=7,5, 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend mit einem Hochsalzpuffer (1 M NaCl, 20 mM Tris pH=7,5, 1 mM EDTA) eluiert. Die DNA wird durch Zusatz von Äthanol präzipitiert.

"Southern Analyse" ist jene Methode, durch die die Gegenwart eines bestimmten DNA-Fragments in einem DNA-Gemisch durch Hybridisierung mit einer bekannten, markierten Oligonukleotidsonde oder einem markierten DNA Fragment nachgewiesen wird. Southern Analyse bedeutet im folgenden, so nicht anders spezifiziert, die Auftrennung des DNA Gemischs auf einem 1% Agarosegel, Denaturierung und Transfer auf Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schuell, BA 85) mittels der Methode von E. Southern, J. Mól. Biol. 98 (1978), pp.503-517, und Hybridisierung wie beschrieben in R. Hauptmann et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985), pp.4739-4749.

"Transformation" bedeutet das Einbringen von DNA in einen Organismus, so daß die DNA dort replizierbar ist, entweder extra-chromosomal oder als chromosomale Integranter. Transformation von E.coli folgt der im M13 Cloning and Sequencing Handbuch (Cloning and Sequencing Handbook, Fa Amersham, PI/129/83/12) angegebenen Methode.

"Sequenzieren" einer DNA bedeutet die Analyse der Nukleotidsequenz in einer DNA. Dazu wird die DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, und die Fragmente in entsprechend geschnittene M13 mp8, mp9, mp18 oder mp19 Doppelstrang DNA eingebracht, oder die

DNA wird mittels Ultraschall, nachfolgender Reparatur der Enden und Größenselektion in Sma I geschnittene, dephosphorylierte M13 mp8 DNA (Shotgun Methode) eingebracht. Nach der Transformation von E.coli JM 101 wird Einzelstrang DNA aus rekombinanten M13 Phagen entsprechend dem M13 Cloning and Sequencing manual (Cloning and Sequencing Handbook, Fa Amersham, PI/129/83/12) isoliert und nach der Sanger'schen Dideoxymethode (F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 74 (1977), pp.5463-5467) sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgt mittels der ursprünglich von R. Staden entwickelten (R. Staden, Nucleic Acids Res. 10 (1982), pp.4731-4751) und von Ch. Pieler modifizierten (C. Pieler 1987, Dissertation, Universität Wien) Computerprogramme.

"Ligieren" bezieht sich auf den Prozeß der Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Enden von Doppelstrang-DNA Fragmenten. Üblicherweise werden zwischen 0,02 und 0,2 µg DNA-Fragmente in 10 µl mit etwa 5 units T4-DNA Ligase ("Ligase") in einer geeigneten Pufferlösung ligiert (T.Maniatis et al., Molecular cloning, 1982, p.474).

"Präparation" von DNA aus Transformanten bedeutet die Isolierung der Plasmid DNA aus Bakterien mittels der alkalischen SDS Methode modifiziert nach Birnboim und Doly (T.Maniatis et al., Molecular cloning, 1982, pp.368-369) unter Weglassen des Lysozyms. Dabei werden die Bakterien aus 1,5 bis 50 ml Kultur verwendet.

"Oligonukleotide" sind kurze Polydesoxynukleotide, die chemisch synthetisiert werden. Dazu wurde der Applied Biosystems Synthesizer Modell 381A verwendet. Die Oligonukleotide werden entsprechend dem Modell 381A User Manual (Applied Biosystems) aufgearbeitet und durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) gereinigt.

"Phosphorylieren" bedeutet die enzymatische Uebertragung des gamma-Phosphatrestes aus ATP auf eine freie 5'OH-gruppe einer Nukleinsäure, meist ein Oligonukleotid. In 10 µl Lösung werden bis zu 100 pMol des Oligonukleotids mit 10 Einheiten T 4 -Poly-nukleotidkinase in Gegenwart von 100 pMol ATP in geeigneter Pufferlösung (70 mM Tris, pH=7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT) 30 Minuten bei 37°C phosphoryliert. Die Reaktion wird meist durch 10 Minuten Erhitzen auf 100°C gestoppt.

Einige verwendete Abkürzungen sollen kurz erklärt werden:

bp:	Basenpaare
BSA:	Rinderserumalbumin
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Aethylendinitrilotetraessigsäure, diNatriumsalz
SDS:	Natriumdodecylsulfat
Tris:	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Denhardt:	0,02% Ficoll, 0,02% Polyvinylpyrrolidon, 0,02% BSA
LB:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
1x SSC:	150 mM NaCl, 15 mM tri-Natriumcitrat, pH=7
TE:	10 mM Tris pH=8,0, 1 mM EDTA

Verzeichnis der Abbildungen:

- 0.1: Tryptische Fragmente aus Placenta-VAC
 - 0.2: HPLC der tryptischen Peptide aus Placenta-VAC
 - 0.3: HPLC der tryptischen Peptide aus Nabelschnur-VAC
 - 0.4: Gelpermeations-HPLC von Placenta- und Nabelschnur-VAC
 - 0.5: Reverse-Phase-HPLC von Placenta-VAC
 - 0.6: SDS-Gelelektrophorese von Placenta-VAC
 - 1: Screening-Oligonukleotide EBI-386, -387 und -388
 - 2: Screening-Oligonukleotide EBI-118 und EBI-119
 - 3: Northern Blot Analyse mit VAC-alfa und VAC-beta cDNA
 - 4: VAC-alfa cDNA Sequenz
 - 5: Anordnung der Peptidsequenzen in der VAC-alfa cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz
 - 6: Vierfach wiederholte Subsequenz im VAC-alfa Protein
 - 7: Vac-beta cDNA Sequenz
 - 8: Vierfach wiederholte Subsequenz im VAC-beta Protein
 - 9: Aminosäurezusammensetzung von VAC-alfa und VAC-beta
 - 10: Genomische Southern Blot Analyse mit VAC-alfa und VAC-beta cDNA
 - 11: Aminosäurevergleich von VAC-alfa mit VAC-beta
 - 12: Nukleotidvergleich zwischen VAC-alfa und -beta cDNA
 - 13: Hydrophilizitätsplot von VAC-alfa und VAC-beta
 - 14: Vergleich von VAC-alfa, VAC-beta, Lipocortin I und Lipocortin II
 - 15: Sequenz des Promotor- und Terminator Teils in pRH284
 - 16: Konstruktion von pRH291
 - 17: Konstruktion von pRH212
 - 18: Konstruktion von pRH292
 - 19: SDS-Gelelektrophorese der exprimierten Proteine
 - a) Coomassie Blau gefärbtes Proteingel
 - b) Western Blot
- Legende: M = Molekulargewichtsmarke
+Phosphat = Inhibition der VAC Expression
-Phosphat = VAC Expression (pho Promotor induziert)

20: Reinigung von VAC-alfa; Coomassie Blau gefärbtes
SDS-Gelelektrophorese-Gel

Banden:

- 1: roher Extrakt
 - 2: Ammoniumsulfatpellet (gelöst und dialysiert)
 - 12: 5 µg DEAE-FF-Sepharose Fraktionen
1-11
 - 3: VAC-Pool nach DEAE-FF-Sepharose
Chromatographie
 - 4: VAC-Pool nach Sephacryl-S 200 HR
Chromatographie
 - 5: gereinigtes VAC nach Q-Sepharose-FF-
Chromatographie
 - 6: gereinigtes, natürliches VAC aus
Human-Placenta
 - 7: Molekulargewichtsmarker (Pharmacia; 94kD,
67kD, 43kD, 30kD, 20kD und 14kD)
- 21: Sephacryl S-200 HR Chromatographie von
vorgereinigtem r-VAC-α
- 22: Q-Sepharose-FF-Chromatographie von vorgereinigtem
r-VAC-α
- 23: Gelpermeations-HPLC von natürlichem VAC
- 24: Gelpermeations-HPLC von rekombinantem VAC-α
- 25: Reverse Phase HPLC von natürlichem VAC
- 26: Reverse Phase HPLC von rekombinantem VAC-α
- 27: HPLC der tryptischen Fragmente aus natürlichem VAC
- 28: HPLC der tryptischen Fragmente aus rekombinantem
VAC-α

- 29: SDS-Gel von einem Vergleich zwischen natürlichem und rekombinantem VAC- α in An- oder Abwesenheit von DTT
- 30: SDS-Gel von rekombinantem VAC- α in An- oder Abwesenheit von DTT
- 31: Western Blot Analyse von natürlichem VAC und rekombinantem VAC- α
- 32: Isoelektrische Fokussierung von natürlichem VAC und rekombinantem VAC- α
- 33: Modifizierter Prothrombin Zeit Test mit natürlichem und rekombinantem VAC
- 34: Thrombin Zeit Test mit natürlichem und rekombinantem VAC
- 35: Faktor Xa Bildung im Plasma durch natürliches und rekombinantes VAC
- 36: Bindung von VAC an Phospholipid-Doppelschnitten
- 37: Konstruktion von pGN25 und pGN26.
- 38: Reinigung von rekombinantem VAC 8; Coomassie, Blau gefärbtes SDS-Gelelektrophorese-Gel.
- 39: Reinigung von rekombinantem VAC 8; in process Proben.
- 40: Gelpermeation - HPLC von rekombinantem VAC 8.
- 41: Reverse Phase HPLC von rekombinantem VAC 8.

- 42: Reverse Phase HPLC von rekombinantem VAC β .
nach Inkubation.
- 43: Aminosäureanalyse von rekombinantem VAC β .
- 44: N-terminale Sequenzierung von rekombinantem VAC β .
- 45: SDS-Gel von rekombinantem VAC β in An- oder
Abwesenheit von DTT.
- 46: Isoelektrische Fokussierung von rekombinantem VAC β .
- 47: Effekt von VAC- α und VAC- β auf die Prothrombinase
Aktivität. Prothrombin Aktivierung wurde in
Anwesenheit variierender Mengen VAC- α (o) oder
VAC- β () wie beschrieben gemessen.
- 48: Effekt von VAC- α auf die Phospholipase A_2
Aktivität.
Phospholipase A_2 Aktivität wurde wie beschrieben
bestimmt. VAC- α induzierte Inhibition wurde
entweder bei 13,2 μ M Phospholipid o (offene
Kreise) oder bei 6,6 μ M Phospholipid gemessen
(ausgefüllte Kreise).
- 49: Effekt von VAC- β auf die Phospholipase A_2
Aktivität.
Die Bestimmung der % Inhibition erfolgte wie
beschrieben. Inhibition wurde entweder bei 13,2
 μ M Phospholipid o (offene Kreise) oder bei 6,6
 μ M Phospholipid gemessen (ausgefüllte Kreise).

- 50: Auswirkung von Ca^{++} auf die VAC- α induzierte Inhibition der Phospholipase Aktivität. Die Inhibition wurde bei 6,6 μM Phospholipid und 1 mM (offener Kreis), 0,5 mM (ausgefüllter Kreis), 0,1 mM (offenes Quadrat) oder 0,05 mM Ca^{++} (ausgefülltes Quadrat) bestimmt.
- 51: Auswirkung von Ca^{++} auf die VAC-B induzierte Inhibition der Phospholipase Aktivität. Die Inhibition wurde bei 6,6 μM Phospholipid und 1 mM (offener Kreis), 0,5 mM (ausgefüllter Kreis), 0,1 mM (offenes Quadrat) oder 0,05 mM Ca^{++} (ausgefülltes Quadrat) bestimmt.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 0

Das aus Nabelschnurgefäßen und/oder Placenta isolierte und gereinigte Material wurde mit Hilfe einer Reverse-Phase HPLC nachgereinigt.

Stationäre Phase: Bakerbond WP-RP 18, 4,6x250 mm, 5 μ m
Teilchen, 300 Å Poren

Mobile Phase A: 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser, pH
2,2

Mobile Phase B: 0,1 % Trifluoressigsäure in Acetonitril

Gradient: 20-68 % B in 24 min

Fluß: 1 ml/min

Detektion: UV, 214 nm

Anschließend an diese Reinigungsstufe wurden beide Materialien, jeweils die Substanz, die das Molekulargewicht 32.000 aufwies, mit Trypsin verdaut.

Reaktionsbedingungen:

- (30 μ g VAC aus Placenta in 135 μ l 0,15 M
 NH_4HCO_3 , pH 8,0
+ 2 % w/w Trypsin (Worthington)
6 Stunden bei 37 °C
+ 2 % w/w Trypsin (Worthington),
über Nacht bei 37 °C

- 30 μ g VAC aus Nabelschnur in 100 μ l 1 %
 NH_4HCO_3 , pH 8,0
+ 2 % w/w Trypsin (Worthington)
6 Stunden bei 37 °C
+ 2 % w/w Trypsin (Worthington),
über Nacht bei 37 °C

Die erhaltenen Bruchstücke wurden mit Hilfe von HPLC aufgetrennt und einer Sequenzierung mit einem Gasphasensequenator Typ 470A von Applied Biosystems, Programm 02 RPTH zugeführt.

HPLC-Trennbedingungen:

Stationäre Phase:	µBondapak C18, 3,8x300 mm, 10 µ Teilchen
Mobile Phase A:	0,1% Trifluoressigsäure in Wasser, pH 2,2
Mobile Phase B:	0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril
Gradient:	0-55% B in 55 min
Fluß:	1 ml/min
Detektion:	UV, 214 nm (obere Spur) 280 nm (untere Spur)

Neben dem tryptischen Verdau wurde das über Reverse-Phase-HPLC gereinigte Material auch noch einer BrCN-Spaltung unterzogen. Auch diese Spaltpeptide wurden sequenziert und mit den Daten der Peptide aus dem tryptischen Verdau verglichen.

BrCN-Spaltung:

111 µg über RP-HPLC gereinigtes VAC wurden in 111 µl 70% Ameisensäure gelöst. Diese enthielt bereits den 250-fachen molaren Überschuß an BrCN (90 µg). Die Inkubation erfolgte im Dunkeln, 17 Stunden bei Raumtemperatur. 100 µl wurden für die HPLC-Auftrennung verwendet.

HPLC-Säule: μ Bondapak C 18
Mobile Phase A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser
Mobile Phase B: 0,1% Trifluoressigsäure in
Acetonitril
Gradient: 0 - 70% B in 70 min
Fluß: 1 ml/min
Detektion: UV, 214 und 280 nm

Ein Vergleich der hiermit erzielten Ergebnisse sowie die Analyse mittels Gelpermeations-HPLC und SDS-Gelelektrophorese belegt die Identität von VAC aus Placenta und VAC aus Nabelschnur

Gelpermeations HPLC:

Stationäre Phase: Waters I-125, 7,8x600 mm, 10 μ m
Teilchen
Mobile Phase: 0,5M Na_2SO_4 , 0,02 M
 Na_2PO_4 , pH 7,0, 25%
Propylenglykol, 0,04% Tween 20
Fluß: 0,5 ml/min
Detektion: UV, 214 nm

SDS-Gelelektrophorese

SDS-Gel: 15%
Gelstärke: 0,7 mm
Elektrophoresebedingungen: 20 mA/Platte, 2-3 Stunden
Laufzeit
Färbung: Coomassie Blue
Proben: :8 μ g VAC aus Nabelschnur bzw.
:7 μ g VAC aus Placenta

Beispiel 1Herstellung einer humanen plazentalen cDNA-Bibliotheka) Gesamt-RNA Isolierung aus Plazenta

GT: 5 M Guanidinium-Thiocyanat, 50 mM Tris
pH=7,4, 25 mM EDTA. Vor Gebrauch 8% (v/v)
beta-Mercaptoäthanol zusetzen. 20 ml GT
werden 5 bis 10 Minuten vor Gebrauch auf Eis
gekühlt, GT soll dabei nicht präzipitieren.

GH: 6 M Guanidinium-Hydrochlorid, 25 mM EDTA, 10
mM beta-Mercaptoäthanol, pH= 7,0. Eiskühlen.

1g tiefgefrorene und mechanisch pulverisierte Plazenta
werden in 20 ml GT (0°C) 20 Sekunden mit maximaler
Geschwindigkeit mit einem Polytron (Brinkmann) gemixt.
Das Volumen des Homogenats wird bestimmt, in 0,3 vol
Äthanol (-20°C) gegossen, gemischt und sofort bei
12000 rpm 5' bei -10°C (Beckman JA 21 Zentrifuge,
JS13.1 Rotor) zentrifugiert. Ein eventueller
Proteinfilm sowie der Überstand werden entfernt. 10 ml
eiskaltes GH werden dem Pellet zugesetzt und 10
Sekunden mit dem Polytron homogenisiert. Die
Suspension wird 5 Minuten bei -10°C und 12000 rpm
zentrifugiert. Der Überstand wird in ein steriles
Corexrohrchen transferiert, das Pellet verworfen. Zum
Überstand werden 0,025 vol 1 M Essigsäure und 0,75 vol
kalter Äthanol (-20°C) zugesetzt und gut durchmischt.
Nach ca. 2 Stunden Inkubation bei -20°C wird 10 Minuten
bei 6000 rpm bei -20°C (JA20 Rotor) zentrifugiert. Der
Proteinfilm und der Überstand werden sorgfältig
entfernt. 2 ml GH (0°C) werden zum Pellet zugegeben,

das Pellet resuspendiert, und die Suspension in ein 15ml Corex Röhrchen transferiert. Mit weiteren 8ml GH wird das alte Corex Röhrchen nachgespült, die Lösung mit den 2ml vereint. Es ist wichtig, daß das gesamte Pellet suspendiert ist, eventuell ist durch mildes Sonikieren nachzubehandeln. 0,025 vol 1 M Essigsäure und 0,5 vol kalter Äthanol (-70°C) werden zugesetzt und ca. 2 Stunden bei -20°C inkubiert. Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, JA20 Rotor), Lösen und Präzipitieren werden zweimal wiederholt, wobei die totale GH-Menge auf 5 ml halbiert wird. Nach der letzten Zentrifugation soll kein Proteinfilm mehr über der Lösung sichtbar sein, sonst ist dieser Reinigungsschritt zu wiederholen. Das Pellet wird mit 5 ml Diäthylpyrocarbonat behandeltem Wasser (0°C) 2 Minuten gevortext. Die klare Lösung wird dekantiert, zu dem eventuell zurückbleibenden Pelletresten wird nochmals Wasser gegeben und gevortext, bis die Lösung klar ist. Durch Zusatz von 0,1 vol 3 M Na-Azetat ($\text{pH}=5,8$), 2,5 vol Äthanol und 1 Stunde Inkubation bei -70°C wird die RNA 10 Minuten bei 6000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Lösen und präzipitieren wird einmal wiederholt. Letztendlich wird die RNA in Äthanol bei -20°C aufbewahrt.

b) poly-A⁺-RNA Isolierung

0,5 mg oligo dT-Zellulose (Collaborative Research, Typ 3, Bindungskapazität: 5 mg poly-A⁺-RNA/g) werden im Bindungspuffer suspendiert (200 mM NaCl, 0,2 % SDS, 10 mM Tris, $\text{pH}=7,4$, 1 mM EDTA). 1 ml dieser Suspension wird in eine Säule gepackt und nacheinander mit 10 ml Wasser, 10 ml 0,1 N NaOH, 10 ml Wasser und letztlich mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Gesamt-RNA wird aus der alkalischen Lösung durch Zentrifugieren (10 Min., 6000 rpm, JA20 Rotor pelletiert. Ca. 10 mg RNA werden in 4,5 ml Wasser gelöst. Nach Zusatz von

50 μ l 2% SDS wird die Lösung 3 Min. auf 70°C erhitzt und unmittelbar auf Eis gekühlt. Nach dem Zusatz von 50 μ l 1M Tris (pH=7,4), 10 μ l 0,5 M EDTA und 200 μ l 5 M NaCl wird die Lösung sofort auf die Säule aufgetragen. Die aus der Säule tropfende Lösung wird wieder auf die Säule aufgetragen. Diese Prozedur wird insgesamt dreimal wiederholt. Anschließend wird die Säule mit 30 ml Bindungspuffer gewaschen. Die gebundene RNA wird mit 5 ml 0,2% SDS eluiert. Die Säule wird mit 10 ml Wasser, 10 ml 0,1 N NaOH und 10 ml H₂O gewaschen und mit 10 ml Bindungspuffer äquilibriert. Die RNA Lösung wird nochmals 3 Minuten auf 70°C erhitzt, rasch auf Eis abgekühlt, 50 μ l 1 M Tris pH=7,4, 10 μ l 0,5 M EDTA und 200 μ l 5 M NaCl zugesetzt und auf die Säule aufgetragen. Die durchlaufende Lösung wird insgesamt dreimal auf die oligo-dT Säule aufgetragen. Nach dem Waschen wird die RNA mit 30 ml 0,2% SDS eluiert.

Durch Zugabe von 0,1 vol 3M Na-Azetat pH=5,6 und 2,5 vol Aethanol sowie Inkubation bei -20°C (16 Stunden) wird die RNA ausgefällt. Die RNA wird abzentrifugiert (10 000 rpm, 15 Min., JA-20 Rotor) und in Wasser mit einer Konzentration von 1 μ g/ μ l gelöst.

c) Konstruktion der Lambda-gt10 cDNA Bibliothek

Die Synthese der cDNA, das Methylieren der internen EcoRI-Stellen, das Anbringen von EcoRI Linkern, das Nachschneiden mit EcoRI, die Abtrennung der kurzen DNA-Fragmente, das Ligieren mit den Lambda-gt10 Armen und das in vitro Verpacken der ligierten DNA erfolgte mit dem cDNA Synthese System von Amersham (RPN 1256) sowie dem cDNA Kloniersystem Lambda-gt10 (Amersham, RPN 1257). Die beigefügten Arbeitsvorschriften wurden genau eingehalten. Ausgehend von etwa 3 μ g wurden mRNA letztendlich ca. $0,5 \times 10^6$ rekombinante Lambda-gt10 Phagen erhalten.

Beispiel 2cDNA Isolierunga) Durchsuchen der Lambda-gt10 Bibliothek mit Oligonukleotiden

Zum Durchsuchen der cDNA-Bibliothek nach für VAC-protein kodierender cDNA wurden entsprechend der Sequenzen des tryptischen Peptides P16/II zwei und des Staph A Peptides P20/I/6 ein Oligonukleotid synthetisiert (Fig.1). Diese Oligonukleotide stellen jeweils eine Mischung aller Varianten dar, die jede Kodierungsmöglichkeit der entsprechenden mRNA berücksichtigen. EBI-386 weist bei einer Kettenlänge von 20 Nukleotiden 512 Variationen auf und paßt zu dem Staph-A Peptid P20/I/6. Um die Variation bei dem Oligonukleotid für das tryptische Peptid P16/II niedriger zu halten, wurden zwei Oligonukleotide (20-mere) synthetisiert: EBI-387: 128 Variationen, EBI-388: 64 Variationen.

Weiters wurden zu den tryptischen VAC-Peptid P30/I passend zwei Oligonukleotide unter Verwendung von Desoxyinosin als Base bei "Wobble" Positionen synthetisiert (Fig.2): EBI-118 und EBI-119. Diese Substitution wurde von E. Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260/5 (1985), pp.2605-2608, sowie Y. Takahashi et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (1985) pp.1931-1935, beschrieben. Inosin basenpaart gut mit Cytosin, stört jedoch kaum die Ausbildung der Doppelhelix, wenn andere Nukleotide als Partner angeboten werden.

Jeweils 60 pMol jedes Oligonukleotids wurden mit 60 pMol gamma-³²P-ATP (Amersham, PB 216, 5000 Ci/mMol) in 30 µl Lösung unter Verwendung von 20 Einheiten T₄ Polynukleotidkinase phosphoryliert. Die Lösung

enthielt 70 mM Tris pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$ und 5 mM DTT, die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Durch Zugabe von 30 mM EDTA und 5 Minuten Erhitzen auf 70°C wurde die Reaktion gestoppt. Das markierte Oligonukleotid wurde durch Säulenchromatographie über Biogel P6DG (Biorad) von nicht eingebauter Radioaktivität getrennt. Pro Oligonukleotid wurden zwischen 70 und 110×10^6 cpm Phosphor-32 eingebaut.

Je 15 pMol EBI-118 und EBI-119 wurden in 90 μ l unter Einsatz von 45 pMol gamma- ^{32} P-ATP (Amersham, PB 218, >5000 Ci/mMol) mit 10 Einheiten T_4 -Polynukleotidkinase phosphoryliert und anschließend über Biogel P6DG gereinigt. Insgesamt wurden 70×10^6 cpm Phosphor-32 eingebaut.

Ungefähr $1,2 \times 10^6$ pfu (Plaque forming units) rekombinante Phagen einer humanen, plazentalen cDNA Bibliothek im Phagen Lambda-gt10 wurden verwendet, um E.coli C600 zu infizieren. Etwa 50.000 Phagen wurden pro 13,5 cm Petrischale plattiert (LB, 10 mM $MgSO_4$, 15 g/l Bacto-Agar). Nachdem die Plaques fast konfluent waren, wurden von jeder Platte 2 Abzüge auf Nitrozellulosefilter hergestellt (Schleicher und Schuell, BA 85) (T. Maniatis et al., Molecular Cloning, 1982, pp 320-321).

Die Filter wurden 3x20 Minuten in TE bei 100°C behandelt und anschließend über Nacht bei 65°C gewaschen:

Waschlösung: 50 mM Tris pH=8

1 M NaCl

1 mM EDTA

0,1 % SDS

Danach wurden die Filter 4 Stunden bei 49°C prähybridisiert:

Prähybridisierlösung:

6 x SSC

5 x Denhardt

0,1 % SDS

1 mM Na-Pyrophosphat

50 mM NaH_2PO_4 pH=6,5

100 μM ATP

80 $\mu\text{g/ml}$ denaturierte Hering Sperm DNA

Die Hybridisierung erfolgte in der gleichen Lösung unter Einsatz der gesamten Menge markierter Oligonukleotide. Die doppelten Abzüge der Platten 1 bis 6 wurden mit EBI-386, jene der Platten 7-12 mit EBI-387 und EBI-388 16 Stunden bei 49°C hybridisiert. Die Abzüge der Platten 13-24 wurden 16 Stunden mit EBI-118 und EBI-119 bei 37°C hybridisiert. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Filter zweimal mit 6x SSC/0,01% SDS gespült, 2 x 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 6x SSC / 0,01% SDS und 3 x 20 Minuten in der gleichen Lösung bei 49°C bzw. 37°C gewaschen. Nach dem Lufttrocknen wurden die Filter an Kodak X-Omat S Film bei -70°C unter Verwendung einer Verstärkerfolie exponiert.

Lambda-Phagen, die auf beiden Filtern Hybridisierung mit dem Oligonukleotid zeigten, wurden unter Verwendung desselben Hybridisierungsprotokolls zur Homogenität gereinigt.

Aus der Hybridisierung mit EBI-386, -387 und -388 resultierten die Phagen Lambda-P11/3, Lambda-P6/5, Lambda-P6/6. Die Hybridisierung mit EBI-118 und -119 resultierte in den Phagen Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22.

b) Isolierung der cDNA Inserts

E.coli C 600 wurde mit $2,5 \times 10^6$ pfu (Plaque forming units) Phagen infiziert und mit 6 ml Topagarose (0,7 % Agarose, 10 mM $MgSO_4$, LB) auf 13,5 cm Agarplatten (LB, 10 mM $MgSO_4$, 1,5% Agarose, 0,2% Glukose) plattiert. Nach 5 1/2 Stunden Inkubation bei 37°C waren die Plaques konfluent. Die Platten wurden 30 Minuten bei 4°C gekühlt und die Agarose mit 10 ml Lambda-Diluent (10 mM Tris, pH=8, 10 mM $MgSO_4$, 0,1 mM EDTA) überschichtet. Die Phagen wurden über Nacht bei 4°C unter leichten Schütteln eluiert. Die überstehende Phagensuspension (ca. 8 ml) wurde in Corex Röhrchen transferiert und 10 Minuten bei 15.000 rpm (4°C, JA 21 Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde in Polycarbonatröhrchen dekantiert und bei 50.000 rpm (20°C, L70 Beckman-Zentrifuge, 20°C, 50 Ti Rotor) bis $\omega^2 t = 3 \times 10^{10}$ (ca 23 Minuten) zentrifugiert. Die pelletierten Phagen wurden nach Entfernen des Überstandes in 0,5 ml Lambda-Diluent resuspendiert und in Eppendorf Röhrchen transferiert. Die Suspension wurde durch kurzes Zentrifugieren von nichtsuspendierten Teilchen befreit, der Überstand in ein neues Röhrchen gefüllt. Nach Zusatz von 10 µg/ml RNaseA und 1 µg/ml DNase I wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 25 mM EDTA, 25 mM Tris, pH=8, 0,2% SDS wurde 30 Minuten bei 70°C inkubiert. Als nächstes wurde 1 vol Phenol/Chloroform (1:1) zugegeben, und Proteine durch Kippen des Röhrchens extrahiert. Nach 2 Minuten Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge wurde die wäßrige Phase mit 1 vol Chloroform extrahiert (nur Kippen, nicht Vortexen). Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wurden dem Ueberstand 1/20 vol 3 M Na-Azetat und 1 ml Äthanol zugesetzt. Dabei fiel die Phagen DNA fadenförmig aus. Nach 5 Minuten Inkubation bei 0°C wurde die DNA abzentrifugiert (10 Minuten). Das Pellet wurde einmal mit 70 % Äthanol gewaschen, getrocknet und über Nacht in 50 µl TE gelöst (4°C).

Die DNAs wurden mit EcoRI geschnitten und die entstehenden Fragmente auf einem 1% Agarosegel getrennt. Die cDNA Inserts der Klone Lambda-P11/3, Lambda-P6/5 und Lambda-P6/6 hatten Größen von etwa 1300 bis 1400 bp. Die Sequenzanalyse zeigte, daß alle drei Klone von ein und derselben mRNA abgeleitet waren. Das 5'Ende der mRNA fehlte jedoch in den cDNAs. Die Inserts der Phagen Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22 hatten Längen von ca. 1600, 1100 und 1000 bp. Die Sequenzanalyse ließ eine annähernd vollständige cDNA vermuten. Die cDNAs der beiden Phagengruppen Lambda-P11/3, Lambda-P6/5 und Lambda-P6/6 sowie Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22 sind von zwei verschiedenen mRNAs abgeleitet, wie die nachfolgende Sequenzanalyse ergab.

Die EcoRI Inserts der drei Klone Lambda-P11/3, Lambda-P6/5 und Lambda-P6/6 wurden isoliert und in den EcoRI-geschnittenen Bluescribe M13⁺ Vektor ligiert (Vector Cloning Systems, 3770 Tansy Street, San Diego, CA 92121, USA). Die resultierenden Klone wurden pP6/5, pP6/6 und pP11/3 genannt.

Die EcoRI Inserts der drei Klone Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22 wurden isoliert und in den EcoRI-geschnittenen Bluescribe M13⁺ Vektor ligiert. Die resultierenden Klone wurden pRH201, pRH202 und pRH203 genannt.

c) Weitere VAC cDNA Klone

Um weitere cDNA Klone zu erhalten, wurde die humane, plazentale Lambda-gt10 Bibliothek nochmals durchsucht, diesmal mit dem EcoRI-Insert des pP11/3 als Sonde.

Dieses DNA-Fragment wurde durch Nicktranslation radioaktiv markiert (T.Maniatis, Molecular Cloning, 1982, pp.109-112, keine DNase I verwendet). Insgesamt wurden 4×10^5 Phagen auf 8 Platten durchsucht. Die Behandlung der Nitrozellulosefilter erfolgte wie in T.Maniatis, Molecular Cloning, 1982, pp.320-321 beschrieben. Die Hybridisierungslösung enthielt 6xSSC, 5x Denhardt's, 0,1% SDS sowie 20×10^6 cpm pP11/3 Insert. Die Hybridisierungsdauer betrug 16 h bei 65°C. Die Filter wurden danach 3x10 Minuten bei Raumtemperatur mit 6xSSC/0,01% SDS und 3x45 Minuten bei 65°C und mit 0,2xSSC gewaschen. Insgesamt wurden 69 positiv reagierende Klone erhalten (Lambda-VAC1 bis Lambda-VAC69).

12 dieser Klone wurden im kleinen Maßstab wie oben beschrieben präpariert, die cDNA Inserts mit Eco RI freigesetzt und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Dabei zeigte sich, daß das Insert des Klons Lambda-VAC10 den gesamten für VAC Protein kodierenden Leserahmen enthält.

Beispiel 3

Charakterisierung der cDNAs kodierend für VAC-alfa und VAC-beta

a) Northern Blot Experiment

Zu 2 µg poly-A⁺ RNA wurden 5 µl Wasser, 16 µl Formamid, 6 µl Formaldehyd und 3 µl 0,1 M NaOH zugesetzt, die Lösung 10 Minuten bei 68°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zusatz von 5 µl Farbstofflösung (je 0,4% Bromphenolblau und Xylencyanol in 50% Glyzerin, 1 mM EDTA) wurde die RNA auf einem

Formamid-Agarosegel aufgetrennt (1,5% Agarose, 10 mM Na-Phosphat pH=7,6, 1 mM EDTA, 5 mM Na-Azetat, 6% Formaldehyd, Elektrophorese 100 V, 3 Stunden, Laufpuffer wie Gelpuffer, ohne Formaldehyd). Als Referenz wurde Gesamt-RNA aufgetragen. Diese Spur wurde nach der Elektrophorese abgetrennt und mit EtBr angefärbt, um die Lage der 28 und 18 S rRNA zu bestimmen. Der Rest des Gels wurde zweimal 10 Minuten in 10xSSC gewaschen, und die RNA mit 20xSSC auf Nitro-zellulosefilter übertragen. Das Filter wurde mit 2xSSC gewaschen, getrocknet und 2 Stunden im Vakuum bei 80°C gebacken. Jeweils 1 µg pP11/3 und pRH203 wurden mit dem Multiprime DNA labelling System (Amersham, RPN 1601) radioaktiv markiert. Das Nitro-zellulosefilter wurde 2 h bei 65°C in 6xSSC/5x Denhardt's/0,1% SDS prähybridisiert. Jeweils eine Spur wurde mit 180×10^6 cpm pP11/3 bzw. pRH203 hybridisiert (16h 65°C). Die Filter wurden zweimal 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 6xSSC/0,01% SDS und zweimal 30 Minuten bei 65°C mit 0,2xSSC/0,01% SDS gewaschen, getrocknet und an Kodak X-Omat S Film mit Verstärkerfolie exponiert.

Das Ergebnis ist in Fig.3 abgebildet. Die cDNA des Klons pP11/3 hybridisiert an eine mRNA der Größe von etwa 1700 Basen ("VAC-alpha"), die cDNA des Klons pRH 203 an eine mRNA der Größe von etwa 2200 Basen ("VAC-beta").

Da erstens die eingesetzte Radioaktivitätsmenge sowie die aufgetragene Menge mRNA pro Spur etwa gleich war und zweitens die Hybridisierung eines Genom-Blots in derselben Lösung Banden gleicher Intensität mit beiden cDNAs ergab (siehe unten), ist zu schließen, daß die kürzere mRNA ("VAC-alfa") in größeren Mengen als die längere ("VAC-beta") mRNA in Plazenta vertreten ist.

b) Sequenzanalyse der VAC-alfa cDNA

Die cDNA Klone pP6/5, pP6/6 und pP11/3 wurden total, sowie die der Klone Lambda-VAC1 bis -12 partiell sequenziert. Das Resultat ist in Fig.4 abgebildet. Es wurden insgesamt 1465 Basen sequenziert. Die cDNA weist einen langen, offenen Leserahmen auf, der für 320 Aminosäuren kodieren kann. Wird die DNA Sequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt, so können alle sequenzierten Peptide in dieser Sequenz untergebracht werden (Fig.5). Es handelt sich daher bei dieser cDNA um jene, deren korrespondierende mRNA für VAC-protein kodiert. Da die Sequenzen der zweiten isolierten cDNA (siehe unten) für ein ähnliches, aber von VAC verschiedenes Protein kodiert, wird hier der Name VAC-alfa eingeführt.

Dem ersten ATG-Codon (Basen 35-37) geht im selben Leserahmen ein Stop-Codon voran. Die Basen 30 bis 38 erfüllen ziemlich gut die Kozakregel (M. Kozak, Nature 308 (1984), pp. 241-246), die die Konsensussequenz in der Nähe des Translationsstartcodons mit CC(A/G)CCAUGG angibt, die entsprechende Sequenz hier lautet TCGCTATGG. Die 3' nichttranslatierte Region ist 471 Basen lang. 15 Basen vor Beginn des poly-A Abschnitts befindet sich die Polyadenylierungssequenz AATAAA (N.J.Proudfoot et al., Nature 263 (1976), pp. 211-214). Wird eine Kettenlänge von 150 bis 200 Basen für den Poly-A Abschnitt der mRNA gerechnet, beträgt die Gesamtlänge der mRNA auf Grund der cDNA Sequenz 1600-1650 Basen. Da im Northern Blot Experiment ein höherer Wert bestimmt wurde, ist die 5'nichttranslatierte Region in keiner cDNA komplett enthalten.

Die cDNA des Klons pP6/5 weist im Gegensatz zu allen anderen cDNA Klonen an Position 100 C statt A auf. Dadurch würde sich das Triplet 98-100 (22. Codon) von GAA nach GAC ändern und für Asp anstelle von Glu kodieren. Diese Abweichung kann mehrere Ursachen haben: a) die Reverse Transkriptase baute ein falsches Nukleotid ein, b) es handelt sich um die Transkripte zweier alleler, an dieser Stelle verschiedener Gene oder c) es gibt zwei nicht allele Gene, die sich an dieser Position unterscheiden.

Der lange, offene Leserahmen kodiert für ein Protein mit 320 Aminosäuren, von dem das Met-1 wahrscheinlich abgespalten, und das folgende Alanin an der Aminogruppe, möglicherweise durch Acylierung, blockiert wird. Das errechnete Molekulargewicht beträgt 35.896 D und ist höher als der Wert nach SDS-PAGE. Allerdings ist der Anteil geladener Aminosäuren (Asp, Glu, Lys, Arg, His) mit 30,6 % (98/320) überdurchschnittlich hoch verglichen mit dem durchschnittlichen Wert von 25,1 %. Dies würde das veränderte Wanderungsverhalten des Proteins bei der SDS-PAGE erklären. Innerhalb der stark geladenen Aminosäuren überwiegen die sauren Aminosäuren (Asp und Glu) mit 54 gegenüber den basischen (Lys und Arg) mit 41. Dies erklärt den sauren, isoelektrischen Punkt des VAC- α Proteins ($pI=4,4$ bis $4,8$) VAC- α enthält nur ein für Cystein codierendes Triplet (Aminosäure-Position 316); eine typische N-Glykosylierungsstelle (Asn-XXX-Ser/Thr) ist nicht vorhanden. Eine Strukturanalyse der Aminosäuresequenz (modifiziert nach Pustell, J et al., Nucleic Acids Res. 10 (1982) pp 4765-4782) ergibt eine vierfache Wiederholung einer 67 Aminosäure langen Sequenz (Fig.6), im folgenden "Repeats" genannt. Innerhalb dieser Sequenz sind 7 Aminosäuren (10,4 %) in allen vier Repeats konserviert, 15 Aminosäuren (22,4 %)

kommen in drei von vier Repeats vor, an 28 Positionen (41,8 %) enthalten jeweils zwei Repeats dieselbe Aminosäure.

Ein Vergleich mit publizierten Literaturdaten (M.J.Geisow, FEBS Letters 203 (1986) pp. 99-103, M.J.Geisow et al., TIBS 11 (1986), pp. 420-423) ergab überraschenderweise, daß VAC-alfa damit zu einer größeren Gruppe Ca^{++} abhängiger Phospholipidbindungsproteine gehört. Es wird eine Konsensussequenz beschrieben (Lys-Gly-fob-Gly-Thr-Asp-Glu-var-var-Leu-Ile-fil-Ile-Leu-Ala-fob-Arg; fob=hydrophob, fil=hydro-phil, var=variabel), die an der Ca^{++} Bindung beteiligt sein könnte (M.J.Geisow et al., Nature 320 (1986), pp. 636-638). Diese Sequenz findet sich in jeder der vier wiederholten 67 Aminosäure langen Subsequenzen der erfindungsgemäßen Proteine (Fig.6). Auffällig ist auch der 6 Aminosäuren lange Abschnitt am Ende jeder Repeat, der fast ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren besteht ("oooooo" in Fig.6).

c) Sequenzanalyse der VAC-beta cDNA

Die VAC-beta cDNA Sequenz der Klone Nr15, Nr19 und Nr22 ergab 1940 bp und geht in einen poly-A Abschnitt über (Fig.7). 16 Basen vor dem poly-A Abschnitt findet sich das Polyadenylierungssignal AATAAA. Allerdings kommt diese Konsensussequenz bereits an der Nukleotidposition 1704-1709 vor. Weshalb diese Sequenz nicht als Polyadenylierungssignal verwendet wird, ist unbekannt. Die zusätzlich erforderliche Sequenz an der 3'Seite der AATAAA Sequenz, YGTGTTY (Gill A. et al., Nature 312 (1984), pp. 473-474) kommt erst relativ weit entfernt vor (TGTGTTAT, Position 1735-1742); möglich, daß dies die Erklärung für ein Nichtakzeptieren dieser ersten Polyadenylierungssequenz darstellt.

