



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 38 55 921 T3** 2005.03.10

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 278 776 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **P 38 55 921.8**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **88 301 190.0**

(96) Europäischer Anmeldetag: **12.02.1988**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.08.1988**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **28.05.1997**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **14.04.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.03.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/12**

C07K 14/745, C12N 5/10, C12N 1/21

(30) Unionspriorität:

13743 12.02.1987 US

35409 07.04.1987 US

152698 05.02.1988 US

(73) Patentinhaber:

Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., US

(74) Vertreter:

Henkel, Feiler & Hänzel, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

(72) Erfinder:

Lawn, Richard Mark, San Francisco, CA 94116, US;

Wion, Karen Lynne, Millbrae, CA 94030, US; Vehar,

Gorden Allen, San Carlos, CA 94070, US

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Desoxyribonukleinsäure zur Herstellung von Gewebefaktor-Protein**

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

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft die Herstellung isolierter Desoxyribonucleinsäure (DNA) mit Kodierung für die Erzeugung von Gewebefaktorprotein; Verfahren zur Bildung von DNA-Molekülen mit Kodierung für Gewebefaktorprotein; die Expression von Humangewebefaktorprotein unter Verwendung derartiger DNA sowie neue Verbindungen, umfassend neue Nucleinsäuren, mit Kodierung für Gewebefaktorprotein oder Fragmenten hiervon. Diese Erfindung erstreckt sich auch auf Gewebefaktorproteinderivate, insbesondere Derivate, denen der nahe dem C-terminalen Ende gelegene, cytoplasmatische und/oder hydrophobe Bereich des Proteins fehlt, sowie deren Erzeugung durch rekombinante DNA-Techniken.

[0002] Blutungen stellen eine der ernsthaftesten und signifikantesten Manifestationen von Krankheit dar. Sie können von einer räumlich festgelegten Stelle ausgehen oder allgemein auftreten. Die primäre Hämostase besteht hauptsächlich aus 2 Komponenten: der Vasokonstriktion und der Plättchenpfropfbildung. Die Plättchenpfropfbildung läßt sich in mehrere Stadien unterteilen: die Plättchenadhäsion an durch ein Trauma freigelegte Subendothelflächen; die Plättchenaktivierungsfreisetzungsreaktion; die Plättchenaggregation, die zur Sequestrierung weiterer Plättchen an der Stelle führt, und die Bindung von Fibrinogen und den Koagulationsproteinen an die Plättchenoberfläche, die zur Bildung von Thrombin führt, und die Fusion, die aus der Verschmelzung von Fibrin und vereinigten Plättchen unter Bildung eines stabilen Hämostasepfropfs besteht.

[0003] Die Blutgerinnung erfüllt zwei Funktionen: die Erzeugung des die Plättchenaggregation induzierenden Thrombins und die Bildung von Fibrin, die den Blutpfropf stabilisiert. Eine Zahl diskreter Proenzyme und Prokofaktoren, die mit dem Ausdruck "Gerinnungsfaktoren" bezeichnet werden, sind am Gerinnungsprozeß beteiligt. Der Prozeß besteht aus mehreren Stufen und endet mit der Bildung von Fibrin.

[0004] Fibrinogen wird durch die Wirkung von Thrombin in Fibrin umgewandelt. Thrombin wird durch begrenzte Proteolyse eines Proenzyms, Prothrombin, gebildet. Diese Proteolyse wird durch den aktivierten Faktor X (als Faktor X_a bezeichnet), der sich an die Oberfläche aktivierter Plättchen bindet und in Gegenwart von Faktor V_a und Calciumionen Prothrombin spaltet, bewirkt.

[0005] Die Aktivierung von Faktor X kann auf einem von zwei getrennten Wegen, dem extrinsischen oder dem intrinsischen (**Fig. 1**) erfolgen. Die intrinsische Kaskade besteht aus einer Reaktionsfolge, bei der ein Protein-vorläufer zur Bildung einer aktiven Protease gespalten wird. In jeder Stufe katalysiert die neu gebildete Protease die Aktivierung der Vorläuferprotease auf der nachfolgenden Stufe der Kaskade. Ein Mangel an einem der Proteine auf diesem Weg blockiert den Aktivierungsprozeß auf dieser Stufe, wodurch die Gerinnungsbildung verhindert und typischerweise eine Neigung zu Hämorrhagie ausgelöst wird. Ein Mangel an Faktor VIII oder Faktor IX verursacht beispielsweise die starken Blutungssyndrome Hämophilie A bzw. B. Auf dem extrinsischen Weg der Blutgerinnung wird Gewebefaktor, der auch als Gewebethromboplastin bezeichnet wird, aus geschädigten Zellen freigesetzt, und dieser aktiviert in Gegenwart von Faktor VII und Calcium Faktor X. Obwohl man ursprünglich der Meinung war, daß die Aktivierung von Faktor X die einzige durch Gewebefaktor und Faktor VII katalysierte Reaktion darstellt, ist nun bekannt, daß zwischen Faktor X, Faktor VII und Faktor IX eine Verstärkungsschleife existiert (Osterud, B., S.I. Rapaport, "Proc. Natl. Acad. Sci.", [USA] 74: S. 5260–5264 [1977]; Zur, M. et al., "Blood", 52: 198 [1978]). Jede der Serinproteasen in diesem Schema ist zur Umwandlung der anderen beiden in die aktivierte Form durch Proteolyse fähig, wodurch das Signal in dieser Stufe des Gerinnungsprozesses verstärkt wird (**Fig. 1**). Man hält nun tatsächlich den extrinsischen Weg für den physiologischen Hauptweg der normalen Blutgerinnung ("Haemostasis", 13: S. 150–155 [1983]). Da sich Gewebefaktor normalerweise nicht im Blut findet, erfolgt keine kontinuierliche Verklumpung bzw. Gerinnungsbildung des Systems; der Auslöser der Gerinnung sollte daher die Freisetzung von Gewebefaktor aus geschädigtem Gewebe sein.

[0006] Gewebefaktor ist vermutlich ein integrales Membranglycoprotein, das nach der obigen Diskussion die Blutgerinnung über den extrinsischen Weg auslösen kann (Bach, R. et al., "J. Biol. Chem.", 256 [16]: S. 8324–8331 [1981]). Der Gewebefaktor besteht aus einer Proteinkomponente (früher als Gewebefaktorapoprotein-III bezeichnet) und einem Phospholipid (B. Osterud, S.I. Rapaport, "Proc. Natl. Acad. Sci.", 74, S. 5260–5264 [1977]). Der Komplex wurde auf den Membranen von Monocyten und verschiedenen Zellen der Blutgefäßwände gefunden (B. Osterud, "Scand. J. Haematol.", 32: S. 337–345 [1984]). Für Gewebefaktor aus verschiedenen Organen und Arten wurde eine relative Molekülmasse von 42.000 bis 53.000 berichtet. Human-gewebethromboplastin wurde aus in eine Phospholipiddoppelschicht mit einem optimalen Verhältnis von Gewebefaktorprotein : Phospholipid von etwa 1 : 80 eingefügtem Gewebefaktorprotein bestehend beschrieben (Lyberg, T., Prydz, H., "Nouv. Rev. Fr. Hematol.", 25(5): S. 291–293 [1983]). Über die Reinigung von Gewebefaktor aus verschiedenen Geweben, wie Menschenhirn (Guha, A. et al., "Proc. Natl. Acad. Sci.", 83: S.

299–302 [1986]; Broze, G.H. et al., "J. Biol. Chem.", 260[20]: S. 10917–10920 [1985]; Rinderhirn (Bach, R. et al., "J. Biol. Chem.", 256: S. 8324–8331 [1981]); Humanplazenta (Bom, V.J.J. et al., "Thrombosis Res.", 42: S. 635–643 [1986]; Andoh, K. et al., "Thrombosis Res.", 43: S. 275–286 [1986]); Schafshirn (Carlsen E. et al., "Thromb. Haemostas", 48 [3], S. 315–319 [1982]), und Lunge (Glas, P.; Astrup, T., "Am. J. Physiol.", 219, S. 1140–1146 [1970]) wurde berichtet. Es wurde gezeigt, daß Rinder- und Humangewebethromboplastin bezüglich Größe und Funktion identisch sind (vergleiche Broze, G.H. et al., "J. Biol. Chem.", 260 [20], S. 10917–10920 [1985]). Es wird gemeinhin akzeptiert, daß zwischen den Spezies Unterschiede in der Struktur von Gewebefaktorprotein bestehen, nach der Messung von in-vitro-Gerinnungsansätzen jedoch keine funktionellen Unterschiede bestehen (Guha et al., s.o.). Ferner zeigte sich, daß aus verschiedenen Geweben eines Tieres, zum Beispiel Hundehirn, -lunge, -arterien und -venen, isolierter Gewebefaktor in mancher Hinsicht, z.B. bezüglich des Extinktionskoeffizienten, des Gehalts an Stickstoff und Phosphor und des optimalen Phosphorlipid/Lipid-Verhältnisses, ähnlich war, jedoch bezüglich der Molekülgröße, des Aminosäuregehalts, der Reaktivität gegenüber Antikörpern und der Plasmahalbwertszeit geringe Unterschiede aufwies (Gonmori, H.; Take-da, Y., "J. Physiol.", 229 [3], S. 618–626 (1975)). Alle Gewebefaktoren der verschiedenen Hundeorgane zeigten in Gegenwart von Lipid Verklumpungsaktivität. Es wurde in großem Umfang akzeptiert, daß Gewebefaktor zur Entfaltung biologischer Aktivität mit Phospholipiden in vitro assoziiert sein muß (Pitlick, F.A.; Nemerson, Y., "Biochemistry", 9: S. 5105–5111 [1970]; Bach, R. et al., s. oben 8324). Es wurde gezeigt, daß die Entfernung der Phospholipid-Komponente von Gewebefaktor durch beispielsweise Verwendung einer Phospholipase zu einem Verlust von dessen biologischer Aktivität in vitro führt (Y. Nemerson, "J.C.I.", 47: S. 72–80 [1968]). Eine Relipidierung kann die Aktivität von Gewebefaktor in vitro wiederherstellen (Pitlick, F.A.; Nemerson Y., s. oben; Freyssinet, J.M. et al., "Thrombosis and Haemostasis", 55: S. 112–118 [1986]). Es wurden aminoterminalen Sequenzen von Gewebefaktor (Bach, R. et al., "Am. Heart Assoc." [Nov. 1986]; Morrissey J.H. et al., "Am. Heart Assoc." [Nov. 1986]) und ein CNBr-Peptidfragment (R. Bach et al. s. oben) bestimmt.

[0007] Es wurde lange geglaubt, daß die Infusion von Gewebefaktor die normale Hämostase beeinträchtigt. Im Jahr 1834 stellte der französische Physiologe De Blainville zum ersten Mal fest, daß Gewebefaktor direkt zur Blutgerinnung beiträgt (De Blainville, H., "Gazette Medicale Paris", Series 2, S. 524 [1834]). De Blainville beobachtete ferner, daß die intravenöse Infusion einer Hirngewebesuspension unmittelbar zum Tod führte, wobei dies nach seiner Beobachtung mit einem Hyperkoagulationszustand, der zu extensiv gestreuten Blutgerinnseln, die man bei der Autopsie fand, führte, korreliert war. Es ist nun allgemein akzeptiert, daß die intravenöse Infusion von Gewebethromboplastin eine intravaskuläre Koagulation induziert und bei verschiedensten Tieren Tod verursachen kann (Hunde: Lewis, J.; Szeto I.F., "J. Lab. Clin. Med.", 60: S. 261–273 [1962]; Kaninchen: Fedder, G. et al., "Thromb. Diath. Haemorrh.", 27: S. 365–376 [1972]; Ratten: Giercksky, K.E. et al., "Scand. J. Haematol.", 17: S. 305–311 [1976], und Schafe: Carlsen, E. et al., "Thromb. Haemostas.", 48: S. 315–319 [1982]).

[0008] Trotz der Beschreibung der Isolierung von Gewebefaktor in der Literatur, wie das oben geschildert ist, wurde die genaue Struktur von Gewebefaktorprotein bisher nicht festgestellt. Zwar stand bisher eine gewisse Menge an "gereinigtem" Gewebefaktorprotein entsprechend der Gewinnung aus verschiedensten Geweben zur Verfügung; es bleibt jedoch wegen der geringen Konzentration von Gewebefaktorprotein in Blut und Geweben und der sowohl in wirtschaftlicher als auch in arbeitsmäßiger Hinsicht hohen Kosten zur Reinigung des Proteins aus Geweben ein seltenes Material. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Isolierung von DNA mit Kodierung für Gewebefaktorprotein und die Herstellung geeigneter Mengen an Humangewebefaktorprotein unter Verwendung von Rekombinationstechniken. Eine weitere Aufgabe ist die Herstellung neuer Formen von Gewebefaktorprotein. Diese und andere Aufgaben der Erfindung werden aus der Beschreibung als Ganzes ersichtlich.

[0009] Die Aufgaben dieser Erfindung können durch ein Verfahren, umfassend Identifizieren und Klonieren der cDNA mit Kodierung für Humangewebefaktorprotein; Einführen dieser cDNA in einen rekombinanten DNA-Vektor; Transformation eines geeigneten Wirts mit dem diese DNA enthaltenden Vektor; Expressieren der Humangewebefaktorprotein-DNA in einem derartigen Wirt, und Gewinnung des hergestellten Humangewebefaktorproteins, gelöst werden. In ähnlicher Weise ermöglicht die vorliegende Erfindung die Erzeugung von Humangewebefaktorprotein und/oder Derivaten hiervon durch Rekombinationstechniken sowie die Bereitstellung von auf eine derartige Produktion von Humangewebefaktorprotein gerichteten Produkten und Verfahren. Die Isolierung und Identifizierung und Sequenzierung der Gewebefaktorprotein-DNA war problematisch. Die mRNA war relativ selten, und es war bisher keine vollständige Aminosäuresequenz für Gewebefaktorprotein bekannt.

[0010] Die vorliegende Erfindung erstreckt sich auf die Zusammensetzungen und Verfahren zur Erzeugung von Humangewebefaktorprotein mittels rekombinanter DNA-Technologie, umfassend: 1. die Isolierung und

Identifizierung der gesamten DNA-Sequenz des Proteins und des diese 5'- und 3'-flankierenden Bereichs; 2. den Aufbau von diese DNA-Sequenz enthaltenden Klonierungs- und Expressionsvehikeln, wodurch die Expression von Humangewebefaktorprotein möglich wird, sowie Methionin-, Fusions- oder N-Terminus-Signal-konjugaten hiervon, und 3. Lebzellkulturen, die durch das Enthalten derartiger Vehikel genetisch verändert und zur Erzeugung von Humangewebefaktorprotein fähig sind. Diese Erfindung erstreckt sich ferner auf DNA-Zusammensetzungen und Verfahren zur Erzeugung von DNA mit Kodierung für die Zellproduktion von Humangewebefaktorprotein. Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung sind neue Verbindungen, umfassend DNA-Sequenzen, die zur Bildung von für Gewebefaktorprotein kodierenden Klonen verwendet werden. Diese Erfindung erstreckt sich ferner auf neue Gewebefaktorproteinderivate, insbesondere Derivate, denen die Signalsequenz und der hydrophobe Bereich des Proteins in der Nähe des C-terminalen Proteinendes, der die Gewebefaktorproteintransmembran oder membranbindende Domäne bildende Aminosäuresequenz umfaßt, fehlt.

[0011] Die Nützlichkeit des erfindungsgemäßen Humangewebefaktorproteins und von dessen Derivaten beruht zum Teil auf der neuen und unerwarteten Beobachtung, daß die Infusion von Gewebefaktorprotein, d.h. dem Proteinbereich von Gewebefaktor, dem das natürlicherweise vorkommende Phospholipid fehlt, was bisher als Gewebefaktorapoprotein III bezeichnet und für inaktiv gehalten wurde, bei hämophilen Hunden den hämostatischen Mangelzustand ausglich. Es zeigte sich zum ersten Mal, daß Gewebefaktorprotein die mit einem in-vivo-Mangel an Faktor VIII verbundene Blutungsdiathese, d.h. eine Neigung zu Hämorrhagie, ausgleichen kann. Im Hinblick auf Veröffentlichungen des Standes der Technik, nach denen für Gewebefaktor Phospholipid absolut erforderlich ist, erwartete man, daß die Infusion von Gewebefaktorprotein unwirksam ist. Im Gegensatz zur Arbeit von De Blainville und den in den nächsten einhundertzweiundfünfzig (152) Jahren folgenden Forschern erwies sich das Gewebefaktorprotein ferner bei intravenöser Infusion in Hunde als nicht toxisch.

[0012] Das Humangewebefaktorprotein und dessen Derivate in dieser Erfindung eignen sich zur Behandlung verschiedenster, chronischer Blutungsstörungen, die durch eine sowohl ererbte als auch erworbene Neigung zu Hämorrhagie charakterisiert sind. Beispiele für derartige, chronische Blutungsstörungen sind Mangelzustände der Faktoren VIII, IX oder XI. Beispiele für erworbene Störungen umfassen: erworbene Hemmung gegenüber Blutkoagulationsfaktoren, z.B. Faktor VIII; von-Willebrand-Faktor; Faktor IX, V, XI, XII und XIII; eine Haemostasestörung als Folge einer Abnahme der Synthese von Koagulationsfaktoren und DIC umfassenden Leberkrankheit; mit einem Mangel an Koagulationsfaktor und DIC umfassenden, akuten und chronischen Nierenkrankheiten in Verbindung stehende Blutungsneigung; Haemostase nach Trauma oder chirurgischem Eingriff; Patienten mit sich bei DIC mit einer Zunahme von Faktor VIII von-Willebrand-Faktor und Fibrinogen manifestierender, gestreuter Bösartigkeit, und Haemostase während eines chirurgischen Herz-Lungen-Eingriffs und massiver Bluttransfusion. Das Humangewebefaktorprotein und dessen Derivate gemäß dieser Erfindung können ferner zur Induzierung der Gerinnung bei akuten Blutungsproblemen bei normalen Patienten und bei Patienten mit chronischen Blutungsstörungen eingesetzt werden. Andere Einsatzmöglichkeiten für Gewebefaktorprotein sind den Fachleuten bekannt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0013] Fig. 1 Darstellung der Aktivierung der Blutgerinnung auf dem intrinsischen Weg in einem Diagramm.

[0014] Fig. 2 Nucleotid- und Aminosäuresequenz von Humangewebefaktorprotein. Die Nucleotidsequenz von Humangewebefaktorprotein wurde durch DNA-Sequenzanalyse eines Fettgewebeklons bestimmt und zum Teil durch die Sequenzierung anderer Klone bestätigt. Die vorhergesagten Aminosäuren für das Gewebefaktorprotein sind unter der DNA-Sequenz angegeben und vom ersten Rest des Amino-Terminus der Proteinsequenz ausgehend numeriert. Negative Aminosäurezahlen beziehen sich auf die angenommene Führungssignalsequenz oder das Prä-Protein, während sich positive Zahlen auf das reife Protein beziehen.

[0015] Fig. 3a–3c (Hier zusammengenommen als Fig. 3 bezeichnet): Humangewebefaktorprotein-cDNA und Restriktionsenzymstellen.

[0016] Fig. 4 Aufbau eines Expressionsvektors pCISTF mit Kodierung für Gewebefaktorprotein in voller Länge zum Einsatz in Säugetierwirtszellen.

[0017] Fig. 4a Veranschaulichung eines Teils des Aufbaus der hier verwendeten Vektoren der pCIS2.8c-Serie.

[0018] Fig. 5 Hydropathie-Profil von Gewebefaktor. Die translatierte DNA-Sequenz von Humangewebefaktor

wurde unter Verwendung des Algorithmus von Kyte und Doolittle, "J. Mol. Biol.", 157: S. 105 (1982) aufgetragen. Die Abszisse gibt die am reifen Amino-Terminus beginnende Aminosäuresequenz an. Positive Punkte auf der Ordinate bezeichnen hydrophobe Bereiche des Proteins; die einzelnen Punkte stellen die mittlere Hydrophathie von sechs aufeinanderfolgenden Aminosäuren dar. Unten bezeichnet N die Lage der vorhergesagten, Asparagin-gebundenen Glycosylierungsstellen und O den Cluster von Serin- und Threoninresten bei den Aminosäuren 160–172. Der vorhergesagte, die hydrophobe Membran umspannende Bereich umfaßt die Reste 220–243 und wird durch einen gefüllten Balken angezeigt.

[0019] Fig. 6 Aufbau eines Expressionsvektors pTF 2A12 mit Kodierung für Gewebefaktorprotein der vollen Länge.

[0020] Fig. 7a–7c (Fig. 7a–7c werden hier zusammengekommen als Fig. 7 bezeichnet): Aufbau einer Gewebefaktorprotein-Mutante, bei der ein Cystein an Position 245 durch ein Serin substituiert ist.

[0021] Fig. 8a–8b (Die Fig. 8a–8b sind hier zusammengekommen als Fig. 8 bezeichnet): Aufbau bzw. Konstruktion eines Expressionsvektors für Humangewebefaktor-Fusionsprotein.

[0022] Fig. 9 Ergebnisse eines chromogenen Tests der transienten Expression von Gewebefaktorprotein in Cos-Zellen.

[0023] Fig. 10 Aufbau eines Expressionsvektors für Gewebefaktorprotein mit deletierter, cytoplasmatischer Domäne.

Detaillierte Beschreibung

[0024] Der hier verwendete Ausdruck "Gewebefaktorprotein" bezieht sich auf ein Protein, das beispielsweise durch Induzieren der Gerinnung verschiedene Blutungsstörungen, insbesondere mit Mangel an Gerinnungsfaktoren in Zusammenhang stehende Störungen beseitigen kann. Das Gewebefaktorprotein unterscheidet sich vom Gewebefaktor oder Gewebethromboplastin des Standes der Technik darin, daß ihm der natürlicherweise vorkommende Lipidbereich des Moleküls fehlt. Das Gewebefaktorprotein umfaßt auch mit Phospholipid verbundenes Gewebefaktorprotein, wobei sich dieses Lipid vom natürlicherweise vorkommenden, mit Gewebethromboplastin in Verbindung stehenden Lipid unterscheidet und die Fähigkeit zur Induktion von Gerinnung ohne die beim lipidierten Protein beobachtete, hiermit einhergehende Toxizität aufweist. Die Infusion von Gewebefaktorprotein nach der hier gegebenen Definition führt nicht zu einer gestreuten, intravaskulären Koagulation. Die Fähigkeit von Gewebefaktorprotein zur Beseitigung verschiedenster Blutungsstörungen läßt sich ohne Probleme unter Verwendung verschiedenster in-vivo-Blutungsmodelle, z.B. der Auslösung von Gerinnung in haemophilen Hunden unter Verwendung der Bestimmung der Cuticulablutungszeit (CBT) (Giles, A.R. et al., "Blood", 60: S. 727–730 [1982]) bestimmen.

[0025] Die Aminosäuresequenz von **Fig. 2** stellt die Sequenz des Prä-Gewebefaktorproteins dar. Das Prä-Gewebefaktorprotein kann beispielsweise in Prokaryoten, die reifes Protein nicht verarbeiten und sezernieren, durch Transformation mit einem DNA mit Kodierung für Prä-Gewebefaktorprotein umfassenden Expressionsvektor exprimiert werden.

