

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/10503
C12N 15/57, 9/50, 9/64, 9/76, C12P 21/06		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. März 1999 (04.03.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05094	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum: 12. August 1998 (12.08.98)	
(30) Prioritätsdaten: 971 14 513.1 22. August 1997 (22.08.97) EP 971 17 816.5 15. Oktober 1997 (15.10.97) EP	
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhorfer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE).	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): KOPETZKI, Erhard [DE/DE]; Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg (DE). HOPFNER, Karl-Peter [DE/DE]; Neumarkter Strasse 86B, D-81673 München (DE). BODE, Wolfram [DE/DE]; Tulpenstrasse 5, D-82131 Gauting (DE). HUBER, Robert [DE/DE]; Schlesierstrasse 13, D-82110 Germering (DE).	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Werk Penzberg, Patentabteilung (RE-TB), Postfach 11 52, D-82377 Penzberg (DE).	

(54) Title: ZYMOGENIC PROTEASE PRECURSORS THAT CAN BE AUTOCATALYTICALLY ACTIVATED AND THEIR USE

(54) Bezeichnung: AUTOKATALYTISCH AKTIVIERBARE ZYMOGENE VORSTUFEN VON PROTEASEN UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract

A process for the recombinant production of a protease is characterised by (a) transformation of a host cell with a recombinant nucleic acid which codes for a zymogenic protease precursor containing an autocatalytic cleavage site which does not occur naturally, this cleavage site being recognised by the active form of said protease, cleaving the zymogenic precursor into the active protease; (b) cultivation of the host cell such that the zymogenic protease precursor is created in the host cell in the form of inclusion bodies; (c) isolation and naturalisation of the inclusion bodies in such conditions that the protease part of the zymogenic precursor is produced with its natural conformation; and (d) autocatalytic cleavage of the naturalised zymogenic precursor to produce the active protease. This process is suitable to produce recombinant proteases in a simple manner and with high yields.

(57) Zusammenfassung

Ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer Protease, gekennzeichnet durch a) Transformation einer Wirtszelle mit einer rekombinanten Nukleinsäure, welche für eine zymogene Vorstufe einer Protease codiert, die eine natürlicherweise nicht vorkommende autokatalytische Spaltstelle enthält, wobei diese Spaltstelle von der aktiven Form der genannten Protease erkannt und dabei die Vorstufe zur aktiven Protease gespalten wird, b) Kultivierung der Wirtszelle in der Weise, daß die zymogene Vorstufe der Protease in Form von inclusion bodies in der Wirtszelle entsteht, c) Isolierung der inclusion bodies und Naturierung unter Bedingungen, bei denen der Proteaseanteil der zymogenen Vorstufe in seiner natürlichen Konformation entsteht und d) autokatalytische Spaltung der naturierten, zymogenen Vorstufe in die aktive Protease, ist geeignet, auf einfache Weise und in großen Mengen rekombinante Proteasen zur Verfügung zu stellen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

Autokatalytisch aktivierbare zymogene Vorstufen von Proteasen und deren Verwendung

Gegenstand der Erfindung sind zymogene Vorstufen von Proteasen, die aufgrund einer neu in das Molekül eingeführten Proteasespaltstelle autokatalytisch aktivierbar sind, und deren Verfahren zur Herstellung und Verwendung.

Spezifisch spaltende Proteasen spielen eine bedeutende Rolle in der Biotechnologie bei der rekombinanten Herstellung von Peptidhormonen (Übersicht Peptidhormone, siehe: Bristow, A.F.: In: Hider, R.C.; Barlow, D., eds. Polypeptides and Protein Drugs. Production, Characterization and Formulation. London, Ellis Horwood, pp. 54-69 (1991)) wie z.B. Insulin (Jonasson, P. et al., Eur. J. Biochem. 236 (1996) 656-661; WO 96/20724), den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II (Nilsson, B. et al., Methods Enzymol. 185 (1991) 3-16; Forsberg, G. et al., J. Prot. Chem. 11 (1992) 201-211), Relaxin, Parathyroidhormon (PTH) und Parathyroidhormon Peptidfragmenten (Forsberg, G. et al., J. Prot. Chem. 10 (1991) 517-526; WO 97/18314), Calcitonin (EP-A 0 408 764), Glucagon (EP-A 0 189 998), Glucagon-ähnlichen Peptiden (GLP; WO 96/17942), natriuretischen Peptiden (WO 97/11186), "growth hormon releasing factor" (GRF; WO 96/17942) und Urogastron (Brewer, S.J. und Sassenfeld, H.M., Trends in Biotechnology 3 (1985) 119-122; EP-A 0 089 626) und z.B. N-terminal Initiatormethionin-freien Wachstumsfaktoren und Cytokinen (Übersicht Wachstumsfaktoren und Cytokine, siehe: Wang, E.A., TIBTECH 11 (1993) 379-383; Meyer-Ingold, W., TIBTECH 11(1993) 387-392) wie z.B. IL-1- β , IL-2, GM-CSF (Miller, C.G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 2718-2722), G-CSF (EP-B 0 513 073). In der Medizin werden spezifisch spaltende Proteasen z.B. zur Behandlung der Hämophilie B (Faktor IX und Faktor VII), zur Clotauflösung, z.B. nach Herzinfarkt (tPA, "tissue type plasminogen activator" und Streptokinase) und Thrombin (US Patent 5,432,062) zur Förderung der Blutgerinnung bei der Wundbehandlung eingesetzt.