Die cDNA enthält einen langen, offenen Leserahmen, der vom Beginn der cDNA bis Position 1087 reicht. Er würde ein Kodierungspotential für 362 Aminosäuren beinhalten. Aus Analogiegründen zu VAC-alfa und aufgrund der Tatsache, daß auch ein 34.000 D Protein bei der Reinigung von VAC anfällt (siehe E.P.A. 181.465) wurde das erste Methioninkodon (ATG, Position 107-109) als Translationsstart angenommen. Die Kozakregel ist hier nicht so gut erfüllt wie bei VAC-alfa (AAGAGATGG auf Position 102-110).

Das resultierende Protein (VAC-beta) wäre 327 Aminosäuren lang. Es besitzt 4 Cysteinreste (Aminosäureposition 161, 206, 250 und 293) und eine potentielle N-Glykosylierungsstelle (Asn-Lys-Ser, Aminosäureposition 225-227). Das errechnete Molekulargewicht beträgt 36.837 (Fig.9). Auch in VAC-beta gibt es überdurchschnittlich viele geladene Reste: 97/327 (29,6%), wobei die sauren Aminosäuren (Asp+Glu: 49) über die basischen (Lys+Arg 42) überwiegen; eine Erklärung für das nach SDS-PAGE ermittelte niedrigere Molekulargewicht.

Auch VAC-beta zeigt eine interne Wiederholung einer 67 Aminosäuren langen Sequenz (Fig.8). Innerhalb dieser Sequenz sind 7 Aminosäuren (10,4 %) in allen vier Repeats konserviert, 17 Aminosäuren (25,4 %) kommen in drei von vier Repeats vor, an 25 Positionen (37,7 %) enthalten jeweils zwei Repeats dieselbe Aminosäure. Auch VAC-beta zeigt gute Übereinstimmung mit der 17 Aminosäuren langen Konsensussequenz. Die Ausführungen zum VAC-alfa gelten analog für VAC-beta.

d) Genomische Southernblot Analyse

Die Analyse chromosomaler DNA aus humaner Plazenta nach Southern zeigt ein komplexes Bild. Die DNA wurde mit EcoRI, HindIII, BamHI und PstI geschnitten. Die auf Nitrozellulose transferierte DNA wurde sowohl mit einer VAC-alfa DNA (pP11/3) als auch mit einer VAC-beta DNA (pRH203) hybridisiert. Das Waschen der Filter geschah unter stringenten Bedingungen (siehe Punkt a)), d.h. mit 0,2xSSC und 65°C. Trotzdem ergaben sich bei jedem Verdau relativ viele Banden (Fig.10). Der Vergleich der beiden Blots zeigt, daß die Kreuzreaktion von VAC-alfa und -beta DNA unter diesen Bedingungen eher auszuschließen ist. Die Vielzahl der Banden ist entweder durch die Existenz jeweils ähnlicher Gene zu dem VAC-alfa bzw. VAC-beta Gen zu erklären, oder aber es handelt sich um jeweils ein Gen, das durch viele und/oder lange Introns unterbrochen ist.

Beispiel 4

Protein-Analyse

In Fig.11 ist der Vergleich der Aminosäuresequenzen von VAC-alfa mit VAC-beta wiedergegeben. Die wiederholten Strukturen lassen sich in beiden Proteinen gleich anordnen. Die Verbindungspeptide sind ebenfalls gleich lang mit Ausnahme jener zwischen der 2. und 3. Repeat. In dieses Verbindungspeptid muß bei VAC-alfa eine Lücke eingeführt werden, um eine optimale Anpassung der beiden Sequenzen zu erlauben. Das N-terminale Peptid der beiden Proteine ist unterschiedlich lang, 19 Aminosäuren bei VAC-alfa, 25 Aminosäuren bei VAC-beta. Dieses Peptid weist auch die geringste Homologie auf. Die beiden Proteine sind an 176 von 320 Aminosäurepositionen ident, was einem Homologiegrad von 55,0% entspricht.

An dieser Stelle sei auch der Vergleich der Nukleotidsequenzen der VAC-alfa und -beta cDNAs eingefügt. Werden zwei Gene und deren Produkte miteinander verglichen, sieht man auf der DNA (=RNA) Ebene eine größere Homologie als auf der Aminosäureebene, was durch die Tatsache erklärt ist, daß bei der Nukleinsäure bereits eine Veränderung in einem Basentriplett ausreicht, um eine neue Aminosäure zu kodieren.

In Fig.12 ist der Vergleich der kodierenden Regionen von VAC-alfa und VAC-beta cDNA wiedergegeben. Überraschenderweise zeigen die DNAs nur einen Homologiegrad von 54,2%, also etwas weniger als die beiden Proteine.

In Fig.13 sind die Hydrophilizitätsprofile der beiden Proteine abgebildet. Dabei wurde der Algorithmus von Hopp und Wood verwendet (T.P.Hopp et al., Proc.Natl.Acad.Sci. 78 (1981) pp.3824-3828). Die vier Repeatbereiche sind durch die Balken angedeutet, die Verbindungspeptide in der darunter angegebenen Sequenz eingerahmt. Dabei fällt auf, daß das Verbindungspeptid zwischen der zweiten und dritten Repeat besonders hydrophil ist. In diesem Peptid befindet sich sowohl bei VAC-alfa als auch bei VAC-beta ein Arginin an identer Position. Es wäre daher möglich, daß dieses Arginin einen bevorzugten Angriffspunkt für eine Protease mit trypsinartiger Spezifität darstellt. Dabei müßte das Molekül in zwei etwa gleich große Hälften zerfallen. Es wäre denkbar, daß bereits ein solches "Halbmolekül" eine biologische, beispielsweise eine antikoagulierende Wirkung entfalten kann. Auf der anderen Seite könnte vielleicht der Austausch dieses Arginins durch z.B. Histidin den VAC-proteinen eine größere Stabilität vermitteln.

Aus Fig. 13 ist weiterhin leicht zu erkennen, daß weder VAC-alfa noch VAC-beta einen längeren, hydrophoben Bereich aufweisen, der entweder die Sekretion durch, oder das Einlagern der Proteine in eine Membran erlauben würden. Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei VAC-alfa und VAC-beta um intrazelluläre Proteine handelt.

Wallner et al (Nature 320 (1986), pp.77-81) berichten die Struktur des humanen Lipocortin I, Saris et al. (Cell 46 (1986), pp.201-212) und Huang et al. (Cell 46 (1986), pp. 191-199) die Struktur des murinen bzw. humanen Calpactin I, das auch Lipocortin II genannt wird. Diese Proteine gehören ebenfalls zu der Klasse der Ca^{++} abhängigen Phospholipidbindungsproteinen. Ihre Struktur läßt sich analog zu VAC-alfa und -beta anschreiben (Fig.14). Die Homologien zwischen VAC-alfa und VAC-beta sind jedoch ausgeprägter als jene zwischen VAC und Lipocortin:

VAC-alfa - VAC-beta	: 55,0%
VAC-alfa - Lipocortin I	: 41,9%
VAC-alfa - Lipocortin II	: 43,8%
VAC-beta - Lipocortin I	: 41,7%
VAC-beta - Lipocortin II	: 44,6%

Anzunehmen ist daher, daß auch die Lipocortine aufgrund ihrer analogen Struktur antikoagulierende Wirkung haben, und demzufolge als Antikoagulanzen einzusetzen sind und weiterhin, daß dies eine generelle Eigenschaft dieser Klasse von Ca^{++} abhängiger Phospholipidbindungsproteine ist.

Viele Mitglieder der Ca^{++} abhängigen Phospholipidbindungsproteine binden an gereinigte sekretorische Vesikel oder andere Bestandteile des

Cytoskeletts (siehe R.H.Kretsinger et al., Nature 320 (1986), p.573 für eine Zusammenfassung). Bei der Sekretion kapseln sich die Vesikel vom Golgi-Apparat der Zelle ab, wandern zur Zellmembran und fusionieren mit ihr. Dabei wird der Inhalt der Vesikel von der Zelle freigesetzt. In Analogie zur Kupplung von Erregung mit der Muskelkontraktion wurde vorgeschlagen (W.W.Douglas, Br.J.Pharmac. 34 (1968), 451), daß auch der Stimulus und die Sekretion über Ca^{++} gekoppelt ist. Dabei könnten die Ca^{++} abhängigen Phospholipidbindungsproteine eine wichtige Rolle spielen. In der konservierten, 17 Aminosäuren langen Region jeder Repeat besitzt VAC-alfa 5 bis 6 Hydroxylgruppen-enthaltende Aminosäuren (Asp, Glu, Thr, Ser), jeweils drei davon an identischer Position. Bei VAC-beta finden sich in jeder Repeat vier dieser Aminosäuren. Obwohl keines der Proteine die in Calmodulin, Troponin C, S-100 und Parvalbumin beobachtete EF-Hand Struktur aufweist (R.H.Kretsinger et al., CRC Crit. Rev.Biochem. 8 (1980), p119), die in diesen Molekülen für die Ca^{++} Bindung verantwortlich ist, verleitet die Konservierung dieses Unterabschnitts in jeder Repeat zu dem Schluß, daß diese Region für die Ca^{++} Bindung verantwortlich ist.

Durch gezielte Mutationen in diesem Bereich könnte versucht werden, die biologische Aktivität von VAC-Proteinen zu verändern.

Beispiel 5

Expression von VAC-alfa in E.coli

- a) pRH284T: Expressionsvektor mit dem alkalischen Phosphatasepromotor und Terminator

Das Gen für die alkalische Phosphatase (PhoA) aus *E.coli* unterliegt einer strengen Regulation. In Gegenwart von Phosphat wird das Gen komplett abgeschaltet, bei Abwesenheit von Phosphat im Medium erfolgt Genexpression. H.Shuttleworth et al., *Nucleic Acids Res.* 14 (1986), p.8689 sowie C.N.Chang et al., *Gene* 44 (1986), pp.121-125 beschreiben die Nukleotidsequenz dieses Gens.

Aus mehreren Oligonukleotiden wurde die Promotorregion des PhoA Gens zusammengesetzt und in EcoRI-ClaI geschnittenes pAT153 eingesetzt. Vor der ribosomalen Bindungsstelle wurde eine XhoI Stelle eingeführt. Die originale EcoRI Stelle wird beim Einligieren des synthetischen DNA-Fragmentes zerstört. Nach der ribosomalen Bindungsstelle wurde ein Translationsstart-ATG vorgesehen, dessen G das erste Nukleotid einer SacI (=SstI) Stelle ist. Der Expressionsvektor läßt sich durch Schnitt mit SacI an dieser Stelle linearisieren und der 3'Überhang durch Behandlung mit DNA-Polymerase I - Klenow Fragment in Gegenwart von dGTP in ein gerades Ende überführen. Dadurch kann jedes beliebige Gen an dieser Stelle eingefügt werden, für korrekte Expression muß es mit der ersten Base der kodierenden Region beginnen.

Das HindIII-SalI Fragment des pAT-Anteils wurde entfernt und durch den alkalischen Phosphatase-Transkriptionsterminator ersetzt. Die originale SalI Stelle wurde zerstört. Dafür wurde sie vor dem Terminator zusammen mit der ebenfalls aus pAT153 deletierten BamHI Stelle wieder eingebracht. Die Sequenz der synthetisch hergestellten DNA ist in Fig.15 abgebildet.

b) Expressionsklon pRH291

Der cDNA Klon pP6/5 wurde mit BglII und PstI geschnitten und das 980 bp lange Fragment isoliert, das den Hauptteil der kodierenden und ca. 200 bp 3'nichttranslatierte Region enthält. Mittels Oligonukleotiden wurde das fehlende 5'Ende der kodierenden Region ersetzt. Dabei wurde durch zwei Mutationen (GGC -> GGT, Gly-7 und ACT -> ACC, Thr-8) gleichzeitig eine KpnI-Schnittstelle in die VAC-cDNA eingeführt.

Die Oligonukleotide hatten folgendes Aussehen:

```

      |EBI-678                                     ||EBI-677
5'   GCACAGGTTCTCAGAGGTACCGTGACTGACTTCCCTGGATTTGATGAGCGGGCT 3'
      CGTGTCCAAGAGTCTCCATGGCACTGACTGAAGGGACCTAACTACTCGCCCCGA
      |                                           EBI-680||

```

```

GATGCAGAACTCTTCGGAAGGCTATGAAAGGCTTGGGCACAGATGAGGAGAGC
CTACGTCTTTGAGAAGCCTTCCGATACTTCCGAACCCGTGTCTACTCCTCTCG
                                           EBI-

```

```

      ||EBI-682                                     |
ATCCTGACTCTGTTGACATCCCGAAGTAATGCTCAGCGCCAGGAAATCTCTGCA 3'
TAGGACTGAGACAACTGTAGGGCTTCATTACGAGTCGCGGTCCTTTAGAG      5'
679||                                           EBI-681|

```

Die Oligonukleotide EBI-680, -677, -678 und -682 wurden am 5'Ende phosphoryliert. EBI-678 und -680, EBI-677 und -679 sowie EBI-682 und -681 wurden paarweise auf 100°C erhitzt und langsam abgekühlt (je 100 pMol in 20 µl). Die Doppelstrang-Oligonukleotide wurden vereint und ligiert. pRH284T wurde mit SacI linearisiert, das 3'überhängende Ende durch Behandlung mit DNA-Polymerase I / Klenow Fragment in Gegenwart von dGTP zu einem geraden Ende reduziert, und mit BamHI nachgeschnitten. Ca. 30 ng Vektor, 200 ng cDNA und

250 nMol Oligonukleotide wurden in 15 µl Lösung ligiert. Kompetente E.coli HB101 wurden mit der Ligaselösung transformiert. Der resultierende Klon wurde pRH291 benannt (Fig.16).

Beispiel 6

Vac-beta Expression in E.coli

a) Expressionsklon pRH212

Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pER103 verwendet (E.Rastl-Dworkin et al., Gene 21 (1983), 237-248). Der Vektor wurde mit HindIII linearisiert. Das 5'überhängende Ende wurde mit dATP und DNA-Polymerase I / Klenowfragment partiell eingefüllt, und der verbleibende Einzelstrangrest mit S1 Nuklease verdaut. Der Vektor wurde mit BamHI nachgeschnitten und das große Fragment isoliert (Fig.17). Aus dem Klon pRH203 wurde das 440 bp lange MaeIII-BamHI Fragment isoliert, das die Codons 13 bis 157 enthält. Das fehlende 5'Ende wurde durch Oligonukleotide ergänzt:

EBI-307

5' CCATGGCTTGGTGGAAAGCTTGGATCGAACAGGAAGGT 3'

3' GGTACCGAACCACCTTTCGAACCTAGCTTGTCCTTCCACAGTG 5'

EBI-306

Dabei wurden für E.coli optimale Codons verwendet (zB. R.Grantham et al., Nucleic Acids Res. 8 (1980), 1893-1912). Dieser Codonaustausch resultiert in einer neuen HindIII-Stelle bei Codon 5 bis 7. Das Oligonukleotid EBI-306 wurde phosphoryliert, mit EBI-307 hybridisiert und mit dem VAC-beta Fragment ligiert. Nach dem Nachschnitt mit BamHI wurde das

5' terminale VAC-Fragment in den vorbereiteten pER103 Vektor ligiert. Der entstehende Klon wurde pRH211 benannt. Um die für VAC-beta kodierende Region zu ergänzen, wurde aus dem Klon pRH201 das 1230 bp lange BamHI-SphI Fragment isoliert. Der ca. 200 bp lange pBR322 Abschnitt von BamHI bis SphI aus dem Plasmid pRH211 wurde entfernt und durch den entsprechenden VAC-cDNA Teil ersetzt. Es resultierte der Klon pRH212. Das EcoRI-BamHI Fragment, das den Trp-Promotor (*S.marcescens*), die ribosomale Bindungsstelle und den synthetisch hergestellten Beginn des VAC-beta Gens enthält, wurde durch Sequenzieren überprüft.

b) Expression von VAC-beta (pRH212)

Der Nachweis des plasmidkodierten VAC-beta erfolgte im Maxizell-system (A.Sancar et al., J. Bacteriol. 137 (1979), pp.692-693.). Ecoli CSR603 (F^- , thr-1, leuB6, proA2, phr-1, recA1, argE3, thi-1, uvrA6, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mt1-1, gyrA98 (nalA98), rpsL31, tsx-33, Lambda⁻, supE44) wurde mit pRH212 transformiert und bis zu einer OD_{600} bei 37°C gezüchtet. 20 ml Kultur wurden in einer offenen Petrischale mit einer UV-Germicidlampe (15W) aus 50 cm Entfernung 5 Sekunden lang bestrahlt und anschließend 1 Stunde weiter inkubiert. Der Kultur wurden 100 µg D-Cycloserin zugesetzt. Nach 16 Stunden wurden die Bakterien abzentrifugiert, zweimal mit Hershey-Salzlösung gewaschen (5,4g/l NaCl, 3,0 g/l KCl, 1,1 g/l NH_4Cl , 15 mg/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,2 g/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,2 mg/l $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 87 mg/l KH_2PO_4 , 12,1 g/l Tris pH=7,4), in 5 ml Hersheymedium resuspendiert (pro 100 ml Hersheysalze: 2,0 ml 20% Glukose, 0,5 ml 2% Threonin; 1,0 ml 1% Leucin, 1,0 ml 2% Prolin, 1,0 ml 2% Arginin, 0,1 ml 0,1% Thiamin-HCl) und mit 20 µg/ml Indolacrylsäure 2

Stunden inkubiert. Nach Zusatz von 5 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Methionin und weiterer Inkubation bei 37°C (1 Stunde) wurden die plasmidkodierte Proteine radioaktiv markiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und in 200 μl SDS-Probenpuffer aufgenommen (Lämmli-Gel System, z.B. L.G.Davies et al., Methods in Molecular Biology (1986) pp.306-310). Die markierten Produkte wurden auf einem 15% Acrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und an Kodak X-Omat S Film exponiert. Als Referenz wurde gereinigtes VAC-alfa Protein mitlaufen gelassen und durch Anfärben sichtbar gemacht. VAC-alfa läuft etwas schneller als das pRH212 kodierte VAC-beta, wie es auch dem Molekulargewicht nach zu erwarten war. Die Expression von VAC-beta ist außerdem durch Zugabe des Induktors Indolacrylsäure stimulierbar (Fig.18).

c) Expressionsklon pRH292

Der Expressionsvektor pRH284T wurde mit SacI linearisiert und die 3'überhängenden Ende mit DNA-Polymerase I / Klenowfragment und dGTP in gerade Enden übergeführt. Der Vektor wurde mit SalI nachgeschnitten, und das große Fragment isoliert. Das HindIII-SalI Insert des Klons pRH212 wurde isoliert. 0,2 pMol des Oligonukleotidpaares

5' GCTTGGTGGAA 3' EBI-684
3' CGAACCACCTTTCGA 5' EBI-685

wurde mit 0,2 pMol VAC-beta Insert und 0,015 pMol vorbereiteten pRH284T ligiert. E.coli HB101 wurde mit der Ligaselösung transformiert. Der resultierende Klon wurde pRH292 benannt (Fig.18).

Beispiel 7Nachweis der Expression von Vac- α und Vac- β in
E.coli

a) Anzucht der Klone HB101/pRH291 und HB101/pRH292

Medien: 1) Vorkultur

10 g/l Trypton
 5 g/l Hefeextrakt
 4 g/l Glucose
 9 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 1 g/l NH_4Cl
 1 g/l KCl
 1 ml/l 1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 100 mg/l Ampicillin

Start-pH = 7,2

2) Hauptkultur

0,68 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
 0,62 g/l $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
 2,33 g/l KCl
 0,5 g/l NaCl
 0,53 g/l NH_4Cl
 1,23 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 0,011 g/l CaCl_2
 10 mg/l Thiamin.HCl
 3,92 mg/l $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 0,72 mg/l $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 0,71 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 1,5 mg/l $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
 0,75 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 0,19 mg/l H_3BO_3

0,51 mg/l	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,79 mg/l	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,73 mg/l	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,86 mg/l	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
21 g/l	Caseinhydrolysat (Merck Art. # 2238)
25 g/l	Caseinhydrolysat (Sigma C9386)
100 mg/l	Cystein
2 g/l	Hefeextrakt
1 g/l	Citronensäure
11 g/l	Glucose. H_2O (Start bzw. Feed)

700 ml Vorkulturmedium wurden mit dem Expressionsklon angeimpft und bei 37°C unter Rühren (1000 rpm (=Umdrehungen pro Minute), Magnetstab) und Sauerstoffzufuhr (5 vvm (=vol/vol/min), Belüftungsfritte) 12 bis 15 Stunden inkubiert. 600 ml dieser Vorkultur wurden in einen Fermenter mit 12 l Hauptkulturmedium überführt. Die Hauptkultur wurde unter folgenden Bedingungen fermentiert:

Rührsystem: Blattrührer bei 1000 rpm

Belüftung: 1,0 vvm

Temperatur: 28°C

pH: 6,5 (25% NH_3 zur Korrektur)

Während der Fermentation wurde die Glucosekonzentration gemessen. Bei Absinken auf 5 g/l wurde 10 g/l Glucose nachgefüttert. Alle weiteren Nachfütterungen zu je 10 g/l erfolgten bei einem Absinken der Glucosekonzentration im Fermenter auf 10 g/l. Fiel der Sauerstoffpartialdruck auf etwa 0,05 atm ab, wurde der Druck im Fermenter auf 0,3 bar erhöht. Nach 20 Stunden wurde auf 15°C abgekühlt, die Biomasse über eine CEPA-Zentrifuge vom Nährmedium abgetrennt und bei -70°C eingefroren.

b) Nachweis des rekombinanten Vac-alfa bzw. Vac-beta Proteins

Lösungen:

Probenpuffer:

125 mM Tris pH=6,8
4 % SDS
10 % Mercaptoäthanol
10 % Glyzerin
0,02 % Bromphenolblau

Acrylamidgel:

Sammelgel:

3 % Acrylamid
0,1 % Bisacrylamid
125 mM Tris pH=6,8
0,1 % SDS

Trenngel:

13,5 % Acrylamid
0,45 % Bisacrylamid
375 mM Tris pH=8,8
0,1 % SDS

Laufpuffer:

14,4 g/l Glycin
3,025 g/l Tris
5 ml 20% SDS

Proteingel-Färbelösung: Entfärbelösung:

0,1% Coomassieblau
50 % Methanol
10 % Essigsäure

5% Methanol
10% Essigsäure

Glycerinlösung:

7% Essigsäure

2% Glyzerin

Transferpuffer:

10x Transferpuffer:

24,2 g/l Tris

112,6 g/l Glycin

1x Transferpuffer:

100 ml/l 10x Transferpuffer

200 ml/l Methanol

1 ml/l Empigen

Blocklösung:

1% Tween 20

1% BSA (Rinderserumalbumin)

10% fötales Kälberserum (GIBCO)
in PBS**PBS:**

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

1,15 g/l Na_2PO_4 0,2 g/l KH_2PO_4 0,1 g/l MgCl_2 0,7 g/l CaCl_2 **alkalische-Phosphatase-Puffer:**

100 mM Tris pH=9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl_2

Am Ende der Fermentation wurde die optische Dichte der
Brühe bestimmt und ein Aliquot entnommen. Die
Bakterien wurden in einer Eppendorffzentrifuge
pelletiert, mit einer Konzentration von 20 OD_{600nm}

(optische Dichte bei 600 nm) in Probenpuffer resuspendiert und fünf Minuten bei 100°C denaturiert. Unlösliche Anteile wurden durch Zentrifugieren in der Eppendorfzentrifuge pelletiert. 5 µl Aliquots wurden auf das Acrylamidgel geladen. Als Referenz dienten Expressionsklone, die ständig bei hoher Phosphatkonzentration gezüchtet worden waren (0,08 mM Phosphat). Unter diesen Bedingungen wurde der alkalische Phosphatasepromotor nicht aktiviert.

Die Proteine wurden bei 6,5 V/cm (Sammegel) bzw. bei 13 V/cm (Trenngel) entsprechend dem Molekulargewicht aufgetrennt, bis der Bromphenolblaufarbstoff das Ende des Gels erreicht hatte. Eine Hälfte des Gels wurde mit Coomassieblau gefärbt. Dazu wurde das Gel 30 Minuten in der Färbelösung bewegt und anschließend eine Stunde in der Entfärbelösung behandelt. Zur besseren Entfernung des überschüssigen Farbstoff wurde ein mit Aktivkohle gefüllter Dialysenschlauch in die Entfärbelösung getaucht. Das Gel wurde abschließend 30 Minuten in der Glyzerinlösung behandelt und mittels eines Gelrockners getrocknet.

Die Proteine der zweiten Gelhälfte wurden auf ein Nitrozellulosefilter übertragen. Dazu wurde der Sandwich Whatman 3MM Papier-Gel-Nitrozellulose (Schleicher-Schuell, BA85)-Whatman 3MM Papier in einer Biorad-Transferapparatur in 1x Transferpuffer zwei Stunden einer Spannung von 150 V (Stromstärke 1000 mA) unter Kühlung ausgesetzt. Das Nitrozellulosefilter wurde über Nacht bei Raumtemperatur in 50 ml Blocklösung behandelt. Das Filter wurde drei Stunden in 5 ml Blocklösung / 1:1000 verdünntes Rabbit-Anti-Vac-Antiserum inkubiert und anschließend 30 Minuten in

Fließwasser, sowie dreimal 15 Minuten in PBS / 1% Tween 20 (Merck-Schuchardt # 822184) gewaschen. Das Filter wurde in 20 ml Blocklösung mit einer 1:2000 Verdünnung des Anti-Rabbit IgG (Fc) alkaline phosphatase conjugate (Promega-ProtoBlot Immunoscreening System) drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde wie oben in Fließwasser und PBS / 1% Tween 20 gewaschen. Der Nachweis des gebundenen Antikörper-alkalische Phosphatase-Konjugates erfolgte durch eine Farbreaktion (Promega-ProtoBlot Immunoscreening System). 66 µl NBT (50 mg/ml Nitro-blue-tetrazolium in 70% Dimethylformamid) und 33 µl BCIP (50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat in Dimethylformamid) wurden in 10 ml alkalische-Phosphatase-Puffer gelöst. Das Nitrozellulosefilter wurde bis zur Farbentwicklung in dieser Lösung inkubiert und anschließend 30 Minuten mit Fließwasser gewaschen. Das Filter wurde getrocknet und in Plastikfolie eingeschweißt.

In Figur 19 ist das Resultat wiedergegeben. "+Phosphat" ist die Kontrolle ohne Expression, "-Phosphat" zeigt die Expression von Vac-alfa (Klon HB101/pRH291) bzw. Vac-beta (Klon HB101/pRH292) Protein unter der Kontrolle des alkalischen Phosphatase Promotors. Sowohl Vac-alfa als auch Vac-beta Protein sind bereits auf dem gefärbten Gel zu erkennen. Die gebildete Menge an Vac-Proteinen beträgt überraschenderweise mindestens 20 mg/l/OD600nm Bakterienkultur.

Der Westernblot zeigt deutlich die angefärbte Vac-alfa Bande. Zusätzlich sind einige Proteine niedrigeren Molekulargewichts im Bereich bis 30 kD erkennbar, die

möglicherweise durch proteolytische Spaltung am N- und/oder C-Terminus des Vac-alfa Proteins entstanden sind. Auffällig ist außerdem ein durch das Antiserum erkanntes Protein im Bereich kleiner 20 kD, das eventuell ein durch Proteolyse entstandenes Halbmolekül des Vac-alfa Proteins darstellen könnte. Überraschenderweise wurde auch Vac-beta durch das Anti-Vac-Antiserum erkannt. Da diese Bande wesentlich schwächer als die Vac-alfa Bande gefärbt ist, andererseits aber die Vac-beta Bande im Coomassie Blau gefärbten Gel in ihrer Intensität dem Vac-alfa entspricht, ist daraus zu schließen, daß die Erkennung des Vac-beta Proteins durch das Anti-Vac-Antiserum wesentlich schlechter als jene des Vac-alfa Proteins erfolgt.

Beispiel 8

Reinigung von rekombinantem VAC-alpha

Ausgangsmaterial: E.coli HB101/pRH 291.

Die Zellen waren zentrifugiert und bei -70°C eingefroren worden.

a) Zell Homogenisierung und Extraktion

103,5 g gefrorener Zellkuchen wurde in 500 ml eiskaltem Lyse-Puffer (100 mM TRIS/HCl, 50 mM EDTA und 200 mM NaCl, pH 7,5) suspendiert und mit einem Ultra-Turrax (5 kurze Impulse) zur Zerstörung von Klumpen behandelt. Die Suspension wurde danach 3-mal durch eine Manton-Gaulin Presse bei 6.000 psi geführt. Zuletzt wurde die Presse mit 300 ml Lyse-Puffer gespült. Zur homogenisierten Suspension

wurde langsam eine 5%ige Lösung PEI (Polyethylenimin, Molekulargewicht 30.000-40.000), das mit 5 N HCl auf pH8 eingestellt worden war, bis zu einer Endkonzentration von 0,5% PEI, hinzugefügt. Nach 30-minütigem Rühren in einem Eisbad wurde die Lösung bei 9.000 g, 60 min. und 4°C unter Verwendung einer Beckmann J2-21 Zentrifuge geklärt (roher Extrakt).

b) Ammoniumsulfat Fraktionierung:

Festes Ammoniumsulfat wurde langsam zum gerührten rohen Extrakt bis zu einer Sättigung von 30% (176 g/l) gegeben. Der Niederschlag wurde nach einer Nacht im Kühlraum entfernt. Der klare Überstand wurde langsam bis zu einer Sättigung von 65% mit festem Ammoniumsulfat versetzt (235 g/l Überstand) und zwei Stunden gerührt. Das Präzipitat wurde dann durch Zentrifugation bei 10.000 g 30 min. bei 4°C gesammelt. Es wurde in 500 ml 20 mM TRIS/HCl + 50 mM NaCl, pH 7,4 gelöst und gegen denselben Puffer so lange dialysiert, bis alles Ammoniumsulfat entfernt worden war (bestimmt durch das Ausbleiben einer BaSO_4 -Bildung nach Zugabe von BaCl_2 zum Dialysat).

c) Chromatographie an DEAE-SEPHAROSE FAST FLOW

Das Dialysat wurde durch Zentrifugation geklärt und auf eine 160 ml DEAE-FF-Sephrose-Kolonne (Pharmacia), die mit 20 mM TRIS/HCl + 50 mM NaCl pH 7,4 equilibriert worden war, aufgetragen. Sobald der $\text{OD}_{280\text{nm}}$ des Eluates den Puffer-Level erreichte, wurde ein Gradient von 50 - 500 mM NaCl in 20 mM TRIS/HCl pH 7,4 gefahren (insgesamt 10 Kolonnen-Volumina des linearen Gradienten).

Das Eluat wurde bei OD_{280nm} kontrolliert und durch SDS-PAGE und Western Blot, unter Verwendung eines Kaninchen-Antiserums gegen Placenta-VAC hergestellt, wie für das Rinder-VAC in der EPA 0 181 465 beschrieben, und eines Schweine Anti-Kaninchen IgG gekuppelt an alkalischer Phosphatase, analysiert. VAC-enthaltende Fraktionen wurden gesammelt, wobei einige Fraktionen am Ende des Hauptpeaks verworfen wurden. Der VAC-Pool wurde unter Verwendung einer AMICON Ultrafiltrationszelle und eines PM 10-Typ Ultrafilters konzentriert.

d) Chromatographie an Sephacryl S-200 "High Resolution"

Eine Pharmacia K 26/100 Kolonne (500 ml) wurde mit Sephacryl S-200 HR (Pharmacia) beladen und mit 20 mM Bis-TRIS/HCl + 100 mM NaCl pH 6,3 bei einer Durchflußrate von 15-20 ml/Stunde equilibriert. 6-15 ml Aliquots des konzentrierten DEAE-FF-Sepharose-Pools (total 87,4 ml) und anschließend der Bis-TRIS-Puffer (s.o.) wurden auf die Säule aufgetragen. Das Eluat wurde bei OD 280 nm überwacht. Der VAC repräsentierende Peak war der letzte auffällige Peak des UV-Profiles wie durch SDS-PAGE und Western Blots von Aliquots gezeigt werden konnte. Er wurde gesammelt, die Pools aller Versuche vereinigt (insgesamt 7) und gegen 20 mM Bis-TRIS/HCl pH 6,3 dialysiert.

e) Chromatographie an einer Q-SEPHAROSE-FAST-FLOW

Eine 40 ml Kolonne (K 16/20) einer Q-Sepharose-Fast-Flow (Pharmacia) wurde an das FPLC-System (Pharmacia) angeschlossen und mit 20 mM

Bis-TRIS/HCl pH 6,3 equilibriert. Der dialysierte VAC-Pool wurde auf die Säule aufgetragen und so lange mit 20 mM Bis-TRIS gewaschen, bis der OD_{280nm} des Eluates wieder den Puffer-Level erreicht hatte. Ein NaCl-Gradient in 20 mM Bis-TRIS/HCl pH 6,3 wurde zur Elution verwendet:

0-105 mM NaCl in 1 Kolonnen-Volumen (40 ml)
105-245 mM NaCl in 20 Kolonnen-Volumen (800 ml)
245-350 mM NaCl in 2 Kolonnen-Volumen (80 ml)

VAC konnte im letzten prominenten Peak des UV-Profiles identifiziert werden, der bei ungefähr 0,14 M NaCl eluierte. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE, Western Blot, Reverse HPLC und isoelektrischer Fokussierung bestimmt. Der VAC-Pool wurde bei -20°C aufbewahrt.

Beispiel 9

Vergleich Rekombinantes/natürliches VAC α

Verwendete Methoden:

- a) Gelpermeations-HPLC
- b) Reverse Phase HPLC
- c) N-terminale Sequenzierung
- d) Tryptic Peptid Map
- e) SDS-Gelelektrophorese
- f) Western Blot
- g) Isoelektrische Fokussierung

Für den Vergleich wurde einerseits natürliches VAC, andererseits rekombinantes VAC-alfa verwendet. Im folgenden werden die Versuchsbedingungen für die einzelnen Analysenmethoden beschrieben.

a) Gelpermeations-HPLC

Säule: Waters Protein Pak I 125, 2 x (7,8 x 300 mm), 10 µm Teilchendurchmesser
Eluens: 0,5 M Na₂SO₄, 0,02 M NaH₂PO₄,
pH 7,0, 0,04% Tween 20, 25%
Propylenglykol

Fluß: 0,5 ml/min

Detektion: UV-Absorption, 214 nm

Die Chromatogramme von natürlichem und rekombinantem VAC-alfa zeigen den Hauptpeak des VAC-Monomeren bei einem Molekulargewicht von 34.000 bzw. 33.000. Daneben gibt es jeweils einen geringen Anteil von früher eluierendem Dimeren des VAC. Die Eichung der Molekulargewichtsskala erfolgte über 4 Standardproteine. Die Säule trennt streng genommen nach Molekülgröße und nicht nach Molekulargewicht.

b) Reverse Phase HPLC

Säule: Bakerbond WP C₁₈, 4,6 x 250,
5 µm Teilchendurchmesser, 30 nm
Porendurchmesser

Eluens A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser

Eluens B: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril

Gradient: 20% B für 2 min, 20 - 68% B in 24 min,
68% B für 10 min, 68 - 20% B in 1 min

Fluß: 1,0 ml/min

Detektion: UV-Absorption, 214 nm und 280 nm

Die Chromatogramme von natürlichem und rekombinantem VAC zeigen für VAC eine Retentionszeit von etwa 29 min. Die daneben vorliegenden sehr kleinen Peaks sind nur zum Teil Verunreinigungen der VAC-Probe. Alle mit BW gekennzeichneten Peaks stammen aus dem Blindwert der Säule.

c) N-terminale Sequenzierung

Sequenziert wurde ein über Reverse Phase HPLC entsalzter Peak von rekombinantem VAC-alfa. Die Sequenzierung erfolgte mit einem Gasphasensequenzator der Firma Applied Biosystems (Modell 470A) mit dem Programm 40APTH. Die Probe wurde in 50 µl 70% HCOOH gelöst. Am Sequenzator wurden 2 x 25 µl aufgetragen. Mit einer Ausgangsmenge von 2,3 nMol konnte bis zur Aminosäure 39 sequenziert werden. Es wurde 100%ige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz (aus natürlichem Protein und cDNA) gefunden. Zusätzliches N-terminales Met konnte nicht nachgewiesen werden ($\leq 1\%$). Der N-Terminus liegt bei rekombinantem VAC-alfa frei und nicht blockiert vor wie bei natürlichem VAC.

d) Tryptic Peptid Map

Verglichen wurden natürliches VAC und rekombinantes VAC-alfa. Aus beiden Proben wurde VAC über Reverse Phase HPLC entsalzt, getrocknet und in 0,1% NH_4HCO_3 gelöst. Für die Spaltung wurden 4 Gewichts% Trypsin (Worthington, TPCK behandelt, gelöst zu je 1 mg/ml in Wasser) zugesetzt, nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C nochmals 4 Gewichts% Trypsin. Nach weiterer Inkubation über Nacht wurden die entstandenen Peptide über Reverse Phase HPLC getrennt. Die beiliegenden Chromatogramme (214 nm und 280 nm) zeigen ein praktisch identisches Peptidmuster.

Säule: Waters μ Bondapak C₁₈, 3,8 x 300 mm,
10 μ m Teilchendurchmesser
10 nm Porendurchmesser

Eluens A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser

Eluens B: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril

Gradient: 0 - 55% B in 55 min, 55% B für 15 min,
55 - 0% B in 1 min

Fluß: 1,0 ml/min

Detektion: UV-Absorption, 214 nm und 280 nm

e) SDS-Gelelektrophorese

SDS-Gelelektrophorese wurde weitgehend nach der Originalvorschrift von U.K. Laemmli durchgeführt (Nature 227, 680-685 (1979)). Die Silberfärbung

erfolgte nach der Methode von Oakloy (Anal. Biochem. 105, 361-363 (1980)). Das erste Gel zeigt einen Vergleich zwischen natürlichem und rekombinantem VAC-alfa. Der Gehalt an dimerem VAC wurde durch Scannen mit einem Laserdensitometer quantifiziert und betrug 2% beim natürlichen und 4% beim rekombinanten VAC. Das zweite Gel zeigt nur rekombinantes VAC-alfa, aufgetragen mit und ohne DTT (Dithiothreitol, Reduktionsmittel). Daraus ist ersichtlich, daß das SDS-stabile Dimere offensichtlich über Disulfidbrücken gebunden ist, die mit DTT reduziert werden können.

Stammlösungen der Reagenzien

15% Ammonium-persulfat-Lösung (APS)

150 mg Ammonium-persulfat werden in 1 ml dest. Wasser gelöst.

30% Acrylamid + 0,8% Bis Acrylamid

Acrylamid	Bis-acrylamid	Wasser auf
15 g	0,4 g	50 ml
30 g	0,8 g	100 ml
45 g	1,2 g	150 ml

Das Acrylamid wird in dem entsprechenden Wasservolumen gelöst und vor der Verwendung filtriert.

Trenngel-Puffer

1,5 M TRIS-HCL, 0,4% SDS (Sodium-dodecylsulfat), pH 8,8
18,16 g TRIS + 0,4 g SDS mit konz. HCl auf pH 8,8
einstellen und mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Stackinggel-Puffer

0,5 M TRIS-HCl, 0,4% SDS, pH 6.8
6,04 g TRIS + 0,4 g SDS mit konz. HCl auf pH 6,8
einstellen und mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Laufpuffer

25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, 0,005% Na-azid
pH 8,5 12 g TRIS + 57,6 g Glycin + 4 g SDS + 0,2 g
Natriumazid werden in ca. 3,5 l dest. Wasser gelöst,
auf pH 8,5 eingestellt und auf 4,0 l aufgefüllt. Es
empfiehlt sich die Leitfähigkeit des neuen Laufpuffers
mit den vorhergehenden Chargen zu vergleichen.

0,05% Coomassie-Blue-Färbelösung

0,55 g Coomassie Brilliant Blue R 850 werden in 500 ml
Methanol gelöst, 30 min gerührt und filtriert. Dazu
gibt man 100 ml Eisessig und 500 ml dest. Wasser.

Entfärbelösung

a) Manuelles Entfärben

Die Entfärbelösung entspricht der Färbelösung ohne
Farbstoff: 500 ml Methanol + 500 ml dest. Wasser +
100 ml Eisessig

b) Elektrophoretisches Entfärben in 7,5% Essigsäure

4 x SDS Auftragepuffer (ca. 1 Monat haltbar)

Farbstoffkonzentrat:	Bromphenolblau	50	mg
	Glycerin	0,5	ml
	Wasser (dest.) auf	10	ml

Die Lösung ist ca. 3 Monate haltbar.

Auftragepuffer:	Farbstoffkonzentrat	0,4	ml
	SDS	0,8	g
	Glycerin	4	g
	Wasser (dest.) auf	10	ml

1 x SDS Auftragepuffer

Verdünnung 1:4 des 4 x SDS Auftragepuffers mit dest. Wasser.

Silberfärbung nach Oakley

Reagenzien

<u>Destainer:</u>	Ethanol	200	ml
	Essigsäure (conc.)	62,5	ml
	Dest. Wasser auf	1000	ml

10% Glutardialdehyd-Lösung:

25% Glutardialdehyd-Lösung	20 ml	bzw.	40 ml
Dest. Wasser auf	50 ml	bzw.	100 ml

Die Lösung muß im Kühlschrank aufbewahrt werden.