[0026] Vorzugsweise werden Wirtszellen mit der Eignung zur Durchführung eines derartigen Verfahrens zur Bildung von reifem Gewebefaktorprotein im Kulturmedium oder Periplasma der Wirtszelle transformiert. Typischerweise sind Wirtszellen aus höheren Eukaryoten, wie Säugetierzellen, zur Verarbeitung von Prä-Gewebefaktorprotein und zur Sezernierung von reifem Gewebefaktorprotein bei Transformation mit DNA mit Kodierung für Prä-Gewebefaktorprotein fähig.

[0027] Alternativ kann sezerniertes, reifes Gewebefaktorprotein durch Verbinden bzw. Ligieren des 5'-Endes der DNA mit Kodierung für reifes Gewebefaktorprotein mit dem 3'-Ende von DNA mit Kodierung für eine von der Wirtszelle erkannte Signalsequenz erhalten werden. Ein die verbundenen DNA-Sequenzen umfassender Expressionsvektor wird zur Transformation der Wirtszellen verwendet. Die Wirtszelle verarbeitet das exprimierte Fusionsprotein, indem sie proteolytisch die Peptidbindung zwischen der Signalsequenz und der ersten Aminosäure des Gewebefaktorproteins spaltet und das reife Gewebefaktorprotein in das Periplasma der Wirtszelle oder in das Medium, entsprechend der in Frage kommenden Wirtszelle, sezerniert. Beispielsweise wird zum Aufbau eines prokaryotischen Expressionsvektors der Humangewebefaktorprotein-Sezernierungsleitabschnitt bzw. -leader, d.h. die Aminosäuren –32 bis –1, durch die Bakterien-Alkaliphosphatase oder die wärmestabilen Enterotoxin-II-Leitabschnitte, ersetzt und bei Hefe der Gewebefaktorprotein-Leitabschnitt durch Hefeinvertase,

alpha-Faktor oder Säurephosphatase-Leitabschnitte ersetzt. Mit einer homologen Signal/Gewebefaktorprotein-Fusion transformierte, gramnegative Organismen sezernieren reifes Gewebefaktorprotein in das Zellperiplasma, während Hefe oder *Bazillus* sp. reifes Gewebefaktorprotein in das Kulturmedium sezernieren.

[0028] Unter den Umfang der vorliegenden Erfindung fallen deglycosylierte oder unglycosylierte Derivate dieser Gewebefaktorproteine und biologisch aktive Aminosäuresequenzvarianten von Gewebefaktorprotein, umfassend Allele, und in vitro erzeugte, kovalente Derivate von Gewebefaktorproteinen, die Gewebefaktorproteinaktivität aufweisen.

[0029] Aminosäuresequenzvarianten von Gewebefaktorprotein gehören einer oder mehreren von drei Klassen an: Substitutions-, Insertions- oder Deletionsvarianten. Insertionen umfassen Amino- und/oder Carboxylterminale Fusionen sowie intrasequenzielle Insertionen von Resten aus einzelnen oder mehreren Aminosäuren. Gewebefaktorfusionsproteine umfassen beispielsweise Hybride von reifem Gewebefaktorprotein mit zu Gewebefaktorprotein homologen Polypeptiden, beispielsweise im Falle von Humangewebefaktorprotein, Sekretionsleadern anderer sezernierter Humanproteine. Gewebefaktorfusionsproteine umfassen ferner Hybride von Gewebefaktorprotein mit zur Wirtszelle, jedoch nicht zu Gewebefaktorprotein homologen Polypeptiden sowie zu sowohl der Wirtszelle als auch Gewebefaktorprotein heterologen Polypeptiden. Ein Beispiel für ein derartiges Gewebefaktorfusionsprotein ist die Herpes-gD-Signalsequenz mit dem reifen Gewebefaktorprotein. Bevorzugte Fusionen im Rahmen dieser Erfindung sind aminoterminalen Fusionen mit entweder prokaryotischen Peptiden oder Signalpeptiden von Prokaryoten-, Hefe-, Virus- oder Wirtszellsignalsequenzen. Es ist nicht wesentlich, daß die Signalsequenz von jeglicher, reifer Restsequenz des Proteins, dessen Sezernierung sie üblicherweise steuert, frei ist; doch ist dies zur Vermeidung der Sekretion eines Gewebefaktorfusionsproteins bevorzugt.

[0030] Insertionen können ferner innerhalb der reifen Kodierungssequenz von Gewebefaktorprotein eingeführt werden. Hierbei handelt es sich jedoch gewöhnlich um kleinere Insertionen als bei den amino- oder carboxylterminalen Fusionen in der Größenordnung von 1–4 Resten. Ein repräsentatives Beispiel hierfür ist das [Arg₁₃₅Arg₁₃₆→Arg₁₃₅ProArg₁₃₇]-Gewebefaktorprotein, eine wegen ihrer Beständigkeit gegenüber Trypsin-Hydrolyse am Arg₁₃₅-Rest ausgewählte Variante. Falls nicht anders angegeben, sind die hier beschriebenen, speziellen Gewebefaktorprotein-Variationen Variationen in der Sequenz des reifen Gewebefaktorproteins; es handelt sich nicht um Prä-Gewebefaktorprotein-Varianten.

[0031] Bei Insertionsamino-säuresequenzvarianten von Gewebefaktorproteinen handelt es sich um solche, bei denen ein oder mehrere Aminosäurerest(e) an einer vorgegebenen Stelle in das Zielgewebefaktorprotein eingeführt sind. Üblicherweise handelt es sich bei Insertionsvarianten um Fusionen von heterologen Proteinen oder Polypeptiden am Amino- oder Carboxyl-Terminus von Gewebefaktorprotein. Immunogene Gewebefaktorproteinderivate werden durch Fusion eines zur Verleihung von Immunogenität an die Zielsequenz ausreichend großen Polypeptids durch in-vitro-Vernetzung oder durch mit für das Fusionsprotein kodierender DNA transformierte, rekombinante Zellkultur hergestellt. Derartige immunogene Polypeptide können Bakterienpolypeptide, wie trpLE, Beta-Galactosidase und dergleichen sein.

[0032] Deletionsvarianten sind durch die Entfernung von einem oder mehreren Aminosäurerest(en) aus der Gewebefaktorproteinsequenz charakterisiert. Typischerweise werden nicht mehr als etwa 2–6 Reste an einer beliebigen Stelle im Gewebefaktorproteinmolekül deletiert, obwohl zur Gewinnung von met-Gewebefaktorprotein, einer zur intrazellulären, direkten Expression von reifem met-Gewebefaktorprotein geeignete Variante, eine Deletion der Reste –31 bis einschließlich –1 durchgeführt wird. Eine weitere Deletionsvariante besteht aus der an den Resten 220–242 des Gewebefaktorproteinmoleküls lokalisierten Transmembrandomäne.

[0033] Diese Varianten werden gewöhnlich durch ortsspezifische Mutagenese von Nucleotiden in der DNA mit Kodierung für das Gewebefaktorprotein, wobei DNA mit Kodierung für die Variante produziert und anschließend die DNA in einer rekombinanten Zellkultur exprimiert wird, hergestellt. Gewebefaktorproteinfragmentvarianten mit bis zu etwa 100–150 Resten können bequem durch in-vitro-Synthese hergestellt werden. Die Varianten weisen typischerweise die gleiche qualitative, biologische Aktivität wie das natürlich vorkommende Analogon auf, obwohl auch Varianten zur Modifizierung der Eigenschaften von Gewebefaktorprotein, wie dies im folgenden detaillierter beschrieben wird, ausgewählt werden.

[0034] Die Stelle zur Einführung einer Aminosäuresequenzvariation ist zwar vorgegeben, doch muß die Mutation an sich nicht vorgegeben sein. Zur Optimierung der Leistung einer Mutation an einer bestimmten Stelle können wir beispielsweise am Zielcodon oder -bereich eine willkürliche Mutagenese durchführen und die exprimierten Gewebefaktorproteinvarianten bezüglich der optimalen Kombination an gewünschter Aktivität

screenen. Techniken zur Durchführung von Substitutionsmutationen an bestimmten Stellen in DNA mit bekannter Sequenz, beispielsweise die M13-Primer-Mutagenese, sind bekannt.

[0035] Bei Aminosäuresubstitutionen handelt es sich typischerweise um einzelne Reste; bei Insertionen handelt es sich gewöhnlich um die Größenordnung von etwa 1–10 Aminosäureresten, und bei Deletionen handelt es sich um einen Bereich von 1–30 Resten. Deletionen oder Insertionen erfolgen vorzugsweise in benachbarten Paaren, d.h. als eine Deletion von 2 Resten oder Insertion von 2 Resten. Substitutionen, Deletionen, Insertionen oder eine Kombination hiervon können zur Bildung eines endgültigen Konstrukts kombiniert werden. Naheliegenderweise dürfen die in der DNA mit Kodierung für die Gewebefaktorproteinvariante durchgeführten Mutationen die Sequenz nicht aus dem Leseraster herausbringen und vorzugsweise keine Komplementärbereiche, die eine sekundäre mRNA-Struktur erzeugen könnten, schaffen (EP-A-75 444).

[0036] Bei Substitutionsvarianten handelt es sich um solche, bei denen mindestens einer der Reste in der Sequenz in **Fig. 2** entfernt und ein unterschiedlicher Rest an dessen Stelle inseriert wurde. Derartige Substitutionen werden im allgemeinen entsprechend der folgenden Tabelle 1 zum Zwecke einer feinen Modulierung der Eigenschaften von Gewebefaktorprotein durchgeführt.

Tabelle 1

Originalrest	Substitutionsbeispiele
Ala	ser
Arg	lys
Asn	gln; his
Asp	glu
Cys	ser
Gln	asn
Glu	asp
Gly	pro
His	asn; gln
Ile	leu; val
Leu	ile; val
Lys	arg; gln; glu
Met	leu; ile
Phe	met; leu; tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp; phe
Val	ile; leu

[0037] Wesentliche Veränderungen der Funktion oder immunologischen Identität werden durch die Auswahl von weniger konservativen Substitutionen als in Tabelle 1, d.h. die Auswahl von Resten, die sich bezüglich ihrer Wirkung zur Beibehaltung von a) der Struktur des Polypeptidgerüsts im Gebiet der Substitution, z.B. als Blatt- oder Helixkonformation; b) der Ladung oder Hydrophobie des Moleküls an der Zielstelle oder c) der Sperrigkeit der Seitenkette signifikanter unterscheiden, erreicht. Bei den Substitutionen, bei denen im allgemeinen die größten Veränderungen der Eigenschaften von Gewebefaktorprotein erwartet werden, handelt es sich um Substitutionen, bei denen a) ein hydrophiler Rest, z.B. Seryl oder Threonyl, durch einen hydrophoben Rest, z.B. Leucyl, Isoleucyl, Phenylalanyl, Valyl oder Alanyl; b) ein Cystein oder Prolin durch einen anderen Rest; c) ein Rest mit einer elektropositiven Seitenkette, z.B. Lysyl, Arginyl oder Histidyl; durch einen elektronegativen Rest, z.B. Glutamyl oder Aspartyl, oder d) ein Rest mit einer sperrigen Seitenkette, z.B. Phenylalanin, durch einen keine Seitenketten enthaltenden Rest, z.B. Glycin, substituiert wird oder einen solchen ersetzt.

[0038] Eine Hauptklasse der Substitutions- oder Deletionsvarianten bilden die den Transmembranabschnitt, d.h. den hydrophoben oder lipophilen Abschnitt, von Gewebefaktorprotein umfassenden Varianten. Der Transmembranabschnitt von Gewebefaktorprotein befindet sich etwa an den Resten 220–242 des Proteins, das durch die DNA aus Humanfettgeweben kodiert wird. Bei diesem Abschnitt handelt es sich um eine stark hydrophobe oder lipophile Domäne der geeigneten Größe zur Umspannung der Lipiddoppelschicht der Zellmembran. Vermutlich dient er zur Verankerung von Gewebefaktorprotein in der Zellmembran.

[0039] Eine Deletion oder Substitution der Transmembrandomänen kann die Gewinnung von rekombinantem

Gewebefaktorprotein erleichtern und dieses in einer löslichen Form bereitstellen, indem die Zell- oder Membranlipidaffinität verringert und die Wasserlöslichkeit erhöht wird, so daß zum Verbleiben von Gewebefaktorprotein in wäßriger Lösung keine Netzmittel erforderlich sind. Vorzugsweise wird die Transmembrandomäne eher deletiert als substituiert, um die Einführung möglicher immunogener Epitope zu vermeiden. Ein Vorteil von Gewebefaktorprotein mit deletierter Transmembran besteht darin, daß es mit weniger Schwierigkeiten in das Kulturmedium sezerniert wird. Diese Variante ist wasserlöslich und hat keine merkliche Affinität zu Zellmembranlipiden, wodurch dessen Gewinnung aus rekombinanter Zellkultur beträchtlich vereinfacht wird.

[0040] Substitutions- oder Deletionsmutagenese kann zur Eliminierung von N- oder O-verbundenen Glycosylierungsstellen (z.B. durch Deletion oder Substitution von Asparaginyresten an Asn-X-Thr-Glycosylierungsstellen), Verbesserung der Expression von Gewebefaktorprotein oder Veränderung der Halbwertszeit des Proteins verwendet werden. Alternativ kann nicht-glykosyliertes Gewebefaktorprotein in einer rekombinanten, prokaryotischen Zellkultur erzeugt werden. Deletionen oder Substitutionen von Cystein oder anderen, labilen Resten können ebenfalls, beispielsweise zur Steigerung der Oxidationsstabilität oder Wahl der gewünschten Disulfidbindungsanordnung des Gewebefaktorproteins, erwünscht sein. Ein derartiges Beispiel für eine Cysteinsubstitution ist die Substitution des Cysteins an Position 245 durch ein Serin. Deletionen oder Substitutionen möglicher Proteolysestellen, z.B. Arg Arg, erfolgen beispielsweise durch Deletion eines der Basenreste oder Substitution eines Glutaminyl- oder Histidylrests.

[0041] Der Ausdruck "isolierte DNA" bedeutet chemisch synthetisierte DNA, cDNA oder Genom-DNA mit oder ohne die 3'-und/oder 5'-Flankierungsabschnitte. DNA mit Kodierung für Gewebefaktorprotein erhält man, abgesehen von menschlichen Quellen, durch a) Herstellen einer cDNA-Bibliothek aus der Plazenta, dem Fettgewebe oder anderen Gewebefaktorprotein-mRNA enthaltenden Geweben, wie Hirn, des speziellen Tiers; b) Durchführen einer Hybridisierungsanalyse mit markierter DNA mit Kodierung für Humangewebefaktorprotein oder dessen Fragmente (üblicherweise mehr als 100 bp) zum Nachweis von Klonen in der homologe Sequenzen enthaltenden cDNA-Bibliothek und c) Analysieren der Klone durch Restriktionsenzymanalyse und Nukleinsäuresequenzierung zur Identifizierung der die volle Länge aufweisenden Klone. Sind Klone voller Länge in der Bibliothek nicht vorhanden, können geeignete Fragmente aus den verschiedensten Klonen unter Verwendung der zum ersten Mal in der vorliegenden Erfindung offenbarten Nucleinsäuresequenz gewonnen und zur Bildung eines Klon voller Länge mit Kodierung für Gewebefaktorprotein an den kloneneigenen Restriktionsstellen verknüpft werden.

[0042] Kovalente Modifikationen des Gewebefaktorproteinmoleküls fallen unter den Umfang dieser Erfindung. Derartige Modifikationen werden durch Umsetzen der Zielaminosäurereste des gewonnenen Proteins mit einem organischen, derivatbildenden Mittel, das mit ausgewählten Seitenketten oder terminalen Resten reagieren kann, hergestellt. Alternativ kann eine posttranslationale Modifizierung in ausgewählten, rekombinanten Wirtszellen zur Modifizierung des Proteins verwendet werden. Die hierbei entstehenden, kovalenten Derivate sind als Immunogene oder zur Identifizierung von für die biologische Aktivität sowie die Änderung der pharmakologischen Eigenschaften des Moleküls, wie Halbwertszeit, Bindungsaffinität und dergleichen, wie dies dem Fachmann bekannt ist, wichtigen Resten geeignet.

[0043] Bestimmte, posttranslationale Derivatbildungen ergeben sich aus der Einwirkung rekombinanter Wirtszellen auf das exprimierte Polypeptid. Glutaminyl- und Asparaginyreste werden häufig posttranslational zu den entsprechenden Glutamyl- bzw. Aspartylresten deamidiert. Alternativ werden diese Reste unter schwach sauren Bedingungen deamidiert. Beide Formen dieser Reste fallen unter den Umfang dieser Erfindung.

[0044] Weitere posttranslationale Modifizierungen umfassen die Hydroxylierung von Prolin und Lysin, die Phosphorylierung von Hydroxylgruppen von Seryl- oder Threonylresten, die Methylierung der α -Aminogruppen von Lysin-, Arginin- und Histidinseitenketten (T.E. Creighton, "Proteins: Structure and Molecular Properties", W.H. Freeman & Co., San Francisco, USA, S. 79-86 [1983]), die Acetylierung des N-terminalen Amins und in einigen Fällen die Amidierung des C-terminalen Carboxyls.

[0045] Die zur Beschreibung des Zustands von erfindungsgemäß produziertem Gewebefaktorprotein verwendeten Ausdrücke "praktisch frei von" oder "praktisch rein" bedeuten frei von Protein oder anderen Materialien, die normalerweise mit Gewebefaktorprotein im physiologischen in-vivo-Milieu z.B. bei Gewinnung von Gewebefaktorprotein aus Blut und/oder Geweben durch Extraktion und Reinigung verbunden sind. Andere Materialien umfassen infektiöse Organismen, beispielsweise den Verursacher des erworbenen Schwächesyndroms (AIDS). Das durch das erfindungsgemäße Verfahren erzeugte Gewebefaktorprotein weist eine Reinheit von größer als oder gleich 95% auf.

[0046] Im allgemeinen werden Prokaryoten zum Klonieren von DNA-Sequenzen zur Konstruktion der erfindungsgemäß geeigneten Vektoren verwendet. Beispielsweise ist E.-coli-K12-Stamm 294 (ATCC Nr. 31446) besonders geeignet. Andere einsetzbare Mikroorganismenstämme umfassen E. coli 8 und E. coli X1776 /ATCC Nr. 31537). Diese Beispiele dienen eher der Erläuterung als der Einschränkung.

[0047] Prokaryoten können ferner zur Expression verwendet werden. Es können die genannten Stämme sowie E. coli W3110 (F, λ , prototroph, ATCC Nr. 27325); Bazillen, wie *Bacillus subtilis*, und andere Enterobakterien, wie *Salmonella typhimurium* oder *Serratia marcescens*, und verschiedene *Pseudomonas*-Spezies verwendet werden.

[0048] Im allgemeinen werden bei diesen Wirten Promotoren und Kontrollsequenzen enthaltende Plasmidvektoren, die aus mit der Wirtszelle kompatiblen Spezies abgeleitet sind, verwendet. Der Vektor trägt üblicherweise eine Replikationsstelle sowie eine oder mehrere Markersequenz(en), wodurch eine Phenotyp-Selektion in den transformierten Zellen möglich wird. Beispielsweise wird E. coli typischerweise unter Verwendung eines Derivats von pBR322, einem von einer E.-coli-Spezies abgeleiteten Plasmid (Bolivar et al., "Gene", 2: 95 [1977]), transformiert. pBR322 enthält Gene für Ampicillin- und Tetracyclinresistenz und liefert so auf einfache Weise Mittel zur Identifizierung transformierter Zellen. Das pBR322-Plasmid oder ein anderes Mikroorganismenplasmid muß ferner Promotoren sowie andere, üblicherweise zur rekombinanten DNA-Konstruktion verwendete Steuerelemente enthalten oder so modifiziert sein, daß es diese enthält.

[0049] Zur Verwendung bei prokaryotischen Wirten geeignete Promotoren umfassen beispielsweise die β -Lactamase- und Lactose-Promotorsysteme (Chang et al., "Nature", 275: S. 615 [1978] und Goeddel et al., "Nature", 281: S. 544 [1979]); Alkaliphosphatase, das Tryptophan(trp)-Promotorsystem (Goeddel "Nucleic Acids Res.", 8: S. 4057 [1980] und EPO Appln. Publ. Nr. 36,776) sowie Hybridpromotoren, wie den tac-Promotor (H. de Boer et al., "Proc. Natl. Acad. Sci.", (USA), 80: S. 21–25 [1983]). Es sind jedoch (auch) andere funktionelle Bakterienpromotoren geeignet. Ihre Nucleotidsequenzen sind im allgemeinen bekannt, wodurch es einem Fachmann auf dem einschlägigen Fachgebiet verfahrensmäßig möglich ist, diese unter Verwendung von Linkern oder Adaptoren mit DNA mit Kodierung für Gewebefaktorprotein zu verknüpfen, so daß beliebige, gewünschte Restriktionsstellen eingeführt werden (Siebenlist et al., "Cell", 20: S. 269 [1980]). Promotoren zur Verwendung in Bakteriensystemen können ferner eine arbeitsfähige bzw. operabel mit der für Gewebefaktorprotein kodierenden DNA verbundene Shine-Dalgarno(S.D.)-Sequenz enthalten.

[0050] Zusätzlich zu Prokaryoten können auch eukaryotische Mikroben, wie Hefekulturen, verwendet werden. *Saccharomyces cerevisiae* oder gewöhnliche Bäckerhefe ist der am häufigsten verwendete, eukaryotische Mikroorganismus, wenngleich eine Anzahl anderer Stämme üblicherweise verfügbar ist. Zur Expression in *Saccharomyces* wird beispielsweise das Plasmid YRp7 (Stinchcomb et al., "Nature", 282: S. 39 [1979]; Kingsman et al., "Gene", 7: S. 141 [1979]; Tschemper et al., "Gene", 10: S. 157 [1980]) üblicherweise verwendet. Dieses Plasmid enthält bereits das trp1-Gen, das einen Selektionsmarker für einen Mutantenstamm von Hefe, dem die Fähigkeit zum Wachstum in Tryptophan fehlt, z.B. ATCC Nr. 44076 oder PEP4–1 (Jones, "Genetics", 85: S. 12 [1977]), enthält. Das Vorhandensein der trp1-Läsion als charakteristische Eigenschaft des Hefewirtszellengenoms liefert dann ein effektives Mittel zur Selektion durch Wachstum in Abwesenheit von Tryptophan.

[0051] Geeignete Promotorensequenzen zum Einsatz bei Hefewirten umfassen die Promotoren für 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzeman et al., "J. Biol. Chem.", 255: S. 2073 [1980] oder andere glycolytische Enzyme (Hess et al., "J. Adv. Enzyme Reg.", 7: S. 149 [1968], und Holland, "Biochemistry", 17: S. 4900 [1978]), wie Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase.

[0052] Andere Hefepromotoren, die als induzierbare Promotoren den zusätzlichen Vorteil einer durch die Wachstumsbedingungen gesteuerten Transkription aufweisen, sind die Promotorregionen für Alkoholdehydrogenase 2; Isocytochrom C; saure Phosphatase; mit dem Stickstoffstoffwechsel assoziierte Abbauenzyme; Metallothionein; Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, und für den Einsatz von Maltose und Galactose verantwortliche Enzyme. Zum Einsatz bei der Hefeexpression geeignete Vektoren und Promotoren sind ferner in R. Hitzeman et al., Europäische Patentveröffentlichung Nr. 73,657A, beschrieben. Hefe-Enhancer werden ebenfalls vorteilhaft zusammen mit Hefepromotoren eingesetzt.