Hinsichtlich Substratspezifität unterscheidet man zwischen Proteasen, die selektiv N- oder C-terminal von einer Aminosäure, wie z.B. LysC Endoprotease nach Lysin, oder selektiv von 2 bestimmten Aminosäuren, wie z.B. Trypsin nach Lysin und Arginin, spalten. Daneben gibt es die sogenannten Restriktionsproteasen (Carter, P.: In: Ladisch, M.R.; Willson, R.C.; Painton, C.C.; Builder, S.E., eds., Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large-Scale

Processes. ACS Symposium Series No. 427, American Chemical Society, pp. 181-193 (1990)), die bevorzugt nach einem Erkennungsmotiv aus ≥ 2 Aminosäuren spalten. Dazu gehören z.B. die Prohormon-Konvertasen Furin, PC1/PC3, PC2, PC4, PC5 und PACE4 (Perona, J.J. und Craik, C.S., Protein Science 4 (1995) 337-360), die Blutgerinnungsproteasen FVIIa, FIXa, FXa, Thrombin, Protein C, Kallekrein, Plasmin, Plasminogen Aktivator und Urokinase (Furie, B. und Furie, B.C., Cell 53 (1988) 505- 518; Davie, E.W. et al., Biochem. 30 (1991) 10363-10370; WO 97/03027) und einige Proteasen viralen, wie z.B. die TEV Protease (Parks, T.D. et al., Anal. Biochem. 216 (1994) 413-417), und/oder Proteasen mikrobiellen Ursprungs, wie z.B. die Kexin (Kex2p) Protease aus Hefe (EP-A 0 467 839) und die IgA Protease aus Neisseria gonorrhoeae (Pohlner, J. et al., Nature 325 (1987) 458-462).

Zur rekombinanten Herstellung von Peptidhormonen und einigen therapeutisch genutzten Proteinen aus Fusionsproteinen werden spezifisch spaltende Proteasen, wie z.B. Trypsin, Carboxypeptidase B, Thrombin, Faktor Xa, Collagenase und Enterokinase, als Einsatzstoffe benötigt. Die Methodik der enzymatischen Spaltung von Fusionsproteinen ist Stand der Technik und die zur Spaltung von Fusionsproteinen kommerziell zur Verfügung stehenden Proteasen sind beschrieben (Flaschel, E. und Friehs, K., Biotech. Adv. 11 (1993) 31-78; Sassenfeld, H.M., Trends Biotechnol. 8 (1990) 88-93). In der Regel werden die dort aufgeführten Proteasen aus tierischen Rohstoffen, wie z.B. Pankreas, Leber und Blut, isoliert. Die aus tierischen Rohstoffen isolierten Einsatzstoffe sind jedoch nicht ideal, da sie mit infektiösen Agenzien, wie z.B. humanpathogenen Viren und Prionen, kontaminiert sein können. Trotz entsprechender Maßnahmen bei der Präparation von Proteinen / Enzymen aus tierischen und/oder menschlichen Rohstoffen (z.B. Blut) bleibt ein Restrisiko hinsichtlich der Infektion / Entstehung lebensbedrohlicher Krankheiten, wie z.B. AIDS, Hepatitis und spongiforme Enzephalopathien (Creutzfeld-Jakob-ähnlichen Krankheiten, Stichwort: BSE), bestehen. Da eine Vielzahl von Proteasen, zu denen unter anderen Trypsin, Thrombin und Faktor X zählen, in Form einer inaktiven (zymogenen) Vorstufe synthetisiert werden, wird selbst bei der rekombinanten Herstellung dieser Proteasen in der Regel noch eine zweite, aus einer tierischen Rohstoffquelle stammende Protease, zur enzymatischen Aktivierung der rekombinanten Protease benötigt. So wird z.B. zur Aktivierung von Trypsinogen Enterokinase (Hedstrom, L. et al., Science 255 (1992) 1249-1253), zur Aktivierung von Faktor X (Takeya, H. et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 14109-14117; WO 97/03027) und Thrombin (DiBella, E.E. et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 163-169) eine Protease aus Schlangengift eingesetzt.