0,1 N ammoniakalische Silberlösung:

Erst direkt vor Gebrauch herstellen!

0,1 N Silbernitrat (16,9 g/l)	23	ml	46	ml
25% Ammoniaklösung	0,95	ml	1,9	ml
0,36% Natriumhydroxid (1,8 g/0,5 l)	10,5	ml	21	ml
dest. Wasser auf	50	ml	100	ml

Entwickler-Lösung:

Unmittelbar vor Gebrauch herstellen!

0,5% Citronensäure (1,25 g/250 ml)	5	ml
dest. Wasser	1	l
37% Formaldehyd	1	ml

Entfärbe-Lösung (Photo-Fixierer):

Kodak-Fixierer (Photolabor) Verdünnung 1:4 mit dest. Wasser. Die Verdünnung ist mehrfach verwendbar, jedoch nimmt die Dauer des Entfärbens nach häufigerer Verwendung zu.

2% Glycerin-Lösung:

23 g Glycerin 87% in 1 l dest. Wasser

Durchführung der Silberfärbung nach Oakley

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel an einer Ecke markiert und durchlief danach folgende Färbeschritte im Schüttler:

- 30 min im Destainer-Bad
- 30 min in 20% Glutardialdehyd-Lösung (50 ml)
- 30 min in fließendem Wasser oder über Nacht in ca. 2 l Wasser
- 10 min in ammoniakalischer Silberlösung (50 ml)
- 3 min in fließendem Wasser
- ca. 5 min in Entwickler-Lösung

Der Entwicklungsvorgang wurde nicht nach einer exakten Zeitdauer beendet, sondern dann, wenn die Banden ausreichend gefärbt waren oder spätestens wenn sich der Hintergrund zu färben begann. Gestoppt wurde die Entwicklung durch

- 30 min Wässern der Gele (in einer Wanne oder unter Fließwasser)

Die Entwicklung dauerte auch noch an, wenn das Gel bereits im Wasser war! (Diffusionszeit).

Das Entfärben des Gels war nur dann erforderlich, wenn der Hintergrund zu stark gefärbt war!

- ca. 5-10 min in Kodak-Fixierer, bis ein optimaler Kontrast zwischen den Banden und dem Hintergrund erreicht war. Achtung! Das Entfärben erfolgte auch noch nach unmittelbarem Abstoppen in fließendem Wasser (Diffusionszeit).
- 30 min in 2% Glycerin-Lösung

Danach konnte das Gel auf Filterpapier bei 80°C 1 Std. getrocknet werden.

f) Western Blot

Der immunologische Nachweis erfolgte für VAC mit rabbit anti VAC Serum (1:1000 verdünnt) und mit swine anti rabbit IgG (1:500 verdünnt), das mit Alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Zum Nachweis der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase wurden die Substrate BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat) und NBT (Nitro Blue Tetrazolium) eingesetzt. Die vergleichende Proteinfärbung auf der Nitrocellulose erfolgte mit Amidoschwarz.

Western-blotting im semi-dry Verfahren

1. Materialien:

Semy-dry Electroblotter (Fa. Sartorius) SM 175 56;
Filterpapier in der Größe des zu blottenden Gels;
Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,45 µm) in
Gelgröße;

2. Reagenzien

Anodenpuffer 1: pH 10,4

0,3 M TRIS	3,63 g/80 ml
20% Methanol	20 ml

Anodenpuffer 2: pH 10,4

25 mM TRIS	0,3 g/80 ml
20% Methanol	20 ml

Kathodenpuffer: pH 9,4

25 mM TRIS	0,3 g/80 ml
40 mM ε-Aminocaprinsäure	0,52 g/80 ml (MW 131,3)
20% Methanol	20 ml

Amidoschwarz-Protein-Färbemedium

0,5% (w/v) Amidoschwarz	0,5 g in 40 ml
50% Methanol	50 ml
10% Essigsäure	10 ml

Entfärber

Methanol - Wasser - Essigsäure
5 - 5 - 1

PBS (Phosphate buffered saline) 10x Konzentrat pH 7.2

136 mM Natriumchlorid	80 g
26 mM Kaliumchlorid	2 g
80 mM di-Natriumhydrogenphosphat	11,3 g
(80 mM di-Natriumhydrogenphosphat $\cdot 12H_2O$)	28,7 g)
14 mM Kalium-dihydrogenphosphat	2 g
mit dest. Wasser auffüllen auf	1 l
vor Gebrauch 1/10 verdünnen !!!	

Blocking Puffer:

1% BSA
0,1% Tween 20
in 1x PBS

Waschpuffer:

1 x PBS
1 x PBS + 0,1% Tween 20
1 x PBS

Färbepuffer für Alkalische Phosphatase-Färbung:

pH 9,9	
100 mM TRIS	1,22 g
100 mM Natriumchlorid	0,58 g
5 mM Magnesiumchlorid. 6H ₂ O	0,10 g
mit dest. Wasser auffüllen auf	100 ml

NBT (Nitro-Blue Tetrazolium) - Lösung

50 mg NBT (Fa. Sigma N-6876)/ml 70% Dimethylformamid

BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat) - Lösung

50 mg BCIP (Fa. Sigma B-8503)/ml in 100%
Dimethylformamid

Färbemedium für Alkalische Phosphatase

Färbungspuffer	10 ml
BCIP	0,033 ml
NBT	0,065 ml

Antikörperreagenzien:

Rabbit anti VAC-Serum mit alkalischer Phosphatase
konjugiert.

3. Durchführung des Blots

Das Blotten erfolgte bei 0,8 mA/cm² Gelfläche über
60 min

4. Nachweis der Proteine auf der Nitrocellulose-Membran4.1. Proteinfärbung mit Amidoschwarz

Der für die Proteinfärbung vorgesehene Anteil der Nitrocellulose-Membran wurde abgeschnitten und 5 Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung gelegt. Danach wurde die mehrfach verwendbare Färbelösung abgegossen und überschüssige Färbelösung von der Nitrocellulose-Membran mit Wasser abgespült.

4.2 Immunologischer Nachweis

4.2.1 Blockierung der Nitrocellulose-Membran

Vor dem immunologischen Nachweis wurde die Nitrocellulose-Membran mindestens 60 min (oder auch über Nacht) mit 1% BSA in 1xPBS mit 0,1% Tween 20 blockiert.

4.2.2. Nachweis mit Enzym-markierten Antikörpern

Nach dem Blockieren wurde die Nitrocellulose-Membran mit rabbit anti VAC Serum (in geeigneter Verdünnung in Blockierungsmedium) 60 min inkubiert.

Danach wurde 3x gewaschen: 1x PBS, PBS mit 0,1% Tween, 20, 1x PBS. Darauf erfolgte die Inkubation der Membran mit swine anti rabbit IgG, das mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war (ebenso in einer geeigneten Verdünnung in Blockierungsmedium über 60 min). Danach wurde erneut 3x mit PBS gewaschen wie oben angegeben.

4.2.3 Enzymatische Färbung des Blots

Die Nitrocellulose-Membran wurde in Färbemedium gelegt (für ein Minigel reichten 10 ml aus) und im Schüttler langsam bewegt, bis sich eine ausreichende Anfärbung

der Banden zeigte. Die Färbung wurde durch Auswaschen des Färbemediums mit Wasser beendet, danach die Nitrocellulose-Membran an der Luft getrocknet.

5. Bewertung des Western-Blots

Die immunologisch/enzymatisch nachgewiesenen Banden des Blots wurden mit den Banden der Proteinfärbung des Blots und auch mit dem entsprechenden Bandenmuster der SDS-Elektrophorese verglichen und einander zugeordnet.

7. Isoelektrische Fokussierung

Der isoelektrische Punkt (pI) für rekombinantes VAC-alfa liegt mit 4,9 um 0,1 pH-Einheiten höher als für natürliches VAC (4,8).

Polyacrylamidgel-Isoelektrische Fokussierung (PAGIF oder IEF)

Material und Reagenzien

Polyacrylamidgelplatten für Isoelektrische Fokussierung auf Folie aufpolymerisiert. (LKB -"PAGplate", SERVA - "Servalyt Precotes")

Elektrodenlösungen für die jeweiligen pH-Bereiche:

pH 3,5-9,5 (LKB-PAGplate)

Anodenlösung: 1 M Phosphorsäure

Kathodenlösung: 1 M Natronlauge

pH 5,5-8,5 (LKB-PAGplate)

Anodenlösung: 0,4 M HEPES (mit Na-azid)

Kathodenlösung: 0,1 M NaOH

pH 4,0-6,5 (LKB-PAGplate)

Anodenlösung: 0,5 M Phosphorsäure + 0,1 M
Glutaminsäure

Kathodenlösung: 0,1 M Beta-Alanin (mit Na-azid)

pH 3,5-9,5 (SERVALYT-Precotes)

Anodenlösung: 25 mM Asparaginsäure + 25 mM
Glutaminsäure

Kathodenlösung: 2 M Ethylendiamin + 25 mM Arginin Base
+ 37,5 mM Lysin Base

Kühlvermittler: Kerosin (Fa. SERVA)

Fixierlösung:

10% Trichloressigsäure (TCA) mit 5% Sulfosalicylsäure

0,05% Coomassie Blue Färbelösung

Entfärber: 500 ml Methanol + 500 ml Wasser +
100 ml Eisessig

Proben:

Die Proben sollen salzarm oder besser noch salzfrei
sein. Höhere Salzkonzentration müssen vor der IEF gegen
ca. 5-10 mM Puffer oder Wasser dialysiert werden.

NaCl kann jedoch bis zu 100 mM enthalten sein, ohne daß
die Lauffronten gestört werden.

Fixierung des IEF-Gels vor Proteinfärbung

Das Gel wurde ca. 20 min in die Fixierlösung gelegt,
jedoch ohne dabei zu schütteln! (Es löste sich dabei
leicht von der Folie ab) Danach wurde 5 min gewässert.

Proteinfärbung der IEF-Gele mit Coomassie Blue

Die fixierten Gele wurden ca. 2 Std. in Färbelösung gelegt und dabei nur sehr leicht bewegt.

Entfärben der IEF-Gele

Nach der Färbung wurde die überschüssige Färbelösung mit Wasser abgespült und durch häufiges Wechseln des Entfärbers das Gel entfärbt. Nach ausreichendem Entfärben wurde das Gel wieder gewässert, bis der Entfärber ausgewaschen war.

Trocknen der IEF-Gele

Die Gele wurden auf eine nasse, wasserdurchlässige Klarsichtfolie oder Dialysemembran gelegt, mit der wasserundurchlässigen Seite nach oben und 1 Std. bei 80°C getrocknet.

Beispiel 10

Biologische Aktivität von rekombinantem VAC

A. Modifizierter Prothrombin Zeit Test (s.EPA 0 181 465)

Zitriertes, Plättchen freies Plasma (PFP) wurde in An- oder Abwesenheit von rekombinantem VAC (r-VAC) oder natürlichem VAC zwei Minuten bei 37°C gerührt. Nach der Inkubation wurde eine Lösung aus brain tissue factor und Ca^{++} zugegeben. Die Fibrinbildung wurde beobachtet, die Gerinnungszeit optisch registriert. Die Ergebnisse sind in Fig. 33 dargestellt und belegen, daß r-VAC und VAC die

Fibrinbildung dosisabhängig inhibieren. Die spezifischen Aktivitäten des r-VAC und des VAC bewegen sich in derselben Größenordnung.

B. Thrombin Zeit Test (s. EPA 01 181 465)

Zitriertes PFP wurde in An- oder Abwesenheit von r-VAC oder VAC zwei Minuten bei 37°C gerührt. Nach der Inkubation wurde Thrombin und Ca^{++} zugegeben. Die Fibrinbildung wurde optisch beobachtet. Sowohl r-VAC als auch VAC inhibieren nicht die Thrombin-induzierte Fibrinbildung wie aus Fig. 34 zu entnehmen ist. Folglich inhibieren sowohl r-VAC als auch VAC die Thrombinbildung, nicht jedoch die Thrombinwirkung.

C. Faktor Xa-Bildung in Gewebefaktor-aktiviertem Plasma (s. EPA 0 181 465)

Zitriertes PFP wurde in An- oder Abwesenheit von r-VAC oder VAC zwei Minuten bei 37°C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von "brain tissue factor" und Ca^{++} zum PFP gegeben, um so die Koagulation in Gang zu setzen. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und in einem Puffer 1000fach verdünnt. 10 µl dieser Lösung wurden zu 40 µl einer Mischung, die die nachfolgenden Komponenten des Prothrombinase-Komplexes enthielten, zugegeben.

0,6 nM Faktor Va

50 µM Phospholipide (80% Dioleoyl-phosphatidylcholin/20% Dioleoyl-phosphatidylserin).

1,0 µM Prothrombin

Nach einer Reaktionszeit von zwei Minuten wurde der Anteil an aktiviertem Prothrombin durch die amidolytische Aktivität unter Verwendung des chromogenen Substrats S 2238 beurteilt. Die Menge an amidolytischer Aktivität, die so gemessen wurde, ist der Menge an aktivem Faktor X_a in dem PFP direkt proportional.

Nach 1000-facher Verdünnung bei Anwesenheit von VAC in dem PFP konnte keine Auswirkung auf die Prothrombin-Aktivierung beobachtet werden.

Eine typische Faktor X_a -Bildungskurve und die Auswirkungen von r-VAC und VAC sind in Fig. 35 dargestellt. Durch diese Ergebnisse kann festgestellt werden, daß r-VAC die Gewebefaktor-induzierte Faktor X-Aktivierung im Plasma, in dosisabhängiger Weise wie VAC inhibiert.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin indirekt, daß sowohl r-VAC als auch VAC den Faktor X_a direkt nicht in einer zeitabhängigen Weise inaktivieren. Diese Aussage kann aus der Form der Kurve hergeleitet werden. Nachdem ein Maximum erreicht ist, beginnt die Menge an aktivem Faktor X_a in dem PFP, einer Kinetik Pseudo 1. Ordnung folgend, abzunehmen. Diese Abnahme resultiert vermutlich aus der Inaktivierung des Faktors X_a durch Antithrombin III. Die Geschwindigkeitskonstante Pseudo 1. Ordnung, die aus diesen Daten berechnet wurde, beträgt ca. $0,25 \text{ min}^{-1}$ und ändert sich nicht bei Abwesenheit von r-VAC und VAC.

Diese Daten belegen eindeutig, daß r-VAC VAC-Aktivität zeigt. Obwohl die spezifische Aktivität von r-VAC in diesem Koagulationstest identisch ist mit der von VAC und obwohl r-VAC Faktor X_a und Thrombin direkt nicht inaktiviert, wurden zusätzlich noch Untersuchungen zur r-VAC-Bindung an Phospholipide durchgeführt, um zweifelsfrei die Zugehörigkeit der VAC-Aktivität zum r-VAC zu demonstrieren.

Die Bindung von r-VAC und VAC an eine Phospholipid-Doppelschicht, die aus Dioleoylphosphatidylcholin und Dioleoylphosphatidylserin (80%/20%) besteht, wurde durch Verwendung eines automatischen Ellipsometers bestimmt. Dies Verfahren wurde von Cuypers et al. in J. Biol. Chem. 258 (1983), 2426-2431 beschrieben.

Ein typisches Ergebnis dieser Studie gibt Fig. 36 wieder. Sowohl r-VAC als auch VAC zeigen identische Bindungskinetik an die Doppelschicht, wenn sie in einer Konzentration von 1 µg VAC/ ml dieser Doppelschicht zugesetzt wurden. Die Bindung erfolgt in Anwesenheit von Ca^{2+} und ist, wie durch die Zugabe von EDTA gezeigt werden konnte, reversibel.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß r-VAC biologisch aktiv ist und von natürlichem VAC nicht zu unterscheiden ist.

Beispiel 11**Konstruktion Tetracyclin-resistenter VAC-alpha und VAC-beta Expressionsvektoren (pGN25, pGN26)**

1 µg pAT153 wurde in 50 µl Lösung mit EcoRI geschnitten. Die Enzymaktivität wurde durch Erhitzen auf 70°C zerstört, und die überhängenden Enden durch Zusatz von DNA-Polymerase I/Klenow Fragment (PolIK) (5 units) und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (je 20 µM Endkonzentration) in einer fill in Reaktion begradigt. Nach Erhitzen auf 70°C zur Zerstörung der PolIK Aktivität wurde die DNA mit Äthanol ausgefällt. Die linearisierte DNA wurde in 50 µl mit PvuI nachgeschnitten.

pRH291 bzw. pRH292 wurden zunächst mit SphI linearisiert und das 3' überhängende Ende durch die 3' exonukleolytische Aktivität der PolIK in Gegenwart von dGTP abgebaut. Nach Fällern der DNAs wurden diese mit PvuI nachgeschnitten. Die Fragmente aus allen drei Verdauen wurden auf einem Agarosegel getrennt und die entsprechenden Fragmente eluiert (pAT153: 3032 bp, pRH291: 1987 bp, pRH292: 2607 bp). 50 ng pAT153 Fragment wurden mit 50 ng pRH291 bzw. pRH292 Fragment versetzt und in 10 µl ligiert. 100 µl kompetenter E.coli HB101 wurden mit 5 µl der Ligaselösung versetzt und transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Agar, der 100 µg/ml Ampicillin enthielt. Von den entstandenen Klonen wurden einige auf LB-Agar mit 12,5 µg/ml Tetracyclin ausgestrichen. Die darauf wachsenden Klone wurden zur Herstellung von Plasmid DNA verwendet. Die in einer Minipräparation hergestellte Plasmid-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und so die Richtigkeit der Konstruktion überprüft. Jeweils ein Klon wurde ausgewählt und mit pGN25 (VAC-alpha) oder pGN26 (VAC-beta) bezeichnet.

E.coli HB101/pGN25 bzw. HB101/pGN26 wurden, wie in Beispiel 7 beschrieben, einer Fermentation unterzogen, wobei diesmal anstelle des Amicillins 5 mg/l Tetracyclin in der Vorkultur verwendet wurden. Während der Hauptfermentation wurden Aliquots entnommen und auf einem 15% Acrylamid/0,1% SDS Gel nach Lämmli untersucht. Es wurde kein Unterschied zu den Fermentationen von E.coli HB101/pRH291 bzw. HB101/pRH292 festgestellt. Aus der Biomasse der Fermentation wurde VAC-alpha und VAC-beta gereinigt. Die Proteinanalyse ergab ebenfalls keinen Unterschied zu den entsprechenden rekombinanten Proteinen aus den Fermentationen der Klone HB101/pRH291 und HB101/pRH292.

Beispiel 12

Reinigung von rekombinantem VAC-8

Ausgangsmaterial: E.coli HB101/pRH 292.

Die Zellen waren zentrifugiert und bei -70°C eingefroren worden.

a) Zell Homogenisierung und Extraktion

100 g gefrorener Zellkuchen wurde in 500 ml eiskaltem Lyse-Puffer (100 mM TRIS/HCl, 50 mM EDTA und 200 mM NaCl, pH 7,5) suspendiert und mit einem Ultra-Turrax (5 kurze Impulse) zur Zerstörung von Klumpen behandelt. Die Suspension wurde danach 3-mal durch eine Manton-Gaulin Presse bei 6.000 psi geführt. Zuletzt wurde die Presse mit 300 ml Lyse-Puffer gespült. Zur homogenisierten Suspension

wurde langsam eine 5%ige Lösung PEI (Polyethylenimin, Molekulargewicht 30.000-40.000), das mit 5 N HCl auf pH8 eingestellt worden war, bis zu einer Endkonzentration von 0,5% PEI, hinzugefügt. Nach 30-minütigem Rühren in einem Eisbad wurde die Lösung bei 9.000 g, 60 min. und 4°C unter Verwendung einer Beckmann J2-21 Zentrifuge geklärt (roher Extrakt).

b) Chromatographie an Silica

Silica Catalyst Carrier, Grade 953W (Grace GmbH, Worms, BRD) wurde in destilliertem Wasser geklärt und in eine Chromatographiesäule von 5 cm Durchmesser und 20 cm Höhe gefüllt. Nach Äquilibration mit Lys-Puffer wurde der rohe Extrakt auf die Säule aufgetragen und mit 3 l Lys-Puffer gewaschen. VAC-8 wurde mit einem Lineargradienten von Tetraethylammoniumchlorid in Lys-Puffer (0-1 M in 200 ml Puffer) eluiert. Fraktionen des Eluats wurden durch SDS-PAGE auf VAC-8 unter Verwendung von Referenz-Material kontrolliert. VAC-8 enthaltende Fraktionen wurden gesammelt.

c) Chromatographie an DEAE-SEPHAROSE FAST FLOW

Die gesammelten Silica-Fraktionen wurden gegen 20 mM TRIS/HCl pH 8,4 dialysiert und auf eine 175 ml DEAE-FF-Sepharose-Kolonne (26 x 330 mm, Pharmacia), die mit 20 mM TRIS/HCl pH 8,4 equilibriert worden war, aufgetragen. Die Kolonne wurde mit 500 ml Pufferlösung gewaschen und VAC-8 mit einem

Gradienten von 0-500 mM NaCl in 875 ml Pufferlösung (5 Kolonnen Volumen) eluiert. Das Eluat wurde bei 280 nm kontrolliert und durch SDS-PAGE, unter Verwendung eines Referenz-Materials analysiert. VAC- β enthaltende Fraktionen wurden gesammelt und unter Verwendung einer AMICON Ultrafiltrationszelle und eines PM 10-Typ Ultrafilters konzentriert.

d) Chromatographie an Sephacryl S-200 "High Resolution"

Eine Pharmacia K 26/100 Kolonne (500 ml) wurde mit Sephacryl S-200 HR (Pharmacia) beladen und mit 20 mM Bis-TRIS/HCl + 100 mM NaCl pH 8,4 bei einer Durchflußrate von 120 ml/Stunde equilibriert. 4 ml Aliquots des konzentrierten DEAE-FF-Sepharose-Pools wurden auf die Säule aufgetragen und die Durchflußrate auf 60-80 ml/Stunde reduziert. Das Eluat wurde bei 280 nm überwacht. Der VAC- β repräsentierende Peak war der einzige Peak des UV-Profiles. Er wurde gesammelt, wobei hochmolekulare Verunreinigungen, die ebenfalls im UV-Profil detektierbar waren verworfen wurden. Das gereinigte VAC- β wurde durch SDS-PAGE analysiert und bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle: Reinigung von rekombinantem VAC-8

Ausgangsmaterial: 100 g gefrorener Zellkuchen

	<u>Volumen(ml)</u>	<u>mg Protein/ml</u> ^{x)}	<u>mg total</u>
ROEXTRAKT	810	16,1	13.040
SILICA DURCHFLUSS	2270	0,35	795
VAC-beta SILICA POOL	380	5,0	1.900
VAC-beta DEAE-FF-POOL	120	2,6	312
DEAE-FF-POOL KONZENTRAT	4	58	232
VAC-beta SEPHACRYL-POOL	33,5	2,2	74

x) Protein bestimmt durch BIO-RAD Protein Assay (Standard: bovine serum albumin)

Beispiel 13Analytik und Charakterisierung von VAC-beta

Als In Process Kontrolle zwischen den einzelnen Reinigungsschritten wurde die SDS-Gelelektrophorese verwendet. Die genaue Durchführung dieser Analyse erfolgte gleich wie bei den Endkontrollen und ist dort beschrieben. Eine Serie der während einer Reinigung erhaltenen SDS-Gele ist im Beispiel 12 (Reinigung von VAC-beta) enthalten.

Als Endkontrollen und zur Charakterisierung des gereinigten Proteins wurden die folgenden Methoden verwendet:

- a) Gelpermeations-HPLC
- b) Reverse Phase HPLC
- c) Aminosäureanalyse
- d) N-terminale Sequenzierung
- e) SDS-Gelelektrophorese
- f) Isoelektrische Fokussierung

a) Gelpermeations-HPLC

Säule: Waters, Protein Pak I 125, 2 x (7,8 x 300 mm), 10 µm Teilchendurchmesser, Raumtemperatur

Eluens: 0,5 M Na₂SO₄, 0,02 M NaH₂PO₄, pH 7,0, 0,04% Tween 20, 25% Propylenglykol

Flußrate: 0,5 ml/min

Detektion: UV-Absorption, 214 nm, 0,5 AUFS

Das Chromatogramm (Fig. 40) von gereinigtem VAC-beta zeigt den Hauptpeak des VAC-beta Monomeren bei einem Molekulargewicht von 29.000, daneben ist eine geringe Menge dimeres VAC-beta (M etwa 50.000) nachweisbar. Diese Werte für das Molekulargewicht liegen relativ weit unterhalb des erwarteten Wertes (M 37.000), was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß die hier verwendete Gelpermeations-Säule nach der Molekülgröße bzw. -gestalt trennt und nicht nach dem Molekulargewicht

b) Reverse Phase HPLC

Säule: Bakerbond WP C₁₈, 4,6 x 250 mm, 5 µm
Teilchendurchmesser, 30 nm Porendurchmesser, Raumtemperatur

Eluens A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser

Eluens B: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril

Gradient: 20% B für 2 min, 20 - 68% B in 24 min,
68% B für 10 min, 68 - 20% B in 1 min

Flußrate: 1 ml/min

Detektion: UV-Absorption, 214 nm, 0,5 AUFS

Das Chromatogramm (Fig. 41) stammt direkt aus dem Eluat der letzten Reinigungsstufe und zeigt hauptsächlich den Peak des oxidierten VAC-beta (2 Disulfidbrücken, $t_R = 26,6$ min). Daneben sind etwa 9% reduziertes VAC β ($t_R = 27,4$ min) sowie einige kleinere Peaks von restlichen Verunreinigungen nachweisbar.

Das Chromatogramm (Fig. 42) zeigt dieselbe VAC-beta Probe nach 2 Stunden Inkubation in 3 M Harnstoff, 0,05 M Dithiotreitol. Das Protein liegt hauptsächlich in der reduzierten Form ($t_R = 27,4$ min) vor.

c) Aminosäureanalyse

Gereinigtes VAC-beta wurde über Reverse Phase HPLC (Methode siehe unter b) entsalzt. Der Hauptpeak von VAC-beta wurde in einem Hydrolyseröhrchen gesammelt und getrocknet.

Die Hydrolyse erfolgte mit 6 N Salzsäure (mit 1% Phenol) in der Gasphase (110°C, 22 Stunden).

Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mit einem Aminosäureanalysator ((Typ 6300, Fa. Beckman) über eine Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin.

Die Aminosäureanalyse (Fig. 43) einer VAC-beta Probe weist eine Gesamtabweichung gegenüber der theoretischen Zusammensetzung von 6.56% auf.

d) N-terminale Sequenzierung

Gereinigtes VAC-beta wurde über Reverse Phase HPLC (Methode siehe unter b) entsalzt. Der Hauptpeak von VAC-beta wurde gesammelt und getrocknet.

Der Rückstand wurde in 75 µl 0,1% Trifluoressigsäure gelöst und direkt für die Sequenzierung verwendet.

Die Sequenzierung erfolgte mit einem Gasphasensequenzator der Fa. Applied Biosystems (Modell 470 A9) mit dem Programm 39apth.

Mit einer Ausgangsmenge von etwa 1 nM konnte bis zur 39. Aminosäure sequenziert werden. Es wurde 100%ige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz gefunden. N-terminales Methionin wurde offensichtlich zu 100% abgespalten. (Fig. 44)

e) SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophoresen wurden weitgehend nach der Originalvorschrift von U.K. Lämmli durchgeführt. Für in Process Kontrollen wurden VAC-beta-Proben vor dem Auftragen mit Dithiothreitol versetzt und aufgekocht. Endkontrollen erfolgten sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen. Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Blue.

Fig. 45 zeigt ein SDS-Gel von VAC-beta Proben.

Spur 1 und 10: Molekulargewichtsmarker

Spur 2 und 3: In Process Probe von VAC-beta mit und ohne DTT (Dithiothreitol)

Spur 4 und 6: 10 µg VAC-beta nicht reduziert

Spur 5 und 7: 10 µg VAC-beta mit DTT reduziert

Spur 8 und 9: 1 µg VAC-beta nicht reduziert

VAC-beta ohne Reduktionsmittel ist als Doppelbande nachweisbar. Die intensivere untere Bande bei M etwa 36.000 ist die oxidierte Form, die obere Bande bei M etwa 38.000 die reduzierte Form von VAC-beta. Die mengenmäßige Verteilung der beiden Formen ist besser aus den Spuren 8 und 9 ersichtlich.

Nach Zugabe von DTT als Reduktionsmittel ist daher nur mehr die obere Bande sichtbar (siehe Spur 3, 5 und 7). Da die Spuren 4 bis 7 stark überladen sind, sind neben den VAC-beta Banden auch einige Banden von restlichen Verunreinigungen sichtbar.

f) Isoelektrische Fokussierung

Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blue.

Die isoelektrische Fokussierung Fig. 46 (3.3.1988/51) von weitgehend gereinigtem VAC- β zeigt, daß VAC- β direkt aus der letzten Reinigungsstufe (Spur 2 und 3) zwei Hauptbanden bei pH 5,35 bzw. 5,45 ergibt. Der isoelektrische Punkt (pI) von VAC- β ist damit deutlich basischer als der von VAC- α (pI=4,9), was den Erwartungen entspricht, da VAC- β weniger saure Aminosäuren enthält.

Nach der Reduktion mit Dithiothreitol (Spur 4 und 5) ist die Hauptbande bei pH 5,45 stark angereichert. Diese stellt offensichtlich die reduzierte Form von VAC- β dar.

Beispiel 14

Biologische Aktivitäten von VAC- α und VAC- β

1. Effekt von VAC- α und VAC- β auf die Prothrombinase Aktivität.

Der Prothrombinase Komplex wurde aus gereinigten bovinen Koagulationsfaktoren und Phospholipiden rekonstituiert. Er bestand aus 0,3 nM Faktor Xa, 0,6 nM Faktor Va, 1 μ M Prothrombin, 2 μ M Phospholipid Vesikeln (25% Dioleoyl-phosphatidylserin, 75 % Dioleoyl-phosphatidylcholin) und 3 mM CaCl_2 .

Prothrombin Aktivierung wurde folgendermaßen gemessen: Faktor Xa, Va, Phospholipide, Ca^{++} und variierende Mengen VAC wurden zwei Minuten bei 37°C inkubiert. Die Aktivierung des Prothrombin wurde durch dessen Zugabe gestartet. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben der Mischung in folgendem Puffer aufgenommen:

50 mM TRIS/HCl, 175 mM NaCl, 0,5 mg/ml BSA, 20 mM EDTA und 0,23 mM S2238. Amidolytische Aktivität wurde bei 405 nm verfolgt. Aus einer Standardkurve, die mit bekannten Mengen Thrombin erstellt worden war, wurde anschließend die Menge an aktiviertem Prothrombin bestimmt. Fig. 47 gibt das Ergebnis wieder.

2. Phospholipase Inhibitor Aktivitäten von VAC

E.coli wurde metabolisch mit ^3H -Ölsäure markiert und weiterbehandelt wie beschrieben (Davidson, F.F. et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1690-1705). Die E.coli Membran Präparation enthielt 198 μM Phospholipide mit einer spezifischen Aktivität von $1,2 \times 10^4$ cpm/nMol Phospholipid. Diese Membran Präparation diente als Phospholipasesubstrate in dem Assay, der wie folgt durchgeführt wurde: 103 μl 0,1 M TRIS/HCl, pH 8,0, unterschiedliche Mengen an VAC und Ca^{++} enthaltend und 10 μl E.coli Membranen wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 wurden 10 μl 0,1 M TRIS/HCl, pH 8,0, 2 ng bovine Pankreas Phospholipase A_2 enthaltend zugegeben. Nach zwei Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μl 2N HCl und 50 μl 0,1 M TRIS/HCl pH 8,0, das 100 ng/ml BSA enthielt, gestoppt. Die Mischung wurde bei 14.000 rpm fünf Minuten zentrifugiert. Die Menge an freigesetzter ^3H -Ölsäure wurde durch Szintillationszählung des Überstandes bestimmt. Prozent Inhibition der Phospholipase A_2 Aktivität wurde folgendermaßen berechnet :

$$100\% - [(cpm_{\text{pla+vac}} - cpm_{\text{blank}}) / (cpm_{\text{pla}} - cpm_{\text{blank}})] * 100\%$$

Hierbei bedeutet $\text{cpm}_{\text{pla}+\text{VAC}}$, cpm_{pla} und $\text{cpm}_{\text{blank}}$ die cpm, die in den Überständen der Mischungen, entweder Phospholipase A_2 und VAC, Phospholipase A_2 oder VAC enthaltend, gemessen wurden. Die Ergebnisse finden sich in den Figuren 48, 49, 50 und 51.

Beispiel 15

Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen VAC- α

1. Kopplung von VAC- α an "keyhole limpet" - Hämocyanin (KLH)

VAC- α wurde folgendermaßen kovalent an "keyhole limpet" - Hämocyanin (KLH; SIGMA chemical company, St. Louis, USA, Katalog-Nummer H-2133) gekoppelt.

1.1 VAC- α /KLH Präparation 1:

0,51 mg VAC- α wurden in 1,5 ml isotoner phosphat-gepufferter Natriumchlorid-Lösung pH 7,2 (im folgenden "PGS" abgekürzt) gelöst und mit 0,12 ml einer KLH-Lösung (8 mg/ml in PGS) gemischt. 0,017 ml einer 25%igen Glutardialdehydlösung wurden hinzugefügt und das Gemisch 45 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde über Nacht gegen 1 l PGS dialysiert. Portionen dieser Lösung wurden bei -20°C gelagert.

1.2 VAC- α /KLH Präparation 2:

2,54 mg VAC- α wurden in 2 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 gelöst und mit 0,3 ml KLH-Lösung (siehe 1.1) gemischt. 0,023 ml einer

25%igen Glutardialdehyd-Lösung wurden hinzugefügt und das Gemisch 45 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde über Nacht gegen 1 l PGS (siehe 1.1) dialysiert. Portionen dieser Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

2. Immunisierung

Eine 10 Wochen alte weibliche Balb/c-Maus wurde folgendermaßen immunisiert:

Immunisierung	Tag	VAC- α /KLH Präparation	Adjuvans
1	1	1 (0.15 ml)	komplett
2	24	1 (0.15 ml)	inkomplett
3.	49	1 (0.15 ml)	inkomplett
4	188	2 (0.1 ml)	inkomplett
5	225	2 (0.1 ml)	inkomplett
6	258	2 (0.1 ml)	inkomplett
7	265	2 (0.1 ml)	inkomplett
8	271	2 (0.1 ml)	inkomplett
9	272	2 (0.1 ml)	inkomplett
10	273	2 (0.1 ml)	kein

Alle Immunsierungen, ausgenommen die letzte, erfolgten durch intraperitoneale Injektion einer Emulsion gleicher Volumina von Antigen-Lösung und Freund'schem Adjuvans.

3. Zellfusion und Hybridom-Selektion

Peritoneale Zellen wurden aus Balb/c Mäusen durch Spülen mit einer sterilen Saccharose-Lösung (110 g/l in deionisiertem Wasser) gewonnen, durch Zentrifugation gesammelt und in Roswell Park Memorial Institute 1640

Medium mit Natrium-Penicillin G (100 Einheiten/ml) und Streptomycin (50 Einheiten/ml) (im folgenden "Kulturmedium genannt) mit 10% fötalem Kalbsserum in einer Zelldichte von etwa $3,5 \times 10^4$ Zellen/ml suspendiert. 0,1 ml - Aliquots wurden in die Vertiefungen von Gewebekulturplatten (96 Vertiefungen pro Platte) pipettiert; die Platten wurden über Nacht inkubiert.

Einen Tag nach der letzten Immunisierung wurde die Maus in Äther anästhesiert und getötet. Die Milz wurde aseptisch entnommen und die Milzzellen wurden durch vorsichtiges Schaben auf einem Stahlgitter gewonnen. Die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium suspendiert und durch Zentrifugation gesammelt.

P3x63Ag8,653 Maus-Myelomzellen (Kerney et al., J. Immunol. 123, 1548, 1979) wurden in stationärer Suspensionskultur in Kulturmedium mit 10% fötalem Kalbsserum gezüchtet. Etwa 10^8 Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt. Die Myelomzellen wurden zu den Milzzellen zugegeben; die gemischte Zellpopulation wurde neuerlich durch Zentrifugation gesammelt und in 3 ml einer sterilen Lösung von 40% Polyäthylenglycol 4000 (Merck, Darmstadt BRD, Katalognummer 9727) in Kulturmedium suspendiert. Die Suspension wurde 1,5 Minuten bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt und anschließend 1 Minute stehen gelassen. 3 ml Kulturmedium wurden unter ständigem Schütteln über einen Zeitraum von 1,5 Minuten zugetropft, die Suspension dann eine Minute stehengelassen. Anschließend wurden weitere 6 ml Kulturmedium unter Schütteln über 1,5 Minuten zugetropft und 1 Minute stehen gelassen. Die Suspension wurde in der Folge unter Schütteln mit 12 ml Kulturmedium mit 10% fötalem

Kalbsserum tropfenweise während drei Minuten verdünnt, dann 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt und in 150 ml Kulturmedium mit 20% fötalem Kalbsserum, Thymidin ($1,6 \times 10^{-5} \text{ M}$), Hypoxanthin (10^{-4} M) und Aminopterin (4×10^{-7}) (in der Folge "HAT-Medium" genannt) suspendiert. Je 0,1 ml dieser Suspension wurden in die Vertiefungen einer Zellkultur-Platte pipettiert, in die am Vortag peritoneale Zellen eingesetzt worden waren (siehe oben); die Platten wurden drei Tage inkubiert. 0,075 ml HAT-Medium wurden zugegeben, anschließend wurden die Kulturen weitere 8 Tage inkubiert. Alle Inkubationen der Zellkulturen wurden bei 37°C in einer wasserdampf-gesättigten Atmosphäre von 5% CO_2 in Luft ausgeführt.

3. Screening nach Hybridomen, die Antikörper gegen VAC- α produzieren

Das Screening wurde mit Hilfe eines Enzym-Immuntest durchgeführt. Die Vertiefungen einer für Enzym-Immuntests geeigneten Mikrotiter-Platte wurden mit VAC- α beschichtet (0,005 mg/ml in 0,1 M Natriumkarbonat-Puffer pH 9,6; über Nacht bei $2-8^\circ\text{C}$ oder eine Stunde bei 37°C). Die Lösung wurde entfernt und die Platten wurden einmal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Freie Protein-Bindungsstellen wurden mit einer Lösung von Rinderserum-Albumin ($5\mu\text{g/ml}$ in isotoner phosphat-gepufferter Kochsalzlösung pH 7,2 [PGS]) eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert, anschließend einmal mit Wasser gewaschen. In jede Vertiefung wurden 0,1 ml Hybridom-Überstand zugegeben und 2-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Überstände entfernt, die Vertiefungen wurden dreimal mit Wasser gewaschen.

0,05 ml einer Lösung von mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Kaninchen-Antikörpern gegen Maus-Immunglobuline (Dakopatts, Kopenhagen, Dänemark, Katalognummer P161; 1:2000 in PGS mit 5 mg/ml Rinderserumalbumin wurden zugegeben und drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend dreimal mit Wasser gewaschen. 0,1 ml einer frisch hergestellten Mischung gleicher Volumina von Lösungen von ortho-Phenylendiamin (8,65 mg/ml in 0,1 M Kaliumzitrat pH 5), Natrium Perborat (3,75 mg/ml in 0,1 M Kaliumzitrat pH 5) und Wasser wurden zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,1 ml 4 N H_2SO_4 zugegeben. Die optische Dichte der Lösungen wurde in einem Mehrkanal-Photometer für Mikrotiter-Platten bei 492 nm bestimmt.

Zellkultur-Medium mit 20% fötalem Kalbsserum wurde als negative Kontrolle, Serum der immunisierten Maus (in PGS mit 5 mg/ml Rinderserumalbumin verdünnt) als positive Kontrolle verwendet. Kulturüberstände aller Hybridom-Kulturen wurden in zwei unabhängigen Tests 11 bzw. 13 Tage nach der Zellfusion getestet. Kulturen, die in beiden Tests ein positives Signal gaben, wurden in weiteren Screening-Test untersucht, in denen sowohl unbeschichtete als auch mit VAC- α beschichtete Testplatten eingesetzt wurden. Zwei der Kulturen gaben wiederholt positive Ergebnisse mit beschichteten, nicht aber mit unbeschichteten Platten. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Probe	Optische Dichte bei 492 nm			
	Experiment 1		Experiment 2	
	beschichtet	unbeschichtet	beschichtet	unbeschichtet
Mausserum 1: 100	0,291	0,152	1,735	0,475
Hybridom VAA-8	1,061	0,102	1,169	0,108
Hybridom VAA-9	0,552	0,187	0,387	0,109
Negative Kontrolle	0,032	0,031	0,071	0,055

Beispiel 16:

Herstellung der Expressionsvektoren pRH281/n und pRH281/nT (n=5,6,7,8,9)

Der in der EPA Nr. 186 098 beschriebene

Expressionsvektor pRH100 hat verschiedene Nachteile:

- a) konstanter und nicht optimaler Abstand zwischen ribosomaler Bindungsstelle (RBS) und Translationsstart-ATG
- b) Zwischen RBS und ATG gibt es einige C's und G's
- c) die -35 Region des *Serratia marcescens* trp Promotors ist verglichen mit der *E.coli* Sequenz nicht optimal (TTGACT statt TTGACA)

d) die EcoRI-Stelle vor dem Promotor ist überflüssig.