[0053] Die Transkription aus Vektoren in Säugetierwirtszellen steuernde, bevorzugte Promotoren können aus verschiedensten Quellen, beispielsweise den Genomen von Viren, wie Polyoma, Simian Virus 40 (SV40), Ade-

novirus, Retroviren, Hepatitis-B-Virus und vorzugsweise Cytomegalovirus oder aus heterologen Säugetierpromotoren, z.B. beta-Aktinpromotor, erhalten werden. Der early- und late-Promotor des SV40-Virus werden bequemerweise als SV40-Restriktionsfragment, das ferner den SV40-Virus-Replikationsursprung enthält, gewonnen (Fiers et al., "Nature", 273: S. 113 [1978]). Der sofortige (immediate) early-Promotor des Human-Cytomegalovirus wird in geeigneter Weise als HindIII-E-Restriktionsfragment erhalten (P.J. Greenaway et al., "Gene", 18: S. 355–360 [1982]). Natürlich sind hier Promotoren aus der Wirtszelle oder verwandte Spezies ebenfalls geeignet.

[0054] Die Transkription von DNA mit Kodierung für Gewebefaktorprotein durch höhere Eukaryoten wird durch Insertion einer Enhancersequenz in den Vektor gesteigert. Enhancer stellen cis-agierende Elemente aus DNA mit üblicherweise etwa 10–300 bp dar, die auf einen Promotor hinsichtlich einer Steigerung von dessen Fähigkeit zur Initiation der Transkription einwirken. Enhancer sind bezüglich Orientierung und Position relativ unabhängig. Sie wurden 5' (Laimins, L. et al., "Proc. Natl. Acad. Sci.", 78: S. 993 [1981]) und 3' (Lusky, M.L. et al., "Mol. Cell. Bio.", 3: S. 1108 [1983]) zur Transkriptionseinheit innerhalb eines Introns (Banerji, J.L. et al., "Cell", 33: S. 729 [1983]) sowie innerhalb der Kodierungssequenz selbst (Osborne, T.F. et al., "Mol. Cell Bio.", 4: S. 1293 [1984]) gefunden. Viele Enhancersequenzen sind bis heute aus Säugetiergenen (Globin, Elastase, Albumin, α -Fetoprotein und Insulin) bekannt. Typischerweise möchte man jedoch einen Enhancer aus einem Virus von eukaryotischen Zellen verwenden. Beispiele umfassen den SV40-Enhancer auf der late-Seite des Replikationsursprungs (bp 100–270), den Cytomegalovirus-early-Promotor-Enhancer, den Polyom-Enhancer auf der late-Seite des Replikationsursprungs und die Adenovirenenhancer.

[0055] In eukaryotischen Wirtszellen (Hefe-, Pilz-, Insekten-, Pflanzen-, Tier-, Human- oder Keimzellen) verwendete Expressionsvektoren können ferner zur Termination der Transkription nötige Sequenzen enthalten, wodurch die mRNA-Expression beeinflusst wird. Diese Regionen werden als polyadenylierte Segmente im nicht-translatierten Abschnitt der mRNA mit Kodierung für Gewebefaktorprotein transkribiert. Die nicht-translatierten 3'-Regionen umfassen ferner Transkriptionsterminationsstellen.

[0056] Expressionsvektoren können ein Selektionsgen, das auch als Selektionsmarker bezeichnet wird, enthalten. Beispiele für geeignete Selektionsmarker für Säugetierzellen sind Dihydrofolatreductase (DHFR), Thymidinkinase oder Neomycin. Bei erfolgreicher Übertragung derartiger Selektionsmarker in eine Säugetierwirtszelle kann die transformierte Säugetierwirtszelle, wenn sie einem Selektionsdruck ausgesetzt wird, überleben. Es gibt zwei in weitem Umfang verwendete, unterschiedliche Kategorien an Selektionsabläufen. Die erste Kategorie beruht auf dem Metabolismus einer Zelle und der Verwendung einer Zelllinienmutante, der die Fähigkeit zu wachsen, unabhängig von einem ergänzten Medium, fehlt. Zwei Beispiele hierfür sind CHO-DHFR-Zellen und Mäuse-LTK-Zellen. Diesen Zellen fehlt die Fähigkeit, ohne die Zugabe von Nährstoffen, wie Thymidin oder Hypoxanthin, zu wachsen. Da diesen Zellen bestimmte, für einen vollständigen Nucleotidsyntheseweg notwendige Gene fehlen, können sie nur überleben, wenn die fehlenden Nucleotide in einem ergänzten Medium bereitgestellt werden. Eine Alternative zur Ergänzung der Medien besteht in der Einführung eines intakten DHFR- oder TK-Gens in Zellen mit einem Mangel an den jeweiligen Genen, wodurch ihre Wachstumsbedürfnisse geändert werden. Individuelle Zellen, auf die das DHFR- oder TK-Gen nicht übertragen wurde, können in einem nicht ergänzten Medium nicht überleben.

[0057] Bei der zweiten Kategorie handelt es sich um dominante Selektion, die sich auf ein bei einem beliebigen Zelltyp verwendetes Selektionsschema bezieht und bei der die Verwendung einer Zelllinienmutante nicht erforderlich ist. In diesen Schemas wird typischerweise ein Wirkstoff zur Blockierung des Wachstums einer Wirtszelle verwendet. Zellen mit einem neuartigen Gen können ein Wirkstoffresistenz verleihendes Protein exprimieren und die Selektion überleben. Beispiele für eine derartige dominante Selektion verwenden die Wirkstoffe Neomycin (Southern P.; Berg, P., "J. Molec. Appl. Genet.", 1: S. 327 [1982]); Mycophenolsäure (Mulligan, R.C.; Berg, P., "Science", 209: S. 1422 [1980]), oder Hygromycin (Sugden, B. et al., "Mol. Cell. Biol.", 5: S. 410–413 [1985]). In den genannten drei Beispielen werden Bakteriengene mit eukaryotischer Steuerung zur Verleihung von Resistenz gegenüber dem geeigneten Wirkstoff G418 oder Neomycin (Geneticin), xgpt (Mycophenolsäure) bzw. Hygromycin verwendet.

[0058] Der Ausdruck "Amplifikation" bezieht sich auf das Anwachsen oder die Replikation einer isolierten Region innerhalb der Chromosomen-DNA einer Zelle. Die Amplifikation wird unter Verwendung eines Selektionsmittels, z.B. Methotrexat (MTX), das DHFR inaktiviert, erreicht. Bei der Amplifikation oder der Herstellung aufeinanderfolgender Kopien des DHFR-Gens ergeben sich bei Anwesenheit größerer Mengen an MTX größere Mengen an erzeugtem DHFR. Ein Amplifikationsdruck wird ungeachtet der Anwesenheit von endogener DHFR durch Zugabe noch größerer Mengen an MTX zu den Medien ausgeübt. Die Amplifikation eines gewünschten Gens kann durch Kointransfektion einer Säugetierwirtszelle mit einem Plasmid mit einer DNA mit Kodierung für

ein gewünschtes Protein und dem DHFR- oder Amplifikationsgen, das die Kointegration ermöglicht, erreicht werden. Zur Sicherstellung eines größeren Bedarfs der Zelle an DHFR, der durch Replikation des Selektionsgens befriedigt wird, werden nur Zellen, die in Anwesenheit einer noch größeren MTX-Konzentration wachsen können, ausgewählt. Solange das Gen mit Kodierung für ein gewünschtes, heterologes Protein mit der Selektionsgenreplikation dieses Gens kointegriert ist, erfolgt eine Replikation des Gens mit Kodierung für das gewünschte Protein. Hieraus ergibt sich die Expression einer größeren Menge des gewünschten, heterologen Proteins durch Zunahme der Genkopien, d.h. eines amplifizierten Gens, mit Kodierung für das gewünschte, heterologe Protein.

[0059] Bevorzugte, geeignete Wirtszellen zur Expression der erfindungsgemäßen Vektoren mit Kodierung für Gewebefaktorprotein in höheren Eukaryoten umfassen: durch SV40 transformierte Affenleber-CV1-Linie (COS-7, ATCC CRL 1651); Humanembryonieren-Linie (293, Graham, F.L. et al., "J. Gen Virol.", 36: S. 59 [1977]); Babyhamsternierenzellen (BHK, ATCC CCL 10); Chinesische-hamster-ovary-Zellen-DHFR (CHO, Urlaub und Chasin, "Proc. Natl. Acad. Sci.", (USA) 77: S. 4216, [1980]); Mäuse-Sertoli-Zellen (TM4, Mather, J.P., "Biol. Reprod.", 23: S. 243–251 [1980]); Affennierenzellen (CV1 ATCC CCL 70); afrikanische Grünaffen-Nierenzellen (VERO-76, ATCC CRL-1587); Humancervixcarcinomzellen (HELA, ATCC CCL 2); Hundenierenzellen (MDCK, ATCC CCL 34); Buffalorattenleberzellen (BRL 3A, ATCC CRL 1442); Humanlungenzellen (Ww138, ATCC CCL 75); Humanleberzellen (Hep G2, HB 8065); Mäusemammatumoren (MMT 060562, ATCC CCL51), und TRI-Zellen (Mather, J.P. et al., "Annals N.Y. Acad. Sci.", 383: S. 44–68 [1982]).

[0060] Der Ausdruck "Transformation" bedeutet die Einführung von DNA in einen Organismus entweder als extrachromosomales Element oder durch chromosomale Integration, so daß die DNA replizierbar ist. Falls nicht anders angegeben, wird hier zur Transformation der Wirtszellen die von F. Graham; A. van der Eb, "Virology", 52: S. 456–457 (1973) angegebene Methode verwendet. Es können jedoch auch andere Verfahren zur Einführung von DNA in Zellen, z.B. die Einführung durch Nuklearinjektion oder Protoplastenfusion, verwendet werden. Bei Verwendung von prokaryotischen Zellen oder hauptsächlich Zellwandbauteile enthaltenden Zellen, besteht das bevorzugte Transfektionsverfahren in einer Calciumbehandlung unter Verwendung von Calciumchlorid nach der Beschreibung von F.N. Cohen et al., "Proc. Natl. Acad. Sci.", (USA), 69: S. 2110 (1972).

[0061] Die Bildung bzw. Konstruktion geeigneter, die gewünschten Kodierungs- und Steuersequenzen enthaltenden Vektoren bedient sich Standard-Ligationstechniken. Isolierte Plasmide oder DNA-Fragmente werden geschnitten, zurechtgeschnitten und in der gewünschten Form zur Bildung des erforderlichen Plasmids wieder verknüpft.

[0062] Für die Analyse zur Bestätigung der richtigen Sequenzen in den gebildeten bzw. konstruierten Plasmiden werden die Ligationsgemische zur Transformation von E.-coli-K12-Stamm 294 (ATCC 31446) verwendet und erfolgreiche Transformanten bei Eignung mittels Ampicillin- oder Tetracyclinresistenz selektiert. Die Plasmide der Transformanten werden hergestellt, durch Restriktion analysiert und/oder nach dem Verfahren von Messing et al., "Nucleic Acids Res.", 9: S. 309 (1981) oder dem Verfahren von Maxam et al., "Methods in Enzymology", 65: S. 499 (1980) sequenziert.

[0063] Die Wirtszellen können mit den erfindungsgemäßen Expressionsvektoren transformiert und in üblichen Nährmedien, die zur Einführung von Promotoren, der Selektion von Transformanten oder Amplifikation von Genen entsprechend modifiziert wurden, kultiviert werden. Die Kulturbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert und dergleichen, entsprechen den früher bei der zur Expression ausgewählten Wirtszelle verwendeten. Sie sind dem Fachmann auf dem einschlägigen Fachgebiet bekannt.

[0064] Der Ausdruck "Transfektion" bezieht sich auf die Aufnahme eines Expressionsvektors durch eine Wirtszelle, unabhängig davon, ob Kodierungssequenzen in der Tat exprimiert werden. Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren der Transfektion bekannt, beispielsweise CaPO_4 und Elektroporation. Eine erfolgreiche Transfektion wird im allgemeinen dadurch erkannt, daß in der Wirtszelle irgendeine Anzeige der Wirkungsweise dieses Vektors erfolgt.

[0065] Zur Erleichterung des Verständnisses der folgenden Beispiele werden nun bestimmte, häufig vorkommende Verfahren und/oder Begriffe beschrieben.

[0066] "Plasmide" werden durch ein vorangestelltes, kleines p und/oder sich anschließende Großbuchstaben und/oder Zahlen bezeichnet. Die hier verwendeten Ausgangsplasmide sind entweder kommerziell erhältlich, auf nicht eingeschränkter Basis öffentlich verfügbar oder können nach veröffentlichten Verfahren aus verfügbaren Plasmiden gebildet werden. Ferner sind zu den beschriebenen äquivalente Plasmide auf den einschlä-

gigen Fachgebiet bekannt und dem Fachmann ersichtlich.

[0067] Der Ausdruck "Verdauung" von DNA bezieht sich auf die katalytische Spaltung von DNA mit einem nur auf bestimmte Sequenzen in der DNA wirkenden Restriktionsenzym. Die hier verwendeten, verschiedenen Restriktionsenzyme sind kommerziell erhältlich. Sie wurden unter Reaktionsbedingungen, mit Kofaktoren und anderen Erfordernissen entsprechend dem Wissen eines Fachmanns eingesetzt. Zu analytischen Zwecken wird typischerweise 1 µg des Plasmids oder DNA-Fragments mit etwa 2 Enzymeinheiten in etwa 20 µl Pufferlösung verwendet. Zum Zwecke der Isolierung von DNA-Fragmenten zur Plasmidkonstruktion werden typischerweise 5–50 µg DNA mit 20 bis 250 Enzymeinheiten in einem größeren Volumen verdaut. Die geeigneten Pufferlösungen und Substratmengen für spezielle Restriktionsenzyme sind durch den Hersteller spezifiziert. Üblicherweise werden Inkubationszeiten von etwa 1h bei 37°C verwendet. Sie können jedoch gemäß den Lieferantenvorschriften variiert werden. Nach der Verdauung wird das Reaktionsgemisch direkt auf einem Polyacrylamidgel zur Isolierung des gewünschten Fragments der Elektrophorese unterzogen.

[0068] Der Ausdruck "Gewinnung" oder "Isolierung" eines gegebenen DNA-Fragments aus einem Restriktions- bzw. Verdauungsgemisch bedeutet die Auftrennung des Verdauungsgemischs auf Polyacrylamid- oder Agarosegel durch Elektrophorese; die Identifizierung des interessierenden Fragments durch Vergleich von dessen Beweglichkeit gegenüber Marker-DNA-Fragmenten bekannten Molekulargewichts; die Entfernung des das gewünschte Fragment enthaltenden Gelabschnitts, und die Abtrennung des Gels von DNA. Dieses Verfahren ist allgemein bekannt (Lawn, R. et al., "Nucleic Acids Res.", 9: S. 6103–6114 [1981], und Goeddel, D. et al., "Nucleic Acids Res.", 8: S. 4057 [1980]).

[0069] Der Ausdruck "Dephosphorylierung" bezieht sich auf die Entfernung der terminalen 5'-Phosphate durch Behandeln mit bakterieller Alkaliphosphatase (BAP). Dieses Vorgehen hindert die beiden Restriktionschnittenden eines DNA-Fragments an einer "Zirkularisierung" oder der Bildung einer Insertion eines weiteren DNA-Fragments an der Restriktionsstelle blockierenden, geschlossenen Schleife. Zur Dephosphorylierung werden übliche Verfahren und Mittel verwendet (Maniatis, T. et al., "Molecular Cloning", 133–134, Cold Spring Harbor, [1982]). Die Reaktionen unter Verwendung von BAP werden in 50mM Tris bei 68°C zur Unterdrückung der Aktivität von möglicherweise in den Enzymzubereitungen vorhandenen Exonucleasen durchgeführt. Die Reaktionsdauer beträgt 1h. Anschließend an diese Reaktion wird das DNA-Fragment einer Gel-Reinigung unterzogen.

[0070] Der Ausdruck "Ligation" bezieht sich auf den Prozeß der Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei doppelsträngigen Nucleinsäurefragmenten (T. Maniatis et al., "Id.", S. 146). Falls nicht anders angegeben, kann eine Ligation unter Verwendung bekannter Pufferlösungen und unter Bedingungen mit 10 Einheiten T4-DNA-Ligase ("Ligase") pro 0,5 µg nahezu äquimolarer Mengen an den zu verknüpfenden DNA-Fragmenten durchgeführt werden.

[0071] Der Ausdruck "filling" oder "blunting" bezieht sich auf die Verfahren, durch die das einsträngige Ende am kohäsiven Ende einer durch ein Restriktionsenzym geschnittenen Nucleinsäure in einen Doppelstrang umgewandelt wird. Dadurch wird das kohäsive Ende eliminiert und zu einem glatten Ende umgebildet. Dieser Prozeß stellt ein vielseitiges Werkzeug bei der Umwandlung eines möglicherweise mit den durch nur ein oder einige andere(s) Restriktionsenzym(e) erzeugten Enden kohäsiven Restriktionsschnittendes in ein mit einer beliebigen, glattendig schneidenden Restriktionsendonuklease kompatibles Ende oder ein anderes aufgefülltes, kohäsives Ende dar. Typischerweise wird das blunting durch Inkubation von 2–15 µg der Ziel-DNA in 10mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, 50mM NaCl, 10mM Tris-Puffer (pH-Wert 7,5) bei etwa 37°C in Anwesenheit von 8 Einheiten Klenow-Fragment von DNA-Polymerase-I und jeweils 250 µM der vier des Desoxynukleosidtriphosphaten durchgeführt. Die Inkubation wird im allgemeinen nach 30 min. durch Phenolund Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung beendet.

[0072] Humangewebefaktorprotein sowie dessen rekombinantes Expressionsprodukt wird nach dem folgenden Protokoll erhalten:

1. Dem aminoterminalen Abschnitt von Gewebefaktorprotein entsprechende Oligonucleotidsonden, die für die einzelnen Aminosäuren eine einzelne Codonwahl darstellen, und das CNBr-Peptidfragment wurden auf chemischem Wege synthetisiert.
2. Zwei zu Codons für Aminosäuresequenzen von Gewebefaktorprotein komplementäre Desoxyoligonucleotide gemäß der folgenden Beschreibung wurden synthetisiert und mit γ^{32} P-ATP radioaktiv markiert:

- a) 5' CTG ACC TGG AAG TCC ACC AAC TTC AAG ACC ATC CTG-
GAG TGG GAG CCC AAG CCT GTG AAC -3'; and
- b) 5' ATG GGC CAG GAG AAG GGC GAG TTC CGG GAG ATC TTC-
TAC ATC ATT GGC GCT GTG GTC TTT GTG GTG ATC ATC-
CTG GTG ATC -3'.

3. Oligo(dT)-Primer aufweisende cDNA-Bibliotheken wurden in λ gt10 hergestellt.

4. Eine Humanplazenta-cDNA-Bibliothek wurde unter Verwendung der chemisch synthetisierten Oligonucleotidsonden gescreent. Bei Einsatz der 60-mer-Sonde a) wurden keine positiven Plaques erhalten. Bei Einsatz der 81-mer-Sonde b) wurden zweiundzwanzig (22) positive Plaques erhalten, wobei die Hälfte sehr schwach positiv war. Die elf (11) besten wurden für ein Rescreening zur Plaque-Reinigung ausgewählt. Beim zweiten Screening wurden 5 positive Plaques erhalten. Die DNA von diesen beiden wurde jeweils hergestellt.

5. Klone mit einer Gesamt-cDNA von etwa 2800 bp insertierter DNA wurden isoliert. Es wurde eine Sequenzierung und Charakterisierung der Plazenta-Klone durchgeführt. Da die Größe der mRNA auf einem Northern-Blot 2,35 kb betrug, enthielten diese Klone möglicherweise nicht herausgeschnittene Introns. Daher wurde eine Humanfett(gewebe)-Bibliothek gescreent.

6. Eine Oligo(dT) Primer aufweisende Humanfett(gewebe)-Bibliothek wurde unter Einsatz eines 1400-bp-EcoRI-Fragments aus einem der Plazenta-Klone gescreent.

7. Klone mit einer Gesamt-cDNA von etwa 2350 bp (umfassend 150 bis 200 bp für das polyA-Ende) und 1800 bp Insert-DNA wurden isoliert. Diese Klone mit 2350 bp und vermutlich der gesamten Gewebefaktor-mRNA wurden sequenziert.

8. Die die volle Länge aufweisende cDNA mit Kodierung für Humangewebefaktorprotein wird in einem Plasmid konstruiert. Es sollte registriert werden, daß die Kenntnis der vollständigen DNA-Sequenz in **Fig. 2** die Herstellung extrem langer Sonden mit perfekter Homologie zu Humangewebefaktorprotein-cDNA ermöglicht, wodurch die Sondierung von cDNA oder von Genombibliotheken anderer Spezies in beträchtlicher Weise vereinfacht und die Effizienz erhöht wird und eine Dispensierung mit Gewebefaktorproteinreinigung, Sequenzierung und der Herstellung von Sondenpools möglich wird.

9. Die cDNA mit Kodierung für Humangewebefaktorprotein wird dann in ein Expressionsvehikel eingebaut, welches wiederum zur Transformation einer geeigneten Wirtszelle verwendet wird. Diese wird anschließend zur Produktion des gewünschten Gewebefaktorproteins in einer Kultur wachsen gelassen.

10. Das gemäß dem vorstehenden Verfahren erzeugte, biologisch aktive Gewebefaktorprotein weist 263 Aminosäuren auf.

[0073] Die folgenden Beispiele erläutern das zur Zeit als das Beste angesehene Verfahren zur praktischen Umsetzung der Erfindung, sollen diese jedoch nicht beschränken.

BEISPIEL 1

Klonieren von cDNA

[0074] DNA mit Kodierung für Gewebefaktorprotein kann bei Kenntnis der vollständigen DNA-Sequenz durch chemische Synthese, durch Screenen reverser Transkripte von mRNA aus verschiedenen Geweben oder durch Screenen von Genombibliotheken aus einer beliebigen Zelle erhalten werden. Da zum Zeitpunkt dieser Erfindung weder die vollständige Aminosäure- noch die DNA-Sequenz von Gewebefaktorprotein bekannt waren, war die chemische Synthese der vollständigen DNA-Sequenz mit Kodierung für Gewebefaktorprotein nicht möglich.

[0075] Eine Humanplazenta-cDNA-Bibliothek wurde nach einer früheren Beschreibung (A. Ullrich et al., "Nature", 309: S. 418-425 [1984]) hergestellt. Doppelsträngige cDNA wurde aus Humanfett(gewebe)-RNA unter Verwendung von reverser Transkriptase in bekannter Weise hergestellt. Nach E.-coli-RNase-H-Behandlung wurde DNA-Polymerase-I zur Synthetisierung des zweiten Strangs verwendet und anschließend eine Ligation an synthetische Oligonucleotide mit Restriktionsstellen für Sall, SstI, XhoI und einem überhängenden EcoRI-Ende nach einer früheren Beschreibung (Gubler, U. und Hoffman, B.J., "Gene", 25: S. 263 [1983]) durchgeführt. Diese DNA wurde in die EcoRI-Stelle von λ gt10 insertiert (Huynh, T. et al., "DNA Cloning Techniques", [Ed. Grover, D.] [1984]).