Zudem spielen spezifisch spaltende Proteasen in der Medizin eine bedeutende Rolle. So werden z.B. FIX, FVII, tPA ("tissue type plasminogen activator"), Protein C und Thrombin und/oder davon abgeleitete Proteasevarianten bei der Behandlung von Gerinnungsstörungen eingesetzt bzw. befinden sich in der Erprobung. Außerdem ist Trypsin Bestandteil einiger Arzneimittel (Salben, Dragees und zu inhalierenden Aerosolen (Rote Liste, 1997; The United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP23-NF18, 1995).

Von Graf, E. et al. (Biochem. 26 (1987) 2616-2623; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 4961-4965) wurde die Expression / Sekretion von Ratten Trypsinogen und Trypsinogen-mutanten in *E. coli* beschrieben. Zur Sekretion der Trypsinogene ins Periplasma von *E. coli* wurde die native Trypsinogen Signalsequenz durch die Signalsequenz der bakteriellen alkalischen Phosphatase (phoA) ausgetauscht. Die sekretierten inaktiven Trypsinogene wurden aus dem Periplasma isoliert und durch enzymatische Spaltung mittels gereinigter Enterokinase aktiviert.

Von Vasquez, J.R. et al. (J. Cell. Biochem. 39 (1989) 265-276) wurde die Expression / Sekretion von anionischem Ratten Trypsin und Trypsinmutanten in *E. coli* beschrieben. Zur Expression / Sekretion der aktiven Trypsine ins Periplasma von *E. coli* wurde das native Trypsinogen prepro-Segment (Signalsequenz und Aktivierungspeptid) durch die Signalsequenz der bakteriellen alkalischen Phosphatase (phoA) ersetzt und der durch Phosphat regulierbare phoA Promotor verwendet. Aktives Trypsin wurde aus dem Periplasma isoliert. Die Ausbeute war jedoch sehr gering (ca. 1 mg/l).

Von Higaki, J.N. et al. (Biochem. 28 (1989) 9256-9263) wurde die Expression / Sekretion von Trypsin und Trypsinmutanten ins Periplasma von *E. coli* unter Verwendung des tac Promotors und der *S. typhimurium* hisJ Signalsequenz beschrieben. Die Ausbeute an aktivem Trypsin betrug ca. 0,3 mg/l. Durch Hochzelldichtefermentation konnte die Volumenausbeute von aktivem anionischem Rattentrypsin auf ca. 50 mg/l gesteigert werden (Yee, L. und Blanch, H.W., Biotechnol. Bioeng. 41 (1993) 781-790). Die Autoren weisen auf einige Probleme bei der Expression / Sekretion von aktivem Trypsin in *E. coli* hin. Enzymatisch aktives Trypsin entsteht im Periplasma von *E. coli* nach Abspaltung der Signalsequenz und nativer Trypsinproteininfaltung unter Ausbildung von 6 Disulfidbrücken. Die Bildung von aktivem Trypsin ist für die Zelle toxisch. Aktives Trypsin hydrolysiert die periplasmatischen *E.coli* Proteine, wodurch die Zellen lysieren. Zudem scheint die Proteinfaltung von Trypsin, im Speziellen die korrekte native Ausbildung der 6 Disulfidbrücken im Periplasma von *E.*

coli, erschwert zu sein. Das System war nicht geeignet zur Isolierung größerer Mengen Trypsin (> 10 mg; Willett, W.S. et al., Biochem. 34 (1995) 2172-2180).