Es wurde ein Satz von Oligonukleotiden mit folgender Sequenz synthetisiert:

```

:Trp-1->  ::Trp-3->
AATTGACGCTGATGGCTAAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACATTGCC
      CTGCGACTACCGATTTTGTAAACACGTTTTTCTCCCAACTGTAACGG
      <-Trp-2::
                                :-->Transkriptionsstart
                                ::Trp-5->
TTCGCGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCTCGAGACGGTAAGG
AAGCGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGAGCTCTGCCATTCC
                                <-Trp-4::
                                -----
                                RBS

                SstI      ClaI
                -----EcoRI -----
                ----- :
AGGTTTAATATGAGCTCGAATTCAT
TCCAAATTATACTCGAGCTTAAGTAGC
----      ---      <-Trp-6:
RBS      Translationsstart-ATG
      : n=5 :

```

Jeweils 100 pMol der Oligonukleotide Trp-2, Trp-3, Trp-4 und Trp-5 wurden in 10 µl phosphoryliert. Nach der Reaktion wurden äquimolare Mengen (je 100 pMol) Trp-1 und Trp-2, Trp-3 und Trp-4 sowie Trp-5 und Trp-6 vereint, auf 100°C erhitzt und durch langsames Abkühlen hybridisiert. Die Oligonukleotidpaare wurden vereint und in 55 µl ligiert. pAT153 wurde mit EcoRI und ClaI doppelt geschnitten und das große Vektorfragment isoliert. 50 ng pAT153 Fragment wurden mit 20 pMol synthetischer Promotor DNA in 20 µl ligiert. Kompetente E.coli HB101 wurden mit dem entstandenen

Plasmid transformiert. Von den entstandenen Kolonien wurden einige ausgesucht, die Plasmid DNA isoliert und der Bereich der eingefügten DNA durch Sequenzieren überprüft. Ein Plasmid wurde ausgewählt und mit pRH281/5 bezeichnet, wobei 5 die Zahl der Nukleotide zwischen der RBS und dem Translationsstart- ATG symbolisiert.

Ausgehend von diesem Expressionsvektor wurde das XhoI-SstI Insert durch folgende Oligonukleotidpaare wie oben beschrieben ersetzt:

- | | | |
|----|------------------------------------|--------|
| a) | TCGAGACGGTAAGGAGGTTTAAATATGAGCT | Trp-9 |
| | CTGCCATTCTCCAAATTTATAC | Trp-10 |
| b) | TCGAGACGGTAAGGAGGTTTAAATAATGAGCT | Trp-11 |
| | CTGCCATTCTCCAAATTTATTAC | Trp-12 |
| c) | TCGAGACGGTAAGGAGGTTTAAAATAATGAGCT | Trp-13 |
| | CTGCCATTCTCCAAATTTTATTAC | Trp-14 |
| d) | TCGAGACGGTAAGGAGGTTTAAAAATAATGAGCT | Trp-15 |
| | CTGCCATTCTCCAAATTTTATTAC | Trp-16 |

Die resultierenden Expressionvektoren wurden pRH281/6, pRH281/7, pRH281/8 und pRH281/9 benannt.

Diese neuen Expressionsvektoren weisen folgende Eigenschaften auf:

- die originale EcoRI-Stelle von pAT153 wurde zerstört.
- die -35 Region des *Serratia marcescens* Promotors ist jener des trp-Promotors aus *E.coli* angepaßt.
- vor der artifiziellen ribosomalen Bindungsstelle befindet sich eine singuläre XhoI-Stelle, die das Einbringen einer anderen RBS erlaubt.

- d) Das G des Translationsstart-ATG ist die erste Base einer SstI (=SacI) Stelle. Durch Schnitt mit SstI und anschließendem Abbau des 3' Überhanges entsteht ein gerades Ende, an das eine beliebige cDNA oder ein Gen ligiert werden kann. Beginnt diese DNA mit der ersten Base des zu translatierenden Bereichs, erfolgt eine korrekte Transkription und Translation in E.coli.
- e) 3'seitig dieser SstI Stelle befinden sich eine singuläre EcoRI, ClaI und HindIII Stelle, die für ein gerichtetes Klonieren einer zu exprimierenden DNA verwendet werden kann. Außerdem können auch die singulären Schnittstellen im Tetracyclin Resistenzgen zu diesem Zweck gebraucht werden.
- f) Die Variation /5 bis /9 erlaubt, den optimalen Abstand zwischen RBS und ATG für das jeweilige Gen zu bestimmen.

Manchmal ist es für eine optimale Expression und für die Stabilität des Plasmides nötig, hinter das exprimierte Gen einen Transkriptionsterminator zu setzen (R.Gentz et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78 (1981), 4936-4940). Das HindIII-SalI Fragment des pRH281/5 wurde durch Doppelverdau herausgeschnitten. Das fehlende Stück wurde durch ein den phoA Transkriptionsterminator (H.Shuttleworth et al., Nucl.Acids Res. 14 (1986), 8689; C.N.Chang et al., Gene 44 (1986), 121-125) enthaltendes Oligonukleotidpaar ersetzt:

:EBI-456->

AGCTTGGATCCGTCGACCGCGCCCGGCAGTGAATTTTCGCTGCCGGGTGG
ACCTAGGCAGCTGGCGCGGGCCGTCACTTAAAAGCGACGGCCACC

:-----

-----BamHI -----

HindIII SalI

:
TTTTTTTGCTGC
AAAAAACGACGAGCT
<-EBI-459:

10 pMol des hybridisierten Oligonukleotidpaares wurden mit 100 ng HindIII-SalI doppelt geschnittenen pRH281/5 Vektorteil in 20 µl ligiert. Nach Transformation von E.coli HB101, Isolierung der Plasmid-DNA einiger Kolonien und deren Sequenzüberprüfung wurde ein Plasmid ausgewählt und mit pRH281/5T bezeichnet.

In analoger Weise wie oben beschrieben wurde aus diesem Plasmid die Reihe pRH281/6T, pRH281/7T, pRH281/8T und pRH281/9T unter Verwendung der Oligonukleotide Trp-9 bis Trp-16 hergestellt.

Beispiel 17:

Mutanten des VAC-alpha

Folgende Mutationen wurden an der VAC-alpha DNA durchgeführt (die Aminosäurenummerierung und die Basennummerierungen beziehen sich auf die Figur 4):

- a) Verkleinerung des VAC-Moleküls: VAC-alpha besitzt eine vierfach repetierte 67/68 Aminosäuren lange Sequenz mit einer singulären N-terminalen Extension (Fig.6). Drei verkürzte Formen wurden hergestellt:
- i) Deletion der Aminosäuren 2 bis 18: Eliminierung der singulären N-terminalen Extension, Met-1 sitzt vor Ala-19.

- ii) Deletion der dritten und vierten Repeat: das Arg-161 Codon wurde zu einem Stopcodon mutiert.
- iii) Deletion der N-terminalen singulären Extension, sowie der ersten und zweiten Repeat. Met-1 sitzt vor Ala-165.

b) Ein möglicher Angriffspunkt beim proteolytischen Abbau des VAC-alpha stellt vielleicht das Arg-161 dar. Diese Aminosäure wurde daher mutiert:

- i) Arg-161 zu Glu-161
- ii) Arg-161 zu Gln-161.

c) Durch Einbau einer Faktor Xa-Schnittstelle zwischen der zweiten und dritten Repeat kann vielleicht ein der Inhibition der Koagulationskaskade entkommender Faktor Xa an VAC gebunden werden und/oder dieses sogar in zwei funktionelle Hälften zerlegen, und so die Wirksamkeit von VAC-alpha erhöhen. Es wurde daher folgende Mutation durchgeführt: Asj-168 zu Glu-168, Glu-169 zu Gly-169 und Ala-170 zu Arg-170. Daraus ergibt sich die Faktor Xa Erkennungssequenz Ile-Glu-Gly-Arg.

d) Um die Frage der Wichtigkeit des Cysteins-316 für die biologische Wirksamkeit zu beantworten, und zugleich seine Beteiligung an der Dimerenbildung zu überprüfen, wurde

- i) Cys-316 zu Ser-316 und
 - ii) Cys-316 zu Val-316
- mutiert.

e) Um den Einfluß der N-terminalen Extension zu studieren, wurde diese Extension (Ala-2 bis Ala-19) ersetzt durch die jeweiligen N-Termini aus Lipocortin I, Calpactin I und VAC-beta.

Als erster Schritt wurde aus dem Expressionsvektor pRH291 der Expressionsvektor pGN10 hergestellt. Dieser Expressionsvektor besitzt die Phagen Lambda cII RBS an Stelle der in pRH291 verwendeten STII-RBS. pRH291 wurde mit XhoI und KpnI doppelt geschnitten. Das große Fragment wurde isoliert. 40 pMol des Oligonukleotidpaars EBI-725/EBI-727 mit folgender Sequenz:

EBI-725	TCGAGTTATCTAAGGAAATACTTACATATGGCACAGGTTCTCAGAGGTAC
EBI-727	CAATAGATTCCTTTATGAATGTATACCGTGTCCAAGAGTCTC
	XhoI RBS ATG KpnI

wurden in 6 µl hybridisiert und anschließend mit ca. 200 ng pRH291/großes Fragment in 20 µl Lösung ligiert. Kompetente E.coli HB101 wurden transformiert. Von den entstandenen Ampicillin- resistenten Kolonien wurden die Plasmide einiger Klone isoliert und die Sequenz des neuen Stücks DNA überprüft. Ein Klon wurde ausgewählt und mit pGN10 bezeichnet.

Als Vorbereitung für die Mutagenesereaktionen wurde aus pGN10 das PvuII-SphI Fragment isoliert. PvuII schneidet im phoA Promotor Teil, SphI in der nicht translatierten Region der VAC-alpha cDNA. Das die VAC-alpha cDNA enthaltende Fragment wurde gereinigt und in die SmaI/SphI doppelt geschnittene Doppelstrangform des M13mp18 kloniert. Von den entstandenen Plaques nach Transformation von E.coli JM101 wurde eine ausgewählt, und die M13/VAC-alpha Einzelstrang DNA in größerem Maßstab präpariert.

Die Mutationsreaktionen wurden mit Hilfe des "Oligonucleotide- directed in vitro mutagenesis system" (Amersham, code RPN.2322) unter genauer Einhaltung des beigefügten Protokolls durchgeführt.

Nach der Sequenzüberprüfung der entstandenen Mutanten wurde die entsprechende Doppelstrangform der rekombinanten M13mp8/VAC-alpha Phagen-DNA in Form einer Plasmid Minipräparation isoliert. Mit Ausnahme der Mutation mit EBI-977 (ClaI-Stelle auf Nt.105-110) wurden diese DNAs mit XhoI und SphI doppelt geschnitten, und das die VAC-cDNA enthaltende Fragment isoliert. Ca. 50 ng dieses Fragments wurden mit 50 ng XhoI-SphI doppelt geschnittenem pRH281/5 Vektorteil in 10 µl Lösung ligiert und das entstandene Plasmid in kompetente E.coli HB101 transformiert. Die Plasmide einiger resultierender Kolonien wurden isoliert und durch Restriktionsenzymverdau auf die Richtigkeit der Konstruktion überprüft. Außerdem wurde die letztendlich ausgewählte Kolonie im Labormaßstab fermentiert, und die Proteine des Bakteriums einer Westernblotanalyse unter Verwendung des Rabbit-anti-VAC- Antiserums unterzogen.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die hergestellten Mutanten:

Mutations- Oligo	resultierender Expressionsvektor	Eigenschaften des neuen Klons
EBI-1051	pGN42	Deletion von Ala-2 bis Arg-18
EBI-964	pGN29	Translationsstop auf 161 (Deletion von Arg-161 bis Asp-320)
EBI-1105	pGN43	Deletion von Ala-2 bis Asp-164

EBI-1103	pGN44	Arg-161 zu Gln-161
EBI-1104	pGN45	Arg-161 zu Glu-161
EBI-960	pGN30	Faktor Xa-Schnittstelle auf 167 bis 170
EBI-961	pGN41	Cys-316 zu Ser-316
EBI-959	pGN46	Cys-316 zu Val-316
EBI-977	pGN31	ClaI-Stelle auf Nt.105 bis 110.

Die Sequenzen der Mutationsoligos sind (5'-->3'):

EBI-1051: CCGAAGAGTTTCTGCATCAGCCATATGTAAGTATTTCTTAG
 EBI-964: AATTCCAGCATCAGGGTCTTAGTTAGCCTGAAGGAGAAC
 EBI-1105: AGCTTCATCAATTCCAGCCATATGTAAGTATTTCC
 EBI-1103: AATTCCAGCATCAGGGTCCTGGTTAGCCTGAAGGAGAAC
 EBI-1104: AATTCCAGCATCAGGGTCTTCGTTAGCCTGAAGGAGAAC
 EBI-960: GCCTGAGCATCTTGTTCAACTTGACGACCTTCAATTCCAGCA
 TCAGGGTCTCTG
 EBI-961: CGTTAGTCATCTTCTCCTGAGAGCAGCAGAAGAGC
 EBI-959: CGTTAGTCATCTTCTCCACGAGCAGCAGAAGAGC
 EBI-977: CAACAGAGTCAGGATCGATTCTCATCTGTGCCC

Die angegebenen Sequenzen sind komplementär zu der DNA-Sequenz in Figur 4, was durch die Klonierung der VAC-alpha cDNA in den M13mpl8 bedingt ist.

Die mutierte DNA mit der ClaI-Stelle auf Nt.105 bis 110 wurde mittels EcoRI-HindIII Doppelverdau aus der Doppelstrangform des rekombinanten M13mpl8 freigesetzt, isoliert und in EcoRI-HindIII doppelt geschnittenen Bluescribe M13+ (Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pGN31

genannt. pGN31 wurde mit ClaI und XhoI doppelt geschnitten, und das große Fragment isoliert. Durch Einsatz verschiedener Oligonukleotidpaare wurde der für Lipocortin I (K.-S. Huang et al. Cell 46 (1986), 191-199), Calpactin I (=Lipocortin II, K.-S. Huang et al. Cell 46 (1986), 191-199) und VAC-beta spezifische N- Terminus eingefügt:

a) Lipocortin I-spezifischer N-Terminus

```
:EBI-972->           :Start Lipocortin
TCGAGAGGTTGAGGTGATTTTATGGCAATGGTATCAGAATTCCTCAAGCA
      CTCCAAC TCCACTAAAATACCGTTACCATAGTCTTAAGGAGTTCGT
      :
```

```
GGCCTGGTTTATTGAAAATGAAGAGCAGGAATATGTTCAAAC TGTGAAGT
CCGGACCAAATAACTTTTACTTCTCGTCCTTATACAAGTTTGACACTTCA
```

```
: :EBI-977->
CATCCAAAGGTGGTCCCGGATCAGCGGTGAGCCCCTATCCTACCTTCAAT
GTAGGTTTCCACCAGGGCCTAGTCGCCACTCGGGGATAGGATGGAAGTTA
<-EBI-988::
```

```
:Fortsetzung VAC-alpha
CCATCCTCGGATGCAGAACTCTTCGGAAGGCTATGAAAGGCTTGGGCAC
GGTAGGAGCCTACGTCTTTGAGAAGCCTTCCGATACTTTCCGAACCCGTG
```

```
AGATGAGGAAT
TCTACTCCTTAGC
<-EBI-982:
```

Je 1 pMol EBI-978 und EBI-988 wurden gemeinsam in 6 µl phosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 100°C gestoppt, jeweils 1 pMol EBI-972 und EBI-982 zugesetzt, die Lösung nochmals auf 100°C erhitzt und

langsam abgekühlt. Die beiden Oligonukleotidpaare wurden durch Zugabe von Ligase miteinander ligiert. Danach wurde ca. 1 µg pGN31 ClaI-XhoI großes Fragment zugesetzt, das Volumen auf 40 µl erweitert und ligiert. Nach der Transformation von kompetenten E.coli JM101 wurden einige Kolonien ausgesucht und deren Plasmide gemäß dem Bluescribe-Protokoll von Stratagene mit Hilfe eines Helferphagen in Einzelstrang-DNA überführt und sequenziert. Eines der richtigen Plasmide wurde ausgewählt und mit pGN32 bezeichnet. Mit XhoI und HindIII (befindet sich hinter der SphI-Stelle in der Multiklonierstelle des Bluescribe M13+) wurde das Insert aus dem Vektor geschnitten und gereinigt. pRH281/5 wurde ebenfalls mit XhoI und HindIII doppelt verdaut und das Vektorfragment isoliert. 200 ng pGN32 Insert und etwa 50 ng pRH281/5-Vektorteil wurden in 20 µl ligiert. Die DNA wurde in E.coli HB101 transformiert, und die Plasmid-DNA einiger Ampicillin-resistenter Klone durch Restriktionsenzymanalyse auf die Richtigkeit der Konstruktion überprüft. Außerdem wurde die letztendlich ausgewählte Kolonie im Labormaßstab fermentiert, und die Proteine des Bakteriums einer Westernblotanalyse unter Verwendung des Rabbit-anti-VAC- Antiserums unterzogen. Das resultierende Expressionsplasmid für das Lipocortin I/VAC-alpha-Hybrid wurde pGN35 genannt.

b) Calpactin I spezifischer N-Terminus:

:EBI-990-> Start Calpactin
TCGAGAGGTTGAGGTGATTTTATGTCTACTGTTACGAAATCCTGTGCAA
CTCCAACCTCCACTAAAATACAGATGACAAGTGCTTTAGGACACGTT
:

GCTCAGCTTGAGGGTGATCACTCTACACCCCAAGTGCATATGGGTCTG
CGAGTCGAACCTCCACTAGTGAGATGTGGGGGTTACGTATACCCAGAC

<-

::EBI-1001-> :Fortsetzung VAC-alpha
 TAAAGCCCTATACTAACTTTGATGCTGAGCGGGATGCAGAACTCTTCGG
 AGTTTCGGATATGATTGAACTACGACTCGCCCTACGTCTTTGAGAAGCC
 ELI-985::

AAGGCTATGAAAGCCTTGGGCACAGATGAGGAAT
 TTCCGATACTTTCCGAACCCGTGTCTACTCCTTAGC
 <-EBI-994:

Die Herstellung des rekombinanten Bluescribe M13+
 Plasmids pGN33, seine Sequenzüberprüfung und das
 Umklonieren in den Expressionsvektor pRH281/5 erfolgte
 analog zu der für das Lipocortin I - Hybrid
 beschriebenen Prozedur. Das resultierende
 Expressionsplasmid (Calpactin I/VAC-alpha-Hybrid) wurde
 pGN36 genannt.

c) VAC-beta spezifischer N-Terminus:

:EBI-987-> :VAC-beta Start
 TCGAGAGGTTGAGGTGATTTTATGGCCTGGTGGAATCCTGGATTGAACA
 CTCCAACCTCCACTAAAATACCGGACCACCTTTAGGACCTAACTTGT

:VAC-
 GGAGGGTGTACAGTGAAGAGCAGCTCCCACTTCAACCCAGACCCTGATG
 CCTCCACAGTGTCACTTCTCGTCGAGGGTGAAGTTGGGTCTGGGACTAC

alpha Fortsetzung
 CAGAACTCTTCGGAAGGCTATGAAAGGCTTGGGCACAGATGAGGAAT
 GTCTTTGAGAAGCCTTCCGATACTTTCCGAACCCGTGTCTACTCCTTAGC
 <-EBI-989:

Zur Herstellung des rekombinanten BluescribeM13+
 Plasmids pGN34 wurde hier nur das Oligonukleotidpaar
 (je 1 pMol in 6 µl) durch Erhitzen und langsames

Abkühlung hybridisiert und anschließend wie oben in den XhoI-PstI doppelt geschnittenen pGN31 Vektor ligiert. Die Herstellung des Expressionsvektors pGN37 (VAC-beta/VAC-alpha-Hybrid in pRH281/5) erfolgte wie oben beschrieben.

Tryptic peptides

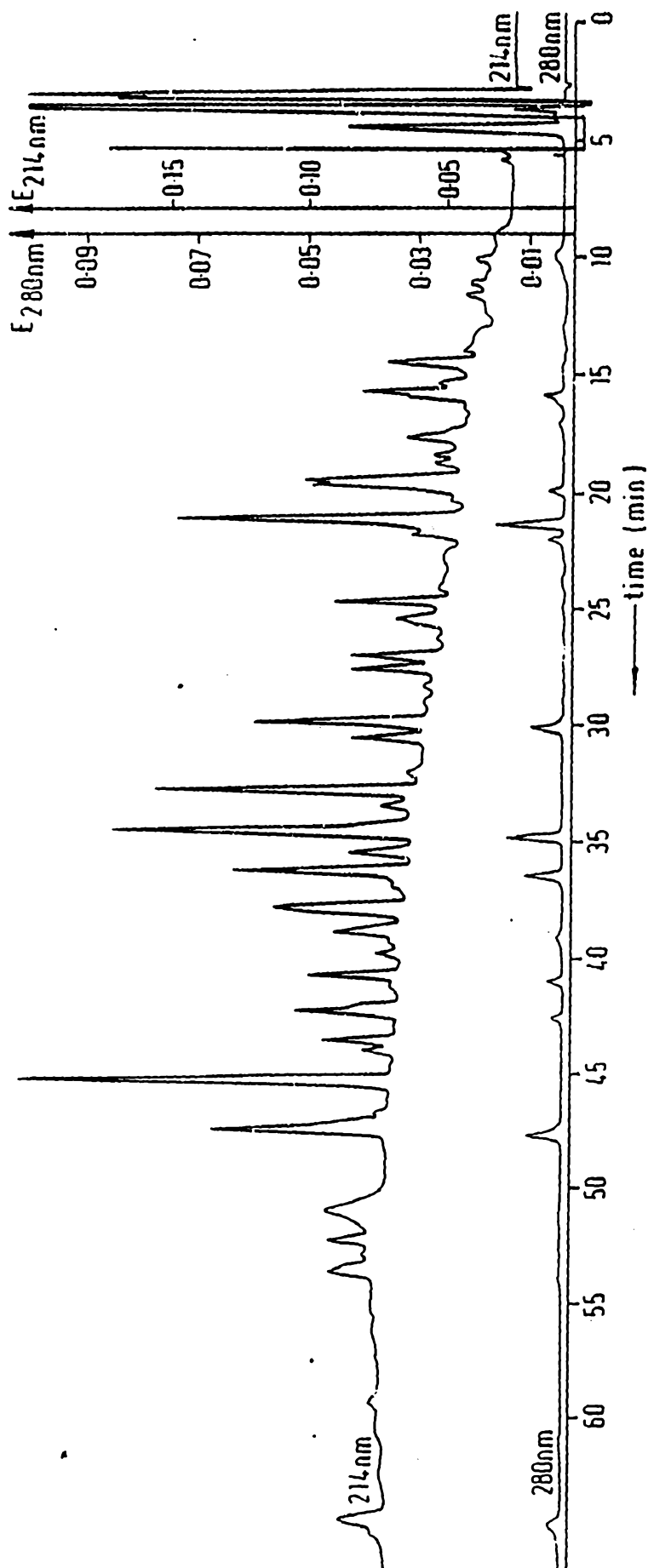
P5 H A L K
 P7 G E T S G D Y K
 P11/I W G T D E E K
 P11/II T P E E L R
 P12 G A G T D D H T L I R
 P14 Q E I S A A F K
 P15 T L F G R
 P16/I L Y D A Y E L K
 P16/II W? L Y D A Y E L K
 P17 V L T E I I A S R
 P18 G T V T D F P G F D E R
 P20/I Q V Y E E E Y G S S L E D D V V G D T S
 G Y Y Q R
 P20/II L I V A L M K
 P21/I S E I D L F N I R K
 P23/I F I T I F G T R
 P24 K N F A T S L Y S M I K
 P25 S? G T D E E K F I T I F G T
 P27 D L L D D L K S E L T G K F E K
 P29/I G L G T D E E S I L T L L T S R
 P29/II M L V V L L Q A N R D P D A G I D E A Q
 V X Q X A Q A L F Q A
 P30/I X I P A Y L A E T L Y Y A M K
 P30/II E T A G N L E Q L L L A V V K

BrCN-Peptides

BrCN 1 K G A G T D D H T L I R V
 BrCN 4 I K G D T S G D Y K K A
 BrCN 15 K P S R L Y D A Y E L K H A L K G A G T
 N E K V L T E I I
 BrCN 22 K G L G T D E E S I L T L L T S X X N A
 Q

FIG.01

FIG. 0.2



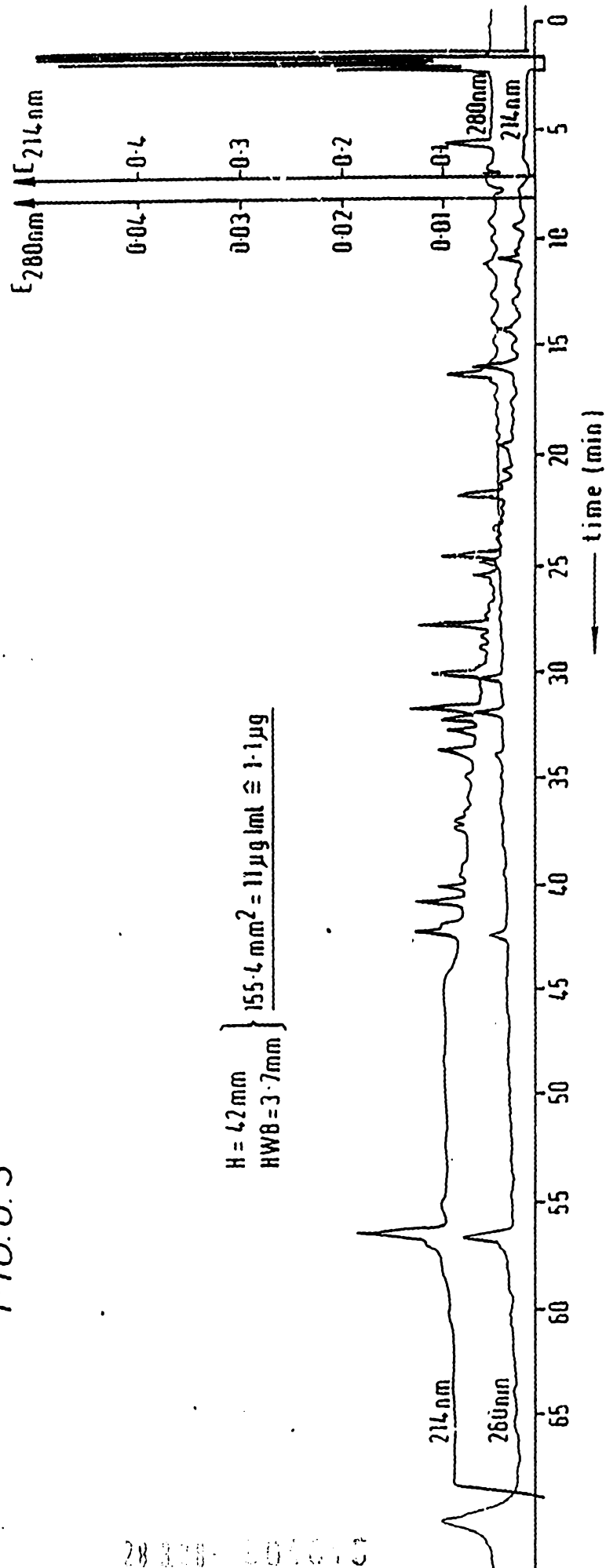


FIG. 0.3

$$\left. \begin{array}{l} H = 4.2 \text{ mm} \\ \text{HWB} = 3.7 \text{ mm} \end{array} \right\} 155.4 \text{ mm}^2 = 11 \mu\text{g lml} \approx 1.1 \mu\text{g}$$

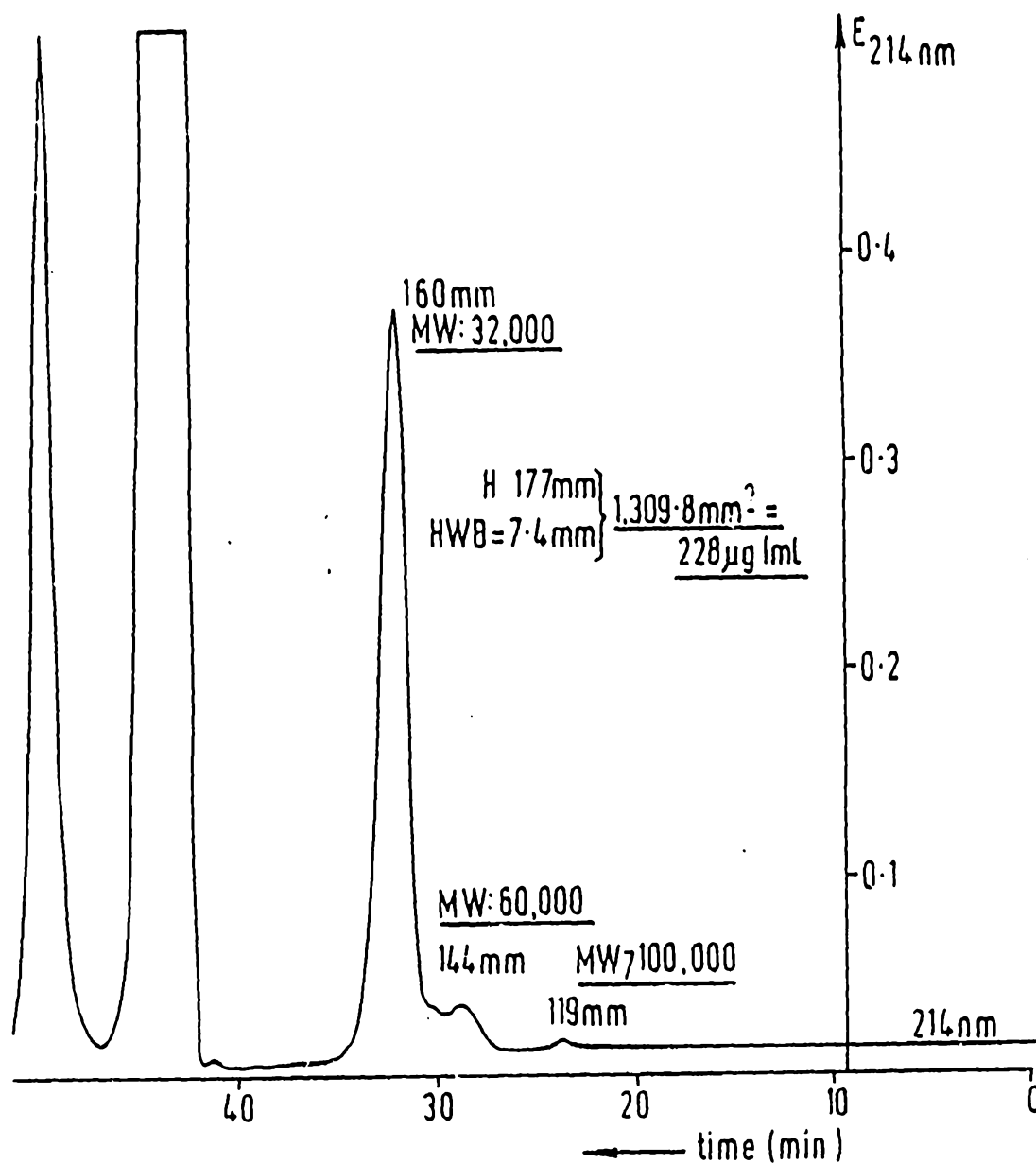


FIG. 0.4/1

273285

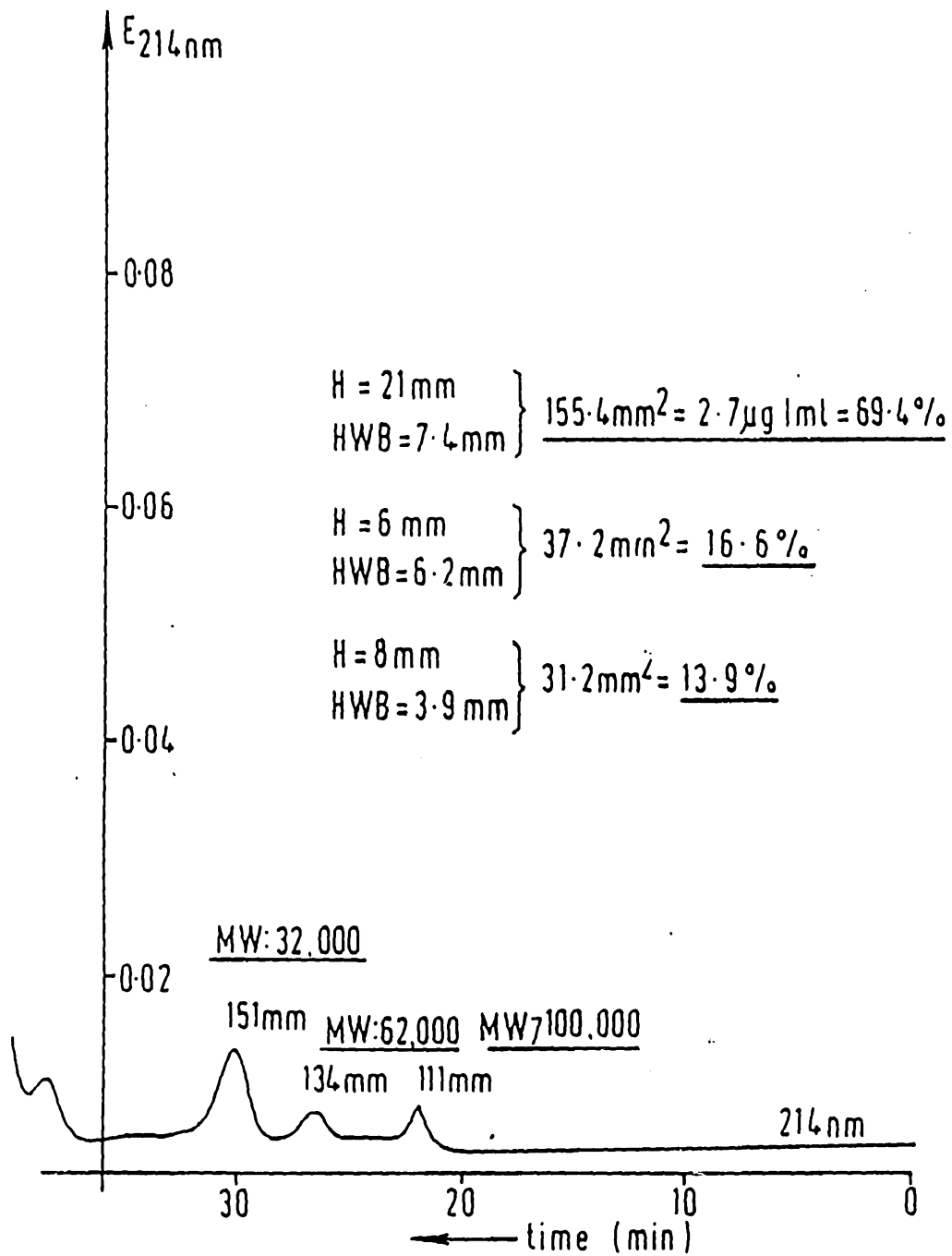


FIG. G. 4/2

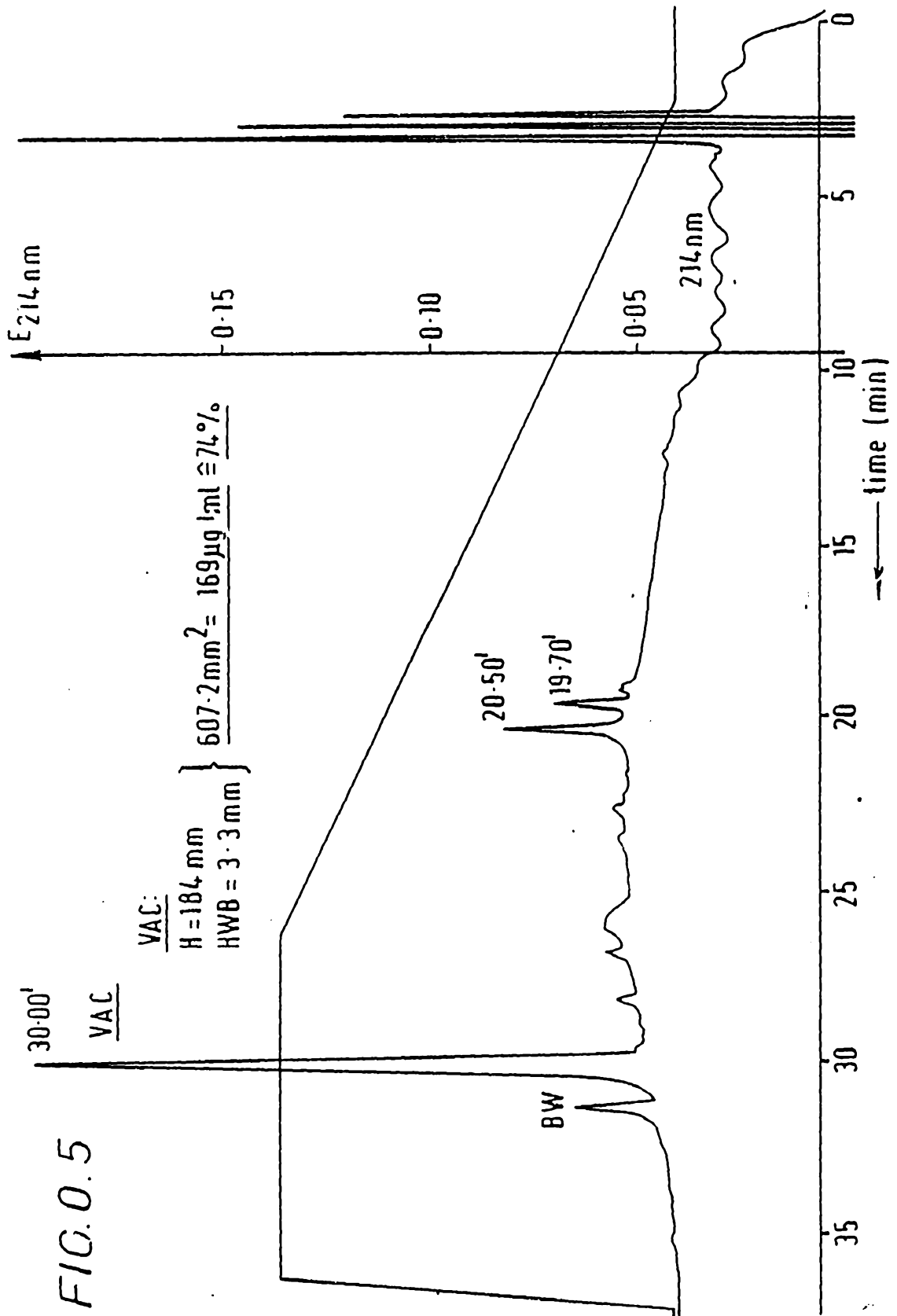
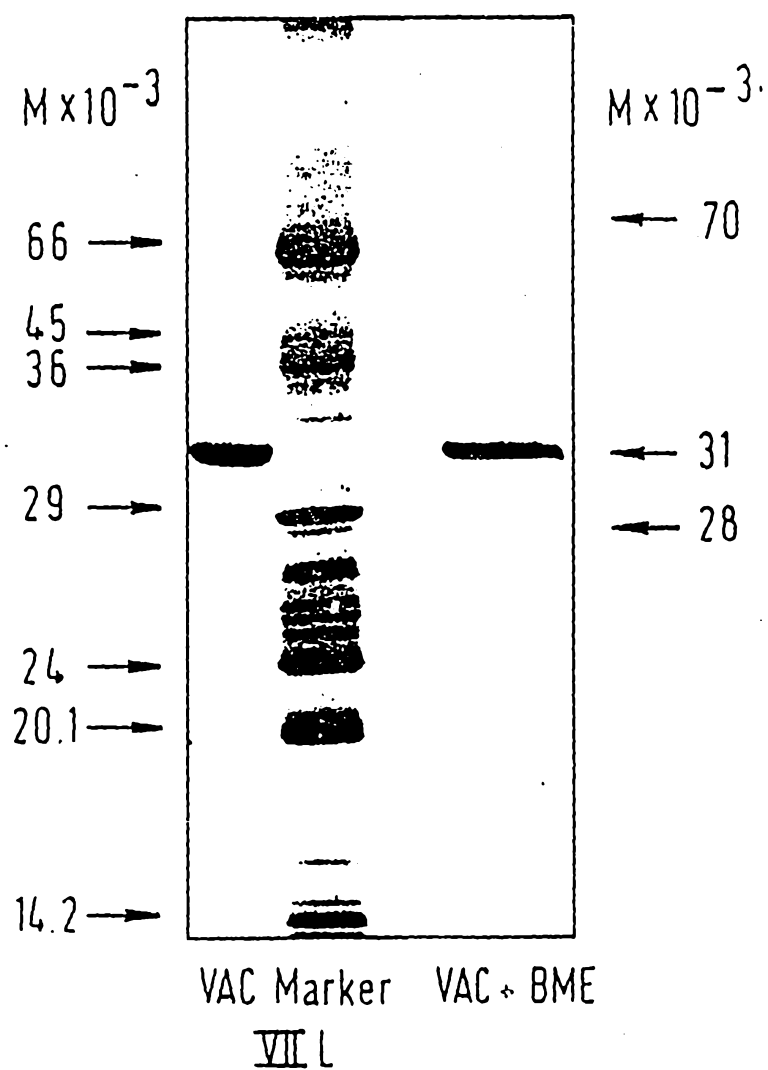
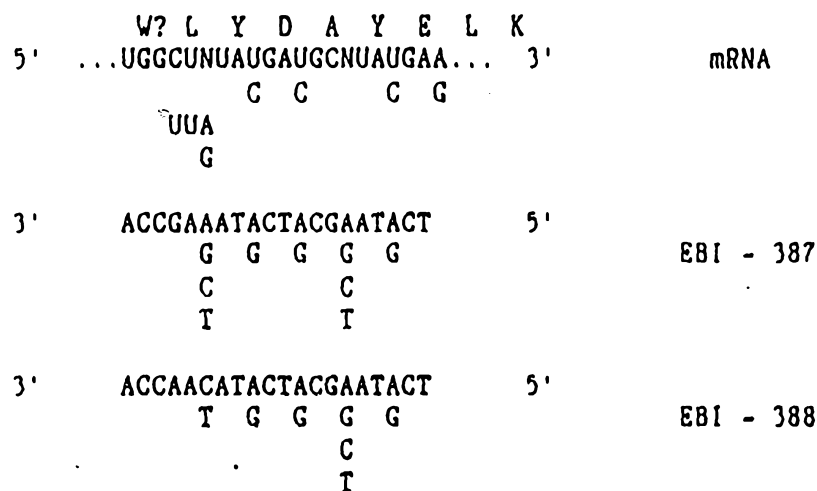


FIG. 0.6



Tryptic peptide P16/II



Staph-A Peptide P20/I/6

(Subfragment of the tryptic peptide P20/I)

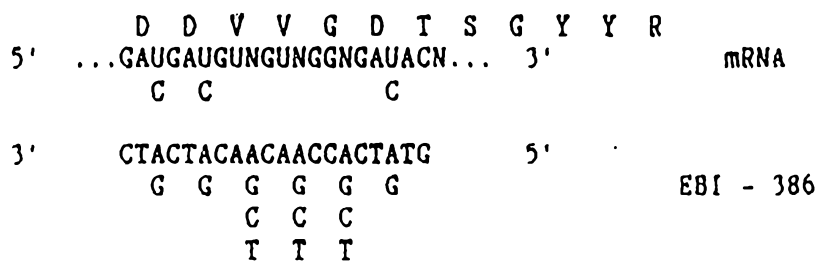


FIG. 1.