[0076] Zwei Oligonucleotidsonden, die eine mögliche Codon-Wahl für die einzelnen Aminosäuren der N-terminalen Aminosäuresequenz (60 Nucleotide) und der internen Aminosäuresequenz in der Nähe des C-Endes (81 Nucleotide) darstellen, wurden auf der Basis der folgenden, beim genannten American Heart Association Meeting vorgestellten Aminosäuresequenzen designed und synthetisiert:

Aminoterminus

5' CTG ACC TGG AAG TCC ACC AAC TTC AAG ACC ATC CTG GAG-
Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu-

TGG GAG CCC AAG CCT GTG AAC -3'
Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn

C-Terminus-Umgebung

5' ATG GGC CAG GAG AAG GGC GAG TTC CGG GAG ATC TTC TAC-
Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr-

ATC ATT GGC GCT GTG GTC TTT GTG GTG ATC ATC CTG GTG ATC-3'
Ile Ile Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile-

[0077] Die cDNA-Klone von Humangewebefaktorprotein wurden unter Verwendung von DNA-Sonden, die zuerst zum Screenen einer Humanplazenta-cDNA-Bibliothek verwendet wurden, erhalten. Ein EcoRI-Fragment aus einem Plazenta-Klon mit 1400 bp wurde zum Screenen einer Humanfett(gewebe)-cDNA-Bibliothek verwendet.

[0078] Etwa 1 Million Phagen der Oligo(dT)-primed-Humanplazenta-cDNA-Bibliothek in λ gt10 wurden auf fünfundzwanzig (25) 15-cm-Petriplatten wachsen gelassen, von denen Dreifachnitrozellulosefilter abgehoben wurden. Die Filter wurden mit jeweils den 32 P-endmarkierten Oligonucleotidsonden in 0,75 M NaCl, 75mM Trisnatriumcitrat, 50 mM Natriumphosphat (pH 6,8), 5X Denhardt'scher Lösung, 20%-igem Formamid, 10%-igem Dextransulfat und 0,2 g/l gekochter, ultraschallbehandelter Lachssperma-DNA bei 42°C über Nacht hybridisiert und dann 2h in 0,30M NaCl, 30mM Trinatriumcitrat, 0,1%-igem NaDodSO₄ bei 42°C gewaschen. Zweiundzwanzig (22) hybridisierende, doppelt positive wurden bei Filtern, die mit der C-Terminusumgebungs-sonde von Gewebefaktorprotein hybridisiert wurden, beobachtet. Die elf (11) Besten wurden zur Plaque-Reinigung ausgewählt. Die aminoterminalen Sonden von Gewebefaktorprotein hybridisierte nicht. Fünf Klone erwiesen sich bei der Plaque-Reinigung als positiv. Die DNA wurde aus diesen präpariert und anschließend durch Verdauung mit EcoRI analysiert. Ein Klon war kürzer und schien ein partieller Klon zu sein. Vier Klone, die sich, bezogen auf die EcoRI-Verdauung, als identisch erwiesen, stellten die besten Kandidaten für cDNA-Klone voller Länge dar. EcoRI-Fragmente von drei dieser Klone, der partielle Klon und zwei der vermuteten Klone voller Länge, wurden zur DNA-Sequenzierung nach dem Dideoxykettenabbruchverfahren (J. Messing et al., "Nucleic Acids Res.", 9: S. 309–321 [1981]) in M13-Phagenvektoren subkloniert.

[0079] Ein EcoRI-Fragment mit 1400 bp aus einem Plazenta-cDNA-Klon wurde an einen Northern-Blot, an den mRNA gebunden war, hybridisiert. Die Größe der Gewebefaktorprotein-mRNA in den als positiv getesteten Plazentaprobe zu etwa 2,35 kb bestimmt. Die Länge der Plazenta-cDNA-Klone einschließlich der dem polyA-Schwanz auf der mRNA entsprechenden Nucleotide betrug etwa 2800 bp. Diese Klone waren etwa 450 bp länger als die beobachtete Länge der mRNA auf dem Northern-Blot. Unmittelbar stromaufwärts der für den Aminoterminus des Proteins kodierenden DNA wurden in allen drei Leserastern Stop-Codons und Methionin-Codons beobachtet, wodurch das Fehlen einer Signalsequenz nahegelegt wird. Das Fehlen einer Signalsequenz unmittelbar 5' der Sequenz, die den NH₂-Terminus des reifen Proteins in den Plazenta-Klonen darstellt, wurde durch Vergleich mit den im folgenden beschriebenen Fett(gewebe)-Klonen bestätigt. Durch Vergleich der Plazenta- und Fett(gewebe)-Sequenzen wurde ferner bestimmt, daß die Plazenta-Klone eine in dem Fett(gewebe)-Klon nicht vorhandene, dazwischenliegende Sequenz oder ein Intron enthielten. Das Vorhandensein des Introns im Plazenta-Klon läßt auf einen schlechten Spleißmechanismus in der Plazenta schließen, wodurch die Isolierung und Klonierung der Prä-Gewebefaktorprotein-DNA ein sehr schwieriges Unterfangen wird.

[0080] Wegen der Diskrepanz in der Länge zwischen den isolierten Plazenta-Klonen und der durch Northern-Blotting bestimmten mRNA wurde Gewebefaktorprotein-cDNA auch aus einer Fett(gewebe)-Bibliothek

isoliert. Eine in λ gt10 konstruierte Fett(gewebe)-cDNA-Bibliothek wurde gewählt, da Fettgewebe Plazentage-webe vergleichbare Mengen an Gewebefaktor-mRNA aufweist. Die Bibliothek wurde unter Verwendung eines EcoRI-Fragments mit 1400 bp eines mit γ^{32} -P-ATP radioaktiv markierten Plazenta-Klons unter stringenteren als den zum Screening der Plazenta-Bibliothek verwendeten Bedingungen gescreent (die genannten Bedingungen wurden so modifiziert, daß bei der Hybridisierung 50% Formamid und beim Waschen 0,03 M NaCl, 3 mM Trisnatriumcitrat, 0,1% NaDodSO₄ bei 60°C verwendet wurden). Es wurden vierzehn doppelt positive unterschiedlicher Intensitäten erhalten. Zwölf hiervon wurden zur Plaque-Reinigung ausgewählt. Beim Rescreenen zur Plaque-Reinigung wurden acht stark doppelt positive erhalten. Die DNA wurde aus den einzelnen dieser positiven Proben präpariert. Vier hiervon, die sich bei Verdauung mit EcoRI als identisch erwiesen, stellten die besten Kandidaten für cDNA-Klone voller Länge dar. Einer hiervon wurde zur Analyse durch DNA-Sequenzierung ausgewählt und als λ TF14 bezeichnet. Die Größe dieser Klone betrug etwa 2350 bp einschließlich der Länge des polyA-Schwanzes. Dies war die gleiche Größe wie die beim genannten Northern-Blot beobachtete Größe. Ein fünfter Klon war kürzer als die genannten 2350-bp-Klone.

[0081] Zwei der Fett(gewebe)-cDNA-Klone waren kürzer als die mRNA voller Länge (etwa 1800 bp) und wiesen EcoRI-Verdauungsmuster auf, die sich von den vermutlichen Klonen voller Länge deutlich unterschieden. Aus der Analyse dieser Klone ergibt sich, daß es sich um partielle Klone dahingehend handelt, daß diese eine einem Abschnitt der Gewebefaktorprotein-mRNA entsprechende DNA umfassen. Der achte Klon wies nur etwa 850 bp auf und wurde zur weiteren Analyse nicht ausgewählt.

BEISPIEL 2

DNA-Sequenz von Gewebefaktorprotein-cDNA

[0082] Die Nucleotidsequenz von Gewebefaktorprotein-cDNA ist in **Fig. 2** angegeben. Von den vier Fett(gewebe)-Klonen mit einem identischen EcoRI-Verdauungsmuster wurde ein Klon vollständig sequenziert und entsprach der in **Fig. 2** angegebenen Sequenz. Der Klon λ TF14 enthält etwa 2217 bp eines Inserts, das etwa 90 Nucleotide des poly(A)-Schwanzes (der in **Fig. 2** nicht angegeben ist) umfaßt. Die cDNA-Sequenz enthält 99 bp einer 5'-nicht-translatierten Sequenz. Das EcoRI-Verdauungsmuster des Klons von mutmaßlich voller Länge umfaßte drei Fragmente mit etwa 900, 750 und 650 bp. Ein fünfter Klon schien sich bezüglich des EcoRI-Verdauungsmusters im Fragment am 5'-Ende zu unterscheiden. Zwei der Fett(gewebe)-Klone wiesen ein EcoRI-Verdauungsmuster auf, das darauf hinwies, daß sie kürzer als die Klone voller Länge waren. Sie enthielten jedoch ein EcoRI-Fragment, das länger als jedes Fragment in den Klonen voller Länge war. Dies kann auf EcoRI-Polymorphismus oder das Vorhandensein eines Introns zurückzuführen sein. Der längste Klon wurde vollständig sequenziert. Die Vollständigkeit der Kodierungssequenz wurde durch die Anwesenheit eines mit einem Startcodon ATG beginnenden langen, offenen Leserasters bestätigt. Auf das ATG-Initiator-Codon folgen Codons für eine hydrophobe Leader- oder Signalsequenz.

[0083] Das 5'-Ende der cDNA enthält ein ATG-Startcodon für die Aminosäure Methionin, auf das ein kontinuierliches, offenes Leseraster, welches für ein Polypeptid aus 295 Aminosäuren kodiert, folgt. Bei den ersten 32 Aminosäureresten handelt es sich meist um hydrophobe Aminosäuren, die vermutlich ein aminoterminalen Signalpeptid darstellen. Die anschließende, aminoterminalen Sequenz entspricht der Sequenz von Gewebefaktorprotein, die aus Gewebe gereinigt wurde. Die cDNA-Sequenz sagt voraus, daß das reife Gewebefaktorprotein 263 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von etwa 29.500 enthält. Das Gewebefaktorprotein ist bekanntlich ein Membranglycoprotein mit einer relativen Molekülmasse von 42.000 bis 53.000 auf SDS-Polyacrylamidgelen. Die translatierte DNA-Sequenz sagt vier (4) Asparagin-verbundene Glykosylierungsstellen vorher. Ein Hydropathie-Profil des Proteins (**Fig. 5**) zeigt, daß die ersten drei dieser Stellen in hydrophilen Abschnitten lokalisiert sind, wodurch die Wahrscheinlichkeit zunimmt, daß sie auf der Oberfläche des Proteins liegen und tatsächlich glycosyliert sind. In ähnlicher Weise liegt ein Cluster aus sieben von dreizehn Resten (Aminosäuren 160–172), bei denen es sich entweder um Serin oder Threonin handelt (was auf mögliche Stellen für O-verbundene Glycosylierung hinweist) ebenfalls in einem als hydrophil vorhergesagten Abschnitt. Das Hydropathie-Profil zeigt ferner einen auffallenden Cluster von hydrophoben Resten in der Nähe des Carboxyterminus (**Fig. 5**). Dieser, die Aminosäuren 220–243 umfassende Abschnitt umfaßt wahrscheinlich die Membranankerdomäne von Gewebefaktor. Eine Suche in Sequenz-Datenbasen zeigte keine signifikante Homologie von Gewebefaktor mit verfügbaren Proteinsequenzen. Es ist anzumerken, daß keine deutliche Homologie zu Faktor VIII, einem Protein-Kofaktor des Gerinnungsproteasefaktors IX, bestand. Dies ist unerwartet, da sowohl der Faktor-VIII-Faktor-IX- als auch der Gewebefaktor-Faktor-VII-Komplex die Aktivierung von Faktor X katalysieren und die Proteasen der einzelnen Komplexe (Faktor IX und VII) stark homolog sind (F.S. Hagen et al., "Proc. Natl. Acad. Sci.", (USA) 83: S. 2412 [1986] und S. Yoshitake et al., "Biochemistry", 24: S. 3736 [1985]). Nun läßt sich erkennen, daß diese Wechselwirkungen sich nicht in einer Ähnlichkeit der primären

Proteinsequenz der beiden Kofaktoren widerspiegeln.

[0084] Die cDNA-Sequenz impliziert, daß reifer Gewebefaktor durch Signalpeptidase-Spaltung eines Prä-Peptids ohne weitere Propeptid-Verarbeitung freigesetzt wird. Die 32 Aminosäuren vom Anfangs-Methionin bis zum reifen Aminoterminus beginnen mit einem geladenen Abschnitt, auf den eine hydrophobe "Core"-Sequenz von 14 Resten folgt. Das Präpeptid endet mit ala-gly-ala; ala-X-ala ist die häufigste Sequenz, die vor einer Signalpeptidase-Spaltung liegt (O. Perlman et al., "Mol. Biol.", 167: S. 391 [1983]).

[0085] Das Methionin-Codon bei 100–102 (**Fig. 2**) initiiert vermutlich die Translation von Prä-Gewebefaktorprotein. Die fünf diesem ATG vorangehenden Nucleotide und das eine diesem ATG folgende Nucleotid sind bei Nucleotiden, die Translationsinitiationsstellen in eukaryotischer mRNA umgeben, üblich. Sie sind jedoch nicht vollständig mit der von M. Kozak, "Nucl. Acids Res.", 12: S. 857 [1984] beschriebenen Konsensussequenz identisch. Die charakterisierten cDNA-Klone scheinen praktisch den gesamten 5'-nicht-translatierten Abschnitt der Information zu enthalten.

[0086] Die cDNA enthält einen 3'-nicht-translatierten Abschnitt mit 1139 Nucleotiden, in dem 23 Nucleotide vor dem poly(A)-Schwanz das übliche Polyadenylierungssignal AATAAA liegt. Eine bemerkenswerte Eigenschaft des nicht-translatierten Abschnitts ist das Vorhandensein einer Repeatsequenz der Alu-Familie mit 300 bp. Im Humangenom sind etwa 300.000 Kopien des Alu-Repeats vorhanden, und es gibt zahllose Beispiele ihres Vorhandenseins in den Introns von Genen, wo sie während der Reifung der mRNA durch Spleißen entfernt werden (C.W. Schmid et al., "Science", 216: S. 1065 [1982] und P.A. Sharp, "Nature", 301: S. 471 [1983]). Obwohl cytoplasmatische poly(A)⁺-mRNA ebenfalls Alu-Sequenzen enthält, gab es bisher nur zwei spezielle Berichte über Alu-ähnliche Sequenzen in der 3'-nicht-translatierten Sequenz von mRNAs: In den Histokompatibilitätsantigenen der Klasse 1 bei Maus und Ratte und beim menschlichen low-density-Lipoprotein-Rezeptor (L. Hood et al., "Ann. Rev. Immunol.", 1: S. 529 [1983]; B. Majello et al., "Nature", 314: S. 457 [1985] und T. Yamamoto et al., "Cell", 39: S. 27 [1984]). Alu-Sequenzen werden oft von kurzen, direkten Repeats flankiert; wahrscheinlich eine Folge ihrer Insertion in das Genom an versetzten Doppelstrangbrüchen. Die Alu-Sequenz im 3'-Abschnitt von Gewebefaktor-cDNA ist von einem direkten Repeat aus 11 Nucleotiden flankiert, wie dies in **Fig. 2** durch Pfeile angedeutet ist.

BEISPIEL 3

Expression von Humangewebefaktorprotein

Eukaryotenwirt

[0087] Die Humangewebefaktorprotein-cDNA voller Länge war im cDNA-Klon λ TF14 enthalten. Die cDNA voller Länge wurde in ein Expressionsplasmid, umfassend den Cytomegalovirusenhancer und -promotor, die (das) Cytomegaloviruspleißdonorstelle und -intron, das(die) Ig-variabler-Region-Intron und -Spleißakzeptorstelle, die SV40-Polyadenylierungs- und Transkriptionsterminationsstelle, inseriert. Die in **Fig. 4** angegebene Herstellung des Expressionsvektors wurde wie folgt unternommen.

[0088] Der als pCIS2.8c26D bezeichnete hier verwendete Grundvektor basiert auf dem in der Europäischen Anmeldung Nr. 87308060.0 (US-A-07/071674, eingereicht am 9. Juli 1987, und 06/907185, eingereicht am 12. September 1986, Docket Nr. 373P1) beschriebenen pF8CIS.

[0089] Entsprechend **Fig. 4a** wurde ein einziges Nucleotid, das in pF8CIS vor der ClaI-Stelle liegt, von Guanosin zu Thymin geändert, so daß ein dam⁻-Stamm von E. coli zum Schneiden der ClaI-Stelle nicht erforderlich ist.

[0090] Es wurde eine Ligation mit 3 Teilen durchgeführt, umfassend die folgenden Fragmente: a) das ClaI-SstII-Fragment von pF8CIS mit 12617bp (aus einem dam⁻-Stamm isoliert und BAP-behandelt); das SstII-PstI-Fragment von pF8CIS mit 216bp, und c) ein kurzes, synthetisches PstI-ClaI-Oligonucleotid, das mit Kinase behandelt wurde (s. **Fig. 4a**; ein Stern kennzeichnet das geänderte Nucleotid). Diese 3-Teile-Ligation erzeugt den Expressionsvektor pCIS2.8c24D, der in den zur Expression von Gewebefaktor verwendeten Abschnitten zu pCIS2.8c26D und pCIS2.8c28D identisch ist.

[0091] Dieser Vektor wurde zur Entfernung der Faktor-VIII-Kodierungssequenz durch einen ClaI-HpaI-Verdau modifiziert. Dieser Abschnitt wurde durch einen Polylinker zur Gewährleistung weiterer, möglicher Klonierungsstellen ersetzt. Die Sequenz des verwendeten Polylinkers ist im folgenden angegeben:

5' CGATTCTAGACTCGAGGTCCGCGGCCGCGTT 3'
 3' TAAGATCTGAGCTCCAGGCGCCGCGCAA 5'

[0092] Die ClaI- und HpaI-Stellen des ursprünglichen Vektors werden regeneriert, und Stellen für die Enzyme XbaI, XhoI, NotI wurden eingeführt. Dieser Vektor wird als pCIS2.CXXNH bezeichnet. Die Kodierungsregion für Gewebefaktor wurde aus λ TF14 unter Verwendung der an der 5'-Verbindung des λ -Vektors und der cDNA befindlichen Sall-Stelle und einer 3' der Kodierungsregion im nicht-kodierenden Bereich der cDNA gelegenen NcoI-Stelle subkloniert. Zunächst wurde durch Verdauung mit NcoI ein 3'-stumpfes Ende erzeugt und anschließend eine Auffüllreaktion mit der Klenow-Fragment-DNA-Polymerase und 4dNTPs durchgeführt. Beim anschließenden Schneiden der λ TF14-DNA mit Sall wurde ein Fragment mit etwa 1232 bp mit der am 5'-Ende überhängenden Sequenz TCGA und einem 3'-stumpfen Ende, das die Gewebefaktorkodierungsregion enthielt, erzeugt. Dieses wurde in den mit XhoI (Bildung eines überhängenden TCGA) und HpaI-(stumpfes Ende) geschnittenen Vektor pCIS2.CXXNH durch Ligation eingeführt. Der neue Vektor wurde als pCIS.TF oder alternativ als pCISTF1 bezeichnet.

[0093] Humanembryonierenzellen (293 Zellen) und Affennierenzellen (Cos-Zellen) wurden mit dem Gewebefaktorprotein-cDNA enthaltenden Expressionsvektor pCIS.TF transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und bezüglich der Gewebefaktorproteinaktivität durch den im folgenden beschriebenen Chromogen-Assay getestet. Die Zellen wurden von den 100-mm-Platten durch Suspendieren in 1 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer des pH-Werts 7,0, der 0,15 M NaCl enthielt, entfernt. Die Extinktion bei 550 nm wurde zur Einstellung auf die unterschiedliche Zelldichte auf den Platten auf 0,750 eingestellt. Die Zellen wurden 1 min ultraschallbehandelt. Triton X-100 wurde entsprechend einer Endkonzentration von 0,1% zugesetzt. Die Proben wurden 90 min bei Raumtemperatur rotieren gelassen und der Zellabfall durch Zentrifugieren mit $10.000 \times g$ entfernt. Die durch Detergentien aufgeschlossenen bzw. löslich gemachten Extrakte wurden durch Verdünnen von 2 μ l der Probe in 0,8 ml 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, worin 0,1 M NaCl, 0,1% Rinderserumalbumin (TBS-Puffer) enthalten waren, relipidisiert. Die Lösung wurde mit 50 μ l einer 5-mg/ml-Lösung von Phosphotidylcholin (Lecithin) in 0,25% Desoxycholsäure und 25 μ l CdCl_2 versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert.

[0094] Das rekombinante Gewebefaktorprotein wurde bezüglich der Funktionsfähigkeit in einem speziellen, farberzeugenden Test (Chromogen-Assay) getestet. Die Ergebnisse sind in **Fig. 9** angegeben. Wie erwartet zeigte sich, daß verschiedene Konzentrationen von Kaninchenhirn-Thromboplastin (roher Gewebefaktor) in diesem Test reagierten. Kontroll-COS-7-Zellen (die den Stamm-Expressionsvektor ohne Gewebefaktor-cDNA enthielten) wiesen eine nur schwach über dem Lehrversuch (nur mit Zugabe des Relipidisierungsgemischs) liegende Aktivität auf. Die mit dem Gewebefaktorexpressionsplasmid transfizierten Zellen zeigten dagegen in diesem Test eine stark positive Reaktion, wodurch aufgezeigt wurde, daß die cDNA für Gewebefaktor kodiert.

BEISPIEL 4

Expression von Humangewebefaktorprotein

Prokaryotenwirt

[0095] Das Plasmid pTF2A12 wurde unter Verwendung des Alkaliphosphatase-Promotors und der STII-Leadersequenz zur Expression von reifem Gewebefaktorprotein in *E. coli* konstruiert (US-A-4680262). Dieses Plasmid wurde durch Ligation von 4 DNA-Fragmenten konstruiert (vergl. **Fig. 6**). Das erste bestand aus dem synthetischen DNA-Doppelstrang:

5' TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATT
 ACGTAGTCCGTGATGTTTATGACACCGTCGTATATTAAATTG-5'

[0096] Das genannte Fragment kodiert für die ersten 12 Aminosäuren von reifem Gewebefaktorprotein. Das zweite war ein für die Aminosäuren 13–216 kodierendes BbvI-EcoRI-Restriktionsfragment des im vorhergehenden genannten pCISTF mit 624 Basenpaaren. Das dritte war ein für die letzten 47 Aminosäuren von Gewebefaktorprotein kodierendes EcoRI-BamHI-Fragment von pCISTF mit 518 Basenpaaren. Das Plasmid pAPSTII HGH-1 (US-A-4680262) wurde mit NsiI BamHI von 930 bp zur Erzeugung eines Fragments verdaut.

[0097] Die vier Fragmente wurden zur Bildung des Plasmids pTF2A12 gemäß **Fig. 6** durch Ligation miteinander verknüpft und zur Transformation von *E.-coli*-K12-Stamm-294-Zellen verwendet. Die Transformanten wurden durch Ampicillinresistenz selektiert. Das Plasmid pTF2A12 wurde durch Restriktionsanalyse und Di-desoxy-Sequenzierung selektiert.

[0098] Expressionsvektoren enthaltende E.-coli-K12-Stamm-294-Zellen wurden bei 29°C in 50 µg/ml Carbenicillin enthaltenden, armen Phosphatmedien über Nacht wachsen gelassen. Zellpellets aus 1 ml Kulturlösung mit einer Extinktion von 1 bei 600 nm wurden in 200 µl 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mg/ml Lysozym resuspendiert. Die Suspensionen wurden 1 min pulsbeschallt und anschließend zur Entfernung von Zellabfall mit 10.000 × g zentrifugiert. Die mit Detergentien aufgeschlossenen Extrakte wurden durch Verdünnen von 10 µl der Probe in 0,8 ml 0,05 M Tris-HCl, pH-Wert 7,5, worin 0,1 M NaCl, 0,1% Rinderserumalbumin (TBS-Puffer) enthalten waren, relipidisiert. Die Lösung wurde mit 50 µl einer 5-mg/ml-Lösung von Phosphatidylcholin in 0,25% Desoxycholsäure und 25 µl CdCl₂ versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert.