Zur Herstellung größerer Mengen Trypsin (50-100 mg) für röntgenkristallographische Untersuchungen wurde eine inaktive Trypsinogen Vorstufe in Hefe unter Kontrolle eines regulierbaren ADH/GAPDH Promoters und durch Fusion mit der Hefe α -Factor Leadersequenz sezerniert. Das ins Medium sezernierte Trypsinogen Zymogen wurde in vitro mittels Enterokinase in Trypsin überführt. Die Ausbeute betrug 10-15 mg/l (Hedstrom, L. et al., Science 255 (1992) 1249-1253).

In der EP-A 0 597 681 werden DNA Sequenzen beschrieben, die für reifes Trypsin bzw. Trypsinogen mit vorangehendem Methionrest kodieren.

In der WO 97/00316 wird ein Verfahren zur Herstellung von Trypsin oder eines Derivats durch ein rekombinantes Verfahren in Aspergillus beschrieben. Zur Transformation wird ein Vektor verwendet, welcher für Trypsinogen oder ein Derivat davon codiert, welches N-terminal an ein Signalpeptid fusioniert ist.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein einfaches Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Proteasen sowie neue autokatalytisch aktivierbare Proteasen sowie deren Zymogene (inaktive, zymogene Vorstufen) zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer Protease, gekennzeichnet durch:

- a) Transformation einer Wirtszelle mit einer rekombinanten Nukleinsäure, welche für eine zymogene Vorstufe einer Protease codiert, die eine natürlicherweise nicht vorkommende autokatalytische Spaltstelle enthält, wobei diese Spaltstelle von der aktiven Form der genannten Protease erkannt und dabei die Vorstufe zur aktiven Protease gespalten wird,
- b) Kultivierung der Wirtszelle in der Weise, daß die zymogene Vorstufe der Protease in Form von inclusion bodies in der Wirtszelle entsteht,
- c) Isolierung der inclusion bodies und Naturierung unter Bedingungen, bei denen der Proteaseanteil der zymogenen Vorstufe in seiner natürlichen Konformation entsteht und

d) autokatalytische Spaltung der naturierten, zymogenen Vorstufe in die aktive Protease.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren aktive Proteasen einfach und in hoher Ausbeute herstellbar sind.

Unter Proteasen im Sinne der Erfindung sind sowohl eukaryontische als auch mikrobielle Proteasen zu verstehen. Beispiele hierfür sind in der Einleitung zur Beschreibung dieser Erfindung genannt. Besonders vorteilhaft ist dieses Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Trypsin, Thrombin und Faktor Xa.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine autokatalytisch spaltbare (aktivierbare) zymogene Vorstufe einer Protease, wobei die zymogene Vorstufe eine natürlicherweise nicht vorkommende autokatalytische Spaltstelle enthält (nicht autokatalytisch aktivierbar ist), welche eine Spaltstelle der natürlichen Form ersetzt.

Als Wirtszelle im Sinne der Erfindung ist jede Wirtszelle zu verstehen, in der Proteine als "inclusion bodies" entstehen können. Üblicherweise handelt es sich hierbei um prokaryontische Wirtszellen, vorzugsweise um E.coli-Zellen. Solche Verfahren sind beispielsweise beschrieben in F.A.O. Marston, Biochem. J. 240 (1986) 1-12; L. Stryer, Biochemistry, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1975, 24-30; T.E. Creighton, Progress Biophys. Molec. Biol. 33 (1978) 231-291; C.H. Schein, Bio/Technology 8 (1990) 308-317; EP-B 0 114 506; A. Mitraki und J. King, Bio/Technology 7 (1989) 690-697; EP-B 0 219 874; EP-B 0 393 725 und EP-B 0 241 022. Danach ist unter "inclusion bodies" im wesentlichen unlösliches, denaturiertes und inaktives Protein zu verstehen, welches im Cytoplasma der Wirtszellen angesammelt wird und zumindest teilweise mikroskopisch sichtbare Partikel darstellt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist demzufolge eine Präparation einer erfindungsgemäßen autokatalytisch spaltbaren zymogenen Vorstufe einer Protease, dadurch gekennzeichnet, daß das zu präparierende Protein inaktiv und denaturiert in Form von inclusion bodies in einer prokaryontischen Zelle vorliegt. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine wäßrige Lösung, die aus einem Denaturierungsmittel in einer Konzentration, die geeignet ist, die inclusion bodies aufzulösen, und den aufgelösten inclusion bodies besteht.