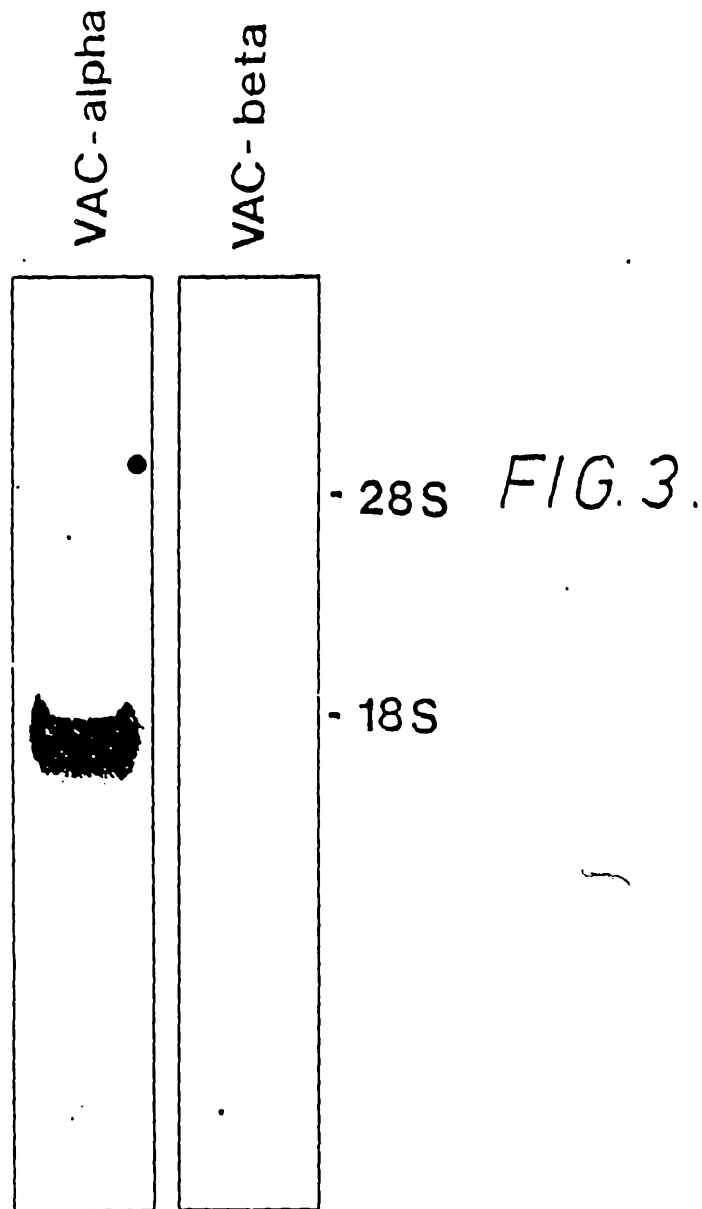
273285

FIG. 2.

Tryptic peptide P30/I

X I P A Y L A E T L Y Y A M K
 5' ...GAAACNCUNUACUACGCNAUGAAA... 3' mRNA
 G U U G
 UUA
 G

3' CTCTGIIAIAIATATCGITACTT 5' EBI - 118
 3' CTTTGTIIAIAIATATCGITACTT 5' EBI - 119



VAC-alpha cDNA

CCTGCTTCACCTTCCCCTGACCTGAGTAGTCGCT

1	5	10	15	
Met Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe				
ATG GCA CAG GTT CTC AGA GGC ACT GTG ACT GAC TTC CCT GGA TTT				45
	20	25	30	
Asp Glu Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly				
GAT GAG CGG GCT GAT GCA GAA ACT CTT CGG AAG GCT ATG AAA GGC				90
	35	40	45	
Leu Gly Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg				
TTG GGC ACA GAT GAG GAG AGC ATC CTG ACT CTG TTG ACA TCC CGA				135
	50	55	60	
Ser Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Phe Lys Thr Leu				
AGT AAT GCT CAG CGC CAG GAA ATC TCT GCA GCT TTT AAG ACT CTG				180
	65	70	75	
Phe Gly Arg Asp Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly				
TTT GGC AGG GAT CTT CTG GAT GAC CTG AAA TCA GAA CTA ACT GGA				225
	80	85	90	
Lys Phe Glu Lys Leu Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu				
AAA TTT GAA AAA TTA ATT GTG GCT CTG ATG AAA CCC CT CGG CTT				270
	95	100	105	
Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr				
TAT GAT GCT TAT GAA CTG AAA CAT GCC TTG AAG GGA GCT GGA ACA				315
	110	115	120	
Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu				
AAT GAA AAA GTA CTG ACA GAA ATT ATT GCT TCA AGG ACA CCT GAA				360
	125	130	135	
Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser				
GAA CTG AGA GCC ATC AAA CAA GTT TAT GAA GAA GAA TAT GGC TCA				405
	140	145	150	
Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln				
AGC CTG GAA GAT GAC GTG GTG GGG GAC ACT TCA GGG TAC TAC CAG				450

FIG. 4/1

FIG. 4/2

CACCACCCCACTGCCTTCCTTCAGCACCTTTAGCTGCATTTGTATGCCAGTGCTTAACA 1057
CATTGCCTTATTCATACTAGCATGCTCATGACCAACACATACACGTCATAGAAGAAAAT 1116
AGTGGTGCTTCTTTCTGATCTCTAGTGGAGATCTCTTTGACTGCTGTAGTACTAAAGTG 1175
TACTTAATGTTACTAAGTTTAATGCCTGGCCATTTTCCATTTATATATATTTTTTAAGA 1234
GGCTAGAGTGCTTTTAGCCTTTTTTAAAACTCCATTTATATTACATTTGTAACCATGA 1293
TACTTTAATCAGAAGCTTAGCCTTGAAATTGTGAACCTCTTGGAATGTTATTAGTGAAG 1352
TTCGCAACTAAACT/AACCTGTAAAATTATGATGATTGTATTCAAAAGATTAATGAAAA 1411
ATAAACATTTCTGTCCCCCTG-polyA 1437

FIG. 4/3

Sequenced VAC-peptides: comparison with sequence

BrCN 22
K G L G T D
P29/I
G L G T D

18
G T V T D F P G F D E R
M A Q V L R G T V T D F P G F D E R A D A E T L R K A M K G L G T D
10 20 30

E E S I L T L L T S X X N A Q
P14 P15 P27
E E S I L T L L T S R Q E I S A A F K T L F G R D L L
E E S I L T L L T S R S N A Q R Q E I S A A F K T L F G R D L L
40 50 60

BrCN 15
K P S R L Y D A Y E L K H
P16/II
W? L Y D A Y E L K
P20/II P16/I P5
D D L K S E L T G K F E K L I V A L M K L Y D A Y E L K H
D D L K S E L T G K F E K L I V A L M K P S R L Y D A Y E L K H
70 80 90

A L K G A G T N E K V L T E I I
P17 P11/II P20/I
A L K V L T E I I A S R T P E E L R Q V Y E
A L K G A G T N E K V L T E I I A S R T P E E L R A I K Q V Y E
100 110 120 130

P29/II
E E Y G S S L E D D V V G D T S G Y Y Q R M L V V L L Q A N R D
E E Y G S S L E D D V V G D T S G Y Y Q R M L V V L L Q A N R D
140 150 160

P11/I
W G T D E E K P23/I
P25 F
S? G T D E E K F
P D A G I D E A Q V X Q X A Q A L F Q A W G T D E E K F
P D A G I D E A Q V E Q D A Q A L F Q A G E L K W G T D E E K F
170 180 190

I T I F G T R
I T I F G T
I T I F G T R S V S H L R K V F D K Y M T I S G F Q I E E T I D
200 210 220

FIG. 5/1

P30/II		P30/I
E I X G N L E Q L L L A V V K		E I P A Y L A E T L Y Y A
R E T S G N L E Q L L L A V V K S I R S I P A Y L A E T L Y Y A		
230	240	250

BrCN 1			
K G A G T D D H T L I R V			
P12		P21/I	P24
M K G A G T D D H T L I R		S E I D L F N I R K	K
M K G A G T D D H T L I R V M V S R S E I D L F N I R K E F R K			
260	270	280	290

	BrCN 4	
	I K G D T S G D Y K K A	
	P7	
N F A T S L Y S M I K G E T S G D Y K		
N F A T S L Y S M I K G D T S G D Y K K A L L L L C G E D D *		
300	310	320

FIG. 5/2

FIG. 6.

VAC-alpha: Quadruplication of a.67 amino acid long sequence

MAQVLRGTVTDFFPGFDERA

PSRLY

ANRDPDAGIDEAQVI

SIRSIPAY

EDD*

DAETLRKAMKG-LGTDEESILTLTSRSNAQRQEISAFAKTLFGRDLLDLKSELTKGFEKLIVALMK

DAYELKHALKG-AGTNEKVLTEIIASRTPEELRAIKQVYEEYEGSSLEDDVVGDTSCYYQRMVLVLLQ

DAQALFQAGELKVCCTDEKFKITIFGTRSVSHLRKVFDKYMTISGFQIEETIDRETSGNLEQLLAVVK

LAETLYYAMKG-AGTDDHTLIRVMVSRSEIDLFNIRKEFRKNFATSLSYSHIKGDTSGDYKKALLLLCG

KG-hGIDExxLIpILApR

OOOOOO

D_AetL̄ AmKG aGIDeE llll SRS Lr I y t rG sleddikgetSG yekllval k
d

"Consensus":

x : 50% of amino acids identical
X : 75% of amino acids identical
X̄ : 100% of amino acids identical

"OOOOOO":

Hydrophobic region

VAC-beta cDNA

AGGCCTGCTCACTCCTCAGCTGCAGGAGCCAGACGTGTGGAGTCCCA
GCAGAGGCCAACCTGTGTCTCTTCATCTCCGTGAGAAAGGTGCCCCGAAGTGAAAGAG

1	5	10	15	
Met	Ala	Trp	Trp	Lys
Ala	Trp	Ile	Glu	Gln
ATG	GCC	TGG	TGG	AAA
	GCC	TGG	ATT	GAA
	CAG	GAG	GGT	GTC
	ACA	GTG		
				45
20	25	30		
Lys	Ser	Ser	Ser	His
Phe	Asn	Pro	Asp	Pro
AAG	AGC	AGC	TCC	CAC
TTC	AAC	CCA	GAC	CCT
GAT	GCA	GAG	ACC	CTC
				90
35	40	45		
Tyr	Lys	Ala	Met	Lys
Gly	Ile	Gly	Thr	Asn
TAC	AAA	GCC	ATG	AAG
GGG	ATC	GGG	ACC	AAC
GAG	CAG	GCT	ATC	ATC
				135
50	55	60		
Asp	Val	Leu	Thr	Lys
Arg	Ser	Asn	Thr	Gln
GAT	GTG	CTC	ACC	AAG
AGA	AGC	AAC	ACG	CAG
CGG	CAG	CAG	ATC	GCC
				180
65	70	75		
Lys	Ser	Phe	Lys	Ala
Gln	Phe	Gly	Lys	Asp
AAG	TCC	TTC	AAG	GCT
CAG	TTC	GGC	AAG	GAC
CTC	ACT	GAG	ACC	TTG
				225
80	85	90		
Lys	Ser	Glu	Leu	Ser
Gly	Lys	Phe	Glu	Arg
AAG	TCT	GAG	CTC	AGT
GGC	AAG	TTT	GAG	AGG
CTC	ATT	GTG	GCC	CTT
				270
95	100	105		
Met	Tyr	Pro	Pro	Tyr
Arg	Tyr	Glu	Ala	Lys
ATG	TAT	CCG	CCA	TAC
AGA	TAC	GAA	GCC	AAG
GAG	CTG	CAT	GAC	GCC
				315
110	115	120		
Met	Lys	Gly	Leu	Gly
Thr	Lys	Glu	Gly	Val
ATG	AAG	GGC	TTA	GGA
ACC	AAG	GAG	GGT	GTC
ATC	ATT	GAG	ATC	CTG
				360
125	130	135		
Ala	Ser	Arg	Thr	Lys
Asn	Gln	Leu	Arg	Glu
GCC	TCT	CGG	ACC	AAG
AAC	CAG	CTG	CGG	GAG
ATA	ATG	AAG	GCG	TAT
				405
140	145	150		
Glu	Glu	Asp	Tyr	Gly
Ser	Ser	Leu	Glu	Glu
GAG	GAA	GAC	TAT	GGG
TCC	AGC	CTG	GAG	GAG
GAC	ATC	CAA	GCA	GAC
				450

FIG. 7/1

Thr	Ser	Gly	Tyr	Leu	Glu	Arg	Ile	Leu	Val	Cys	Leu	Leu	Gln	Gly	
ACA	AGT	GGC	TAC	CTG	GAG	AGG	ATC	CTG	GTG	TGC	CTC	CTG	CAG	GGC	495
				155					160					165	
Ser	Arg	Asp	Asp	Val	Ser	Ser	Phe	Val	Asp	Pro	Ala	Leu	Ala	Leu	
AGC	AGG	JAT	GAT	GTG	AGC	AGC	TTT	GTG	GAC	CCG	GCA	CTG	GCC	CTC	540
				170					175					180	
Gln	Asp	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Ala	Ala	Gly	Glu	Lys	Ile	Arg	Gly	
CAA	GAC	GCA	CAG	GAT	CTG	TAT	GCG	GCA	GGC	GAG	AAG	ATT	CGT	GGG	585
				185					190					195	
Thr	Asp	Glu	Met	Lys	Phe	Ile	Thr	Ile	Leu	Cys	Thr	Arg	Ser	Ala	
ACT	GAT	GAG	ATG	AAA	TTC	ATC	ACC	ATC	CTG	TGC	ACG	CGC	AGT	GCC	630
				200					205					210	
Thr	His	Leu	Leu	Arg	Val	Phe	Glu	Glu	Tyr	Glu	Lys	Ile	Ala	Asn	
ACT	CAC	CTG	CTG	AGA	GTG	TTT	GAA	GAG	TAT	GAG	AAA	ATT	GCC	AAC	675
				215					220					225	
Lys	Ser	Ile	Glu	Asp	Ser	Ile	Lys	Ser	Glu	Thr	His	Gly	Ser	Leu	
AAG	AGC	ATT	GAG	GAC	AGC	ATC	AAG	AGT	GAG	ACC	CAT	GGC	TCA	CTG	720
				230					235					240	
Glu	Glu	Ala	Met	Leu	Thr	Val	Val	Lys	Cys	Thr	Gln	Asn	Leu	His	
GAG	GAG	GCC	ATG	CTC	ACT	GTG	GTG	AAA	TGC	ACC	CAA	AAC	CTC	CAC	765
				245					250					255	
Ser	Tyr	Phe	Ala	Glu	Arg	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	
AGC	TAC	TTT	GCA	GAG	AGA	CTC	TAC	TAT	GCC	ATG	AAG	GGA	GCA	GGG	810
				260					265					270	
Thr	Arg	Asp	Gly	Thr	Leu	Ile	Arg	Asn	Ile	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	
ACG	CGT	GAT	GGG	ACC	CTG	ATA	AGA	AAC	ATC	GTT	TCA	AGG	AGC	GAG	855
				275					280					285	
Ile	Asp	Leu	Asn	Leu	Ile	Lys	Cys	His	Phe	Lys	Lys	Met	Tyr	Gly	
ATT	GAC	TTA	AAT	CTT	ATC	AAA	TGT	CAC	TTC	AAG	AAG	ATG	TAC	GGC	900
				290					295					300	
Lys	Thr	Leu	Ser	Ser	Met	Ile	Met	Glu	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Tyr	
AAG	ACC	CTC	AGC	AGC	ATG	ATC	ATG	GAA	GAC	ACC	AGC	GGC	GAC	TAC	945
				305					310					315	
Lys	Asn	Ala	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Gly	Ser	Asp	Pro	*			
AAG	AAC	GCC	CTG	CTG	AGC	CTG	GTG	GGC	AGC	GAC	CCC	TGA	GGCACAG		991
				320					325						

FIG. 7/2

AAGAACAAGAGCAAAGACCATGAAGCCAGAGTCTCCAGGACTCCTCACTCAACCTCGGC 1050
CATGGACGCAGGTTGGGTGTGAGGGGGTCCCAGCCTTTCGGTCTTCTATTTCCCTATT 1109
TCCAGTGCTTTCAGCCGGGTCTCTGACCCAGAGGTGGAACCGGCCTGGACTCCTCTTC 1168
CCAACTTCCTCCAGGTCATTTCCCAGTGTGAGCACAATGCCAACCTTAGTGTTTCTCCA 1227
GCCAGACAGATGCCTCAGCATGAAGGGCTTGGGGACTTGTGGATCATTCCTTCCCTCCCT 1286
GCAGGAGCTTCCCAAGCTGGTCACAGAGTCTCCTGGGCACAGGTTATACAGACCCCAGC 1345
CCCATTCCCATCTACTGAAACAGGGTCTCCACAAGAGGGGCCAGGGAATATGGGTTTTT 1404
AACAAGCGTCTTACAAAACACTTCTCTATCATGCAGCCGGAGAGCTGGCTGGGAGCCCT 1463
TTTGTTTTAGAACACACATCCTTCAGCAGCTGAGAAATGAACACGAATCCATCCCAACC 1522
GAGATGCCATTAACATTCTCTAAAAATGTTAGGCTCTAAATGGACGAAAAATTCTCTC 1581
GCCATCTTAATAACAAAATAAACTACAAATTCTGACCCAAGGACACTGTGTTATAAGA 1640
GGCGTGGGCTCCCTGGTGGCTGACCAGGTCAGCTGCCCTGGCCTTGACCCCTCTGCA 1699
TGCAGCACAGAAGGGTGTGACCATGCCCTCAGCACCCTCTTGTCCCCACTGAACGGCA 1758
ACTGAGACTGGGTACCTGGAGATTCTGAAGTGCCTTTGCTGTGGTTTTCAAATAATAA 1817
AGATTTGTATTCAACTC-polyA 1834

FIG. 7/3

FIG. 8

VAC-beta: Quadruplication of a 67 amino acid long sequence

DAETLYKAMKG-IGTNEQAIIDVLT	KRSNTQRQIIAKSFKAQFGKDLTETL	KSELSCGFERLIVALMY	PPYRY
EAKELHDAMKG-LGTKEGVII	EILASRTKNQLREIMKAYEEDYGSSLEED	IQADTSGYLERILVCLLQ	GSRDDVSSFVDPALALQ
DAQDLYAAGEKIRGTD	EMKFITILCTRSATHLLRVFEEYEKIANKSIED	SIKSETHGSLEEAMLT	TVVK CTQNLHSY
FAERLYYAMKG-AGTRD	GTLIRNIVSRSEIDINLIKCHF	KKMYGKTLSSMINEDTSGDYKNALISLVG	SDP*

KG-hGTDExxLlpILApR

oooooooo

dAe LY AMKG GI Eg II IL sRS tql. I k ykk yCKsLee IksetSG lEralv Lvk
fe d l

"Consensus":
 x : 50% of amino acids identical
 X : 75% of amino acids identical
 X̄ : 100% of amino acids identical

"oooooooo" : Hydrophobic region

Amino acid composition

	VAC-alpha		VAC-beta	
Ala	26	(8,1%)	25	(7,7%)
Cys	1	(0,3%)	4	(1,2%)
Asp	25	(7,8%)	20	(6,1%)
Asn	6	(1,9%)	9	(2,8%)
Glu	29	(9,1%)	29	(8,9%)
Gln	12	(3,8%)	12	(3,7%)
Phe	13	(4,1%)	9	(2,8%)
Gly	22	(6,9%)	20	(6,1%)
His	3	(0,9%)	6	(1,8%)
Ile	18	(5,6%)	23	(7,0%)
Lys	22	(6,9%)	27	(8,3%)
Leu	38	(11,9%)	33	(10,1%)
Met	8	(2,5%)	11	(3,4%)
Pro	5	(1,6%)	6	(1,8%)
Arg	19	(5,9%)	15	(4,6%)
Ser	21	(6,6%)	27	(8,3%)
Thr	23	(7,2%)	21	(6,4%)
Val	16	(5,0%)	13	(4,0%)
Trp	1	(0,3%)	3	(0,9%)
Tyr	12	(3,8%)	14	(4,3%)

MW = 35896

MW = 36837

charged:

98 (30,6%)

97 (29,6%)

FIG. 9.

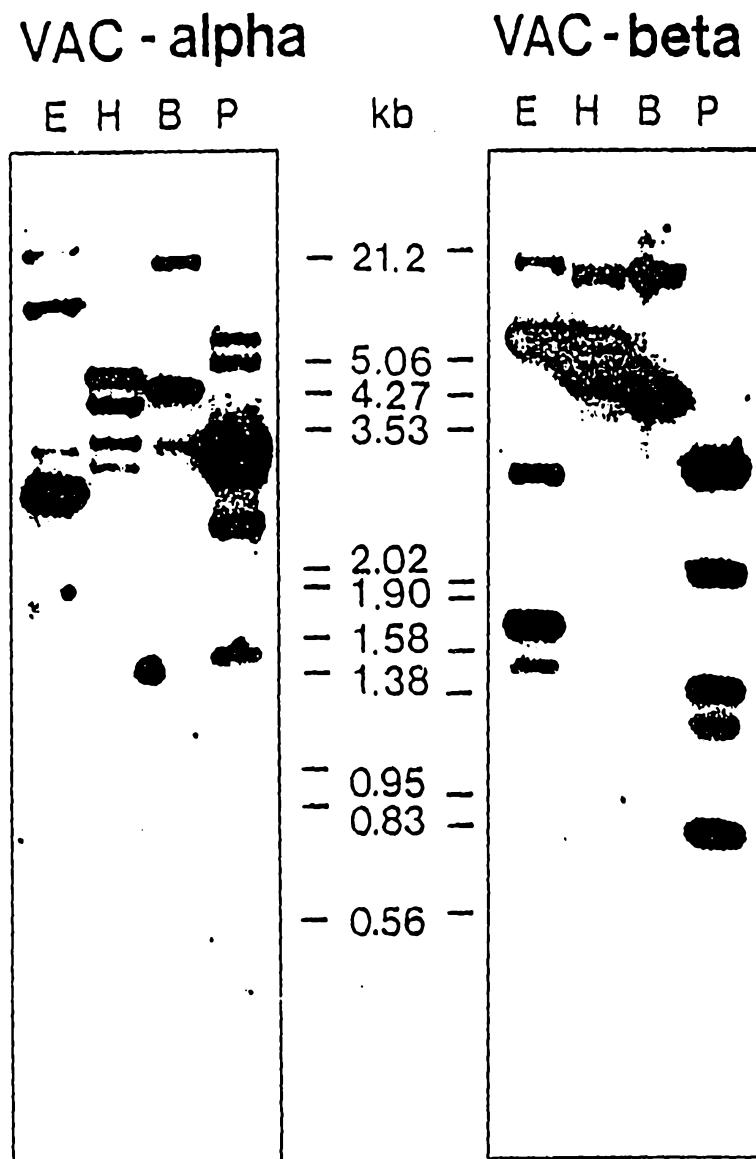


FIG. 10.

FIG. 11.

Comparison of VAC-alpha and VAC-beta

alpha
beta

MAQVLRGTVTDFFPGFDERA
MAWKAWIEQEGV..KSSSH.NPDP

alpha DAETLRKAMKGLGTDEESILTTLTSRSNAQROEISAAFKTLFGRDLLDDLKSELTKGFEKLIVALMK PSRLY
beta I..N.QA.IDV..K...T...Q.AKS..AQ..K..TET.....S....R.....Y .PYR.

alpha DAYELKHALKGAGTNEKVLTEIIASRTPEELRAIKQVYEEYGSSLEDDVVGDTSGYYQRMVLVLLQ ANRDPDAG-IDEAQVEQ
beta E.K..HD.M..L..K.G.II..L....KNQ..E.MKA...D.....E.IQA.....LE.I..C... GS...DVSSFV.P.LAL.

alpha DAQALFOAGELKVGTDDEKFITIFGTRSVSHLRKVFDKYM TISGFQIEETIDRETSGNLEQLLLAVVK SIRSI PAY
beta ...D.YA...KIR....M....LC...AT..LR..EE.EK.ANKS..DS.KS..H.S..EAM.T... CTQNLHS.

alpha LAETLYYAMKGAGTDDHTLIRVMVSRSEIDLFNIRKEFRKNFATSLYSMIKGDTS GDYKKA LLLCG EDD*
beta F..R.....R.G....NI.....NL.KCH.K.MYGKT.S...ME.....N....S.V. S.P*

Comparison of VAC-alpha and beta cDNA

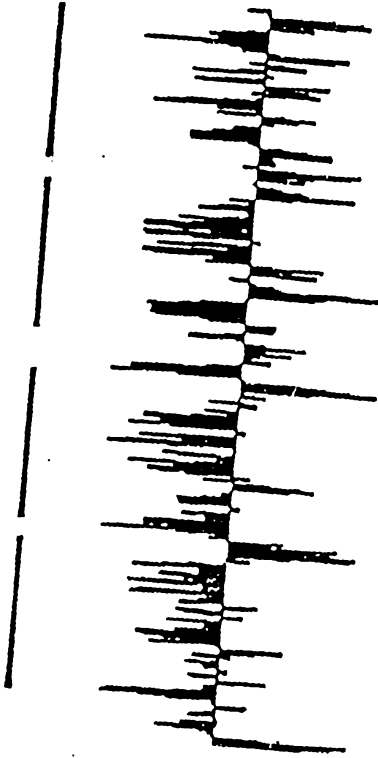
VA	ATGGCACAGGTTCTCAGAGGCACTGTGACTGACTTCCCTGGA	42
VB	ATGGCCTGGTGGAAAGCCTG.ATTG.ACAGGAGG.T.T...A....AGAG.AG.T.CCAC	60
VA	TTTGATGAGCGGGCTGATGCAGAACTCTTCGGAAGGCTATGAAAGGCTTGGGCACAGAT	102
VB	..CA.CCCAGACC.....G..C..CTAC..A..C.....G..GA.C..G..CA.C	120
VA	GAGGAGAGCATCCTGACTCTGTTGACATCCCGAAGTAATGCTCAGCGCCAGGAAATCTCT	162
VB	...C..GCT...A.CGA.G..C.C..CAAGA....C..CA.G.....G...C.G...G.C	180
VA	GCAGCTTTTAAGACTCTGTTTGGCAGGGATCTTCTGGATGACCTGAAATCAGAACTAACT	222
VB	AAGT.C..C...G...A...C....A...C..CACT..G.C.T....G..T..G..C.G.	240
VA	GGAAAATTTGAAAAATTAATTGTGGCTCTGATGAAACCTCTCGGCTTTATGATGCTTAT	282
VB	..C..G.....G.GGC.C.....C..T...T.T..GC.ATACAGA..C..A..CA.G	300
VA	GAACTGAAACATGCCTTGAAGGGAGCTGGAACAAATGAAAAAGTACTGACAGAAATTATT	342
VB	..G...C.TG.C...A.....CTTA.....C..G..GGGT..CA.C.TT..G..CC.G	360
VA	GCTTCAAGGACACCTGAAGAAGTGAAGGCCATCAAACAAGTTTATGAAGAAGAATATGGC	402
VB	..C..TC....CAAGA.CC.G...C.G.AG..A.TGA.G.CG.....G.....C.....G	420
VA	TCAAGCCTGGAAGATGACGTGGTGGGGGACACTTCAGGGTACTACCAGCGGATGTTGGTG	462
VB	..C.....G..G...A.CCAA.CA.....AAGT..C...CTGG..A....CC.....	480
VA	GTTCTCCTTCAGGCTAACAGAGACCCTGATGCTGGAATTGATGAAGCTCAAGTTGAACAA	522
VB	TGC.....G....GC.G...G..TGA..TGAGCA.CT...TG..CCCGGC.C.G.CC.TC	540
VA	GATGCTCAGGCTTTATTTTCAAGGCTGGAGAACTTAAATGGGGGACAGATGAAGAAAAGTTT	582
VB	C.A.ACGCACAGGATC.GT.T..G.C..GCGAG..GATTC.TGGGAC...T..G.T.AAA	600
VA	ATCACCATCTTTGGAACACGAAGTGTGTCTCATTGAG...AAAGGTGTTTGACAAGTAC	639
VB	T...T..C.A.CCTGTGCACGC.CAGTG.CAC.C.CCTGCTG.GA.....AG....T	660

FIG. 12/1

VA	ATGACTATATCAGGATTTCAAATTGAGGAAACCATTGACCGGAGACTTCTGGCAATTTA	699
VB	GA..AA..TG.CAACAAGAGC.....C.G...CA.GA.T.....CCA....TCAC.G	720
VA	GAGCAACTACTCCTTGCTGTTGTGAAATCTATTGGAAGTATACCTGCCTACCTTGCAGAG	759
VB	...G.GGCCA.G..CA....G.....GC.CC.A..ACC.C.ACAG....T.....	780
VA	ACCCTCTATTATGCTATGAAGGGAGCTGGGACAGATGATCATACCCTCATCAGAGTCATG	819
VB	.GA.....C....CC.....A.....GCG....GGG.....G..A...AA...C	840
VA	GTTTCCAGGAGTGAGATTGATCTGTTTAACATCAGGAAGGAGTTTAGGAAGAATTTGCC	879
VB	A.....C.....CT.AAA.CTT....AATGTC.C..C.A.....TG.AC.G.	900
VA	ACCTCTCTTTAFTCCATGATTAAGGGAGATACATCTGGGGACTATAAGAAAGCTCTTCTG	939
VB	.AGA.C..CAGCAG.....C.T..A...C..CAGC..C.....C.....C..C..G...	960
VA	CTGCTCTGTGGAGAAGATGAC	960
VB	AGC..GGTG..CAGC..CCC.	981

FIG. 12/2

HYDROPHOBIC | HYDROPHILIC



DEPT ERKLGHETAI STCSQEFTESEDTUINXTS
 AGTKQSSSTKY LKSMSSLSLTKIHKIDALRSKTSLS
 LUPAANFEFPH ERKXLCLELAITLIKANYDRCLGCV
 HLDHITKTEPDGTAELQQRILASNELLAGTEFSYS
 KUHKIQAALRYAUKYELDDGLRNEELLAGTEFSYS
 AMGGDRQKLRPIINEDESFLTCUKTTHSLIKHMD
 ISAIUQFSIMKIQEIRRAEETTFSHUAKIDKINP
 ISEGLQGEUEGELDDQIDLAEREIESKAANHYEL
 ESTTTIKLAALIRYGLDAAHSEESKAANHYEL
 IGLNKAADSLKGLGEGDMLGKAYDIDEGILGDL
 100 200 300

FIG. 13.

VAC-beta

HYDROPHOBIC | HYDROPHILIC



PDALLQFSINXTTEUVRROQERDIGULGRINXA*
 AFEGLEGEVUDGELVUMDAAESKENXAAUUFFGL
 QPTTTIRLAAGAIRYGLPEGKUYELSEGHNADL
 UGLDSSDTLYGAGDUDDEFSHTENITTVUITTL
 LFRERALGCMETAI STUADLIHTIQRLDCSRSSL
 RDKESALXKLNKSSSLGAKXTLIDISYDRKLGCC
 GEASNFDEFKEROGLIOWIRSRILNYHSEYDG
 UPMIAKDESHKTVVEYQDAGCFKGELEFATFEFSYE
 UAKLQTLKRAUPYDYGEELTGUFTAGATLIRMKD
 INDGTRLKLLLEEDQMAFDITFQSUAKIDKIKD
 100 200 300

VAC-alpha

Comparison VAC/VAC-beta/Lipocortin I/Lipocortin II

VA	MAQVLRGCTVTDFPGFDERA	
VB	HAWKAWIEQEGVTVKSSSHFNPD	
LCI	MAMVSEFLKQAVFIENEQYVQTVKSSKGGPGSAVSPYTFNPSS	
LCII	MSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSAVKPYTNFDAER	
VA	DAETLRKAMKGLGTDEESILTLTSRSNAQOEISAAPKTLFGRDLLDDLKSELTKGKFEKLIIVALMK	PSRLY
VB	DAETLYKAMKGI GTNEQAIIDVLTKRSTNRQRIAKSFAQFGKDLTETLKSELSCGFERLIVALMY	PPYRY
LCI	DVAALHKAIMVKGVDATIIDILTKRNNAQRQIIKAYLQETGKPLDETLLKALTGHLHEVVLALLK	TPAQF
LCII	DALNIETAVKTKGVDEVTIVNLTNRSNVQRQIIAFAYQKRTKSLPSALKSAISGHLETIVILGLLK	TPAQY
VA	DAYELKHALKGAGTNEKVLTEIIASRTPEELRAIKQVYEEYSSLEDDVVGDTSGYYQRHLVVLLQ	ANRDPDAG-IDEAQVEQ
VB	EAKELHDAMKGLGTKEGVIIELASRTKNQREIMKAYEEDYGSSLEEDIQADTSGYLERILVCLLQ	GSRDDVSSFVDPALALQ
LCI	DADELRAAMKGLGTDEDTLIEILASRTNKEIRDINBVYREELKNDLAKDIISDTSGDFRNALLSLAK	GDRSEDFGVNED-LADS
LCII	DASELKASMKGLGTDEDSLIEIICSRINQELQEIINBVYKEHYKTDLEKDIISDTSGDFRKLMLVALAK	GRRAEDEGSGVIDYELIDQ
VA	DAQALFQAGELKWGTDEEKFITIFGTRSVSHLRKVDFDKYMTISGFIETIDHETSGNLEQLLAVVK	SIRSIPAY
VB	DAQDLYAAGEKIRGTDENKFITILCTRSATHLLRVFEEYEKIANKSIEDSIKSETHGSLEEAMLTIVVK	CTQNLKSY
LCI	DARALYEAGERKGTDVNVFNTIITRSYPQLRRVFQKYTKYKHDNKNVLDLELKGDIKCLTIAIVK	CATSKPAF
LCII	DARELYDAGVKRKGTDVVPKVISIMTERSVCHLQKVFERYSYSPYDMLESIKKEVKGDLENAFNLVQ	CIONKPLY
VA	LAETLYYAMKGAGTDDHTLIRVMVSRSEIDLFIIRKEFRKNFATSLYSMIKGDTSQDYKKALLLCCG	EDD*
VB	FAERLYYAMKGAGTRDGTLLIRNIVSRSEIDLNLKCHFKKMYGKTLSSMIMEDTSGDYKNALLSLVG	SDP*
LCI	FAEKLHQAMKGVGTRHKALIRIMVSRSEIDMNDIKAFYQKMYGISLCOAILDETSGDYKILVALCG	GN*
LCII	FADRLYDSMKGKGTDRDKVLIRIMVSRSEVDMLKIRSEFKRKYGKSLYYYIQQDTKGDYQKALLYLCG	GDD*
VA	human	VAC-alpha
VB	human	VAC-beta
LCI	human	Lipocortin I
LCII	human	Lipocortin II

FIG. 14

Sequence of the alkaline phosphatase gene component in
plasmid pRH284T

```

      10      20      30      40      50      60
AATTGGAGATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATGGCGCAAAATGACCAACAGCGGT
  CCTCTAATAGCAGTGACGTTACGAAGCGTTATACCGCGTTTTACTGGTTGTCGCCA

      70      80      90     100     110     120
TGATTGATCAGGTAGAGGGGGCGCTGTACGAGGFAAAGCCCGATGCCAGCATTTCCTGACG
  ACTAACTAGTCCATCTCCCCCGGACATGCTCCATTTCTGGGCTACGGTCGTAAGGACTGC

      130     140     150     160     170     180
ACGATACGGAGCTGCTGCGCGATTACGTAAAGAAGTTATTGAAGCATCCTCGTCAGTAAA
  TGCTATGCCTCGACGACGCGCTAATGCATTTCTTCAATAACTTCGTAGGAGCAGTCATTT

      190     200     210     220     230     240
AAGTTAATCTTTTCAACAGCTGTCATAAAGTTGTACGGCCGAGACTTATAGTCGCTTTG
  TTCAATTAGAAAAGTTGTGACAGTATTTCAACAGTGCCCGGCTCTGAATATCAGCGAAAC

      250     260     270     280     290     300
TTTTTATTTTTTAATGTATTTGCTCGAGAGGTTGAGGTGATTTTATGAGCTCGAATTCAT
  AAAAATAAAAAATTACATAAAGGAGCTCTCCAAGTCCACTAAAATACTCGAGCTTAAGTA
                                XhoI      RBS      SacI  EcoRI C

      310     320     330     340     350
CGATAAGCTTGGATCCGTCGACCGCGCCCGGCAGTGAATTTTCGCTGCCGGGTGGTTTTT
  GCTATTTCGAACCTAGGCAGCTGGCGCGGGCCGTCACTTAAAAGCGACGGCCACCAAAAA
  laI HindIII BamHI SalI

      360     370
TTGCTGC
  AAGCAGGAGCT

```

FIG. 15.