[0099] Die Gewebefaktoraktivität wurde durch den im folgenden beschriebenen Chromogentest nachgewiesen.

BEISPIEL 5

Expression einer Humangewebefaktorproteinmutante

[0100] Das Plasmid pTFIII ist zur Expression einer reifen Mutantenform von Gewebefaktorprotein in E. coli konstruiert. Diese Mutation wandelt Cystein an Position 245 von reifem Gewebefaktorprotein in Serin um. Die Regulationselemente für die Expression, der Alkaliphosphatase-Promotor und die STII-Leadersequenz sind zu den beim Aufbau des Plasmid pTF2A12 verwendeten identisch.

[0101] Das Plasmid TFIII wurde in drei Stufen hergestellt, wobei die ersten beiden das Carboxy-Ende des Gens wieder aufbauen. Die Plasmide pTF100-1 und pTR80-3 sind die Ergebnisse der ersten beiden Stufen.

[0102] Das Plasmid pTF100-1 wurde aus drei DNA-Fragmenten aufgebaut (s. **Fig. 7a**). Das erste besteht aus dem Klonierungsvektor pTrp14 (US-A-4663283), in dem ein nicht-essentielles EcoRI-XbaI-Fragment entfernt ist (**Fig. 7**). Das zweite bestand aus einem für die Aminosäuren 217–228 von reifem Gewebefaktorprotein kodierenden EcoRI-FokI-Fragment mit 32 Basenpaaren. Das dritte, für die Aminosäuren 229–245 kodierende Fragment bestand aus einem chemisch synthetisierten DNA-Doppelstrang, indem das Codon an Position 245 von TGT zu TCT (unterstrichen) verändert war.

```
5' -TA TTT GTG GTC ATC ATC CTT GTC ATC ATC CTG
      A CAC CAG TAG TAG GAA CAG TAG TAG GAC
```

```
GCT ATA TCT CTA CAC AAG T
CGA TAT AGA GAT GTG TTC AGA TC-5'
```

[0103] Die drei Fragmente wurden unter Bildung des Plasmids pTF100-1 durch Ligation miteinander verbunden und in E.-coli-K12-Stamm 294 transformiert. Die Transformanten wurden durch Ampicillinresistenz selektiert. Das Plasmid pTF100-1 wurde durch Restriktionsanalyse und Didesoxy-Sequenzierung selektiert.

[0104] Das Plasmid pTF80-3 wurde aus zwei DNA-Fragmenten aufgebaut (**Fig. 7b**). Das erste bestand aus dem Plasmid-Vektor pHGH207 (US-A-4663283), in dem das XbaI-BamHI-Fragment mit 930 Basenpaaren entfernt war. Das zweite bestand aus dem chemisch synthetisierten 68-mer-DNA-Doppelstrang:

```
5' -CTA GAA AGG CAG GAG TTG GCC AGA GCT GCA AGG AGA ACT
      TT TCC GTC CTC AAC CGG TCT CGA CCT TCC TCT TGA
```

```
CCC CAC TGA ATG TTT CAT AAG CTT G
GGG GTG ACT TAC AAA GTA TTC GAA CCT AG-5'
```

[0105] Die beiden Fragmente wurden unter Bildung des Plasmids pTF80-3 durch Ligation miteinander verbunden und in E.-coli-K12-Stamm 294 transfiziert. Die Transformanten wurden über Ampicillinresistenz selektiert. Das Plasmid pTF80-3 wurde durch Restriktionsanalyse und Didesoxy-Sequenzierung selektiert.

[0106] Das Plasmid pTFIII wurde aus 4 DNA-Fragmenten aufgebaut (**Fig. 7c**). Das erste bestand aus dem Vektor pAPSTIIHGH (US-A-4680262), in dem das NsiI-BamHI-Fragment mit 930 Basenpaaren entfernt war. Das zweite bestand aus dem für die Aminosäuren 1–217 von reifem Gewebefaktorprotein kodierenden NsiI-EcoRI-Restriktionsfragment von pTF2A12 (s. Beispiel 4 oben) mit 650 Basenpaaren. Das dritte bestand aus einem für die Aminosäuren 218–245 der reifen Gewebefaktorproteinmutante kodierenden EcoRI-XbaI-Fragment von pTF100-1 mit 80 Basenpaaren. Das vierte bestand aus einem für die letzten 18 Aminosäuren kodierenden XbaI-BamHI-Fragment von pTF80-3 mit 60 Basenpaaren. Die vier Fragmente wurden

durch Ligation miteinander verbunden und in E.-coli-K12-Stamm 294 transformiert. Die Transformanten wurden über die Ampicillin-Resistenz selektiert. Das Plasmid pTFIII wurde durch Restriktionsanalyse selektiert.

BEISPIEL 6

Expression eines Humangewebefaktorfusionsproteins

[0107] Ein Fusionselement mit der Herpes-gD-Signalsequenz (EP-Veröffentlichung Nr. 0139416, veröffentlicht am 2. Mai 1985) und dem reifen Abschnitt von Humangewebefaktor-cDNA wurde unter Verwendung der Steuerungselemente von Vektor pRK7 hergestellt. pRK7 und pRK5 (siehe im folgenden) wurden wie folgt konstruiert.

Aufbau von pRK5 und pRK7

[0108] Das Ausgangsplasmid war das bereits geschilderte pCIS2.8c28D. Die Basenzahlen in den Abschnitten 1–6 beziehen sich auf pCIS2.8c28D, wobei die Base 1 auf dem ersten T der vor dem CMV-Promotor liegenden EcoRI-Stelle liegt. Der(das) Cytomegalovirus-early-Promotor und -Intron und der SV40-Ursprung und das polyA-Signal waren auf getrennten Plasmiden plziert.

1. Der Cytomegalovirus-early-Promotor wurde als EcoRI-Fragment von pCIS2.8c28D (9999-12-1) in die EcoRI-Stelle von pUC118 (Yanish-Perron et al., "Gene", 33: S. 103 [1985] kloniert. Zwölf Kolonien wurden aufgenommen und bezüglich der Orientierung, in der eine aus pUC118 hergestellte, einzelsträngige DNA eine Sequenzierung von der EcoRI-Stelle bei 1201 zur EcoRI-Stelle bei 9999 ermöglichen würde, gescreent. Dieser Klon wurde als pCMVE/P bezeichnet.
2. Einzelsträngige DNA wurde aus pCMVE/P zur Insertion eines SP6-Promotors (M.R. Green et al., "Cell", 32: S. 681–684 [1983]) durch ortsspezifische Mutagenese hergestellt. Ein synthetisches, den SP6-Promotor enthaltendes 110-mer (s. "Nucleic Acids Res.", 12: S. 7041 [1984] **Fig. 1**); Sequenzen des SP6-Promotors von –69 bis +5 wurden zusammen mit Fragmenten von 18 bp an beiden Enden des Oligomers entsprechend CMVE/P-Sequenzen verwendet. Die Mutagenese erfolgte nach Standardtechniken. Sie wurde unter Verwendung eines markierten 110-mers mit hoher und geringer Stringenz gescreent. Sechs mögliche Klone wurden herausgenommen und sequenziert. Ein positiver wurde identifiziert und als pCMVE/PSP6 bezeichnet.
3. Der SP6-Promotor wurde geprüft und erwies sich beispielsweise bei Zugabe von SP6-RNA-Polymerase und Prüfen bezüglich RNA geeigneter Größe als aktiv.
4. Ein Cla-NotI-Sma-Adapter wurde zur Insertion von der CII-Stelle (912) zur SmaI-Stelle von pUC118 in pCMVE/P (Stufe 1) und pCMVE/PSP6 (Stufe 2) hergestellt. Dieser Adapter wurde in die ClaI-SmaI-Stelle von pUC118 durch Ligation eingeführt und bezüglich der korrekten Klone gescreent. Der Linker wurde bei beiden sequenziert. Die Klone wurden mit pCMVE/PSP6-L und pCMVE/P-L bezeichnet.
5. pCMVE/PSP6-L wurde mit SmaI (an der Linker-pUC118-Verbindung) und HindIII (in pUC118) geschnitten. Ein HpaI(5573)- bis HindIII(6136)-Fragment des im folgenden angegebenen pSVORAAΔRI 11 wurde in SmaI-HindIII von pCMVE/PSP6-L insertiert. Diese Ligation wurde gescreent. Ein Klon wurde isoliert und mit pCMVE/PSP6-L-SVORAAΔRI bezeichnet.
- a) Der SV40-Ursprung und das polyA-Signal wurden als XmnI(5475)- bis HindIII(6136)-Fragment von pCIS2.8c28D isoliert und in die HindIII- bis SmaI-Stellen von pUC119 kloniert. Dieser Klon wurde als pSVORAA bezeichnet.
- b) Die EcoRI-Stelle bei 5716 wurde durch partielle Verdauung mit EcoRI und Auffüllen mit Klenow entfernt. Die durch Eigenligation nach Auffüllen erhaltenen Kolonien wurden gescreent. Der richtige Klon wurde isoliert und mit pSVORAAΔRI 11 bezeichnet. Die deletierte EcoRI-Stelle wurde durch Sequenzieren geprüft und als korrekt nachgewiesen.
- c) Das HpaI(5573)- bis HindIII(6136)-Fragment von pSVORAAΔRI 11 wurde isoliert und in pCMVE/PSP6-L insertiert (s. 4. oben).
6. pCMVE/PSP6-L-SVORAAΔRI (Stufe 5) wurde mit EcoRI bei 9999 geschnitten, geglättet und selbst-ligiert. Es wurde ein Klon ohne eine EcoRI-Stelle identifiziert und mit pRK bezeichnet.
7. pRK wurde mit SmaI und BamHI geschnitten. Dieses wurde mit Klenow aufgefüllt und durch Ligation wieder verbunden. Die Kolonien wurden gescreent. Eine positive Probe wurde identifiziert und mit pRKΔBam/Sma 3 bezeichnet.
8. Die HindIII-Stelle wurde unter Verwendung eines Konverters in eine HpaI-Stelle umgewandelt. (Ein Konverter ist ein zur Änderung einer Restriktionsstelle in eine andere verwendetes Stück DNA. In diesem Fall könnte ein Ende zu einem HindIII-sticky-end komplementär sein und am anderen Ende eine Erkennungsstelle für HpaI tragen.) Es wurde eine positive Probe identifiziert und mit pRKΔBam/Sma, HIII-HpaI 1 bezeichnet.

9. pRKΔBam/Sma, HIII-HpaI 1 wurde mit PstI und NotI geschnitten und ein RI-HIII-Linker und HIII-RI-Linker durch Ligation eingefügt. Es wurden Klone für die beiden Linker gefunden. Es wurde jedoch auch festgestellt, daß zu viele der HpaI-Konverter eingebaut worden waren (zwei oder mehr Konverter erzeugen eine PvuII-Stelle). Diese Klone mußten daher mit HpaI geschnitten und eigenligiert werden.

10. RI-HIII-Klon 3 und HIII-RI-Klon 5 wurden mit HpaI geschnitten und eigenligiert. Positive Proben wurden identifiziert. Der RI-HIII-Klon wurde mit pRK5 bezeichnet. Ein HIII-RI-Klon wurde mit HpaI geschnitten, verdünnt und eigenligiert. Nach dem Screenen wurde eine positive Probe identifiziert und mit pRK7 bezeichnet.

[0109] Der Vektor pRK7 enthält den CMV-Promotor und -Enhancer und -Spleißdonor, das IgG-Intron und den -Spleißakzeptor, den SP6-Promotor, das SV40-poly-A-Signal und den SV40-Replikationsursprung. Er weist kein DHFR-Gen auf. Der Aufbau des Gewebefaktorproteinexpressionsvektors wurde wie folgt unternommen: die Gewebefaktorprotein-cDNA von λTF14 wurde in die Sall-Stelle von pSP64 kloniert und als pSP64TF (Promega Corporation, 1987) bezeichnet. Das Gewebefaktor-cDNA enthaltende pSP64 wurde mit NcoI geschnitten. Ein nicht-kinasebehandelter 18-mer-Konverter wurde mit dem NcoI-Ende zur Änderung der NcoI-Stelle in eine XbaI-Stelle ligiert. Die verwendeten Linker-Sequenzen waren folgende:

NcoI-XbaI-Linker

18-mer

```

      NcoI           XbaI
5' CATGGAGTCGTAAC TGAT 3'
   3' CTCAGCATTGACTAGATC 5'

```

[0110] pSP64 wurde anschließend mit BbvI verdaut. Ein Fragment mit 1030 bp wurde gel-isoliert. Ein nicht-kinasebehandelter PvuII-BbvI-DNA-Doppelstrang mit etwa 100 bp enthielt die Sequenzen für die erste Thrombinaktivierungsstelle in Faktor VIII und die ersten 12 Aminosäuren von reifem Humangewebefaktorprotein. Die Sequenzen der etwa 100 bp waren wie folgt:

Gewebefaktor/Thrombin-Fusion

```

5' CTG GAG GAC AGT TAT GAA GAT ATT TCA GCA TAC TTG CTG AGT AAA
   GAC CTC CTG TCA ATA CTT CTA TAA AGT CGT ATG AAC GAC TCA TTT

AAC AAT GCC ATT GAA CCA AGA TCA GGC ACT ACA AAT ACT GTG GCA
TTG TTA CGG TAA CTT GGT TCT AGT CCG TGA TGT TTA TGA CAC CGT

GCA TAT AAT T      3'
CGT ATA TTA AAT TG

```

[0111] Das PvuII-BbvI-Fragment wurde an das Fragment mit etwa 1030 bp ligiert. Ein Fragment mit etwa 1130 bp wurde gel-isoliert. Dieses PvuII-XbaI-Fragment wurde anschließend in einen als pSP64ThTF bezeichneten pSP64-Vektor ligiert. Es wurde ein Klon erhalten. Dieser wurde über die das synthetische 100-mer umfassende Fläche sequenziert. Dieses Plasmid wurde mit PvuII und XbaI in einem Versuch zu einer Isolierung einer großen Menge des Inserts verdaut. Die XbaI-Stelle wurde jedoch nicht verdaut. Daher wurde das Insert durch Schneiden mit PvuII und Sall gel-isoliert. Die Sall-Stelle befindet sich im verbleibenden Teil des pSP64-Polylinkers und ist nahe der XbaI-Stelle lokalisiert. Das zweite Fragment, das die Herpes-gD-Signalsequenz plus einen Teil der nicht-translatierten 5'-Region enthält, umfaßte ein aus pgD-DHFR (EP-Veröffentlichung 0139417, veröffentlicht am 2. Mai 1985) erhaltenes Fragment mit 275 bp, welches mit PstI-SacII verdaut wird, und ein synthetisches SacII-PvuII-Fragment mit 103 bp der folgenden Sequenz:

Synthetisches SacII-PvuII-Fragment (HSVgD-Leader)

```

5' -GC AAA TAT GCC TTG GCG GAT GCC TCT CTC AAG ATG GCC GAC
3' -GCG CCG TTT ATA CGG AAC CGC CTA CGG AGA GAG TTC TAC CGG CTG

CCC AAT CGA TTT CGC GGC AAA GAC CTT CCG GTC CTG GAC CAG-3'
GGG TTA GCT AAA GCG CCG TTT CTG GAA GGC CAG GAC CTG GTC-5'

```

[0112] Das dritte Segment wurde durch Verdauen von pRK7 mit PstI-Sall und Gel-Isolation eines Fragments von etwa 4700 bp erhalten. Bei der endgültigen Ligation von 3 Teilen wurden verwendet: a) ein PvuII-Sall-Fragment mit der ersten 5'- zu der für Gewebefaktorprotein kodierenden, cDNA gelegenen Thrombinaktivierungs-

stelle; b) ein PstI-PvuII-Fragment mit der Herpes-gD-Signalsequenz, und c) das die Steuerungselemente enthaltende pRK-Fragment. Die genannten drei Teile und die Klone wurden durch Restriktionsenzymverdauung und Sequenzieren hergestellt und als korrekt identifiziert.

[0113] Humanembryonierenzellen (293S) wurden mit dem das Gewebefaktor-Herpes-gD-Fusionsprotein enthaltenden Expressionsvektor transfiziert. Die Human-293-Zellen werden 15 h nach einer transienten Transfektion geerntet. Das Kulturmedium wird entfernt, und es werden 2 ml Extraktionspuffer (5 mM Tris HCl), 150 mM NaCl: pH 7,5 [TBS] mit 0,1% Triton X-100) pro 100-mm-Gewebeplatte zugegeben. Die Zellen werden suspendiert und (Ende-über-Ende) 45–60 min bei 4°C rotiert. Der Extrakt wird 20 min mit 8000 × g zentrifugiert und anschließend direkt auf die monoklonale Antikörpersäule (3,5 mg 5B6/ml CNBr-aktivierte Sepharose) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min aufgetragen. Die Herstellung eines Antikörpers zu Herpes-gD ist in der EP-Veröffentlichung Nr. 1139416, veröffentlicht am 2. Mai 1985, beschrieben. Die Antikörpersäule wird mit 10 ml Extraktionspuffer zur Rückführung der Extinktion (280 nm) auf die Grundlinie gewaschen. Die Säule wird anschließend mit 50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 0,1% Triton X-100, pH 7,5, gewaschen und mit 0,1 M Glycin, 150 mM NaCl, 0,1 Triton X-100, pH 2, eluiert. Der pH-Wert wird mit 1 M Tris-HCl, pH 8,5, auf einen neutralen Wert eingestellt.

[0114] Der gD-Abschnitt des gD-Gewebefaktorfusionsproteins wurde vom Fusionsprotein unter Verwendung von Thrombin abgespalten. 1110 Einheiten Thrombin (0,33 mg Protein) wurden kovalent an 0,5 ml CNBr-aktivierte Sepharose entsprechend den Herstellervorschriften gebunden. 5000 Einheiten gDTF-Fusionsprotein werden mit etwa 150 µl Thrombin-Sepharose 90 min bei 37°C inkubiert (Ende-über-Ende-Rotation). Thrombin-Sepharose wird anschließend durch Zentrifugation entfernt.

[0115] Die Gewebefaktoraktivität wurde durch den im folgenden Chromogentest nachgewiesen.

BEISPIEL 7

Expression von Gewebefaktorprotein mit deletierter Cytoplasmadomäne

[0116] Der Vektor pRKTFΔ244 wurde entsprechend **Fig. 10** zur Expression von Gewebefaktorprotein ohne die Cytoplasmadomäne, die Aminosäuren 244–263, konstruiert. Der Vektor wurde durch die Ligation von 3 Teilen hergestellt. Der erste Teil bestand aus einem durch Verdauen von pCISTF1 mit EcoRI und ClaI erhaltene Fragment mit 859 bp. Das Fragment mit 859 bp wurde gel-isoliert. Der zweite Teil wurde nach der ClaI-BamHI-Verdauung des vorhergenannten pRK5 gel-isoliert. Der dritte Teil bestand aus einem chemisch synthetisierten EcoRI-BamHI-87-mer mit der folgenden Sequenz:

87-mer

```

217
Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile Gly Ala Val Val Phe Val Val
5'-AA TTC AGA GAA ATA TTC TAC ATC ATT GGA GCT GTG GTA TTT GTG GTC
3'-G TCT TTC TAT GAA GTA GAT AAT TCC AGC CAC TAC AAA CAC GAC

Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile Ser Leu His End
ATC ATC CTT GTC ATC ATC CTG GCT ATA TCT CTA CAC TAA G-3'
GAT GAT AAG GAC GAT GAT CAG AGC TAT AGA TAG GTG TTA TCC GA-5'

```

[0117] Bei der Ligation von 3 Teilen wurden verwendet: a) das für die Aminosäuren 1–216 kodierende Fragment mit 859 bp; b) das Fragment von pRK5 mit 4700 bp, und c) das für die Aminosäuren 217–243 kodierende 87-mer. Dieser neue Vektor wurde mit pRKTFΔ244 bezeichnet (s. **Fig. 10**).

[0118] Humanembryonierenzellen (293) wurden mit dem Expressionsvektor pRKTFΔ244 transfiziert. Nach drei Tagen wurde Gewebefaktorprotein mit deletierter Cytoplasmadomäne gemäß der vorherigen Beschreibung gereinigt und mit dem im folgenden angegebenen Chromogentest getestet. Der Gewebefaktor mit deletierter Cytoplasmadomäne zeigte in diesem Ansatz eine starke positive Reaktion, wodurch gezeigt wird, daß das Gewebefaktorprotein mit deletierter Cytoplasmadomäne in diesem in-vitro-Koagulationsversuch wirksam war.

Reinigung von Gewebefaktorprotein

[0119] Gewebefaktorprotein wurde mittels Immunoaffinitätsreinigung unter Verwendung eines Humangewebefaktorprotein bindenden, monoklonalen IgG-Antikörpers gereinigt.

[0120] Humangewebefaktorprotein wurde in der im vorherigen beschriebenen, rekombinanten Kultur synthetisiert. Die folgenden Immunogene wurden gemäß dem folgenden Schema einer BALB/c-Maus (29.1.C.) injiziert: rekombinantes Humangewebefaktorprotein (rTF) (0,07 mg/ml mit einer spezifischen Aktivität von 17040 U/mg); rekombinantes Gewebefaktorprotein, das aus einem durch Thrombin zur Entfernung der Herpes-gD-Sequenzen vom aminoterminalen Ende gespaltenen Gewebefaktor-gD-Fusionsprodukt erhalten wurde (rTF-gDThr) (0,72 mg/ml mit einer spezifischen Aktivität von 4687 U/mg) und rekombinantes Gewebefaktor-Herpes-gD-Fusionsprodukt (rTF-gD) (etwa 150.000 U/mg) nach dem folgenden Immunisierungsschema:

Tag	Verabreichungsweg	Immunogen
1.	subkutan (sc)	0,25 ml r-TF in Freundschem Volladjuvans
14.	zur Hälfte sc und zur Hälfte intraperitoneal (ip)	0,25 ml r-TF:gD in unvollständigem Freundschem Adjuvans
28.	I.P.	0,25 ml r-TF:gD in PBS
42.	I.P.	0,25 ml r-TF:gD in PBS
62.	I.P.	0,25 ml r-TF:gD in PBS
75.	I.P.	0,25 ml r-TF:gD in PBS
85.	intra-splenisch	0,1 ml r-TF:gDThr in PBS **

**10-40 µg/ml

[0121] Der durch Radioimmunfällung (RIP) und ELISA bestimmte Anti-TF-Titer nahm während der Immunisierungen bis zum Tag 85 schrittweise zu.

[0122] Beim RIP-Test wurden 0,005 ml der Seren von immunisierten und nicht-immunisierten Mäusen, die mit 0,495 ml PBSTA (PBS mit 0,5% Rinderserumalbumin [BSA] und 0,1% Triton X-100) verdünnt worden waren, verwendet. 50.000 cpm ¹²⁵I-rTF wurden zugesetzt. Das Gemisch wurde 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Das mit Antikörpern komplexierte ¹²⁵I-rTF wurde durch Inkubation bei Raumtemperatur während 1h mit 0,05 ml SPA-Perlen gefällt. Die SPA-Perlen bestanden aus Staphylokokkenprotein A, das an Sepharose-CL-4B-Perlen, die mit Kaninchen-Anti-Maus-IgG vorinkubiert und in 50 mM Tris, pH 8, 10 mM MgCl₂, 0,1% BSA und 0,02% NaN₃ aufbewahrt worden waren, gebunden war. Die Perlen wurden pelletiert, dreimal mit PBSTA gewaschen und in einem gamma-Zähler gezählt.