Unter einer zymogenen (inaktiven) Vorstufe einer Protease (Zymogen) ist ein Protein zu verstehen, welches auch nach Naturierung der inclusion bodies keine oder nur eine sehr geringe

proteolytische Aktivität, im Gegensatz zur aktiven Protease in der korrekten Proteinstruktur, zeigt (mindestens um den Faktor 5, vorzugsweise den Faktor 10 geringere Aktivität als die aktive Form). Die zymogene Form unterscheidet sich von der aktiven Form der Protease im wesentlichen darin, daß sie zusätzliche Aminosäuren enthält, an welchen gespalten oder die abgespalten werden müssen, um die aktive Form der Protease zu erhalten. Diese Aminosäuren können C-terminal, N-terminal und/oder innerhalb der Protease lokalisiert sein.

Proteasen wie Faktor IX, Faktor X, Thrombin oder Plasminogenaktivator bestehen aus mehreren Domänen. Eine dieser Domänen ist die Proteasedomäne, also die Domäne, welche die Proteaseaktivität vermittelt. Eine Vorstufe der Protease ist im erfundungsgemäßen Sinne dann inaktiv, wenn am N-Terminus der Proteasedomäne zusätzliche Aminosäuren enthalten sind, die autokatalytisch abspaltbar sind.

Unter Naturierung im Sinne der Erfindung ist ein Verfahren zu verstehen, bei welchem ein denaturiertes und im wesentlichen inaktives Protein in eine Konformation übergeführt wird, in der das Protein nach autokatalytischer Spaltung die gewünschte Aktivität zeigt. Üblicherweise handelt es sich bei dieser Konformation um die natürlicherweise vorhandene Konformation des Proteins. Zur Naturierung wird durch den Fachmann geläufige Verfahren (siehe oben) das schwer lösliche denaturierte Protein in Denaturierungsmitteln, wie Guanidinhydrochlorid oder Harnstoff, gelöst, gegebenenfalls reduziert und durch Verringerung der Konzentration des Denaturierungsmittels und/oder gegebenenfalls durch Zugabe einer Denaturierungshilfe, wie Arginin, und/oder eines Redoxsystems, wie GSH/GSSG, in seine aktive Konformation übergeführt.

Unter einer autokatalytischen Spaltung im Sinne der Erfindung ist eine Spaltung der zymogenen Vorstufe der Protease in die aktive Form zu verstehen, welche ohne Zusatz von weiteren Enzymen erfolgt. Da die zymogenen Vorstufen der Proteasen üblicherweise noch geringe restliche proteolytische Aktivitäten zeigen, ist dies für den Start der autokatalytischen Proteolyse ausreichend. Vorzugsweise beträgt das Verhältnis der proteolytischen Aktivität der zymogenen Vorstufe und der aktiven Protease 1 : 5 oder weniger.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind erfundungsgemäße autokatalytisch spaltbare zymogene Vorstufen von Proteasen, bei denen eine Spaltstelle der natürlich vorkommenden Form durch eine autokatalytisch spaltbare Spaltstelle ersetzt ist.

Die rekombinante Herstellung von Proteasen ist schwierig zu bewerkstelligen, da diese Proteasen als aktives Protein die Proteine des Wirtsorganismus spalten und dadurch letal für den Wirtsorganismus sind. Wenn die Proteasen in inaktiver, zymogener Form rekombinant hergestellt werden, ist es erforderlich, das Protein nach der rekombinanten Herstellung in einem zusätzlichen Schritt in die aktive Form zu überführen. Zur Spaltung der zymogenen Form werden wiederum Proteasen, die üblicherweise aus natürlichen Quellen, wie tierischen Rohstoffen, gewonnen werden, verwendet. Damit ist ein solches Verfahren aufwendig und kostenintensiv.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dagegen dadurch aus, daß auf einen zusätzlichen Schritt zur Spaltung der zymogenen Form, durch Zusatz einer weiteren Protease, vollständig verzichtet werden kann. Außer der Kostenersparnis, hat dies auch den Vorteil, daß die so hergestellte rekombinante Protease nicht durch weitere Proteasen (insbesondere durch Proteasen tierischer Herkunft) oder durch Proteine, die natürlicherweise als Verunreinigung der Proteasen bei der Isolierung aus natürlichen Quellen (z.B. Säugerzellproteine) gefunden werden, verunreinigt ist.

Die inaktive, zymogene Form der Protease kann bei der rekombinanten Herstellung, wie jedes andere Protein, exprimiert, isoliert und aufgereinigt werden. Solche Verfahren sind dem Fachmann sowohl für eukaryontische als auch prokaryontische Zellen bekannt.