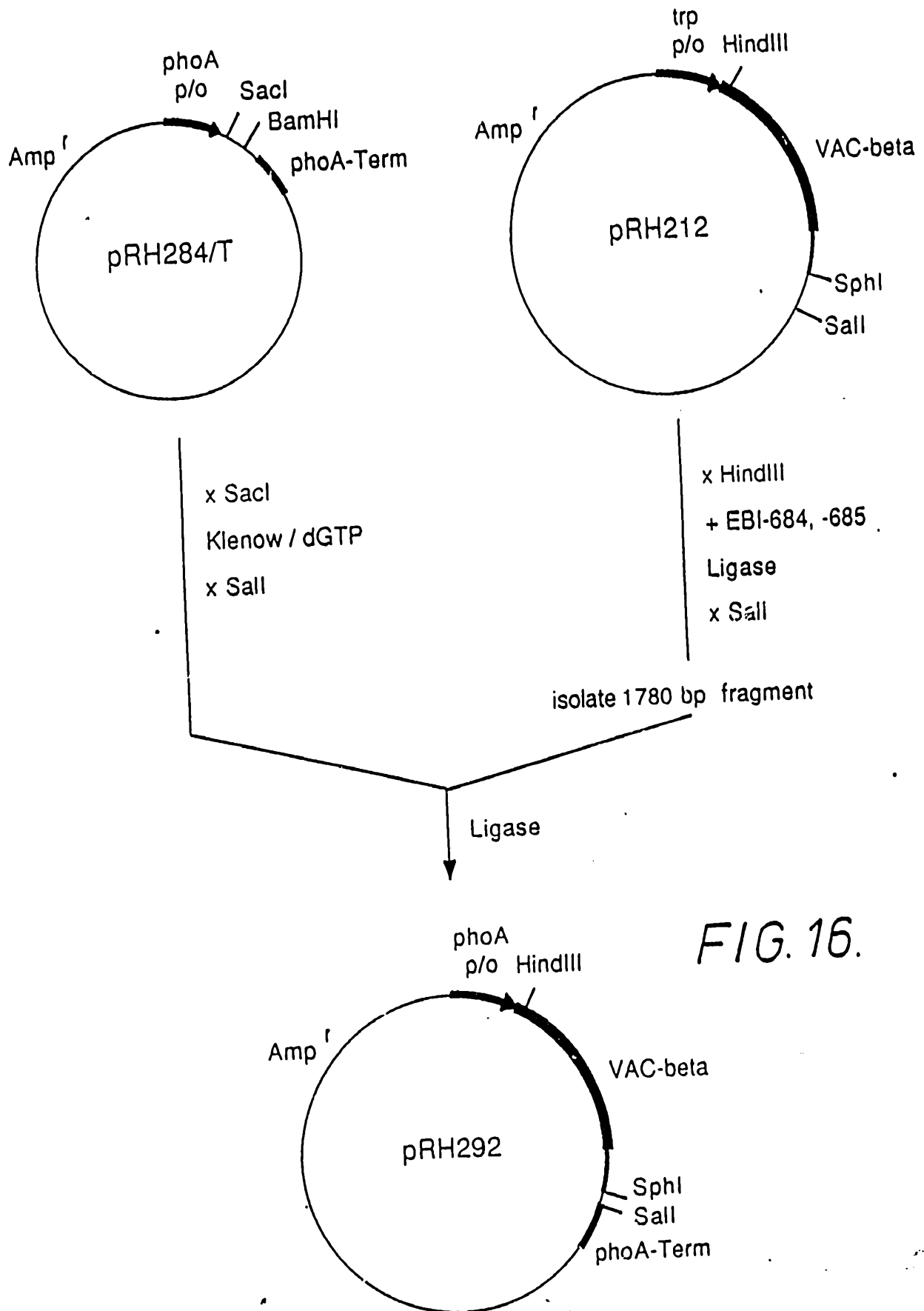
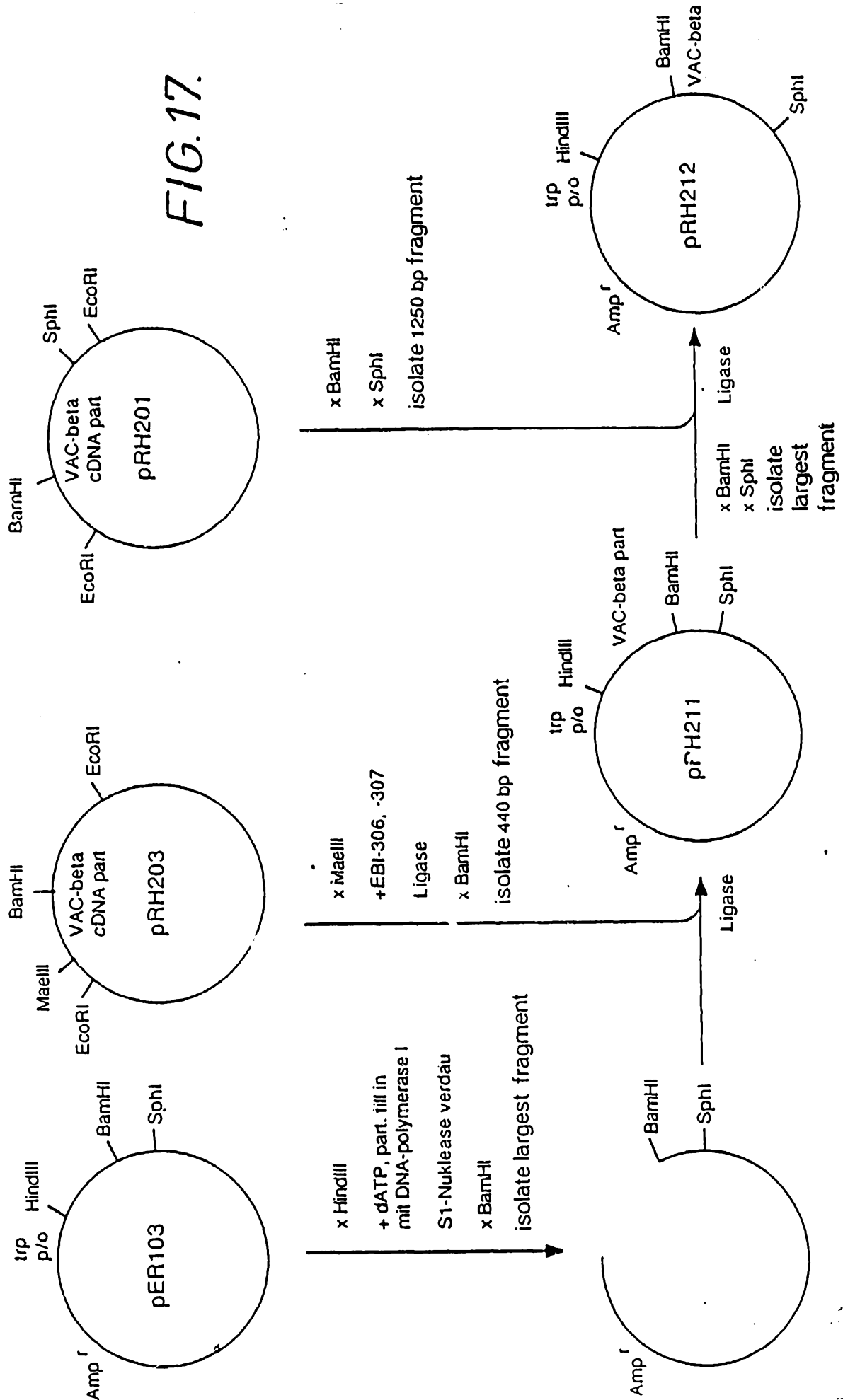


FIG. 16.

FIG. 17.



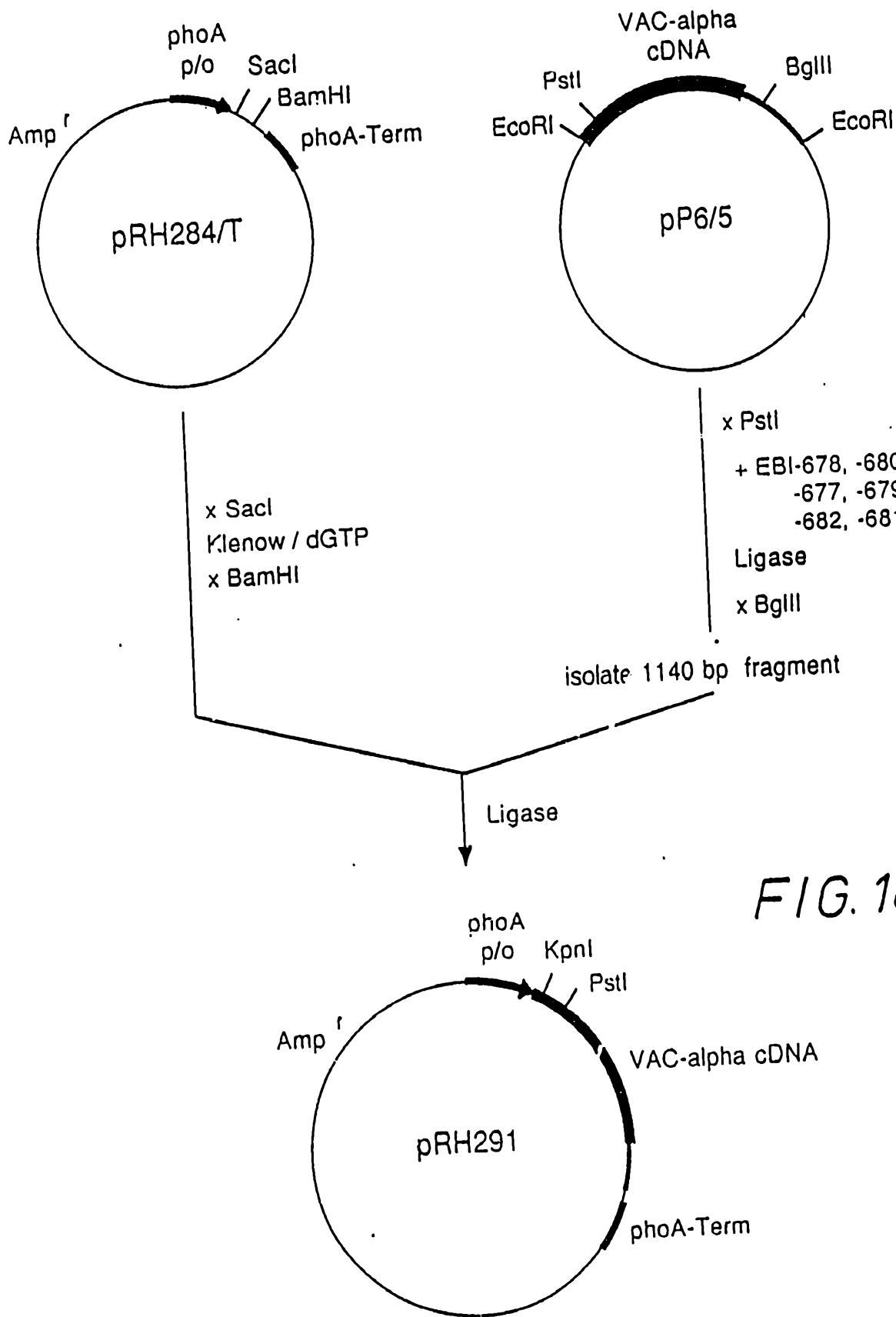


FIG. 18.

FIG. 19.

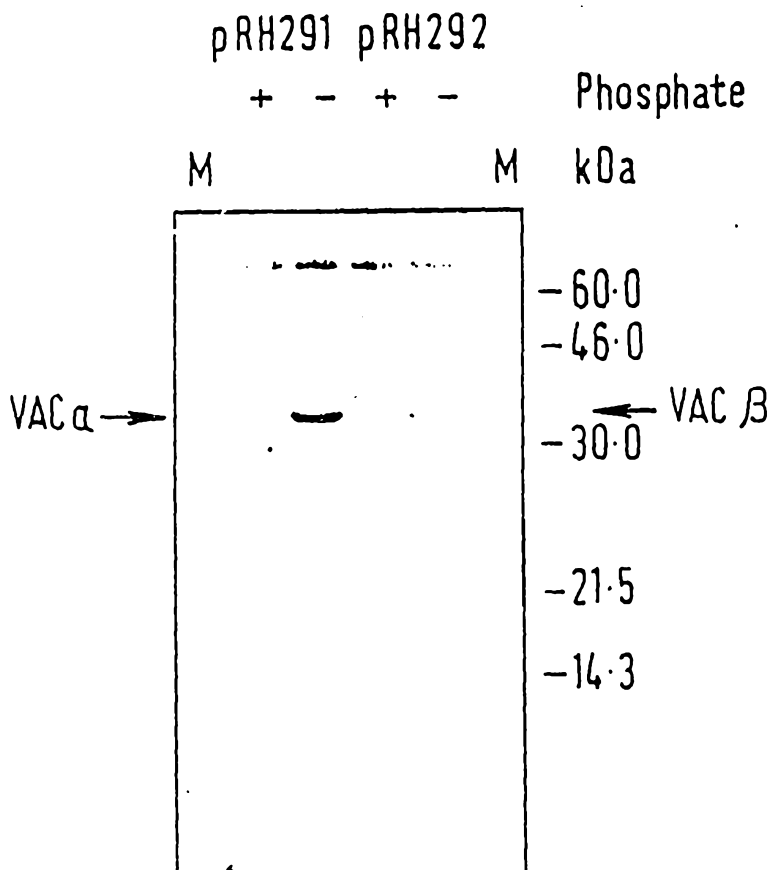
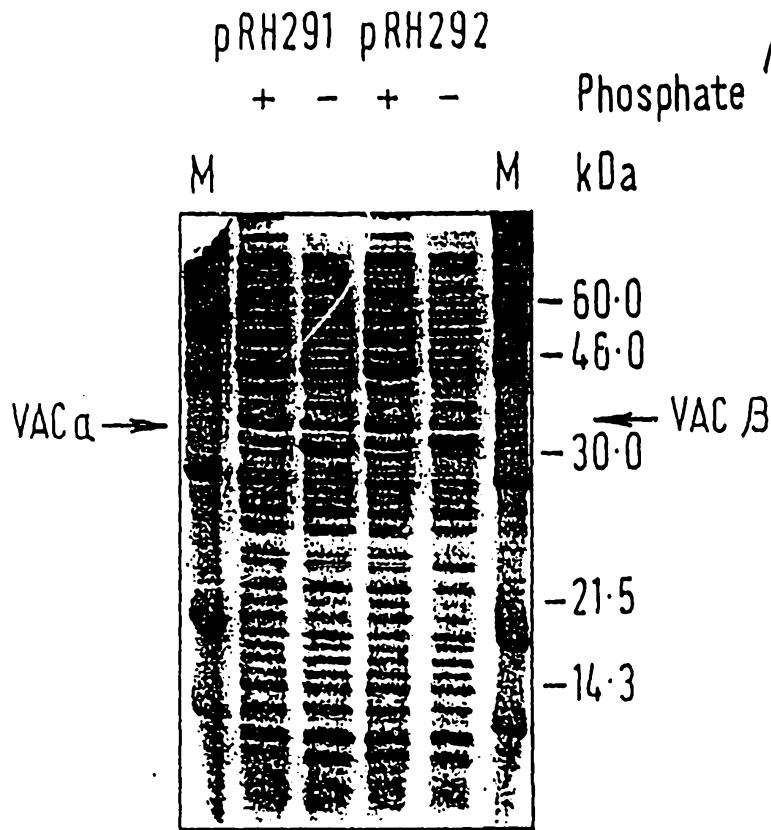


FIG. 20.

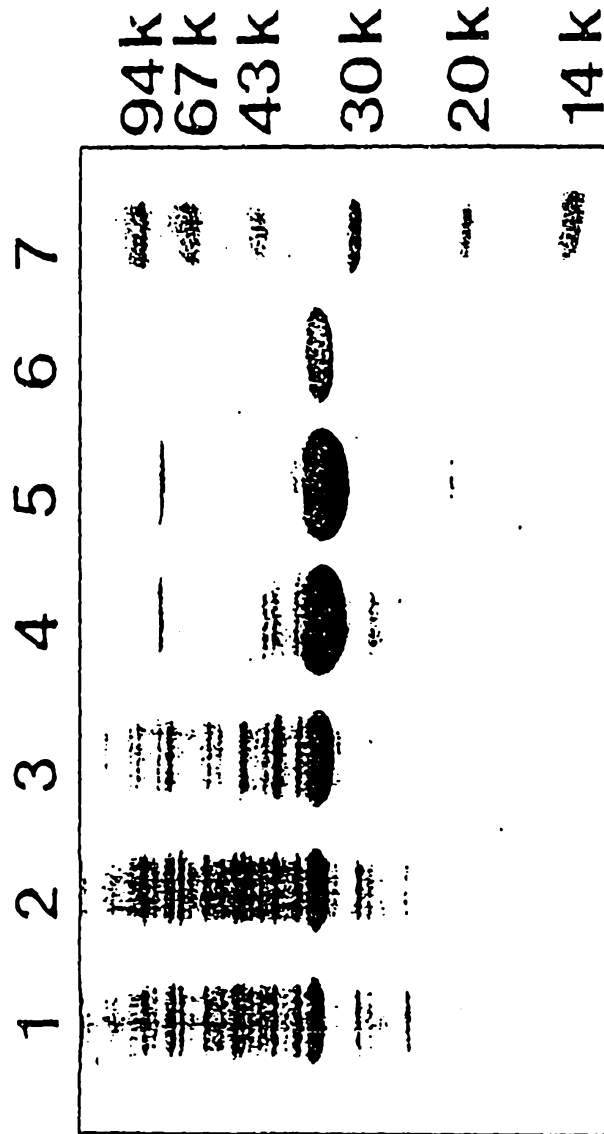


FIG. 21.

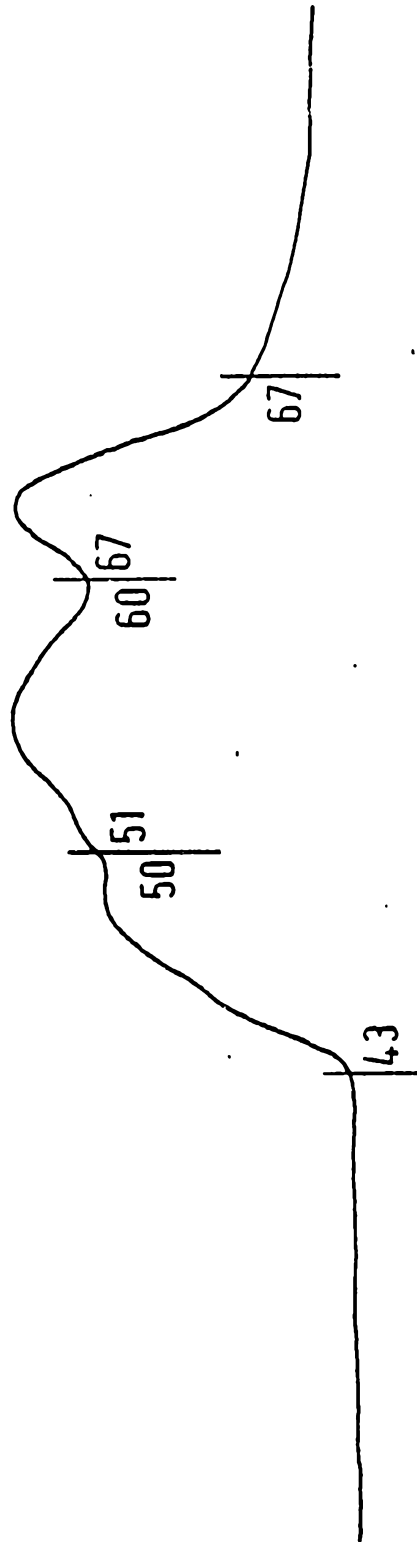


FIG. 22.

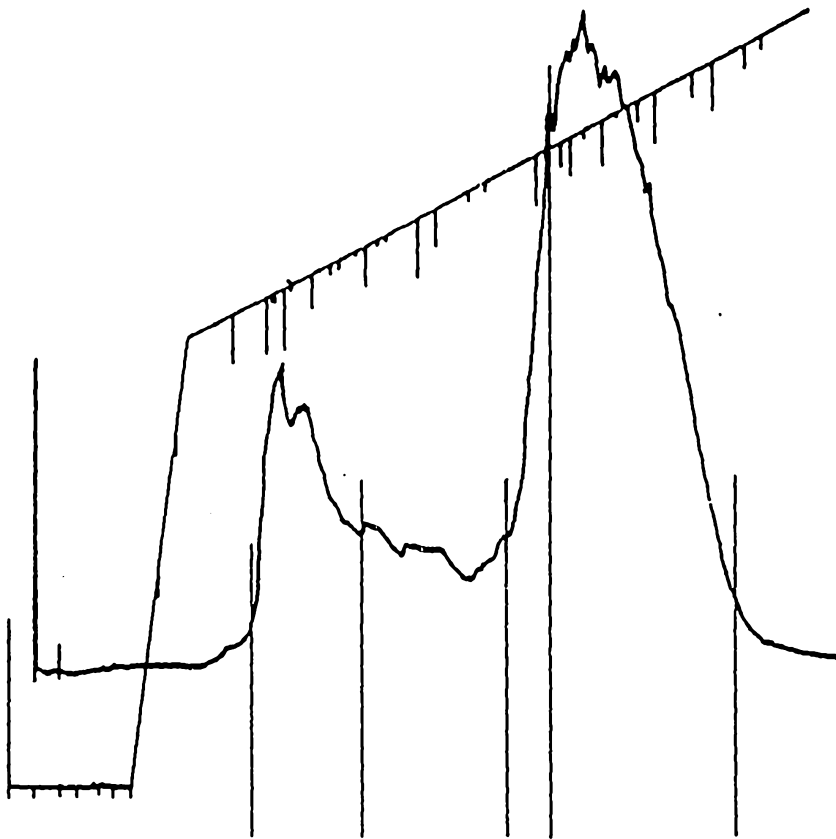
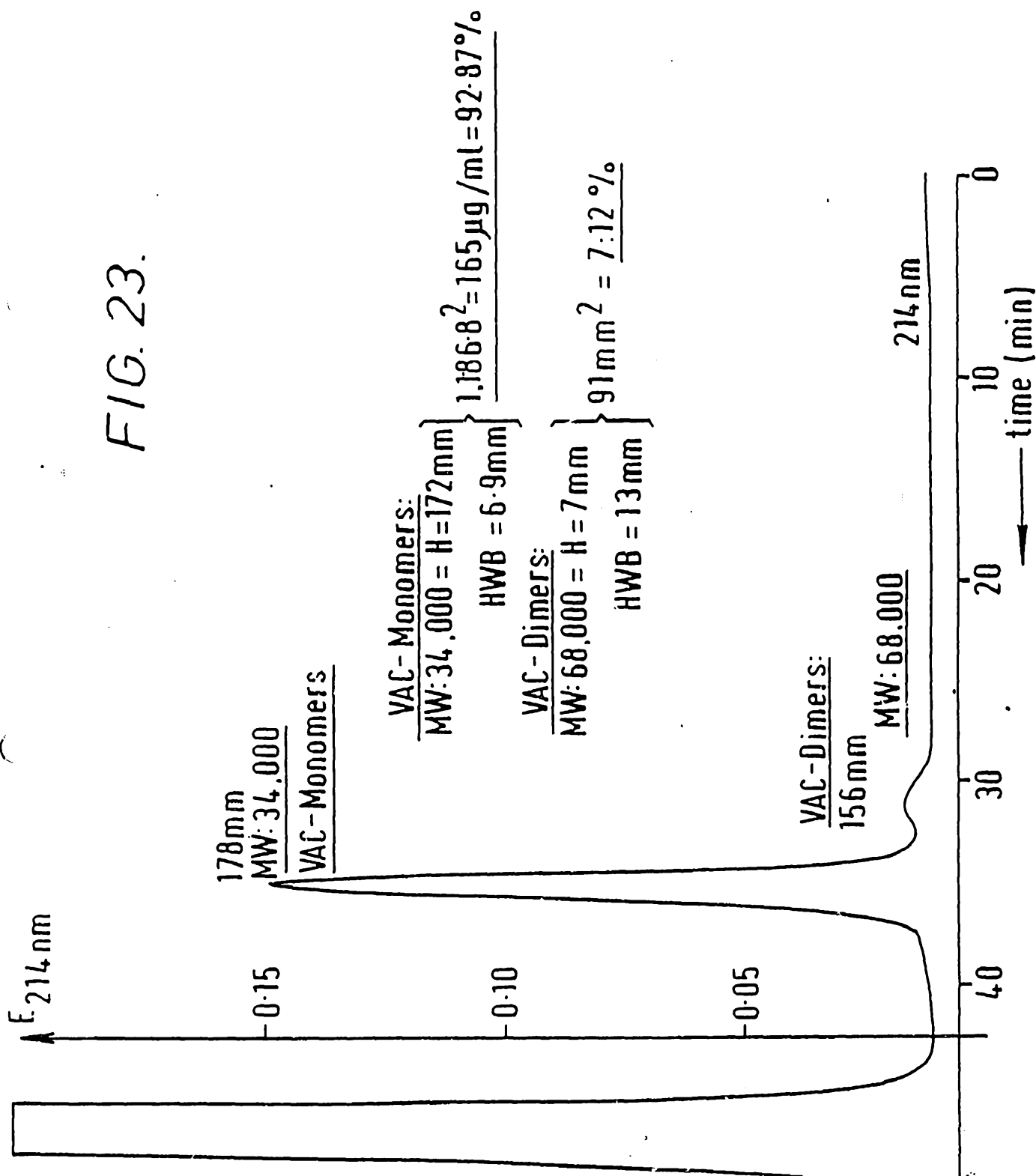


FIG. 23.



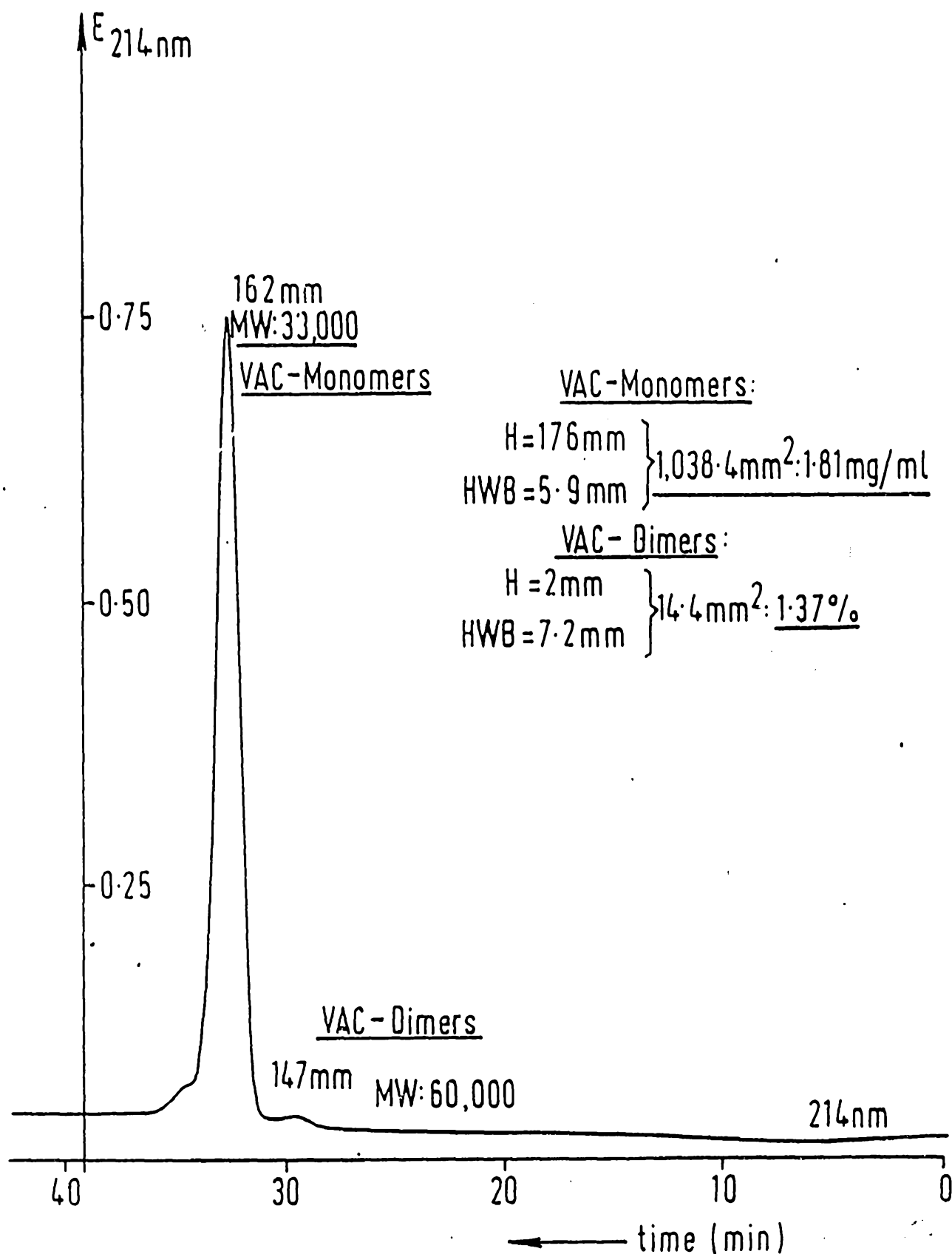


FIG. 24.

273285

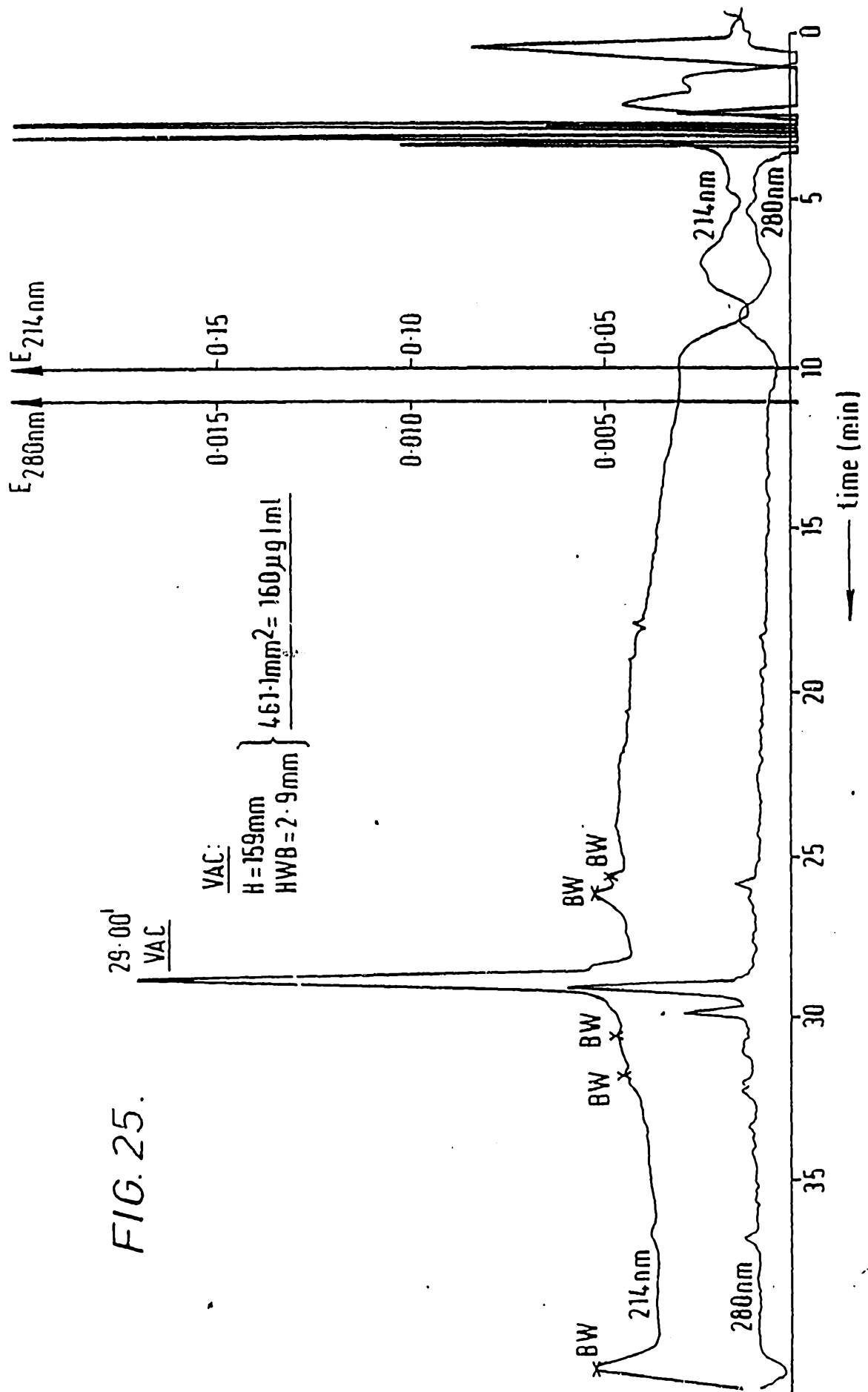


FIG. 25.

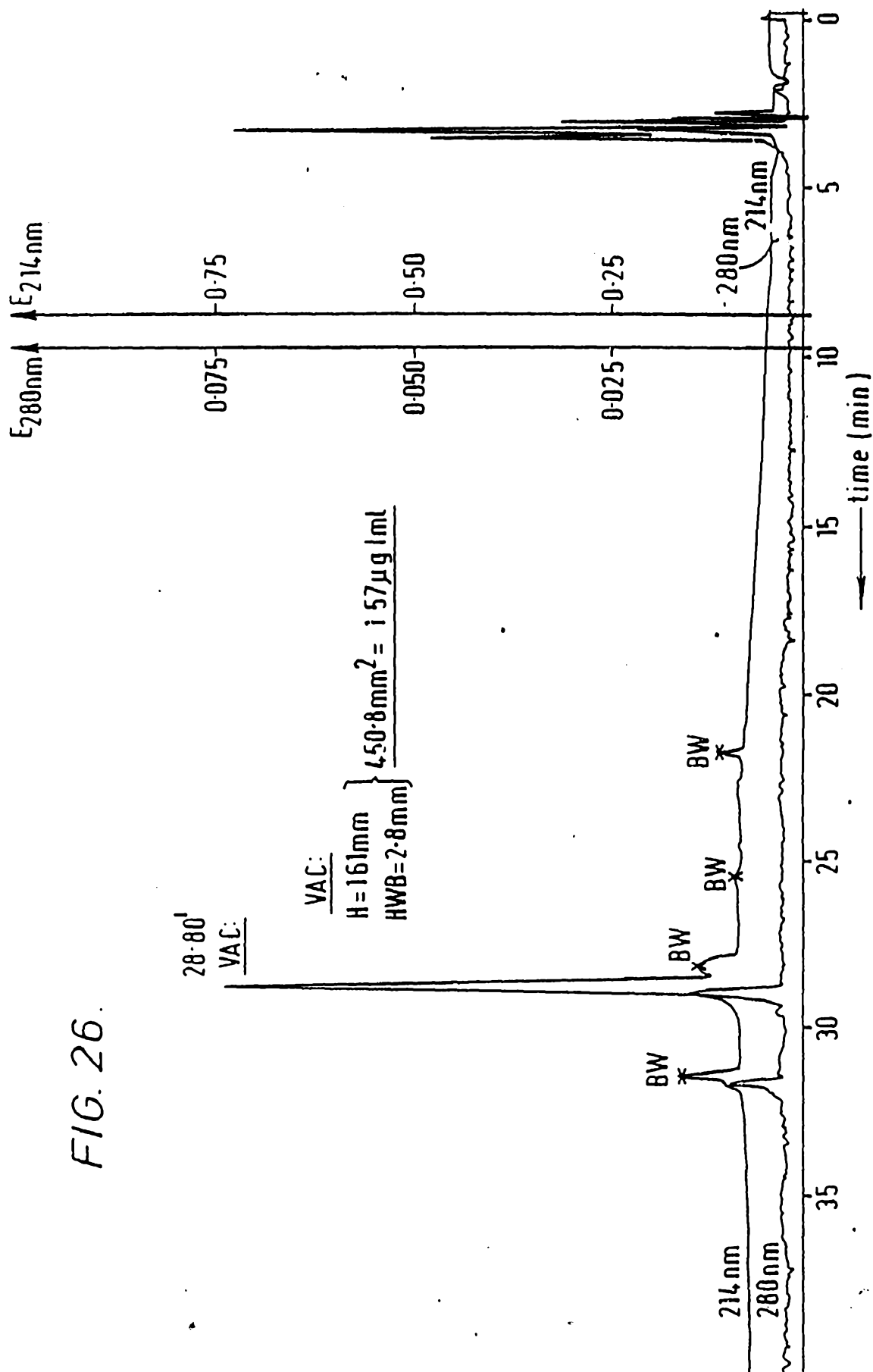


FIG. 26.

273285

FIG. 27.

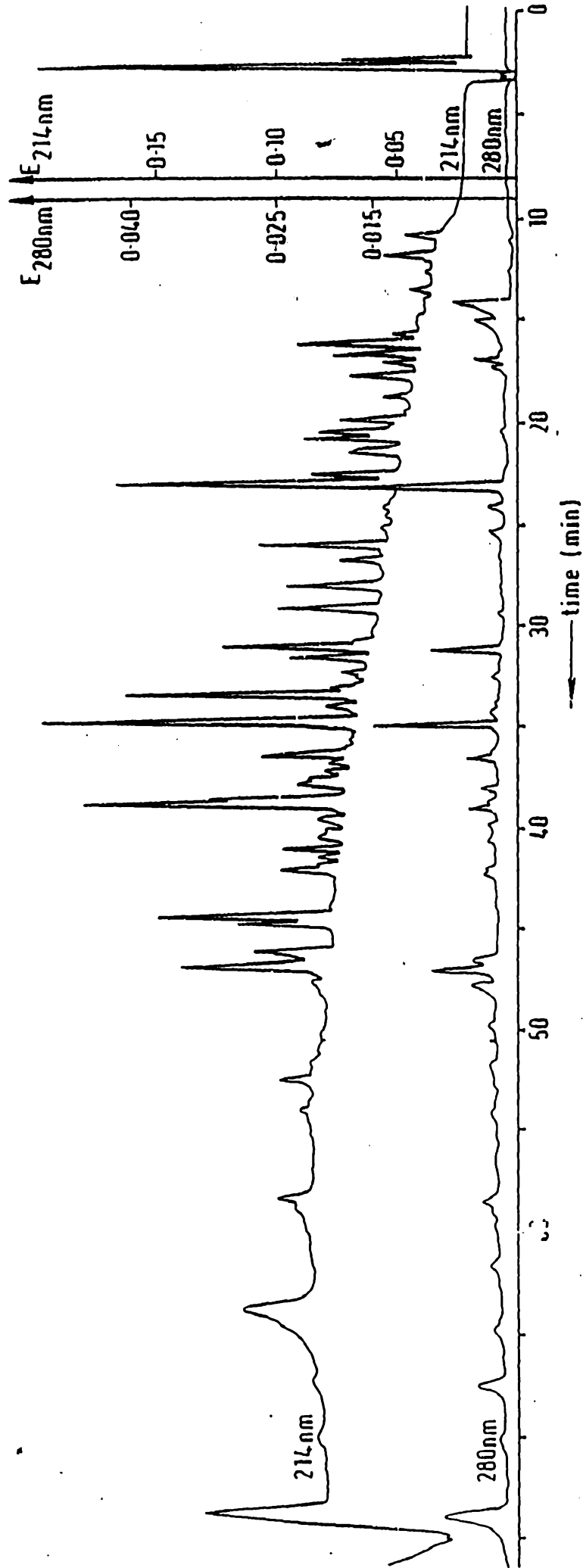


FIG. 28.