[0123] Der ELISA bestand aus 0,1 ml rTF (0,5 µg/ml) in Carbonatpuffer eines pH-Werts von 9,6, das 2h bei 37°C an Mikrotiter-Vertiefungen absorbiert wurde. Eine weitere, nicht-spezifische Adsorption an die Vertiefungen wurde 1h bei 37°C mit PBSTA (PBS mit 5% BSA) blockiert. Die Vertiefungen wurden dreimal mit PBST (PBS mit 0,1% Tween 80) gewaschen. Die in PBS verdünnten Serumproben wurden zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Vertiefungen wurden dreimal mit PBST gewaschen. Jede Vertiefung wurde mit 0,1 ml von an Meerrettichperoxidase konjugiertem Ziegen-Anti-Maus-Immunglobulin versetzt und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vertiefungen wurden wiederum gewaschen. O-Phenylendiamin wurde als Substrat zugesetzt und das Ganze 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2,5 M H₂SO₄ abgebrochen. Die Extinktion der einzelnen Vertiefungen wurde bei 492 nm abgelesen.

[0124] Am 89. Tag wurde die Milz der Maus 29.1.C entnommen, zerkleinert und die Milzzellen mit P3 X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580) nicht-sezernierenden Mausmyelomzellen unter Verwendung des PEG-Fusi-

onsverfahrens von S. Fazakas de St. Groth et al., "J. Immun. Meth.", 35: S. 1–21 (1980) fusioniert. Die Fusionskultur wurde auf 4 Platten mit jeweils 96 Mikrotiter-Vertiefungen überimpft und in HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin)-Medien mittels üblicher Techniken kultiviert (Mishell, Shiigi, "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman & Co., San Francisco, (USA), S. 357–363 [1980]). Die anti-TF-Aktivität der Kultur-Überstände wurde mittels ELISA und RIP bestimmt. Es wurden 20 positive Proben mit anti-TF-Aktivität gefunden. Von diesen wurden 12 stabile Fusionsprodukte, die anti-TF sezernierten, vermehrt und durch Grenzwert-Verdünnung unter Verwendung veröffentlichter Verfahren (Oi, V.J.T. & Herzenberg, L.A., "Immunoglobulin Producing Hybrid Cell Lines" in "Selected Methods in Cellular Immunology", S. 351–372; Mishell, B.B. und Shiigi, S.M. [Hrsg.], W.H. Freeman & Co. [1980]) kloniert. Die Selektion der Klone beruhte auf: makroskopischer Beobachtung einzelner Klone, ELISA und RIP. Die Isotypisierung des Antikörpers erfolgte unter Verwendung eines Zymed-Isotypisierungskits gemäß der beiliegenden Anleitung (Zymed Corp.). Große Mengen spezifischer, monoklonaler Antikörper wurden durch Injektion von klonierten Hybridomzellen in "Pristan-primed"-Mäuse zur Erzeugung von Ascites-Tumoren produziert. Die Ascites wurden anschließend gesammelt und über eine Protein-A-Sepharosesäule gereinigt.

[0125] Etwa 5 ml Ascitesflüssigkeit wurde mit 3000 min^{-1} in einer Sorvall 6000 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die durchsichtige Pristanschicht und die Lipidschicht wurden mit einer Pasteurpipette entfernt. Die Ascitesflüssigkeit wurde in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Ascitesflüssigkeit wurde über ein 0,45M-Filter steril filtriert. Zum Ascites wurden 1,11 g KCl zugesetzt, wobei eine Endkonzentration von 3M KCl erhalten wurde.

[0126] Der Ascites wurde auf eine 10-ml-Säule mit SPA-Sepharose (Fermentech) gegeben. Die Säule wurde mit 3M KCl gewaschen. Das Maus-IgG wurde mit 3 bis 4 Säulenvolumina 0,1M Essigsäure in 0,15M NaCl eines pH-Werts von 2,8 eluiert.

[0127] Der Antikörper D3 wurde entsprechend den Herstellervorschriften mit 3 mg IgG pro ml Sepharose an CNBr-Sepharose gekoppelt (s. Pharmacia & Co., Anleitungshandbuch). Die transfizierten 293S-Zellen wurden in einem 1:1-Gemisch von Ham-F-12 (w/o Glycin, Hypoxanthin und Thymidin) und DMEM (w/o Glycin) wachsen gelassen. Zusatzstoffe zum Grundmedium sind: 10%-iges, dialysiertes oder diafiltriertes Fötenkalbsserum; 50 nM Methotrexat; 2,0 mM L-Glutamin, und 10 mM HEPES-Puffer.

[0128] Eine gefrorene Viole mit 293S (63/2S CISTF) wird in einem, das beschriebene Medium enthaltenden Gewebekulturkolben aufgetaut. Sobald die Kultur zusammenfließt, wird sie mit einem Trypsin/EDTA-Gemisch trypsinisiert und ein kleiner Teil der Zellpopulation zur Beimpfung größerer Kolben verwendet. Die Kulturen werden täglich durch Phasenmikroskopie zur Bestimmung des Wachstums (prozentuales Zusammenfließen), der Morphologie und der allgemeinen Gesundheit überwacht. Sobald die Rollflaschenkulturen zusammenfließen (üblicherweise innerhalb von 5–7 d), wurden die Zellen trypsinisiert und gezählt. Die Zahl der Zellen wurde ermittelt und ihre Lebensfähigkeit mittels der Trypanblau-Exclusionstechnik bestimmt. Typische Zellzahlen bei einer Rollflasche von 850 cm^2 beim Zusammenfließen betrugen 1 bis 4×10^8 Zellen. Die Zellen wurden in 0,01 M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl suspendiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren mit 5000 min^{-1} gesammelt. Die Zellen wurden in 50 mls TBS mit 1% Triton X pro Kolben resuspendiert. Die Kulturen wurden 1h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 20 min mit $8000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die im vorherigen beschriebene D3-Sapharosesäule aufgetragen. Die Säule wurde mit 0,1 M Essigsäure, 150 mM NaCl und 0,05% Tween 80 gewaschen und eluiert.

BEISPIEL 9

Test auf Gewebefaktorprotein

1. Chromogener Gewebefaktortest

[0129] Sämtliche aus dem Kulturmedium extrahierten Proben wurden vor dem Test relipidisiert. Wie im vorherigen diskutiert, ist für Gewebefaktor zur Entwicklung von Aktivität in in-vitro-Testsystemen Phospholipid absolut erforderlich (Pitlick und Nemerson, aao). Lecithin granulat wurde in 0,05 M Tris, 0,1 M NaCl, pH 7,4 (TBS), worin 0,25% Natriumdesoxycholat enthalten war, bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml homogenisiert. Diese Lösung (PC/DOC) wurde zur Relipidisierung von Gewebefaktor wie folgt verwendet. Gewebefaktorprotein wurde in 0,1% Rinderserumalbumin enthaltendem TBS (TBSA) verdünnt. 50 μl wurden in ein $12 \times 75\text{-mm}$ -Polystyrolteströhrchen gegeben und mit 50 μl PC/DOC-Lösung versetzt. Anschließend wurden 350 μl TBSA zusammen mit 25 μl 100 mM CdCl_2 zugegeben. Dieses Relipidisierungsgemisch wurde 30 min bei 37°C inkubieren gelassen.

[0130] Für den Chromogen-Test wurden relipidierte Gewebefaktorproteinproben in TBSA verdünnt. 10 µl wurden mit 50 µl des Faktor-IX_a/Faktor-X-Reagens und 2 µl einer Lösung von gereinigtem FaktorVII, 30 U/ml, in ein Teströhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden auf 37°C erwärmt und mit 100 µl 25mM CaCl₂ versetzt. Die Proben wurden 5 min bei 37°C inkubiert, bevor sie mit 50 µl von für Faktor X_a, S2222, spezifischem, chromogenem Substrat, das auch den synthetischen Thrombininhibitor I2581 enthielt, versetzt wurden. Die Reaktion wurde 10 min ablaufen gelassen und durch die Zugabe von 100 µl 50%-iger Eisessiglösung gestoppt. Die Extinktion wurde bei 405 nm nachgewiesen. Unter Verwendung von Kaninchenhirn-Thromboplastin (kommerziell erhältlich bei Sigma, St. Louis, MO.-Katalog #TO263) wurde eine Standardkurve erstellt, bei der diesem Reagens willkürlich 100 Gewebefaktoreinheiten/ml zugeordnet wurde. Die Verdünnungen erfolgten von 1 : 10 bis 1 : 1000. Die Extinktion wurde auf der Abszisse eines halblogarithmischen Kurvenpapiers mit der Standardverdünnung auf der Ordinate aufgetragen.

2. Einstufiger Test bezüglich Gewebefaktoraktivität

[0131] 10 µl von relipidiertem oder lipidfreiem Gewebefaktorprotein oder TBSA als Kontrolle wurden in einem silikonisierten Glasröhrchen zur Verhinderung einer nicht-spezifischen Aktivierung der Gerinnung durch die Kontaktphase mit 100 µl hämophilem Plasma versetzt. Die Reaktanden wurden auf 37°C erwärmt. Es wurden 100 µl 25 mM CaCl₂ zugegeben und die Zeit der Gerinnungsbildung bestimmt (Hvatum, Y.; Prydz, H., "Thromb. Diath. Haemorrh.", 21, S. 217–222 [1969]).

BEISPIEL 10

Wirksamkeit und fehlende Toxizität von Gewebefaktorprotein in einem Kaninchenhämophiliemodell

[0132] Gewebefaktorprotein wurde hämophilen Hunden unter Verwendung des Verfahrens von Giles, A.R. et al. ("Blood", 60, S. 727–730 [1982]) infundiert.

[0133] Fehlende Gewebefaktorproteintoxizität wurde zuerst bei einem normalen Hund bei Bolusinjektion von Dosen von etwa 50 Gewebefaktorproteineinheiten/kg und 100 Gewebefaktorproteineinheiten/kg bestimmt. Eine Cuticulablutungszeit (CBT) wurde vor der Infusion und 30 min nach den einzelnen Injektionen durchgeführt (Giles supra). Blutproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während des Experiments abgezogen und für Gerinnungsversuche antikoaguliert. Zum Nachweis der in-vivo-Faktor-VIII-Bypassaktivität von Gewebefaktorprotein wurden Experimente unter Verwendung von hämophilen Hunden durchgeführt. Tiere, die keine Nahrung erhalten hatten, wurden anästhesiert und die CBT vor jeglicher Infusion untersucht. Dann wurde Gewebefaktorprotein durch Bolusinjektion verabreicht und zu verschiedenen Zeitpunkten bis 90 min nach der Infusion CBT's gemessen. Es wurden mehrere Dosen von Gewebefaktorprotein verabreicht. Die Blutproben wurden während der gesamten Dauer der einzelnen Experimente gezogen und bezüglich Faktor V, Prothrombin und partieller Thromboplastinzeiten untersucht. CBT's von mehr als 12 min wurden als stark abnormal betrachtet. Diese Nägel wurden kanterisiert, um exzessiven Blutverlust zu vermeiden.

[0134] Einem normalen, betäubten Hund wurden Dosen von Gewebefaktorprotein, die 100 U/kg Gewebefaktorprotein bei der Relipidierung im Chromogen-Test entsprachen, verabreicht. Die CBT in diesem Tier vor einer Infusion lag etwa bei 3 min. Nach 5 min ergab sich eine gewisse Reduktion der WBCT, während diese nach 15 min wieder normal war. Die Konzentrationen von Faktor V waren 30 min nach jeder Infusion normal. Die Prothrombin- und partiellen Thromboplastin-Zeiten waren am Ende des Experiments unverändert und ebenso die CBT's im normalen Bereich. Die Infusion von Gewebefaktorprotein wurde daher in normalen Hunden gut vertragen, und es zeigte sich kein Auftreten einer breiten, intravaskulären Gerinnung.

[0135] Einem hämophilen Hund mit der Eigenschaft einer verlängerten CBT von Hämophilie A wurden 100 U/kg Gewebefaktorprotein verabreicht. Die CBT normalisierte sich 5 min und 20 min nach dieser Infusion. Ein zweites Experiment unter Verwendung von 100 U/kg Gewebefaktorprotein ergab nach 20 min normales CGR und nach 90 min eine geringe Verkürzung von CBT. Der Prokoagulanseffekt blieb 90 min nach der Infusion nicht erhalten, während der CBT-Effekt zu diesem Zeitpunkt abermals verlängert war.

Pharmazeutische Zusammensetzungen

[0136] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können nach bekannten Verfahren zur Herstellung pharmazeutisch geeigneter Zusammensetzungen formuliert werden, wobei hierbei das Gewebefaktorproteinprodukt mit einem pharmazeutisch akzeptablen Trägervehikel kombiniert wird. Geeignete Vehikel sowie deren Formulierung einschließlich anderer Humanproteine, z.B. Humanserumalbumin, sind beispielsweise in "Remington's

Pharmaceutical Sciences" von E.W. Martin, das hier durch Inbezugnahme mit aufgenommen sei, beschrieben. Derartige Zusammensetzungen enthalten eine wirksame Menge dieses Proteins zusammen mit einer geeigneten Menge eines Vehikels zur Herstellung pharmazeutisch akzeptabler Zusammensetzungen, die zur effektiven Verabreichung an den Empfänger geeignet sind. Derartige Zusammensetzungen sollten für entsprechende Zeiträume stabil, zur Verabreichung an Menschen akzeptabel und ohne Schwierigkeiten herstellbar sein. Ein Beispiel für eine derartige Zusammensetzung könnte eine zur parenteralen Verabreichung bestimmte Lösung sein. Obwohl pharmazeutische Lösungszubereitungen in zum sofortigen Gebrauch geeigneter, flüssiger Form bereitgestellt werden, können derartige, parenterale Zubereitungen auch in gefrorener oder in lyophilisierter Form bereitgestellt werden. In ersterem Fall muß die Zusammensetzung vor Gebrauch aufgetaut werden. Die letztere Form wird häufig zur Erhöhung der Stabilität des in der Zusammensetzung enthaltenen, medizinischen Mittels in einem weiten Bereich von Lagerungsbedingungen verwendet. Derartige, lyophilisierte Zubereitungen werden vor Gebrauch durch die Zugabe von geeigneten, pharmazeutisch akzeptablen Verdünnungsmitteln, wie sterilem Wasser oder steriler, physiologischer Kochsalzlösung, hergestellt. Das erfindungsgemäße Gewebefaktorprotein wird zur Bereitstellung einer die Gerinnung induzierenden, therapeutischen Zusammensetzung für verschiedene, chronische Blutungsstörungen, die durch eine Tendenz zu Hämorrhagie, sowohl erblicher als auch erworbener, verabreicht. Beispiele für derartige, chronische Blutungsstörungen sind ein Mangel an Faktor VIII, IX oder XI. Beispiele für erworbene Störungen umfassen: erworbene Hemmung gegenüber Blutgerinnungsfaktoren, z.B. Faktor VIII; von-Willebrand-Faktor; Faktor IX, V, XI, XII und XIII; Hämostasestörungen als Folge einer Lebererkrankung, die eine Abnahme der Synthese von Gerinnungsfaktoren und DIC umfaßt; mit einer akuten und chronischen Nierenerkrankung einhergehende Blutungsneigung, die einen Mangel an Koagulationsfaktor und DIC umfaßt; Hämostase nach Trauma oder chirurgischem Eingriff; Patienten mit gestreuter Malignität, die sich in DIC mit einem Anwachsen von Faktor VIII, von-Willebrand-Faktor und Fibrinogen äußert, und Hämostase während Herz-Lungen-Eingriffen und bei massiver Bluttransfusion.

Patentansprüche

1. Polynucleotid mit Kodierung für ein biologisch aktives Gewebefaktorprotein, dessen Sequenz in **Fig. 2** angegeben ist, oder eine biologisch aktive Variante oder ein Fragment dieses Gewebefaktorproteins, die bzw. das Koagulation induziert, wobei mindestens eine Aminosäure selektiv insertiert, deletiert oder ersetzt ist.
2. Polynucleotid nach Anspruch 1 mit Kodierung entweder für eine biologisch aktive Gewebefaktorproteinvariante oder ein biologisch aktives Fragment dieses Gewebefaktorproteins, die bzw. das Koagulation induziert.
3. Polynucleotid nach Anspruch 1 oder 2, das von Intronen frei ist.
4. Verfahren zur Herstellung eines biologisch aktiven Gewebefaktorproteins oder einer biologisch aktiven Variante oder eines Fragments dieses Gewebefaktorproteins, die bzw. das Koagulation induziert, wobei das Gewebefaktorprotein oder die Variante oder das Fragment nicht-glykosyliert ist oder eine Nicht-Säugetierglykosylierung aufweist, durch a) Einführen des Polynucleotids von Anspruch 1 in einen Nicht-Säugetierwirt; b) Expression des Polynucleotids, und c) Isolieren des Gewebefaktorproteins oder der Variante oder des Fragments hiervon aus dem Wirt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei es sich bei dem Nicht-Säugetierwirt um einen Prokaryonten, eine Hefe, einen Pilz, eine Insektenzelle oder eine Pflanzenzelle handelt.
6. Verfahren zur Herstellung einer biologisch aktiven Variante oder eines biologisch aktiven Fragments des Gewebefaktorproteins, die bzw. das Koagulation induziert, durch a) Einführen des Polynucleotids von Anspruch 2 in einen Wirt; b) Expression des Polynucleotids, und c) Isolieren der Gewebefaktorproteinvariante oder des Fragments des Gewebefaktorproteins.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Wirt aus einem Prokaryonten, einer Hefe, einem Pilz, einer Insektenzelle, einer Pflanzenzelle, einer Tierzelle oder einer menschlichen Zelle besteht.
8. Verfahren nach Anspruch 4 oder 6, wobei im Vergleich zu nativem Gewebefaktorprotein eine ausgewählte Aminosäure derart ersetzt ist, daß in der biologisch aktiven Gewebefaktorproteinvariante a) ein hydrophiler Rest durch einen hydrophoben Rest oder b) ein Cystein oder Prolin durch eine andere Aminosäure oder c) ein Rest mit einer elektropositiven Seitenkette durch einen elektronegativen Rest oder d) ein Rest mit einer sperrigen Seitenkette durch einen Rest mit kleiner Seitenkette oder durch Glycin ersetzt ist.

9. Biologisch aktives Gewebefaktorprotein oder eine biologisch aktive Variante oder ein biologisch aktives Fragment dieses Gewebefaktorproteins, die bzw. das Koagulation induziert, erhältlich nach dem Verfahren gemäß Anspruch 4.

10. Biologisch aktive(s) Variante oder Fragment von Gewebefaktorprotein, die bzw. das Koagulation induziert, erhältlich nach dem Verfahren gemäß Anspruch 6.

11. Biologisch aktives Gewebefaktorprotein mit der Fähigkeit, durch ein Polynucleotid gemäß Anspruch 1 kodiert zu werden, oder ein(e) biologisch aktive(s) Variante oder Fragment dieses Gewebefaktorproteins, die bzw. das Koagulation induziert, mit fehlender Glykosylierung oder mit Nicht-Säugetierglykosylierung.

12. Biologisch aktive Gewebefaktorproteinvariante, die Koagulation induziert, mit der Fähigkeit, durch ein Polynucleotid gemäß Anspruch 1 kodiert zu werden, wobei die Transmembrandomäne von nativem Gewebefaktorprotein fehlt.

13. Biologisch aktive Gewebefaktorproteinvariante, die Koagulation induziert, mit der Fähigkeit, durch ein Polynucleotid gemäß Anspruch 1 kodiert zu werden, wobei eine in nativem Gewebefaktorprotein, eine mögliche Proteolysestelle darstellende, ausgewählte Stelle proteolysebeständig ist.

14. Biologisch aktive Gewebefaktorproteinvariante nach Anspruch 13, wobei eine in nativem Gewebefaktorprotein mögliche Proteolysestelle, umfassend ein Arginin, durch eine andere Aminosäure ersetzt ist oder fehlt.

15. Biologisch aktive Gewebefaktorproteinvariante nach Anspruch 14, wobei das Arginin durch Glutamin oder Histidin ersetzt ist.

16. Biologisch aktive Humangewebefaktorproteinvariante, die Koagulation induziert, mit der Fähigkeit, durch ein Polynucleotid gemäß Anspruch 1 kodiert zu werden, wobei ein Cysteinrest von nativem Humangewebefaktorprotein durch einen anderen Aminosäurerest ersetzt ist.

17. Biologisch aktives Fusionspolypeptid mit der Fähigkeit, durch ein Polynucleotid gemäß Anspruch 1 kodiert zu werden, umfassend Gewebefaktorprotein oder eine Variante oder ein Fragment desselben, die bzw. das Koagulation induziert, und ein weiteres, damit verschmolzenes Polypeptid.

18. Biologisch aktive Humangewebefaktorproteinvariante, die Koagulation induziert, mit der Fähigkeit, durch ein Polynucleotid gemäß Anspruch 1 kodiert zu werden, wobei eine N-verbundene oder eine O-verbundene Glykosylierungsstelle von nativem Humangewebefaktorprotein fehlt.

19. Biologisch aktive Humangewebefaktorproteinvariante nach Anspruch 16, wobei es sich bei dem Cysteinrest um Cystein 245 handelt und der andere Aminosäurerest aus Serin besteht.

20. Nucleotidsequenz mit Kodierung für ein biologisch aktives Gewebefaktorprotein oder eine Variante oder ein Fragment gemäß der Definition nach einem der Ansprüche 11 bis 17.

21. Rekombinanter Expressionsvektor, umfassend eine Nucleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 20.

22. Mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 21 transformierte Zelle.

23. Zelle nach Anspruch 22, bei der es sich um eine Säugetierzelle handelt.

24. Zelle nach Anspruch 22, bei der es sich um eine Prokaryontenzelle handelt.

25. Verfahren zur Herstellung von Gewebefaktor durch Züchten einer transformierten Zelle nach einem der Ansprüche 22 bis 24.

Es folgen 18 Blatt Zeichnungen

Fig.1(I).

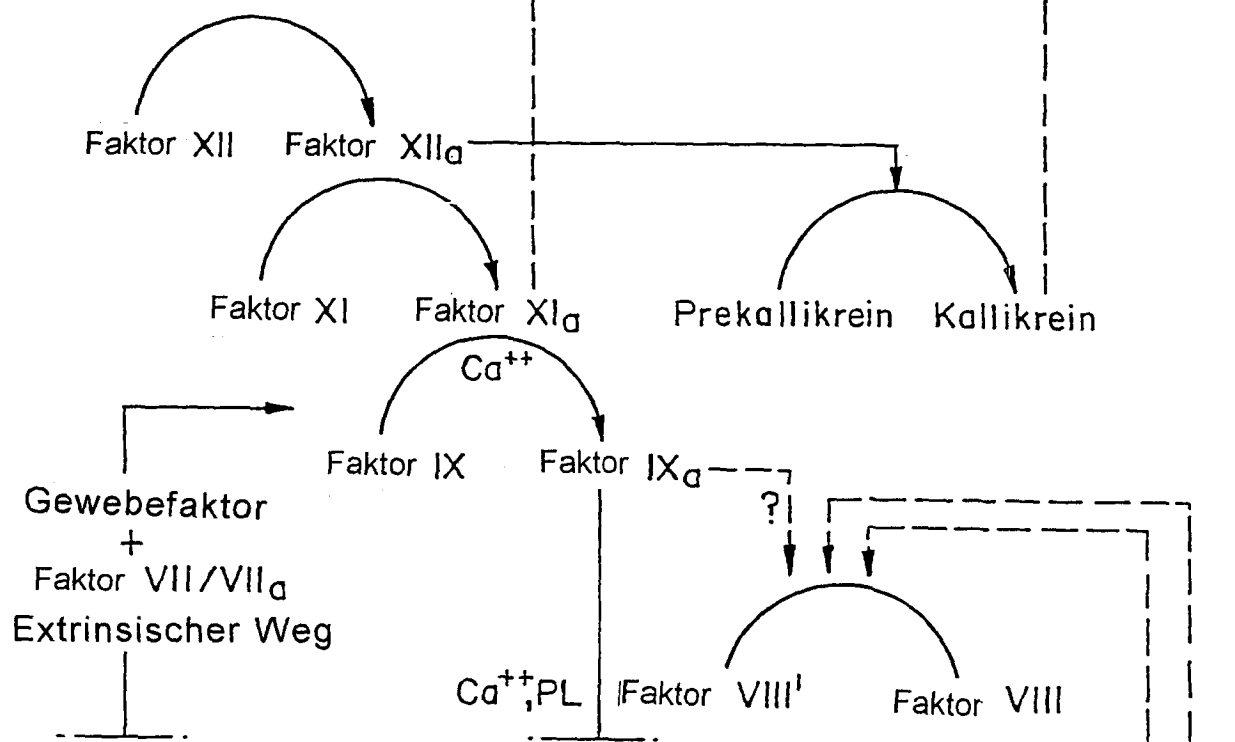
OBERFLÄCHENVERMITTELTE AKTIVIERUNG DER BLUTGERINNUNG
(INTRINSISCHES SYSTEM)

1. Oberfläche (HMW Kininogen, Prekallikrein)

2. Kallikrein

3. Faktor XI_a

4. Plasmin



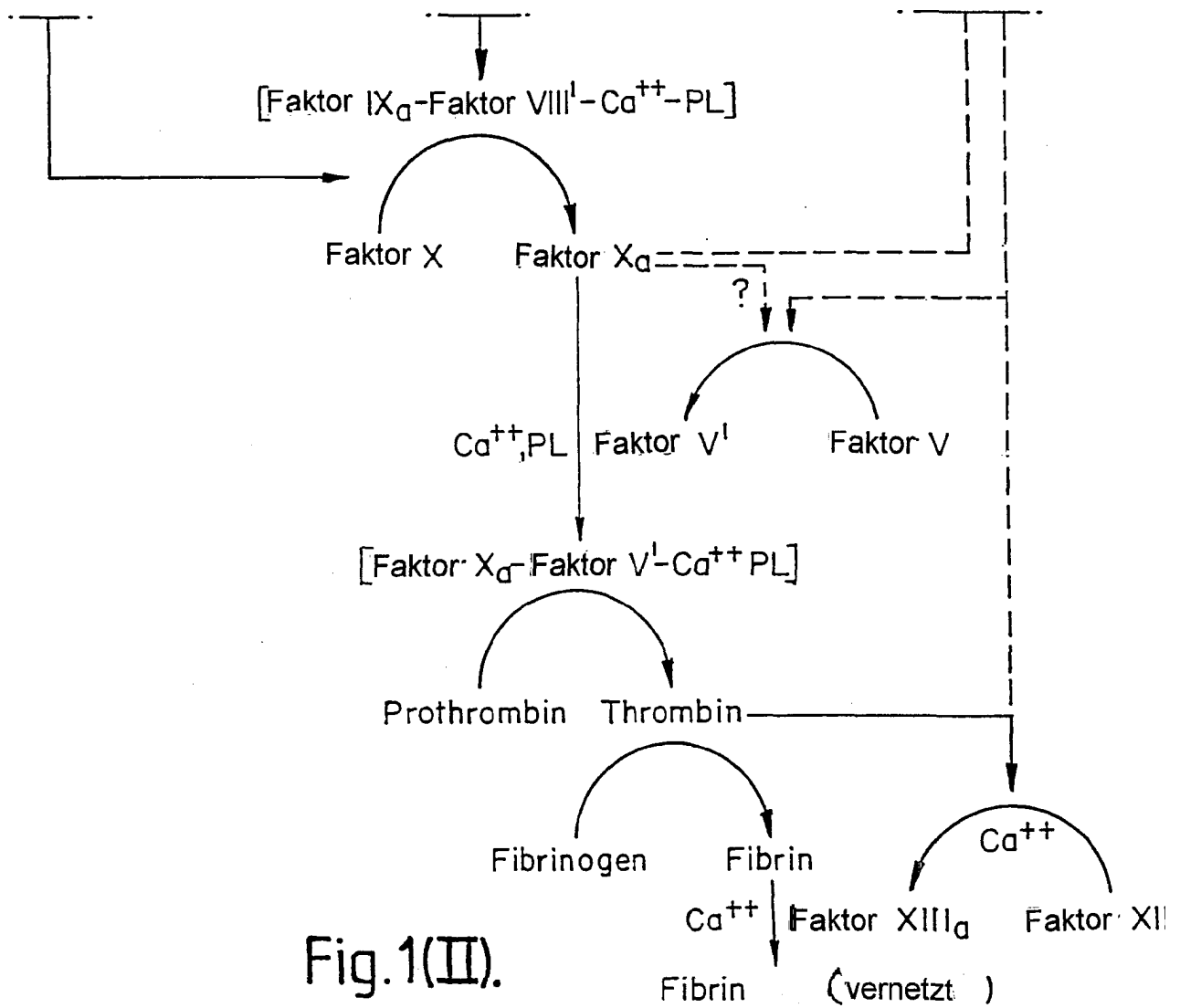


Fig. 2a.

[illegible]

[illegible]

Fig. 2b.

Fig. 3a.

[illegible]

Fig. 3b.

[illegible]

Fig. 3c

```

scrFI      .bstNI      haeIII      haeI      eaeI      bali      hphI      aluI      mnII      haeIII      haeI      mnII      ddeI      sau3AI      dnlI      dnlI      styI
1501 CTACCAACACC AAGCTAATTT TTGTATTTT TAGTAGAGAT GGGGTTTCAC CATCTTGCC AGGCTGGTCT TCAATTCCTG ACCTCAGTTG ATCCACCCAC
    GATGGTGTGG TTTCGATTA AACAATAAAA ATCATCTCTA CCCCAAGTG GTAGAACCGG TCCGACCCGA ACTTAAGGAC TGGAGTCAAC TAGGTGGGTG
    mnII      haeIII      haeI      eaeI      bali      hphI      aluI      mnII      haeIII      haeI      mnII      ddeI      sau3AI      dnlI      dnlI      styI
1601 CTTGGCCTCC CAAAGTGCTA GTATTATGG CGTGAACCC CAGCCCGCAGC CGAAAAGCTT TTGAGGGGGCT GACTTCAATC CATGTAGGAA AGTAAATAGG
    GAACCGGAGG GTTTCACGAT CATAATACCC GCACCTGGTG GTACGGGGTCG GCTTTTCGAA AACTCCCCGA CTGAAGTTAG GTACATCCCT TCATTTTACC
    mnII      haeIII      haeI      eaeI      bali      hphI      aluI      mnII      haeIII      haeI      mnII      ddeI      sau3AI      dnlI      dnlI      styI
1701 AAGGAATTTG GGTGCATTTT TAGGACTTTT CTAACATATG TCTATAATAT AGTGTTTAGG TTCTTTT TTTTCAGGAT ACATTTGGAA ATTCAAAACA
    TTCCCTTTAAC CCACGTAAG ATCCTGAAA GATGTGTATC AGATATTATA TCACAAATCC AAGAAAAAAA AAGTCCCTTA GTAAACCTT TAAGTTTGT
    nlaIV      bnlI      bsp1286
1801 ATTGGCAAC TTTGTATTAA TGTGTTAAGT GCAGGAGACA TTGGTATTCT GGGCACCCTC CTAATATGCT TTACAATCTG CACTTAACT GACTTAAGT
    TAACCGTTTG AACATAATT ACACAATTCA CGTCCCTCTGT AACATAAGA CCCGTGGAAG GATTATACGA AATGTTAGC GTGAATGA CTGAATTCAC
    aluI      hincII      hincII
1901 GCAATTAACA TTTGAGAGCT AACATATATTT TTTATAGACT ACTATACAAA CTACAGAGTT TATGATTTTAA GGTACATTA GCTTCATTTG TTTGACATTTG
    CGTAATTTGT AAACCTCTCGA TTGATATAAA AATATTTCTGA TGATATGTTT GATGTCTCAA ATACTAAAT CCATGAATTT CGAAGATACC AACTGTAACA
    draI      aluI      hincII
2001 ATATATAATT TTTTAAAAAG GTTTTCTATA TGGGGATTTT CTAATTTAAGT AGGTAAATTT GTTCTATTTG TATATATTTG GATAATTTAT TTTAATATATCT
    TATATATAA AAAATTTTTC CAAAAGATAT ACCCCTAAAA GATAAATACA TCCATTATA CAAGATAAAC ATATATAACT CTATTAAATA AATTATATGA
    hphI
2101 TTAATAAAG GTGACTGGGA ATTGTTA
    AATTATTTT CACTGACCCCT TAACAT

```

Fig.4.

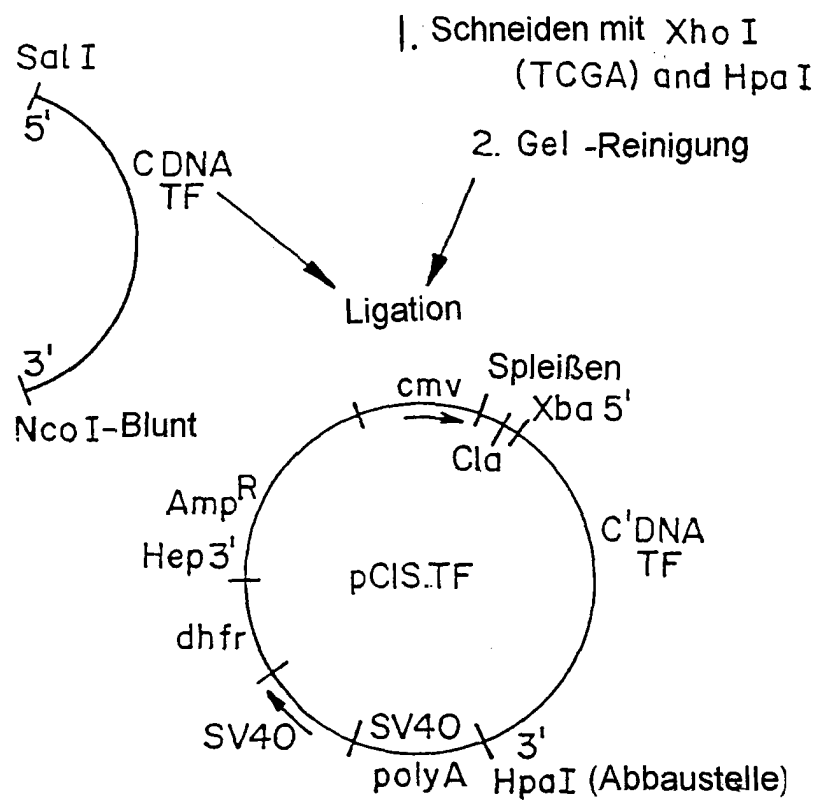
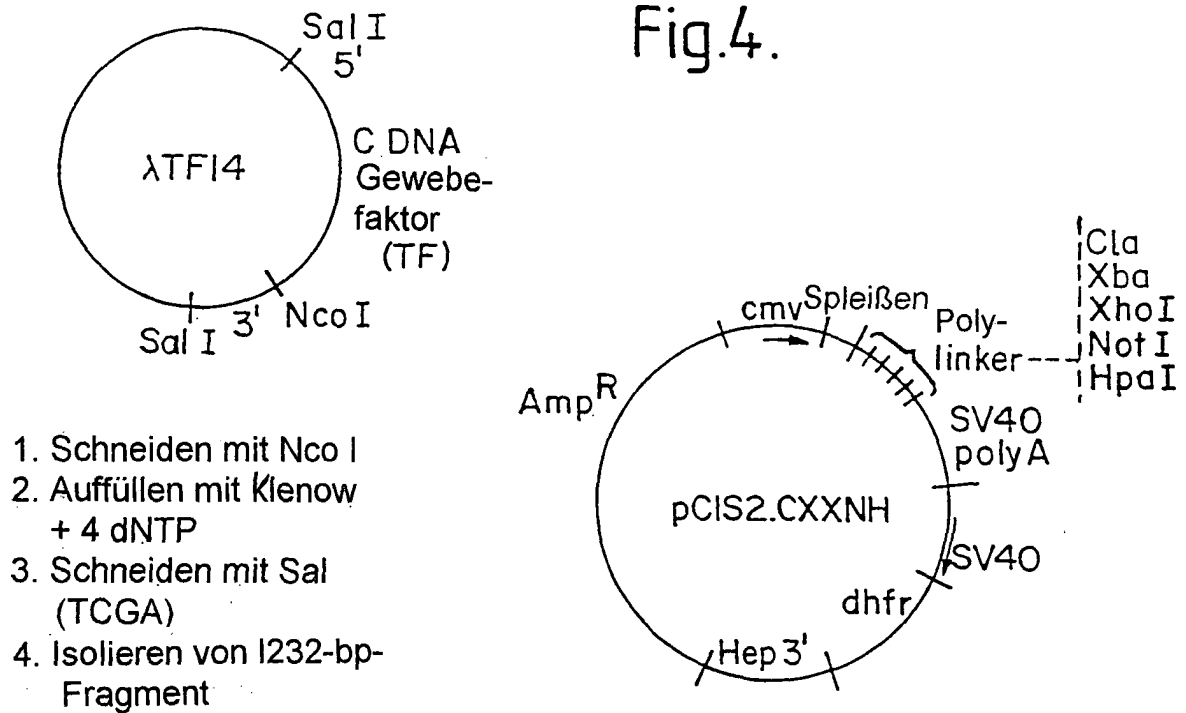


Fig.4a.

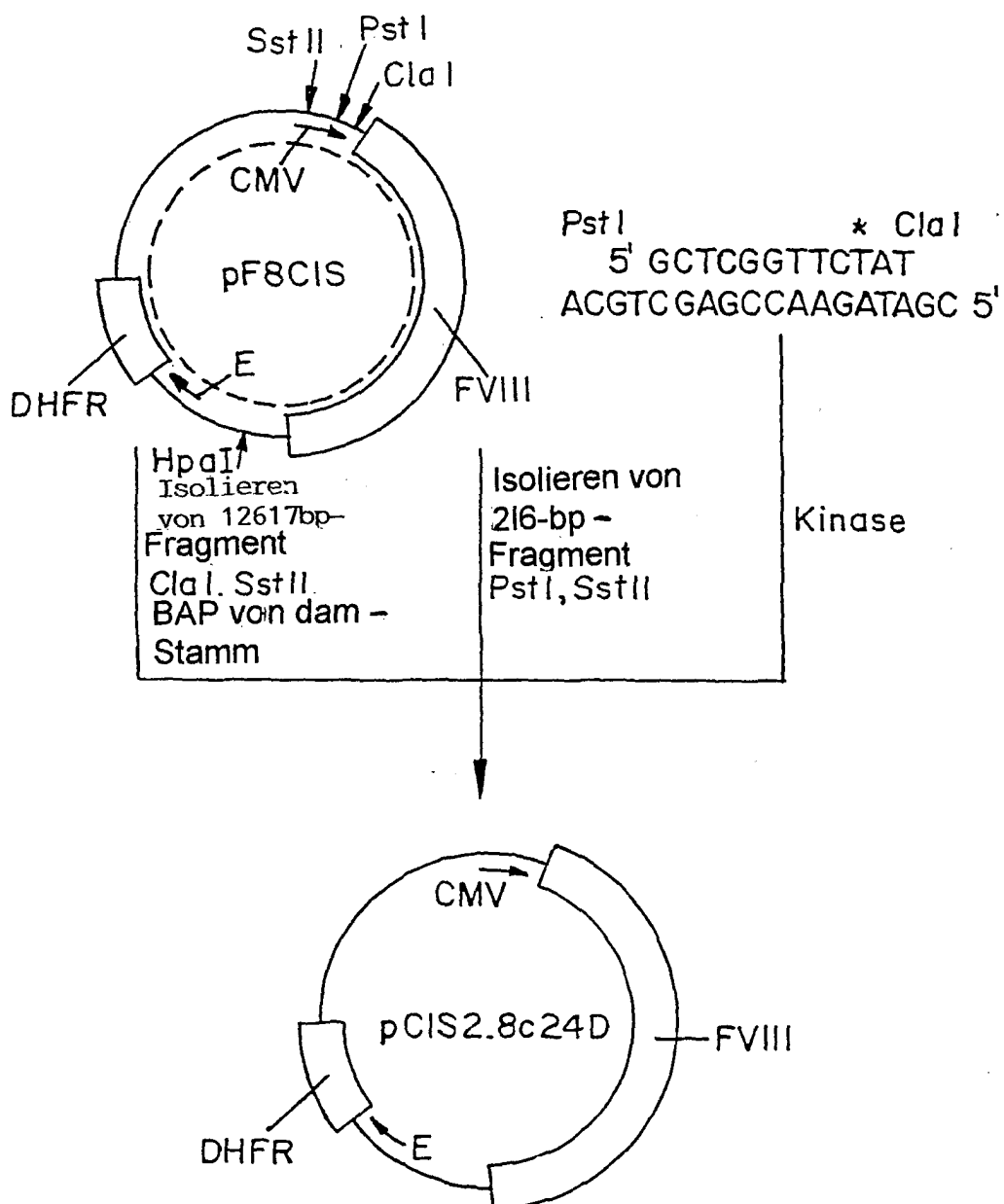
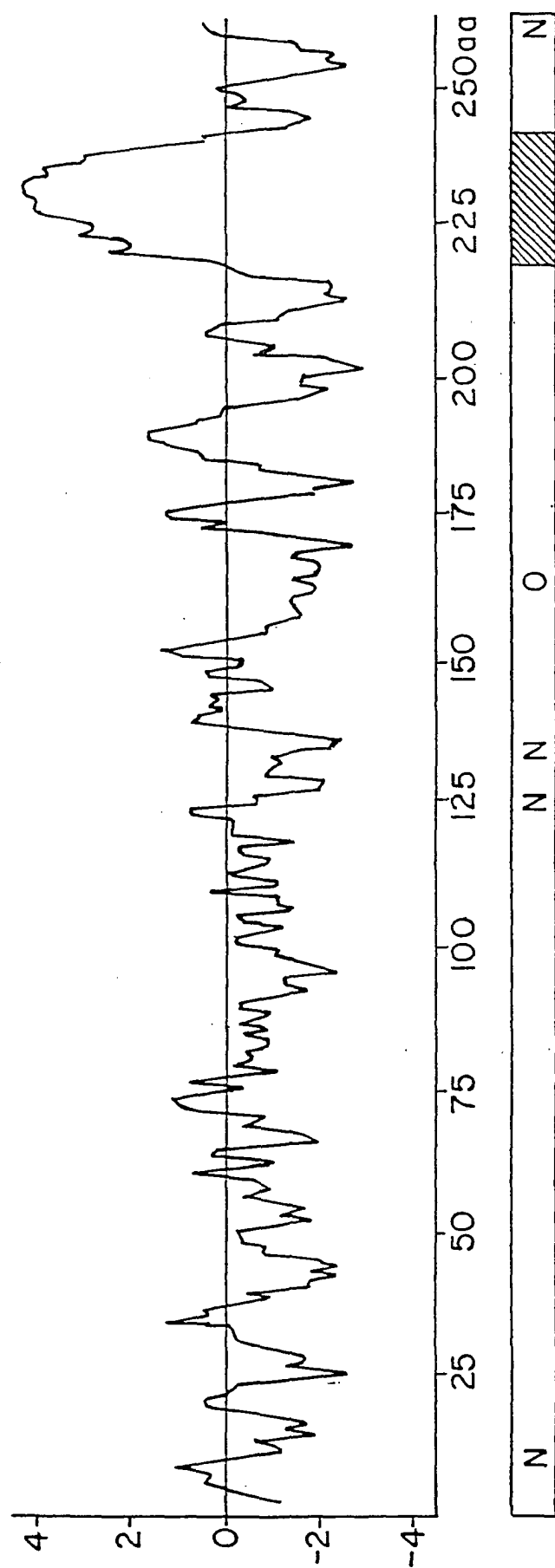


Fig.5.



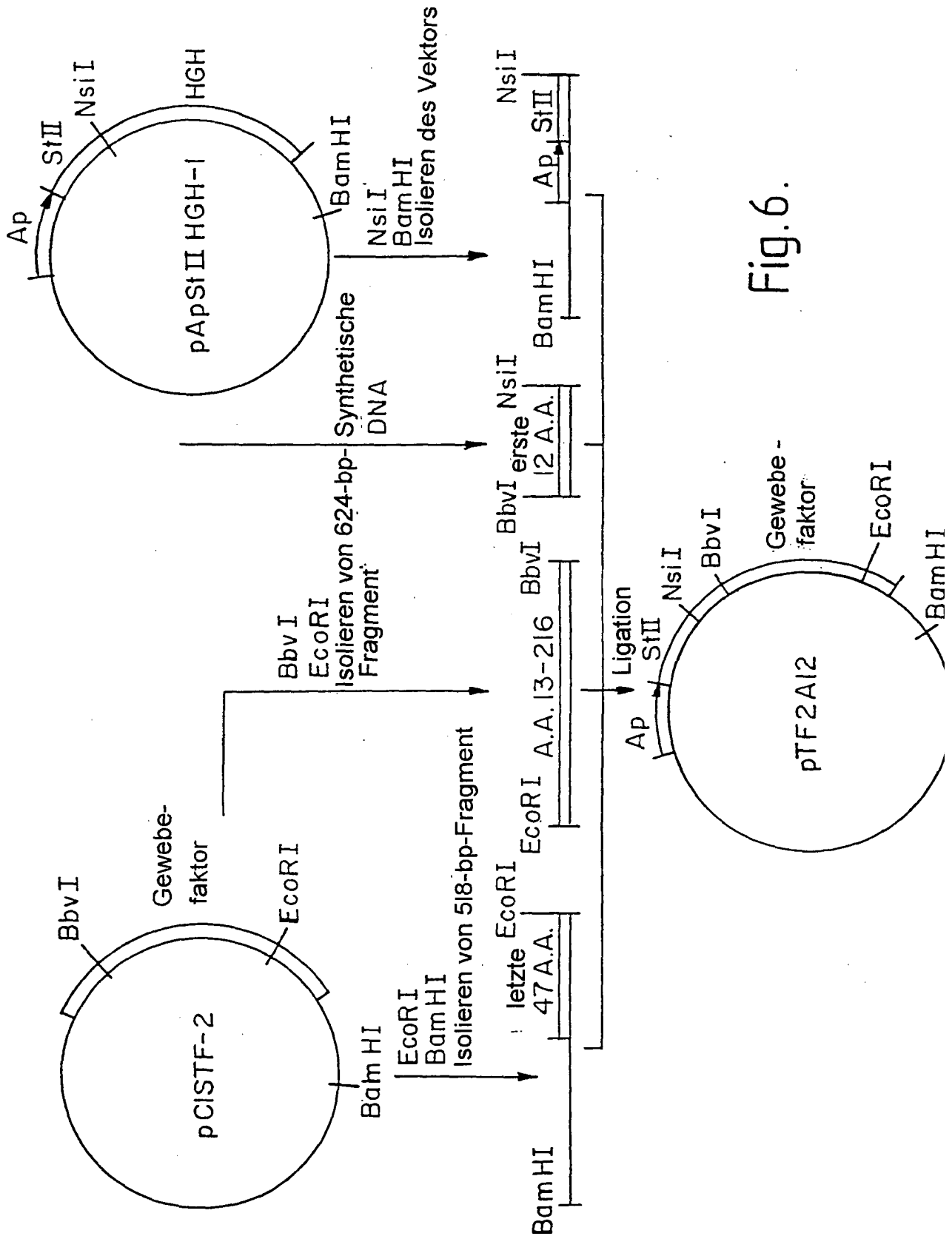


Fig. 6.