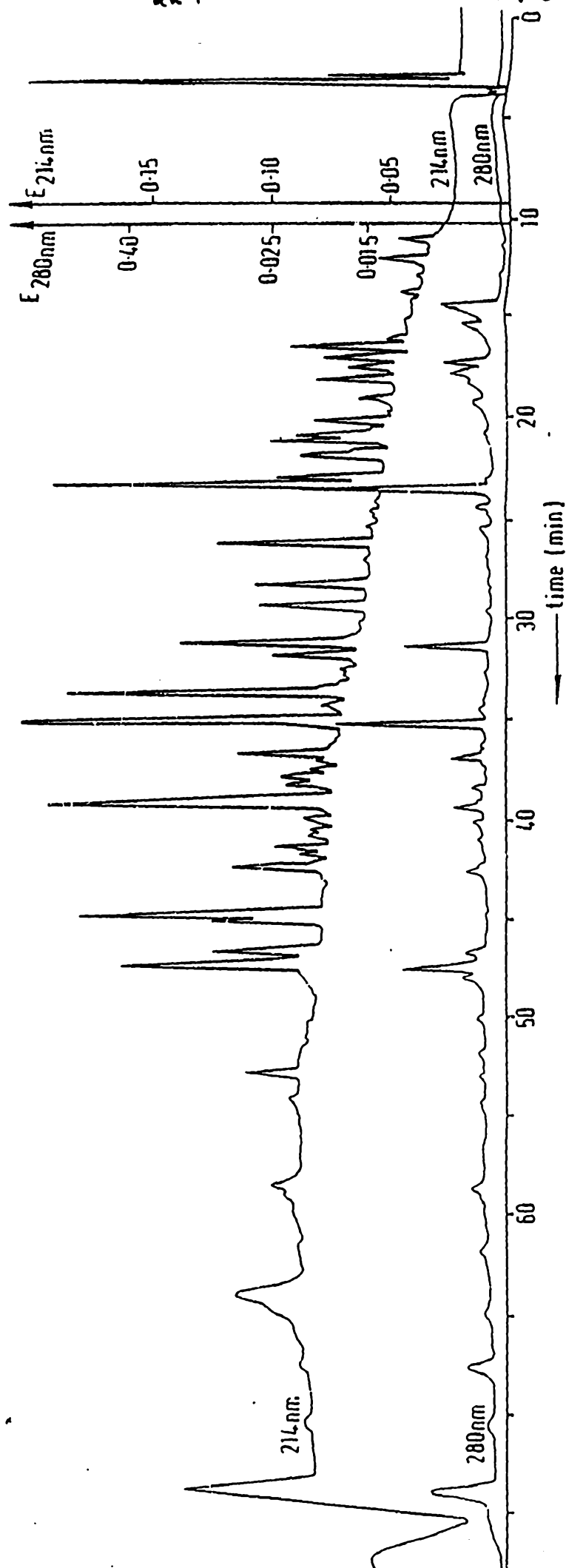
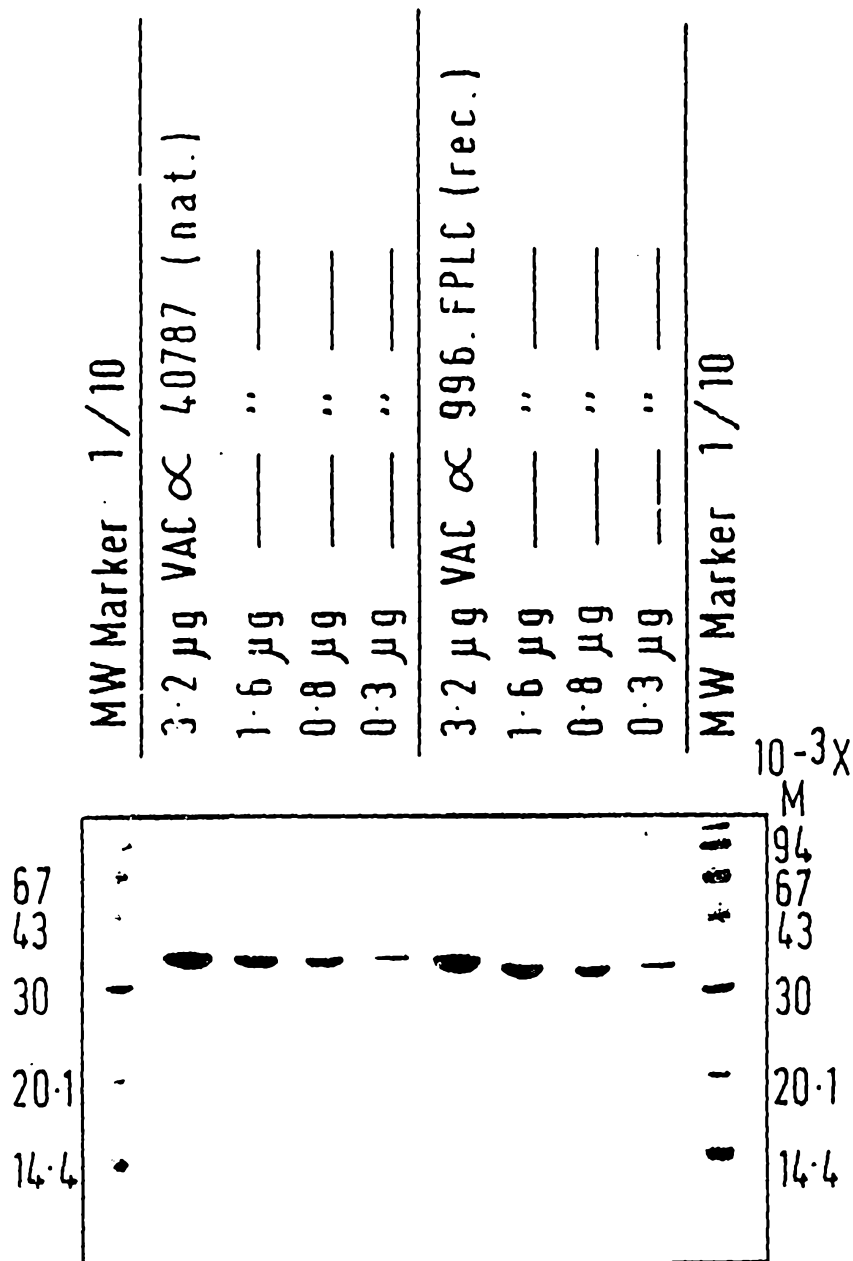


FIG. 29.



Coomassie - Blue

FIG. 30.

15% SDS-PAGE

Gel part I: Silver staining

Gel part II: Coomassie staining

STACKING GEL

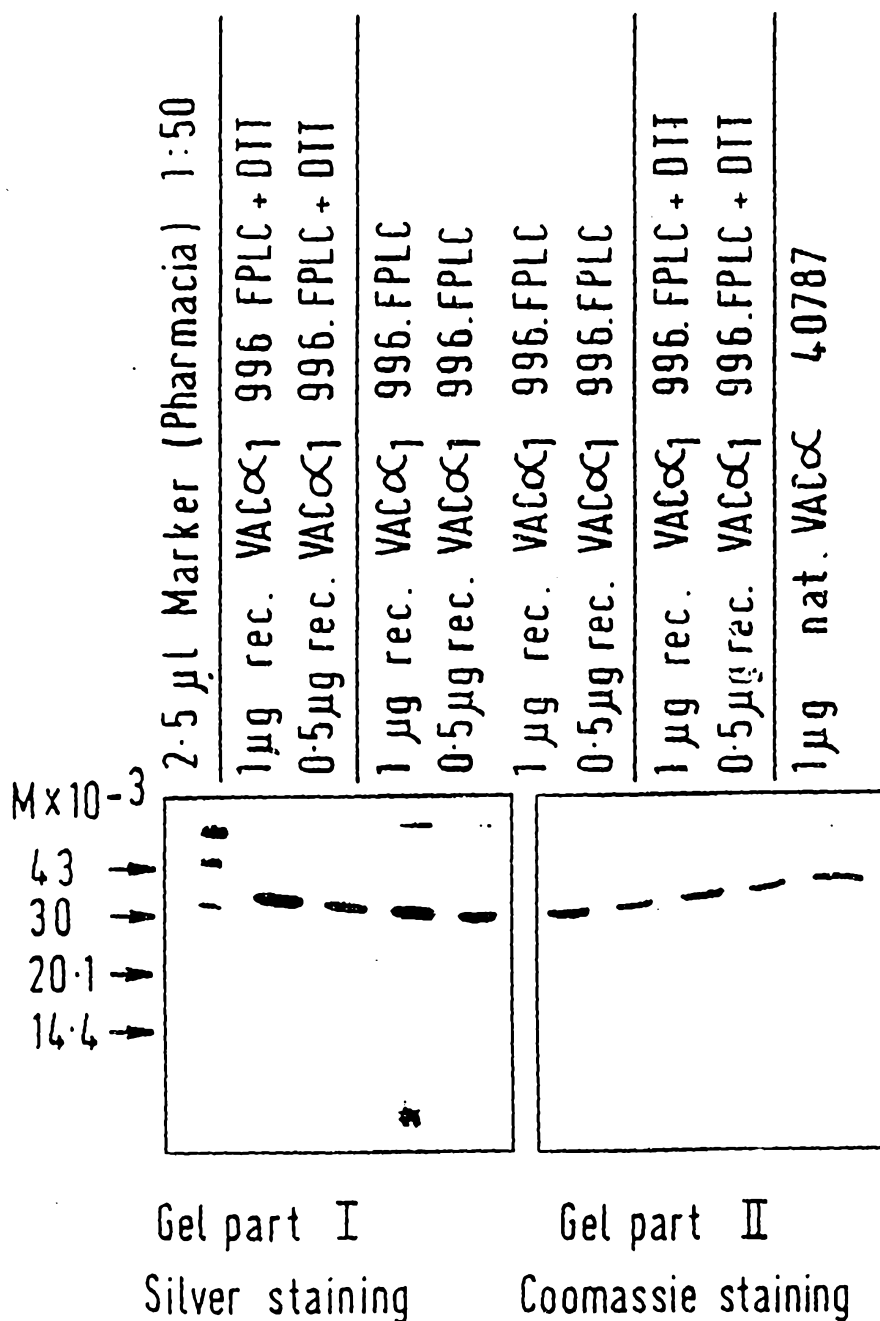


FIG. 31.

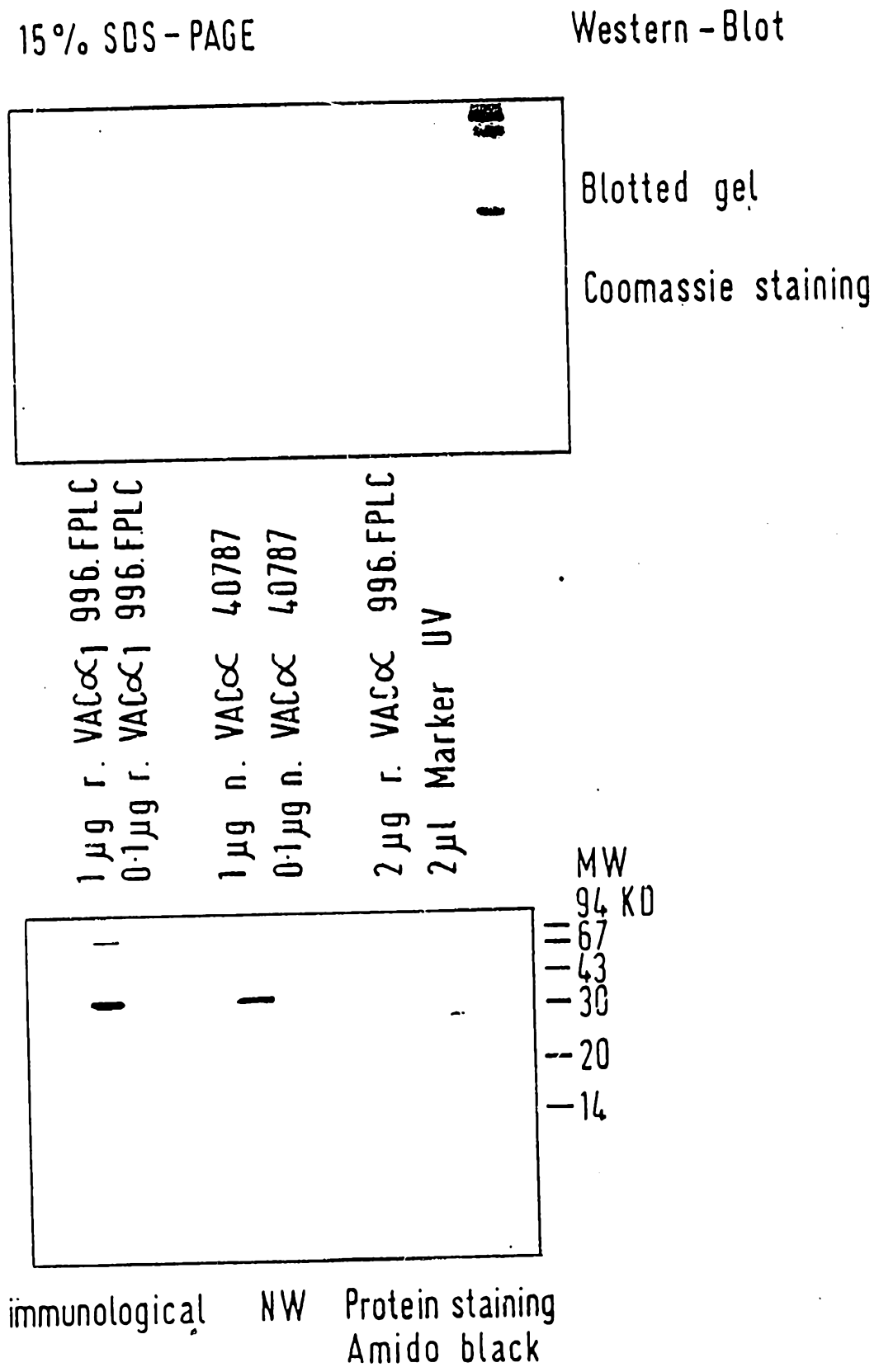
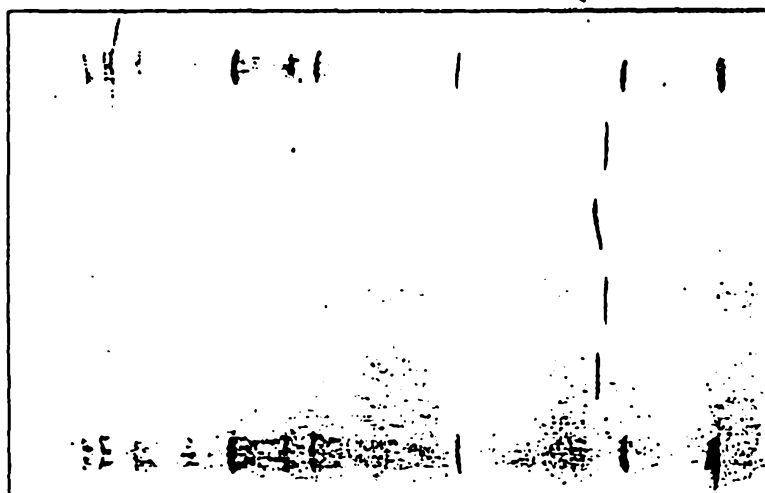


FIG. 32.

LKB AMPHOLINE PAGIF pH 3.5 - 9.5

Coomassie staining

trypsinogen (9.3)
 lentil lectin - basic band (8.65)
 lentil lectin - middle band (8.45)
 lentil lectin - acidic band (8.15)
 myoglobin - basic band (7.35)
 myoglobin - acidic band (6.85)
 human carbonic anhydrase B (6.55)
 bovine carbonic anhydrase B (5.85)
 β -lactoglobulin A (5.2)
 soybean trypsin inhibitor (4.55)
 amyloglucosidase (3.5)

pI Marker (Pharmacia) 10 μ l4.2 μ g nat. VAC 407874.2 μ g rec. VAC 1004.FPLC1 μ g nat. VAC 407871 μ g rec. VAC 1004.FPLCpI Marker (Pharmacia) 10 μ l

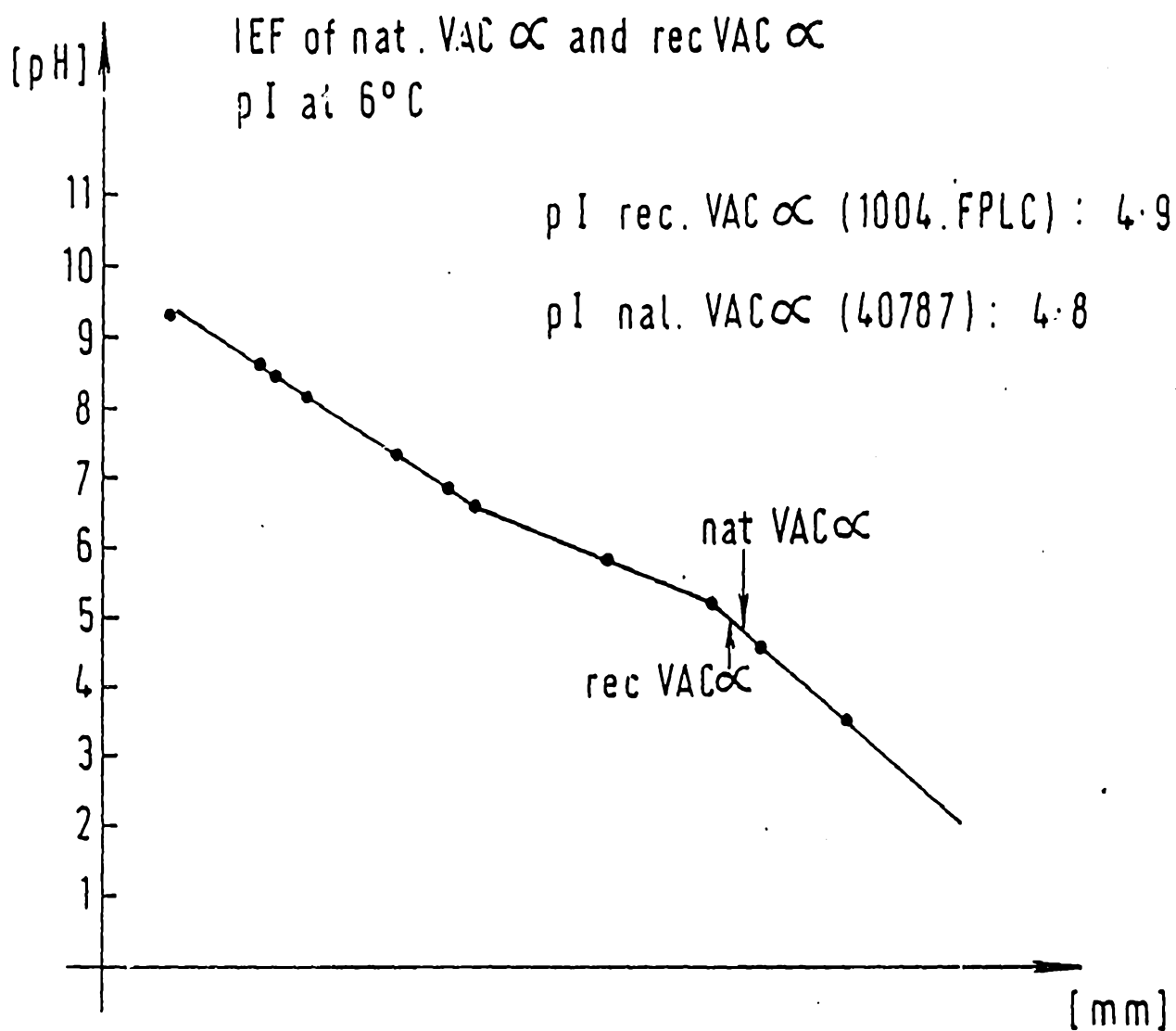
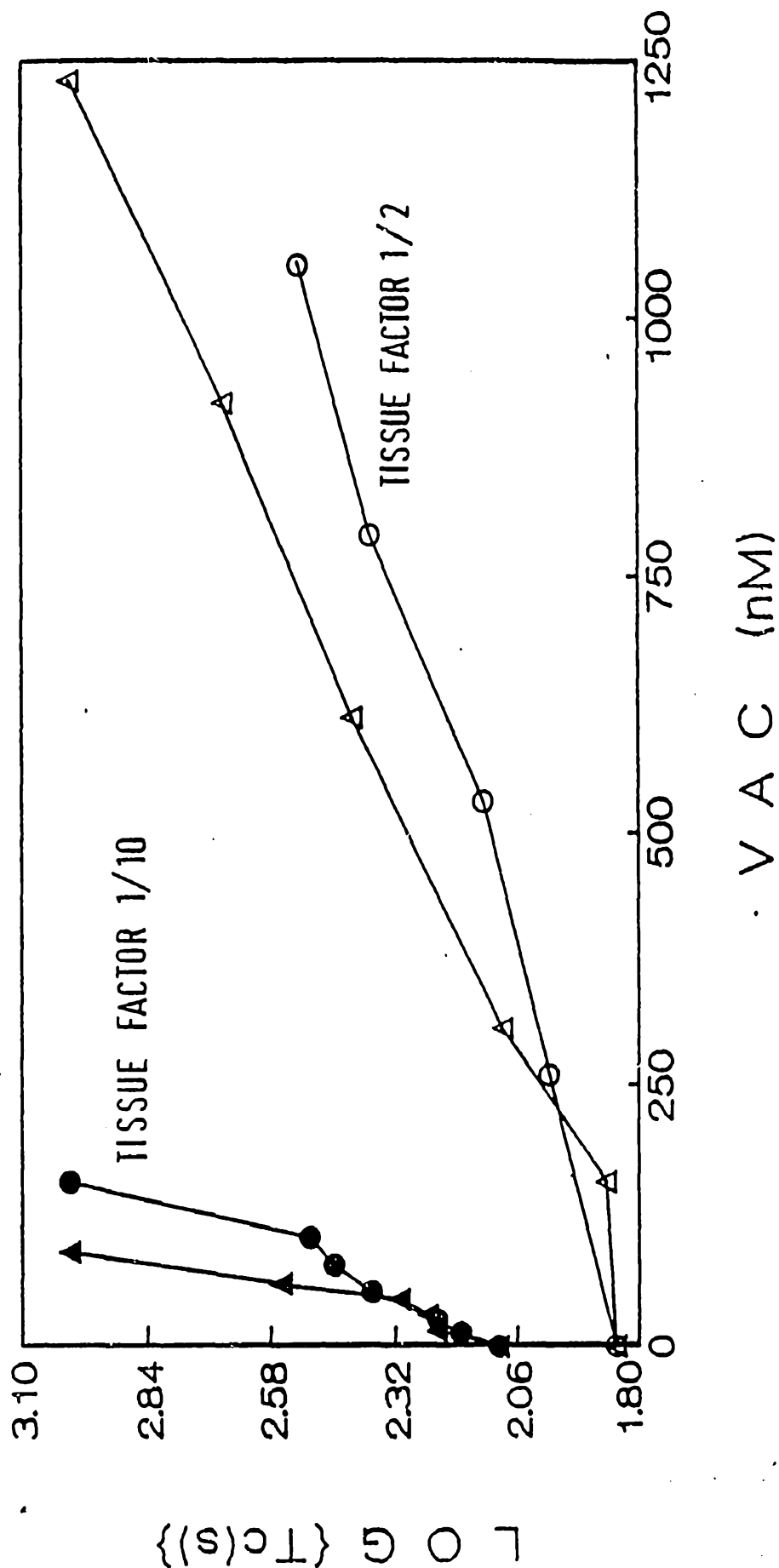


FIG. 32a.

FIG. 33.



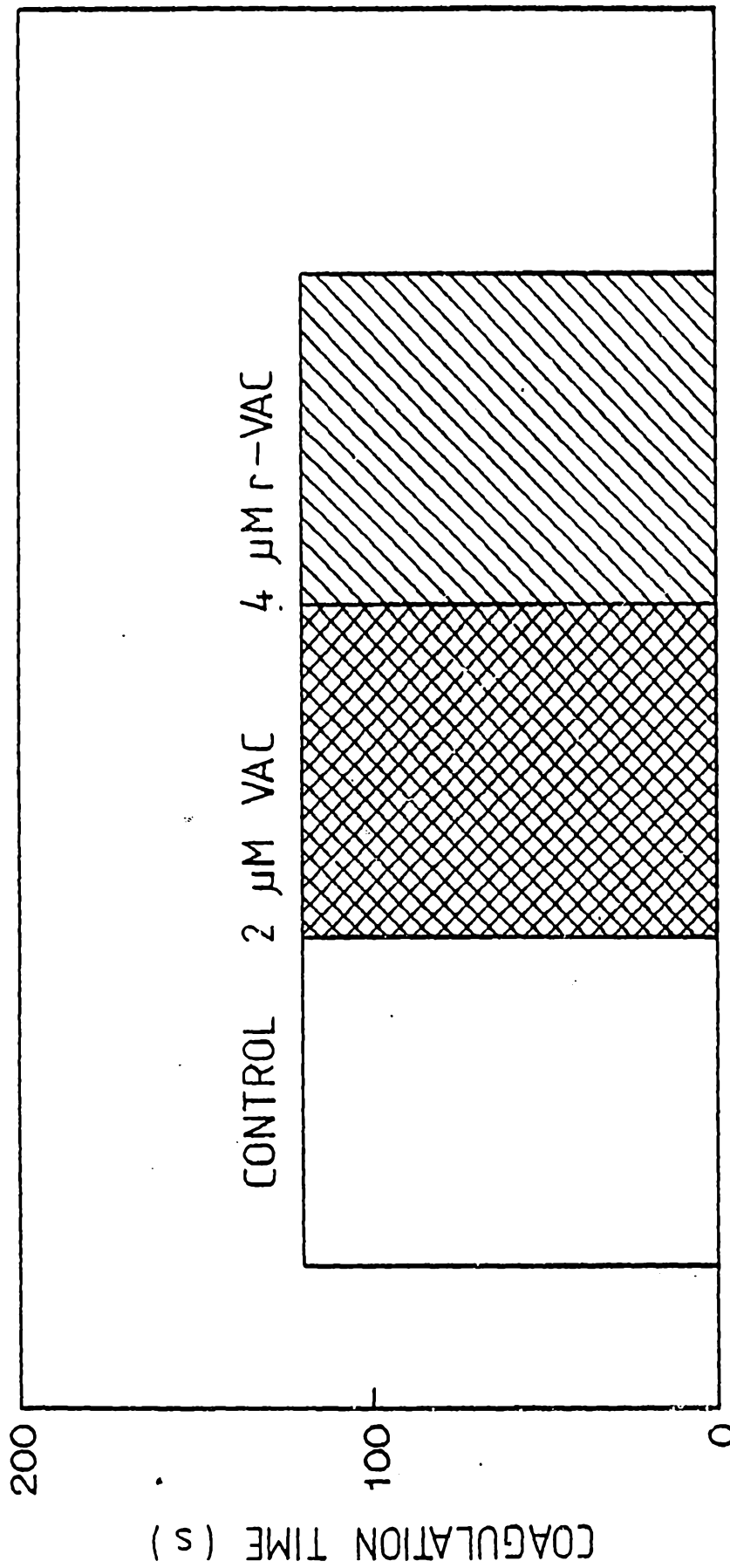
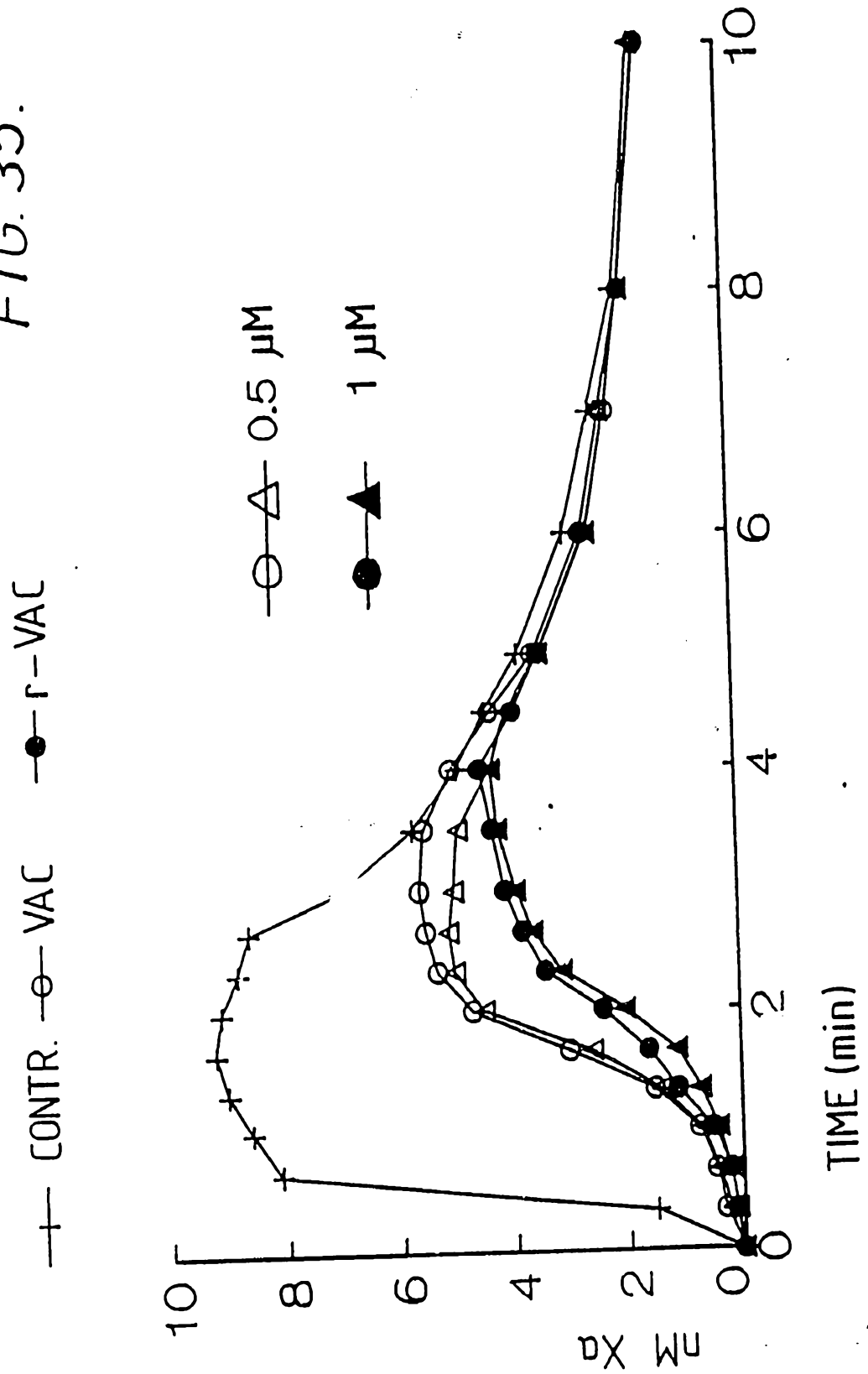


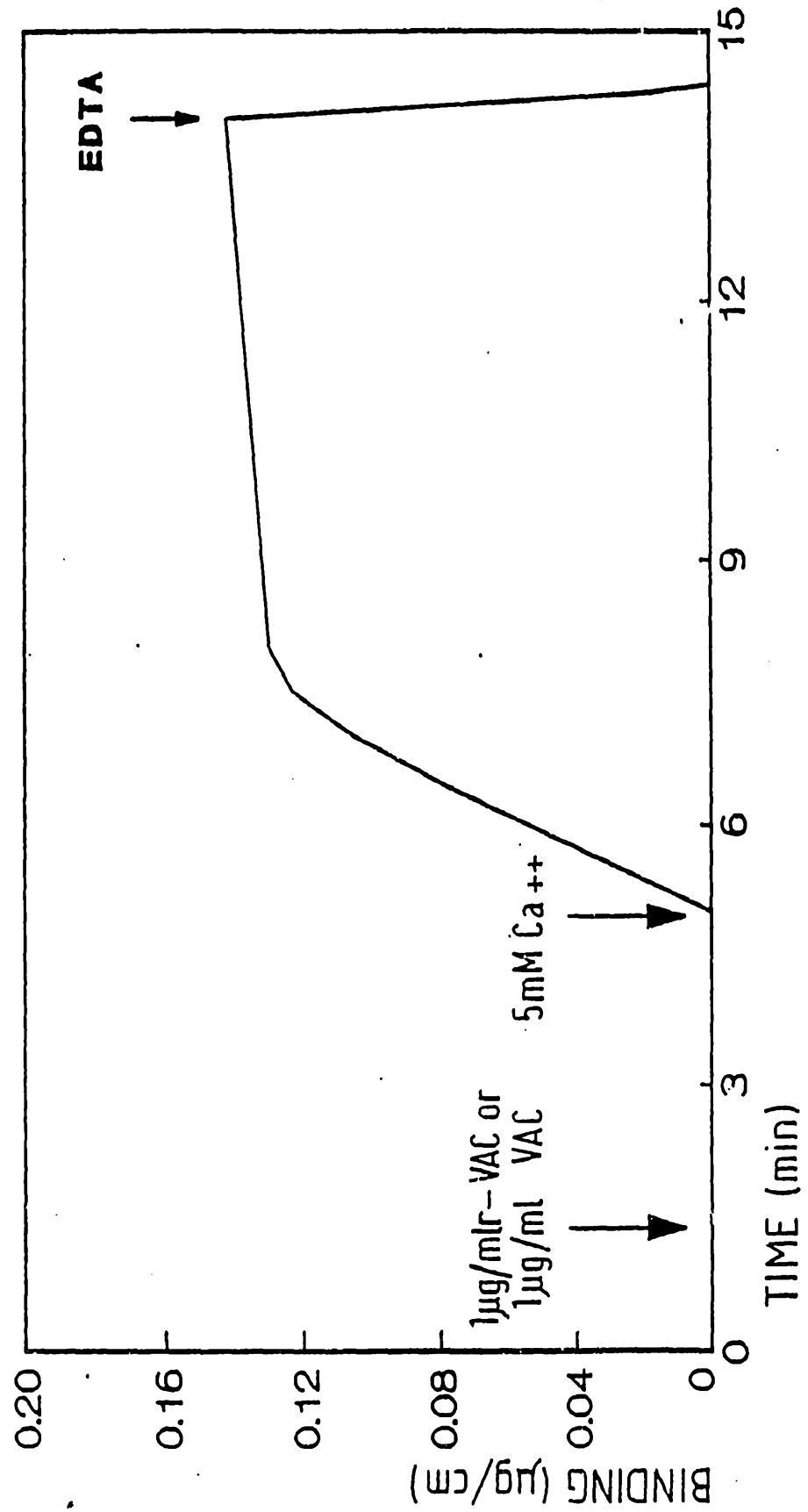
FIG. 34.

FIG. 35.



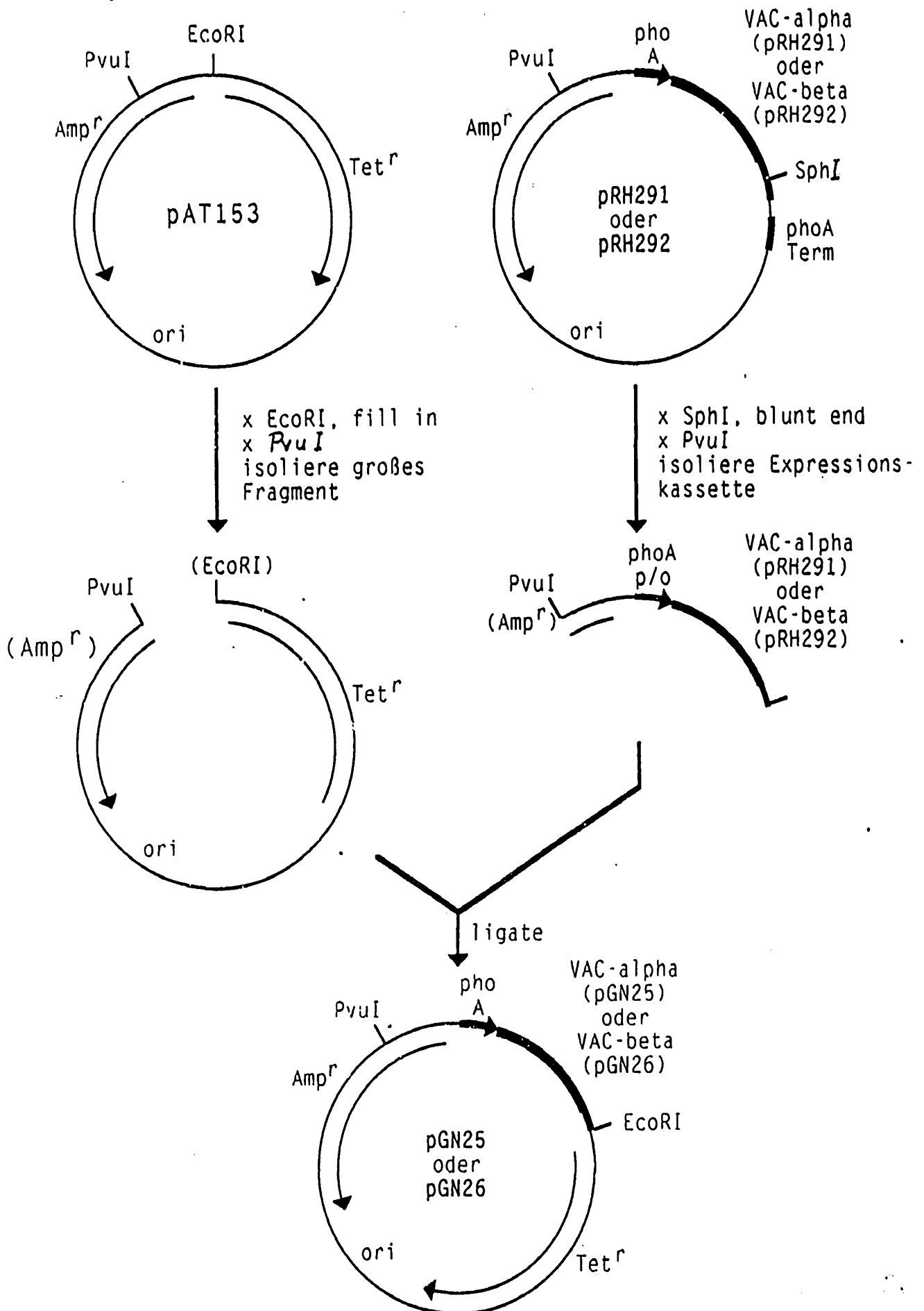
273285

FIG. 36.