Fig. 7a.

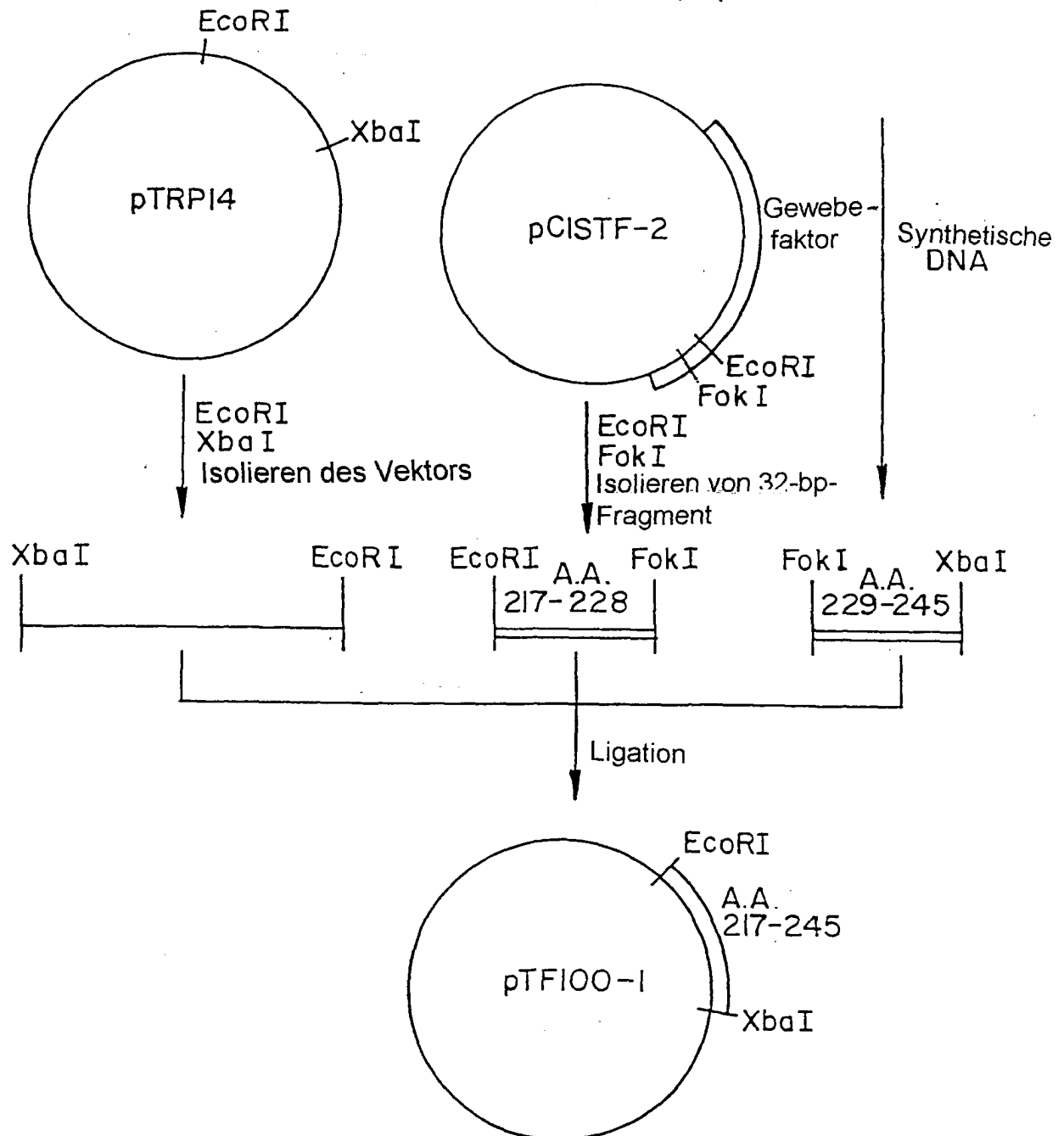
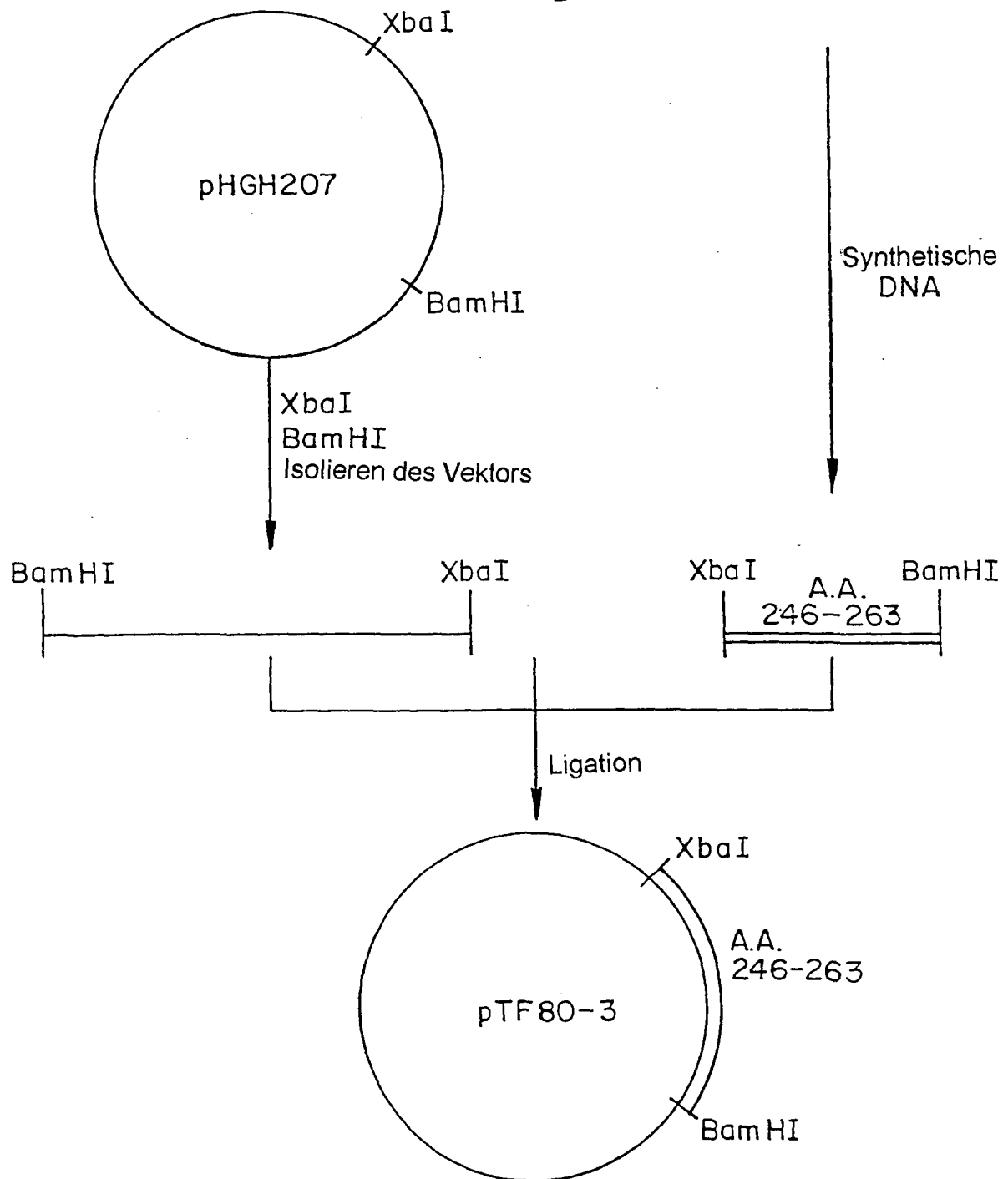


Fig.7b.



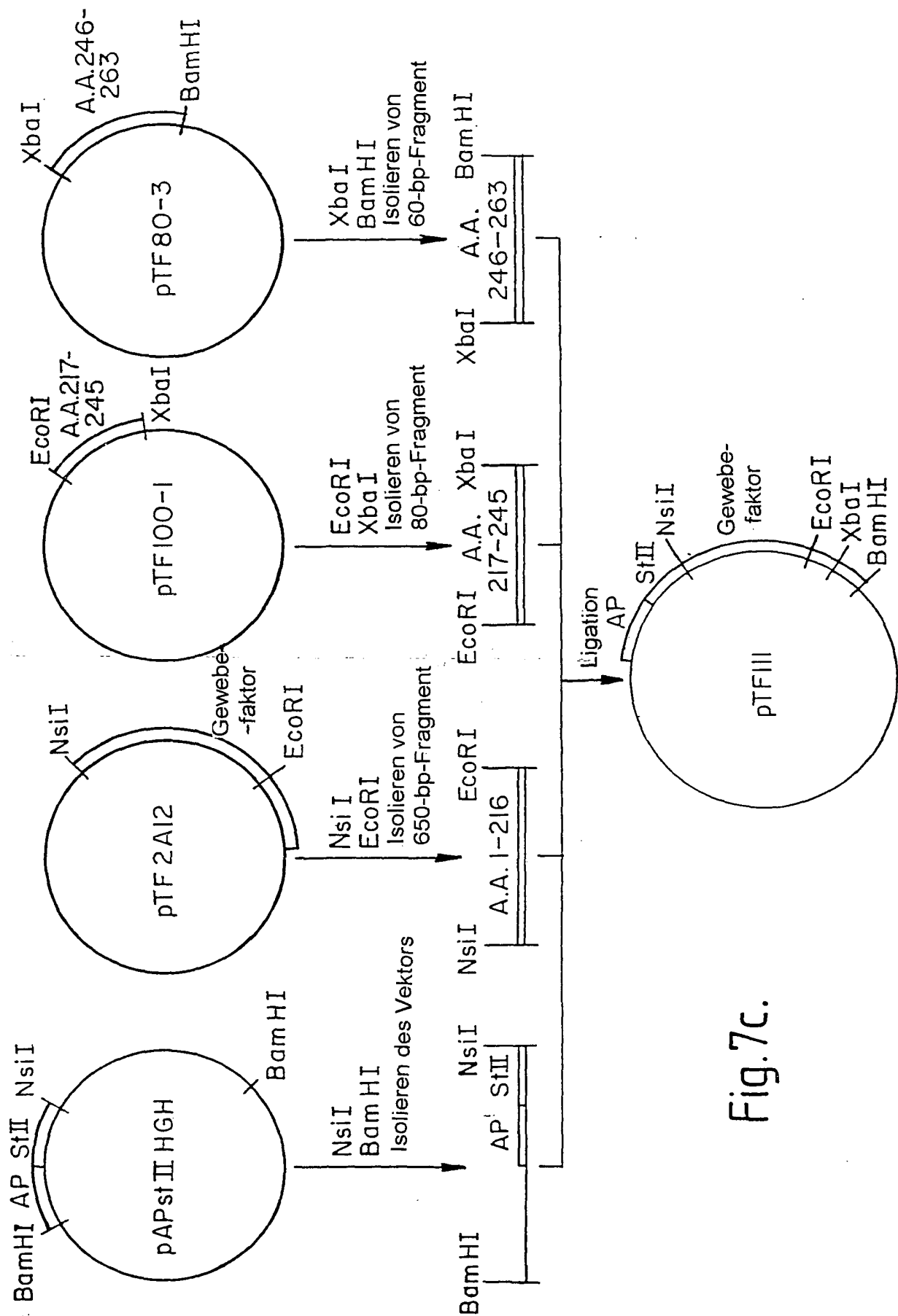


Fig.7c.

Fig. 8a.

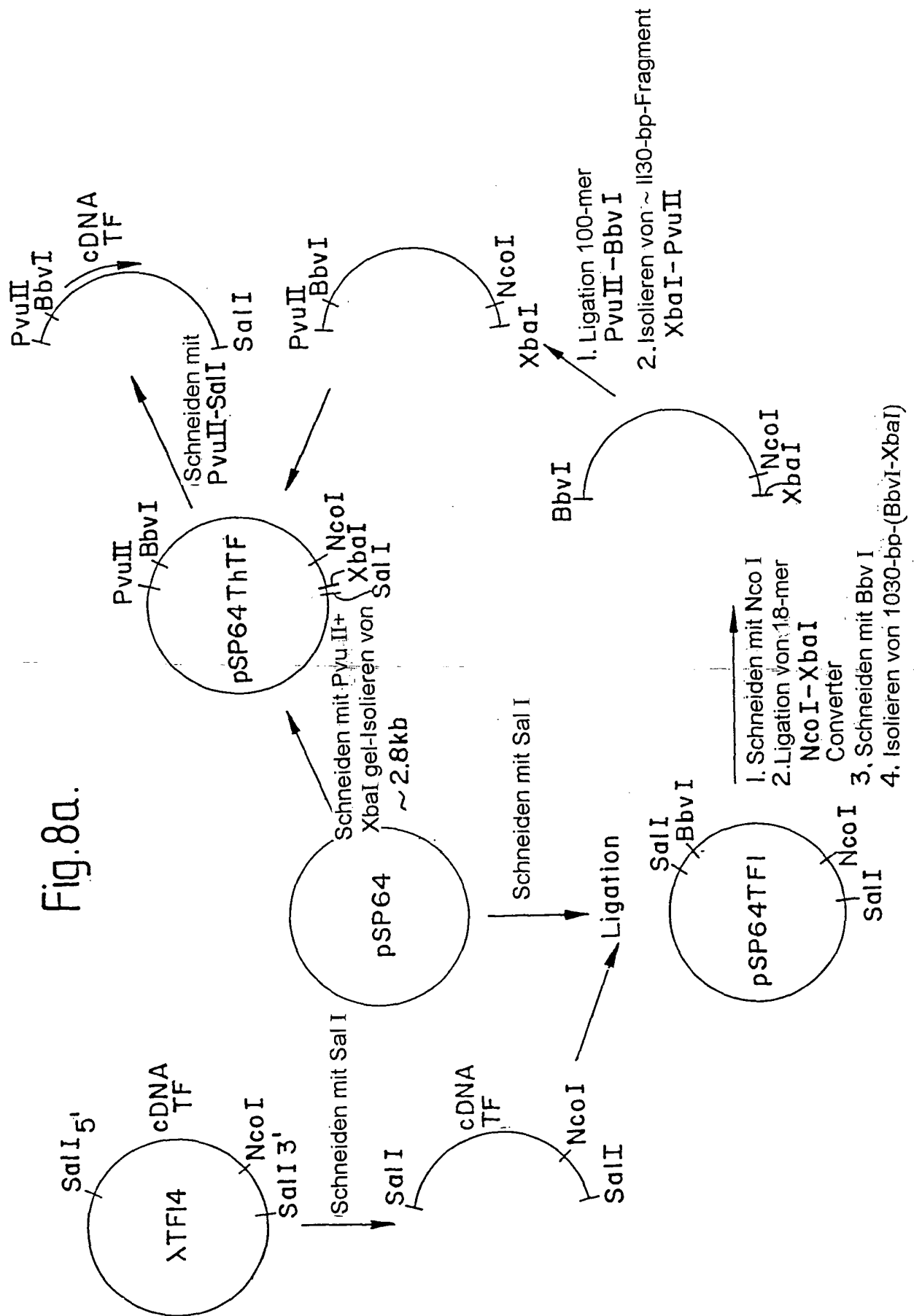


Fig. 8b.

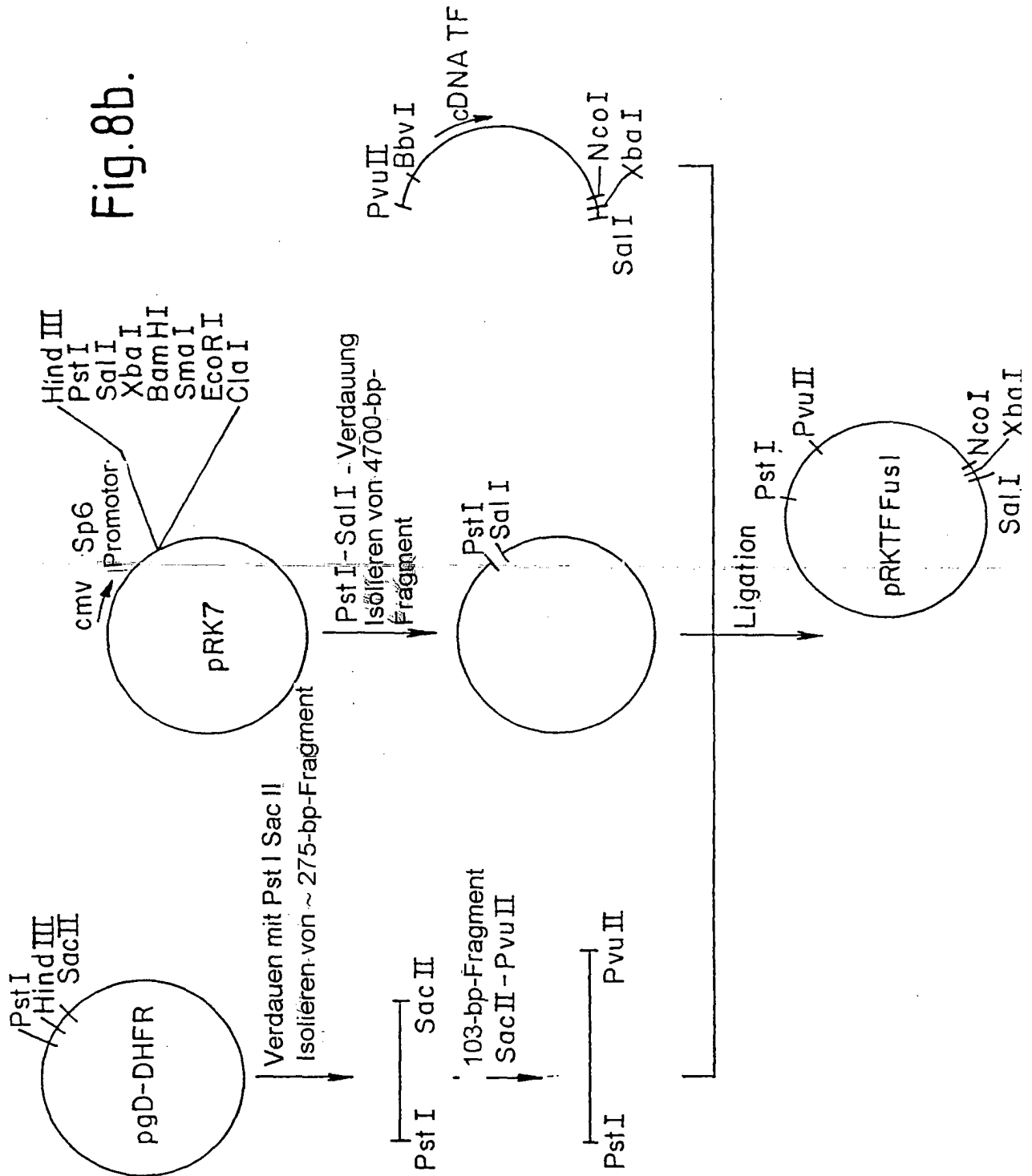


Fig.9.

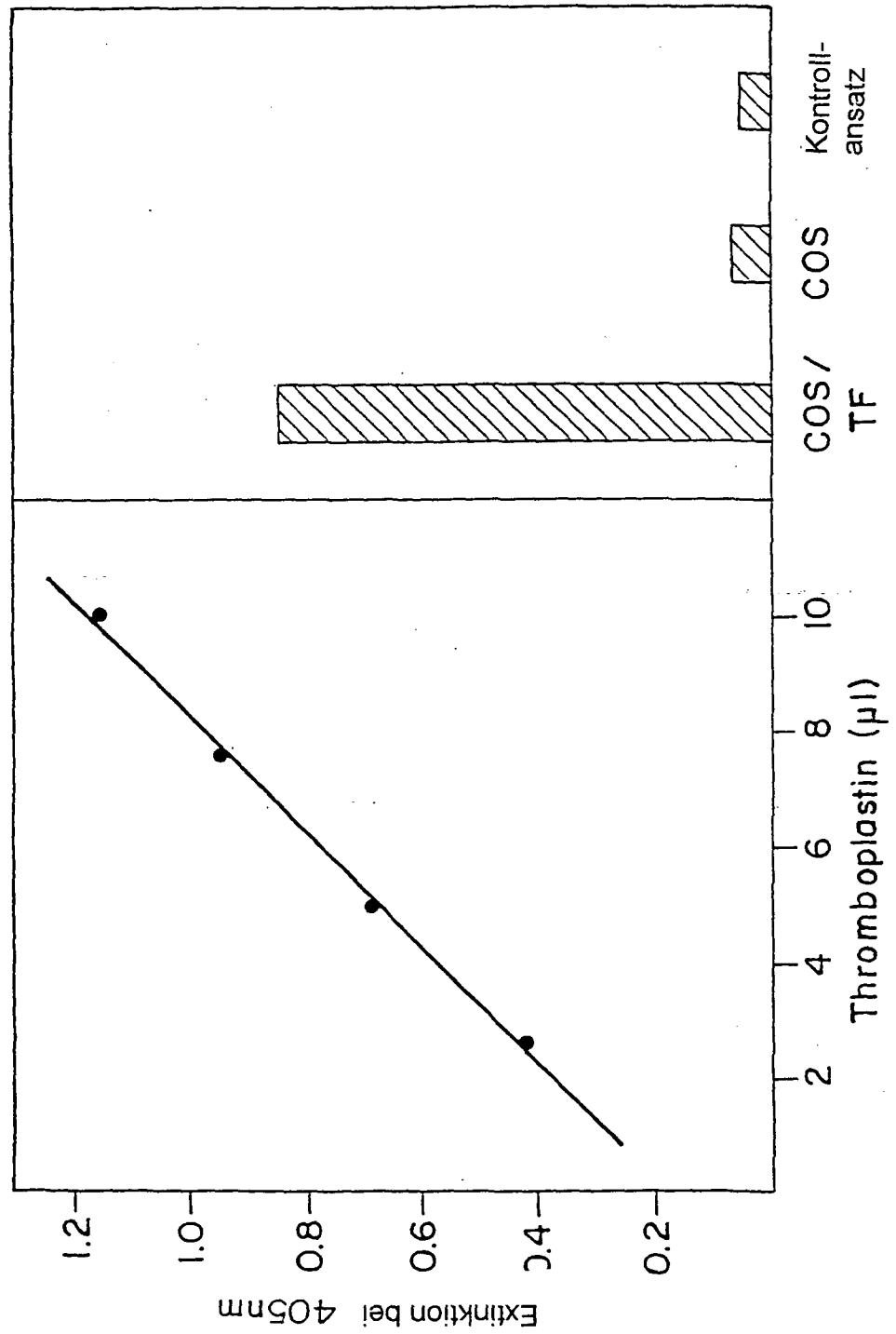


Fig.10.