28388-1016-5

Fig. 37

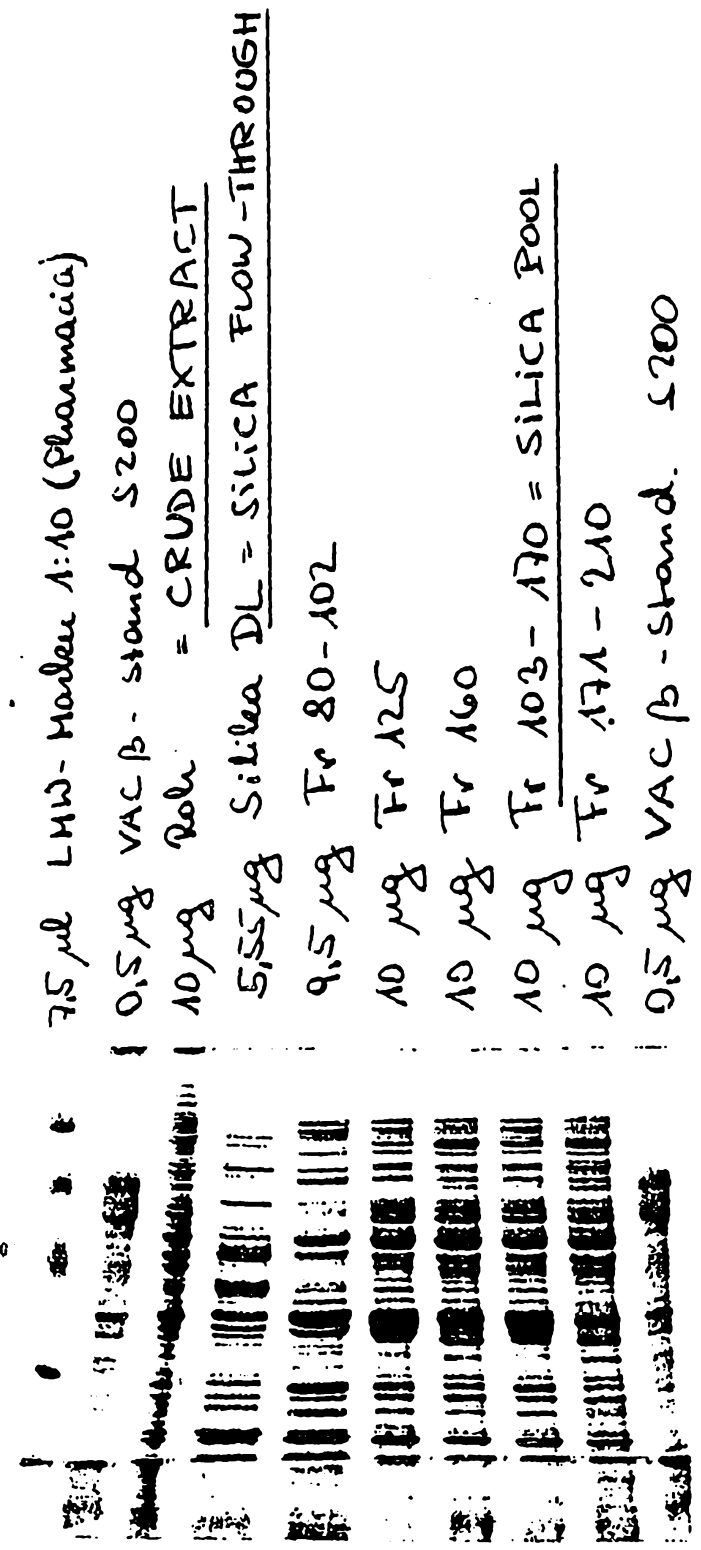


VAC β -4

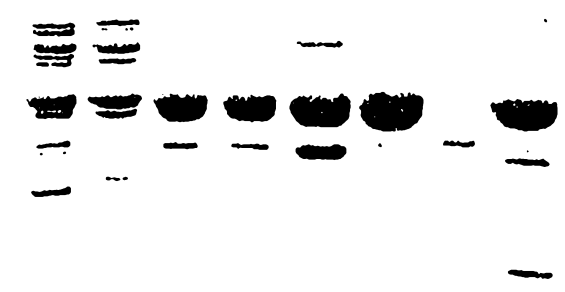
Fig. 38

12,5% SDS - PAGE

Coomassie färbung



4. VAC β in process Proben



15% SDS-PAGE
+DTT

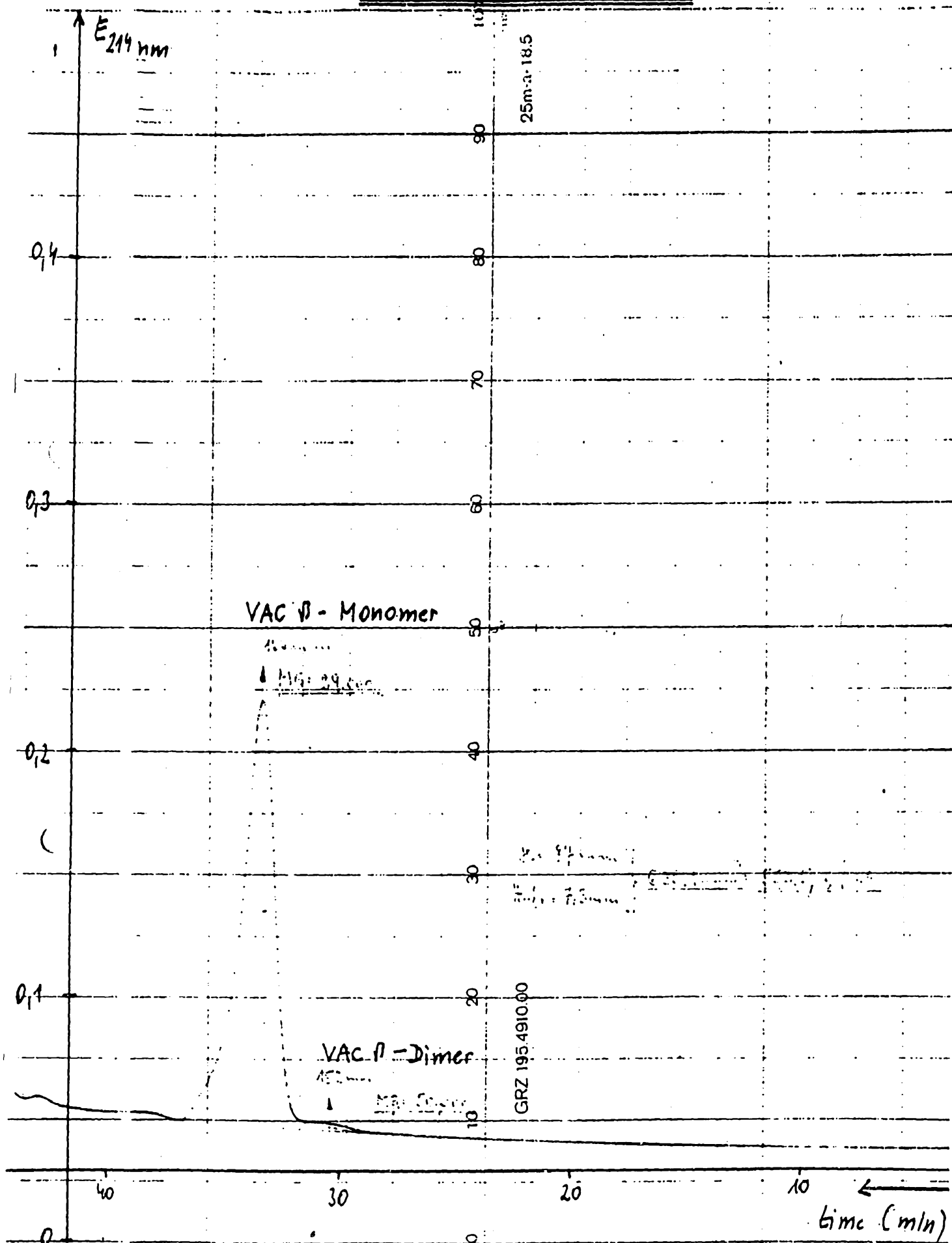
10 μ g DEAE Load $\rightarrow$
 4 μ g DEAE DL $\rightarrow$
 DEAE-FF POOL $\rightarrow$
 10 μ g DEAE FF 40-59 $\rightarrow$
 POOL CONCENTRATE $\rightarrow$
 10 μ g S200 Load $\rightarrow$
 10 μ g S200 Fr. 31+32 $\rightarrow$
 VAC- β SEPHAROSE POOL $\rightarrow$
 10 μ g S200 Fr. 33-37 $\rightarrow$
 LMW - Marker
 10 μ g VAC β -3 (18/12/87) $\rightarrow$

- 234 -

273285

GELPERMEATIONS - HPLC

Fig. 40



28328-1046.5

Fig. 41

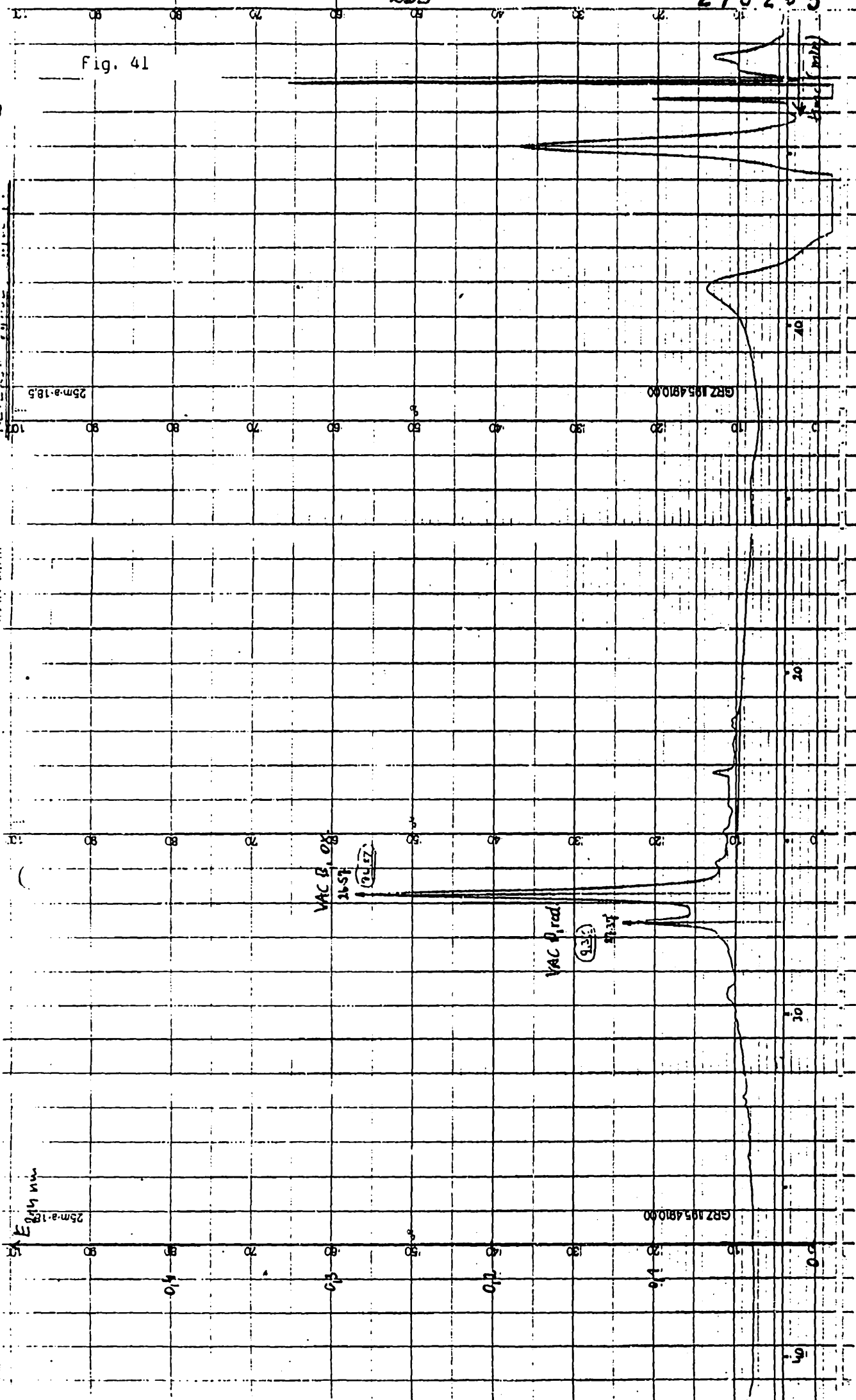
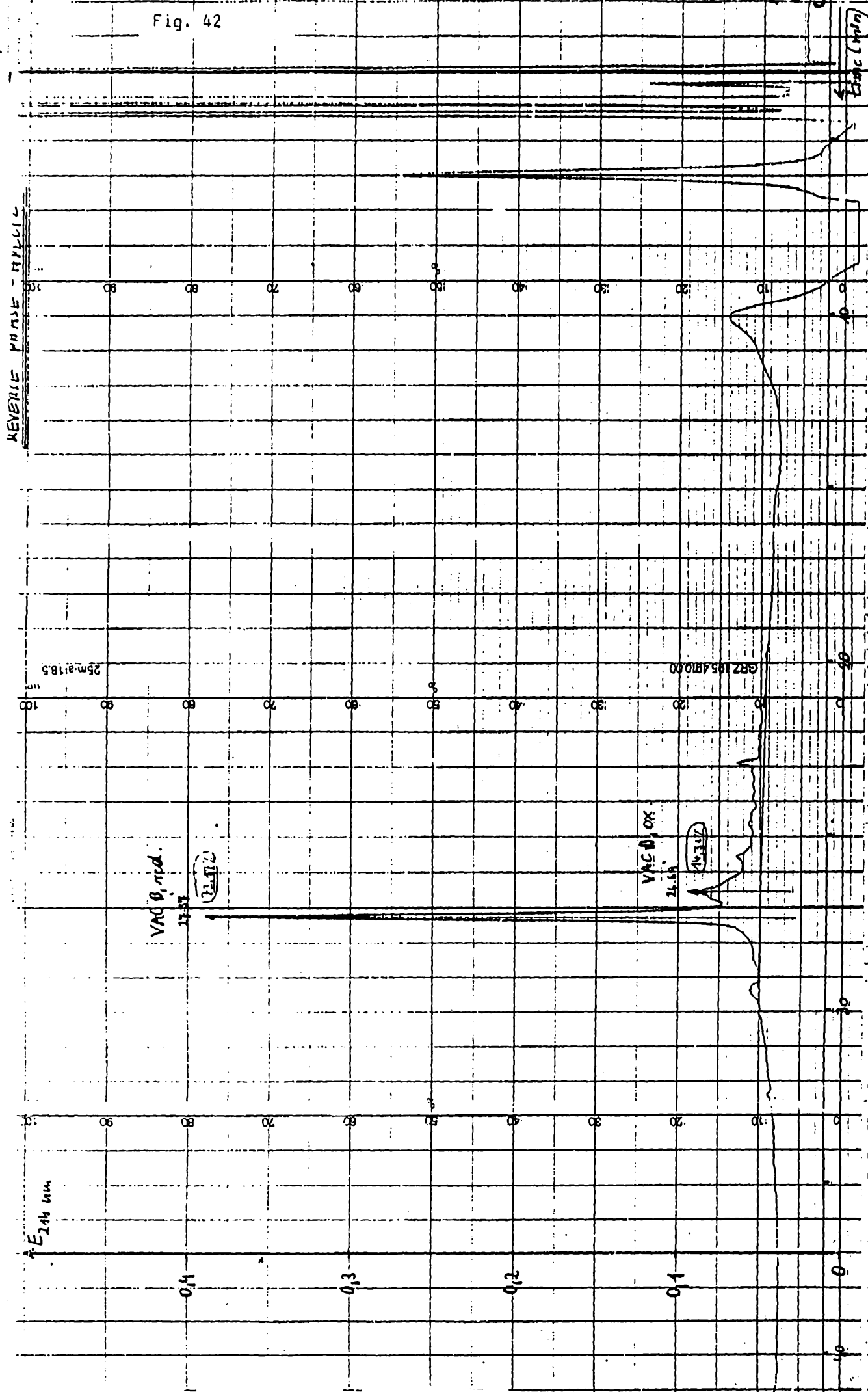


Fig. 42



BECKMAN AMINOSÄUREANALYSE

273285

01-FEB-88

Fig. 43 a

PROBE : Jvaco
 LAUFNUMMER : 22
 PROTEIN : VAC 'beta'
 CHROMATOGRAMM VON : 21.04.88 312136
 INJIZIERTES VOLUMEN : 20 µl
 STANDARDIERTE : Durchschnittswerte von Lauf 22

Name	IST (in nMol)	SOLL	rel IST (I)	rel IST (II)	rel SOLL
ASP	14.07	29	29.73	6.15	7.13
THR	11.15	21	23.45	5.03	5.25
SER	12.14	27	25.86	5.57	6.73
GLU	13.97	41	41.23	9.01	10.25
PRO	5.38	6	11.11	2.43	1.46
GLY	11.34	20	25.12	5.33	5.80
ALA	12.13	25	25.83	5.50	6.25
CYS	2.22	4	4.66	1.00	1.00
VAL	5.36	13	12.32	2.64	3.23
MET	4.61	10	3.63	2.09	2.50
ILE	9.73	23	20.59	4.41	5.73
LEU	15.63	33	33.00	7.03	8.25
TYR	6.55	14	13.77	2.35	3.50
PHE	4.40	9	9.23	1.99	2.25
HIS	2.75	6	5.73	1.24	1.50
LYS	12.96	27	26.42	5.66	6.75
NH3	18.43	0	38.77	8.31	0.00
ARG	7.23	15	15.20	3.28	3.75

Name	SOLL	korr. IST	ger. IST.	ABW	ABW(%)
ASP	29	29.23	29	+ 0.225	0.777
THR	21	23.16	23	+ 2.159	10.283
SER	27	25.84	26	- 1.361	5.042
GLU	41	41.46	41	+ 0.476	1.167
PRO	6	11.17	11	+ 5.174	86.239
GLY	20	24.81	23	+ 4.306	24.032
ALA	25	25.31	25	+ 0.315	1.260
CYS	4	4.61	5	+ 0.606	15.150
VAL	13	12.17	12	- 0.823	6.336
MET	10	9.57	10	- 0.426	4.256
ILE	23	20.33	20	- 2.674	11.626
LEU	33	32.53	32	- 0.406	1.229
TYR	14	13.60	14	- 0.401	2.862
PHE	9	9.13	9	+ 0.132	1.472
HIS	6	5.72	6	- 0.225	4.748
LYS	27	26.03	26	- 0.308	1.139
NH3	0	39.29	0	0.000	0.000
ARG	15	15.01	15	+ 0.014	0.093

AS - Sollwert := 323

AS - Istwert := 330

Gesamtabweichung := 21.20 AS / 6.56 %

Durchschnittliche Proteinmenge := 0.510 nanoMol

ALA/LEU - Proteinmenge := 0.482 nanoMol

28348-501615

-238-

20 aug

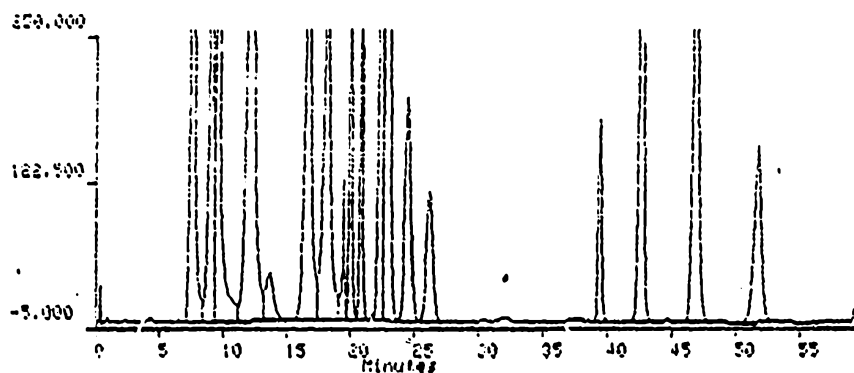
1/21/88

2:17:35

273285

Fig. 43b

Acquisition method	direct	Quantitation method	direct
Units	None	System number	1
Channel	1	Unit	-1
Injection	-1	Total injections	-1
Run time	60.00 min	Sample rate	2 per sec
Injection volume	-1 µL	Sample amount	1.00
Internal standard amt	1.00	Scale factor	1.00
Mode	Analysis	Response factors	Replace
Version	REV 4.0	Channel to calibrate	1
Description			



Peak Name	Ret. time	Area	Height	Type	Amount	RF
ASP	7.67	10249106	530326	**	10.727	1.1893e+06
THR	9.13	8054415	352489	**	7.982	1.1344e+06
GER	9.67	13162093	508530	**	9.327	1.4112e+06
GLU	12.30	21594486	781113	**	15.972	1.3520e+06
PFO	12.73	1215325	42433	**	4.469	4.2372e+05
GLY	15.50	12516849	365363	**	3.017	1.3882e+06
ALA	19.27	11631603	299150	**	3.471	1.2345e+06
CYS	19.60	1603391	124559	**	0.564	1.3584e+06
VAL	20.13	3326378	424365	**	4.445	1.1332e+06
MET	20.93	4366735	296576	**	3.499	1.3911e+06
ILE	22.47	9170392	414630	**	7.277	1.2603e+06
LEU	23.07	16274567	697357	**	11.941	1.3744e+06
TRP	24.60	6120710	125610	88	4.916	1.2592e+06
PRO	26.33	4001320	114100	88	3.306	1.2105e+06
HIS	39.93	2146100	179099	88	2.111	1.4204e+06
LYS	42.73	16209683	945200	88	9.546	1.6980e+06
ARG	46.93	12233695	414891	88	10.936	1.2190e+06
ASP	51.27	6455636	155539	88	3.202	1.2409e+06

28388-5048.5

PROBE: 3.VAC / 5 * S200 * FR 54-5P.

SEQUENCER PROGRAMM: 3PAPTH

ABBAUSCHRITTE: 1+2

PTH-AS-HPLC SIS

ABBAUSCHRITT Nr.: 3P

PTH-AS NACHWEISBAR

SIS ABBAUSCHRITT Nr.: 3P

36 μ g [nmmol] PROBE GELÖST IN 75 μ L 0.1% TFA ; 3 x 25 μ L AM SEQUENCER AUFGETRAGEN.

SEQUENZ:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 AS: 1-10 I. X_{ALA}¹⁾ - TRP - TRP - LYS - X_{ALA}¹⁾ - TRP - ILE - (GLU)²⁾ - GLN - (GLU)²⁾
 AS: 11-20 I. GLY - VAL - THR - VAL - LYS - SER - SER - SER - HIS³⁾ - (PHE) -
 AS: 21-30 I. ASN - PRO - (ASP)⁴⁾ - PRO - (ASP) - X_{ALA}¹⁾ - X_{GLU} - THR - LEU - TYR -
 AS: 31-40 I. LYS - X_{ALA}¹⁾ - MET - (LYS) - GLY - ILE - GLY - (THR) - ASN -

1) PTH-ALA NACHWEIS GESTÖRT DURCH DHPTU (BIS ZU 12000000 IV (AS8) $\hat{=}$ 10 nmol PTH-AS) [SEQUENCER-DEFECT!]

2) RETENTIONSZEITEN VERSCHOBEN VON 1.95' AUF 2.45'

3) " " 5.50' AUF 4.40'

4) " " 1.66 AUF 1.87'

MENGENABSCHÄTZUNG:

KOM- NENTE	AMINOSÄURE VON	bis	MENGE [nmol]	AUTEIL [%]
I	1	(3P)	~0.45	/
II				
III				
IV				
V				
VI				
VII				
VIII				

GESAMTMENGE: ~0.45 nmol
 (BERECHNET AUS ILE 7-8, 70% a.Y.)

VERGLEICHE MIT: 1240

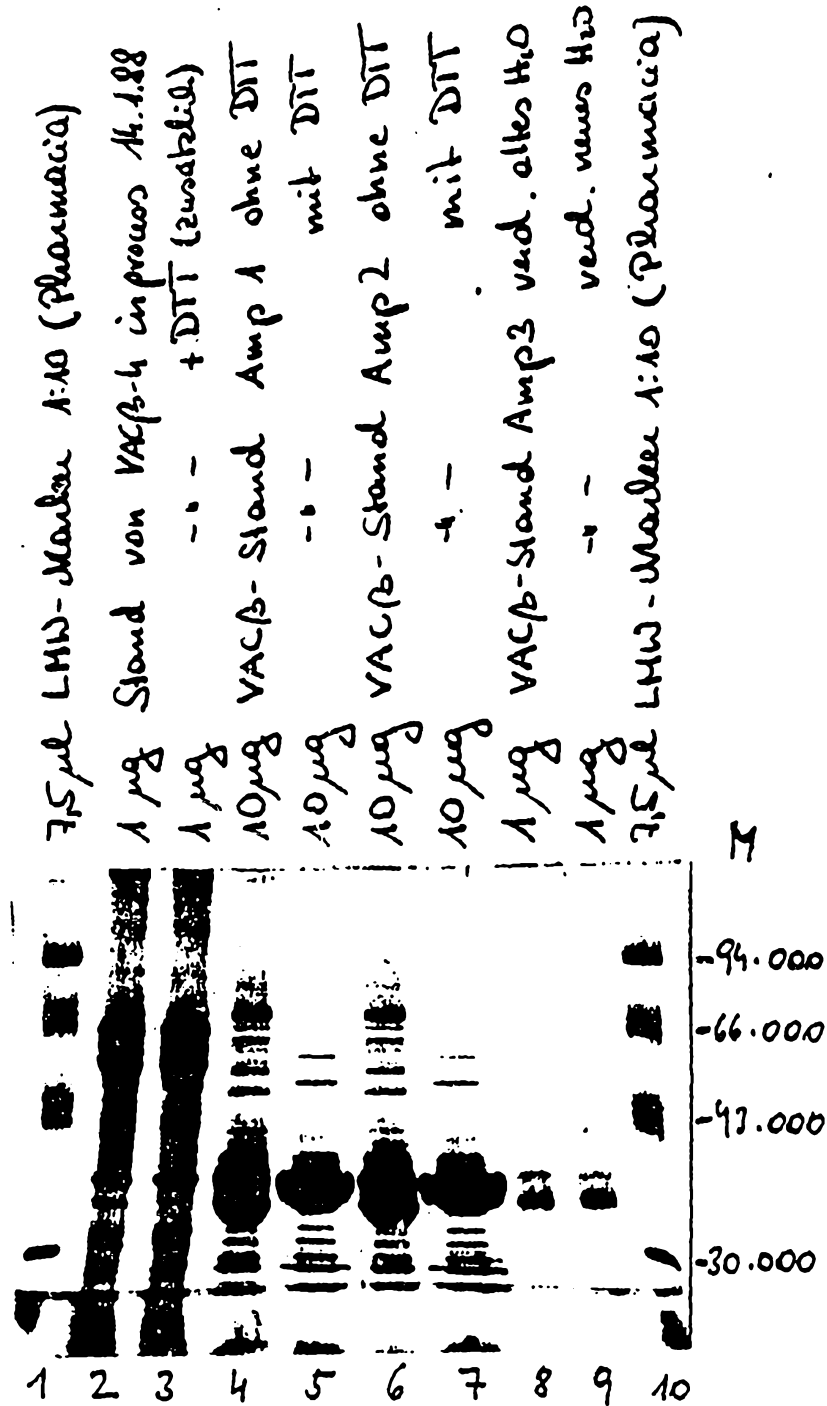
28 328-001015

VAC β - Standardvergleich

Fig. 45

12,5% SDS - PAGE

Coomassiefärbung



ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG (PAGIF)

pH - Bereich: 3.5-9.5

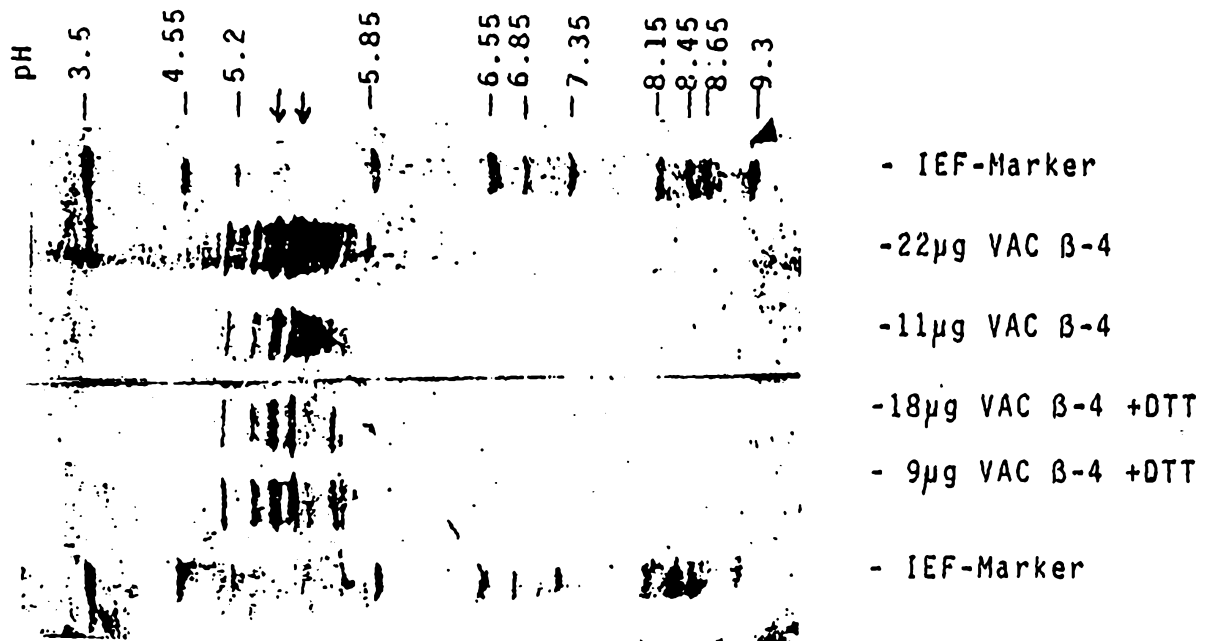
Platten-Fabrikat : LKB-PAGplate

Elektrodenlösungen: Anode 1 M Phosphorsäure

Kathode 1 M Natronlauge

Laufzeit: Präfokussierung 500 Vh

Fokussierung 3000 Vh



VAC β-4 : 1. Hauptbande pI 5.35

2. Hauptbande pI 5.45 + DTT

Fig. 46 b

ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG pH 3,5 - 9,5
mit VAC β -4 (± DTT Reduktion)

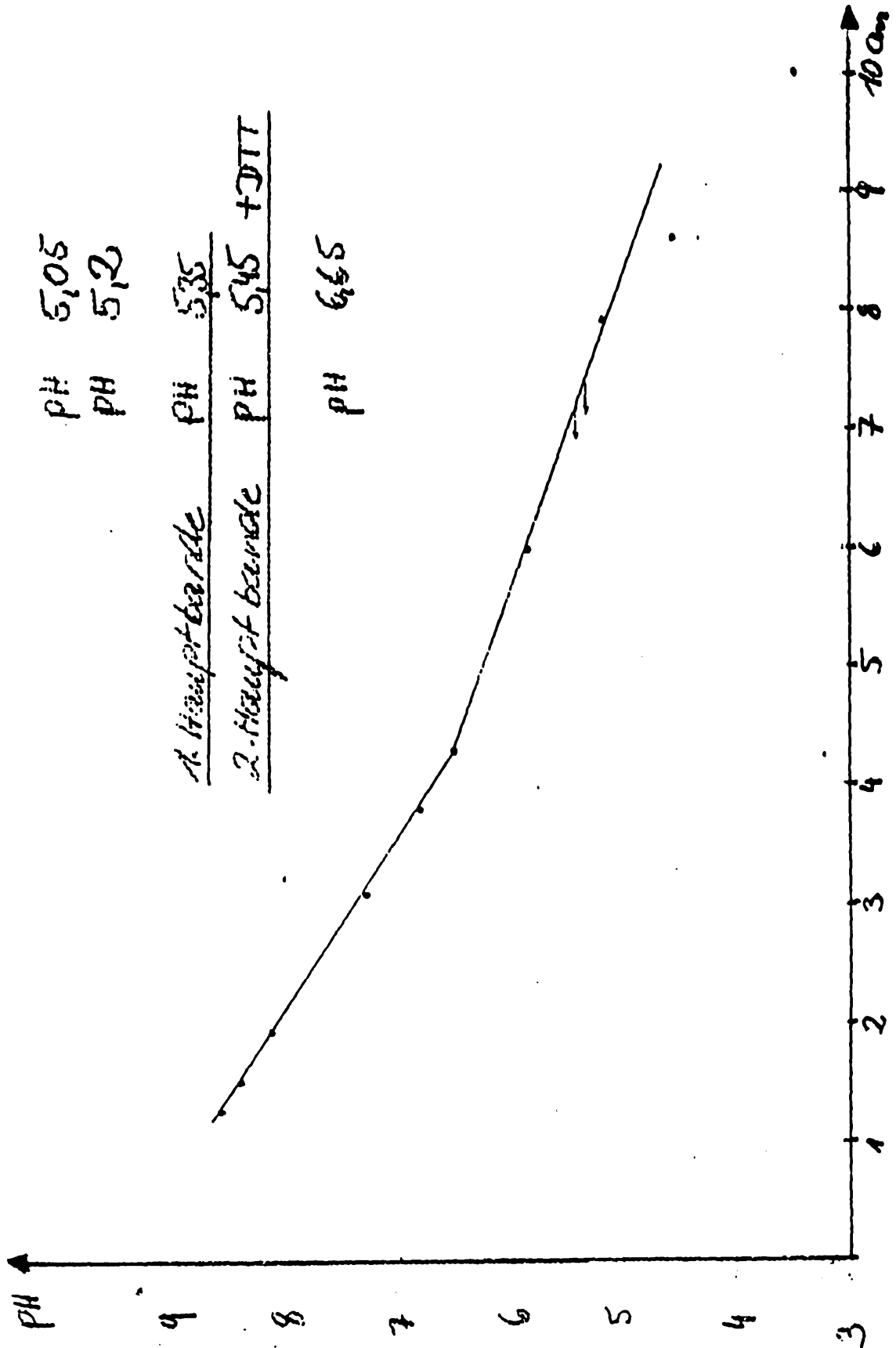


Fig. 47

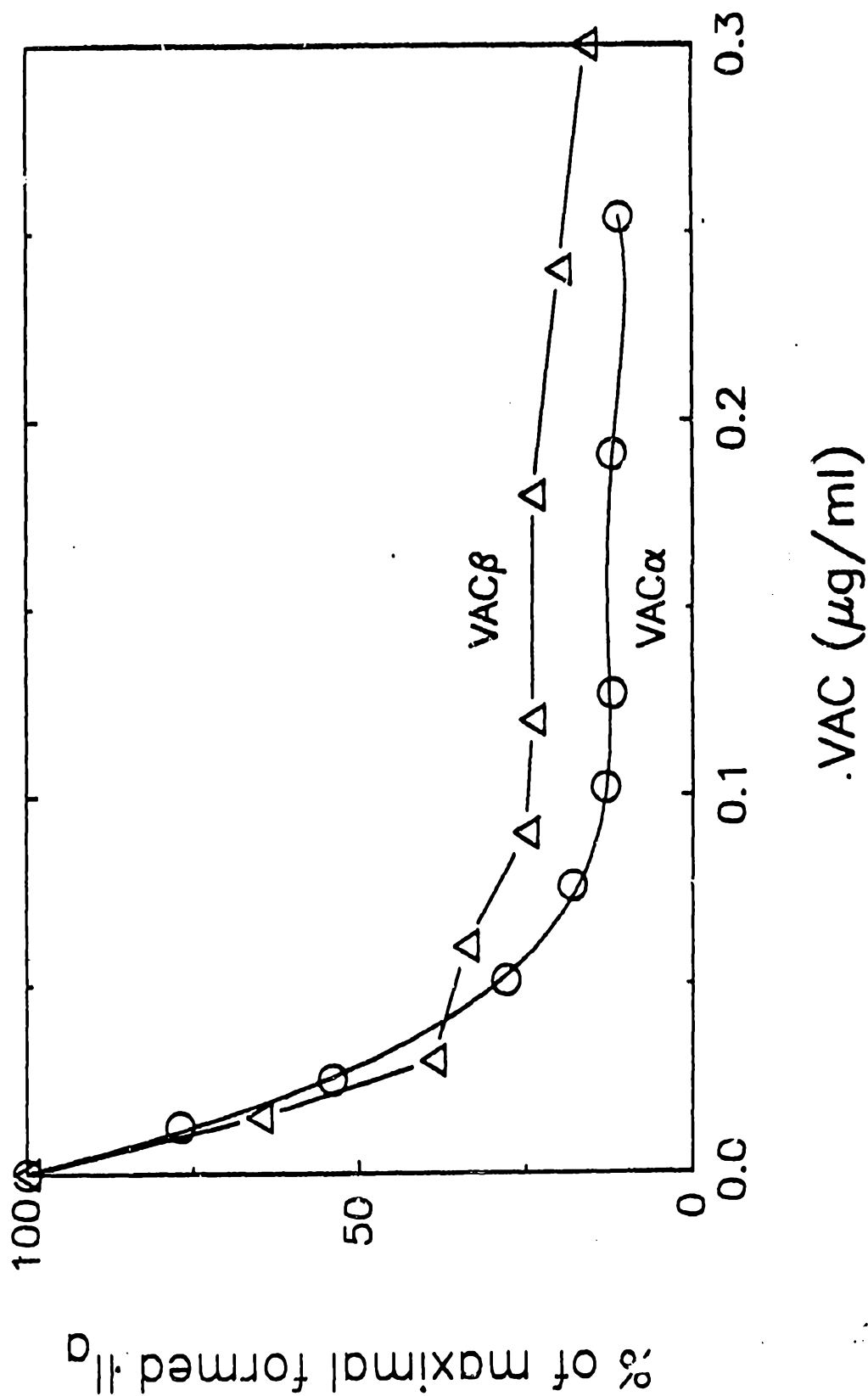


Fig. 48

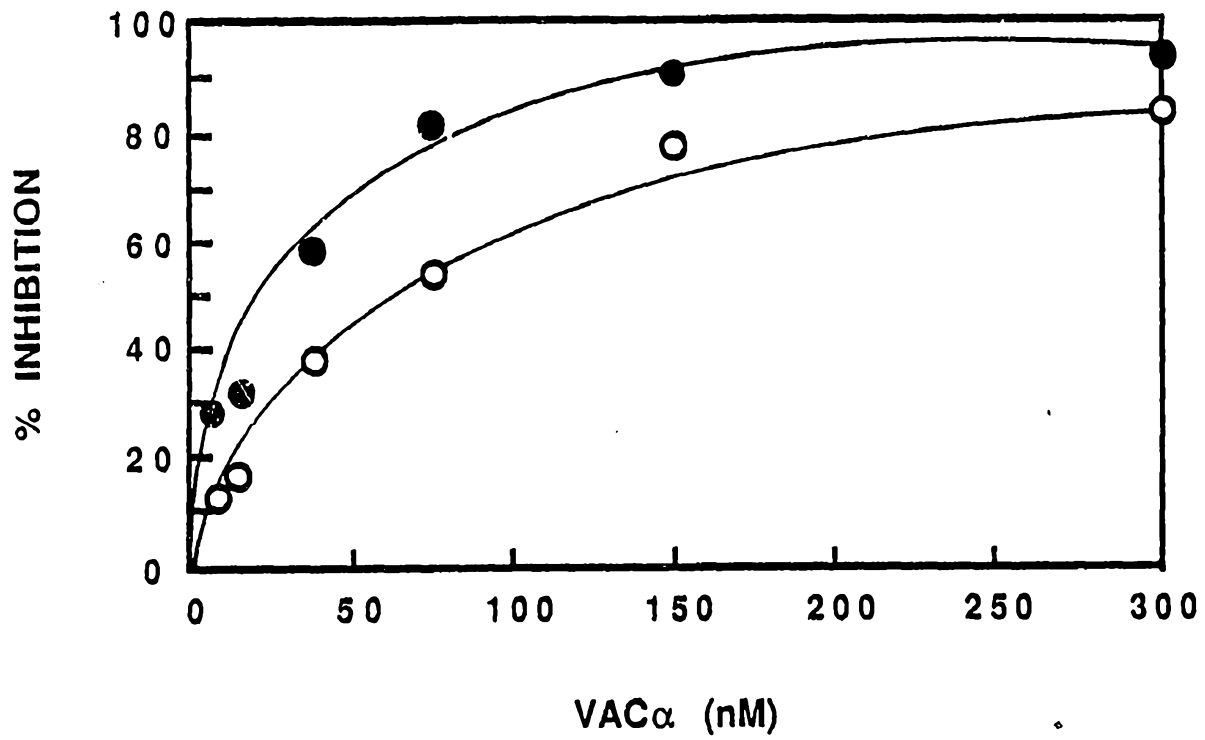


Fig. 49

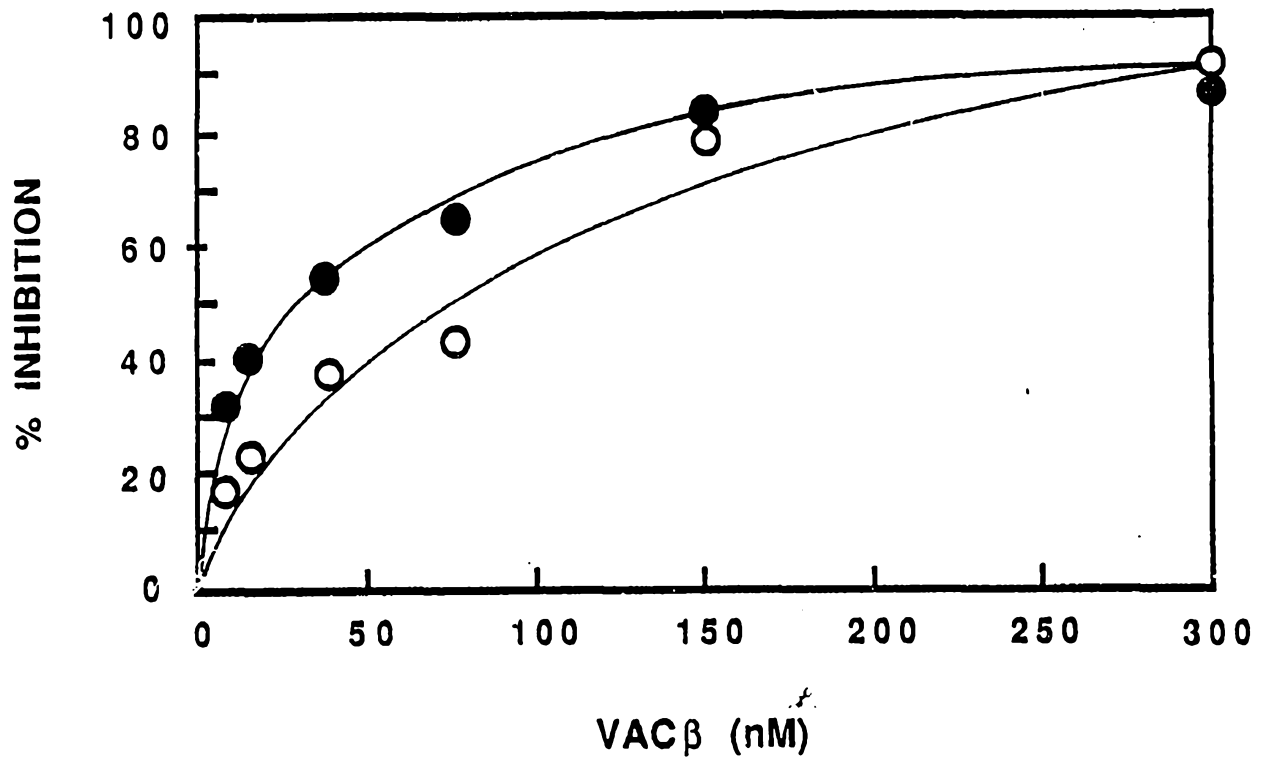


Fig. 50

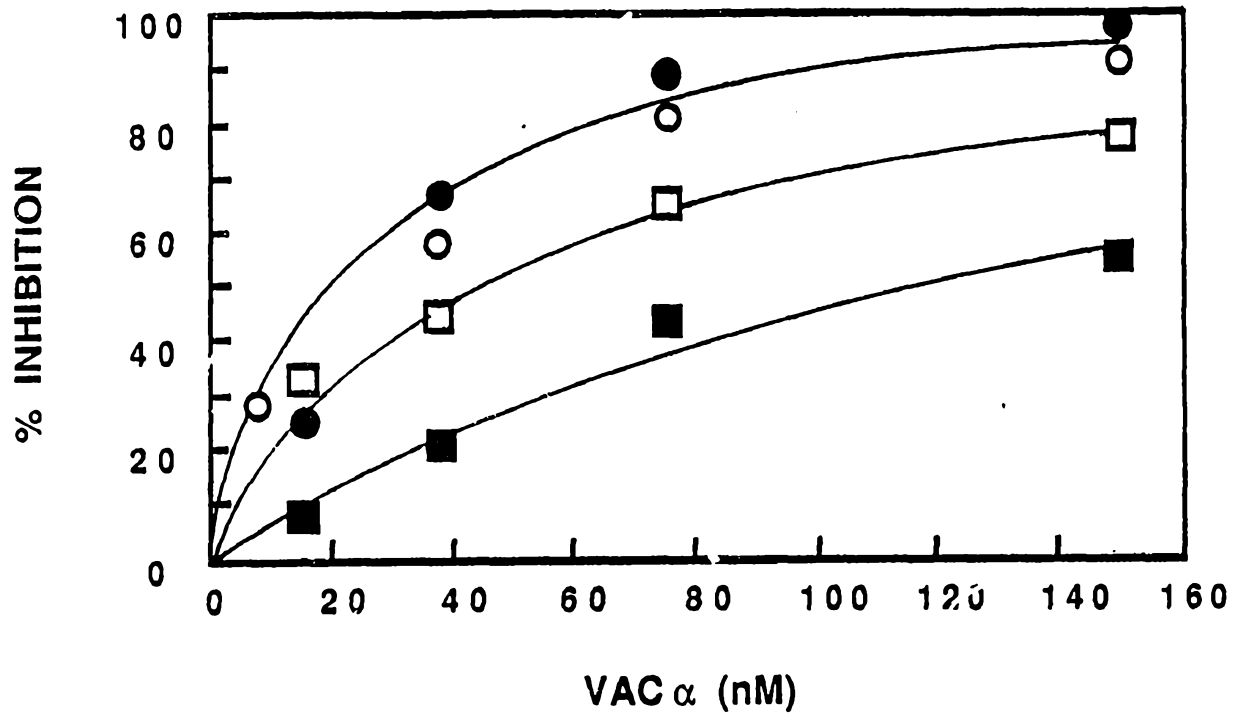


Fig. 51