Proteasen, die erfindungsgemäß hergestellt werden können, sind spezifisch spaltende Proteasen, wie beispielsweise Serinproteasen (z.B. die eukaryontischen Proteasen, wie Faktor IX, Faktor X, Faktor VII, Protein C, Thrombin, Trypsin, Chymotrypsin oder Gewebsplasminogenaktivator).

Erkennungssequenz(en) und Positionierung der in die Protease eingefügten autokatalytischen Spaltstelle oder Spaltstellen sind vom Typ der Protease und auch davon abhängig, wie die Aktivierung der zymogenen Form erfolgt. Die aktive Form von Faktor X entsteht beispielsweise dadurch, daß aus der inaktiven, zymogenen Form ein Fragment herausgeschnitten wird. Dies bedeutet, daß erfindungsgemäß am N- und C-Terminus dieses Fragments jeweils eine autokatalytische Spaltstelle vorhanden sein muß. Die Aktivierung von Trypsin verläuft in der Weise, daß am N-Terminus der zymogenen Form ein Aktivierungspeptid abgespalten wird. In diesem Fall ist es also erforderlich, das native Aktivierungspeptid so zu verändern, daß es autokatalytisch gespalten werden kann. Bei Plasminogenaktivatoren, wie Gewebsplasminogenaktivator, erfolgt die Aktivierung nur durch Spaltung einer Peptidbindung innerhalb des

Moleküls. Erfindungsgemäß wird in einem solchen Falle also die natürlicherweise vorkommende Spaltstelle durch die autokatalytische Spaltstelle ersetzt.

Bei der Endoproteinase LysC erfolgt die Aktivierung durch Abspaltung von jeweils einem N- und C-terminalen Fragment aus einer prepro-Form während der Sekretion. In diesem Fall sollte erfindungsgemäß das C-terminale Prosegment entfernt werden und zwischen das N-terminale Prosegment und die Proteasedomäne eine geeignete autokatalytische Spaltstelle eingefügt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung unterscheidet sich die rekombinante zymogene Form der Protease von der natürlicherweise vorkommenden zymogenen Form. Beispielsweise enthalten bakterielle Proteasen in der zymogenen Form (zelluläre Vorläuferform) Signalsequenzen und Prosequenzen, die dazu geeignet sind, die Ausschleusung der inaktiven Protease aus der Zelle zu ermöglichen. Beim erfindungsgemäßen Verfahren entsteht die rekombinante Protease in Form von unlöslichen inclusion bodies. Es ist also vorteilhaft, die Aminosäuresequenz der zymogenen Form so zu optimieren, daß sie möglichst vollständig zur Bildung von inclusion bodies führt, aus denen die Protease zweckmäßig mit hoher Ausbeute naturierbar ist. Da die inclusion bodies aufgrund der denaturierten Form des Proteins keine enzymatische Aktivität zeigen, ist es nicht unbedingt erforderlich, daß die zymogene Form überhaupt keine proteolytische Aktivität zeigt. Es ist sogar bevorzugt, daß die zymogene Form eine geringe proteolytische Aktivität zeigt, um die autokatalytische Spaltung nach Naturierung zu beschleunigen.

Vorzugsweise erfolgt die Einfügung der Spaltstelle oder der Spaltstellen unter Beibehaltung der nativen Primärstruktur (Proteasedomäne). Erfindungsgemäß ist es dadurch beispielsweise möglich, aktives Trypsin mit unveränderter Aminosäuresequenz auf einfache Weise in Prokaryonten herzustellen. Damit wird eine Protease erhalten, bei der nicht mehr das N-terminale Startcodon (Methionin) abgespalten werden muß.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäß hergestellte aktive Protease immobilisiert. Eine solche Immobilisierung kann beispielsweise durch Bindung an einen polymeren, unlöslichen Träger erfolgen oder durch Selbstvernetzung (vgl. z. B. US-Patent 4,634,671 und EP-A 0 367 302).

Die zymogene Form kann im wesentlichen (bis auf die autokatalytische Spaltstelle) der natürlichen zymogenen Form der Protease entsprechen. Im Falle von Faktor X enthält die

natürlicherweise vorkommende zymogene Form bereits eine autokatalytische Spaltstelle. In diesem Fall ist die zweite Spaltstelle der zymogenen Form durch eine weitere autokatalytische Spaltstelle ersetzt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Sequenz des abzuspaltenden Fragments oder der abzuspaltenden Fragmente weiter modifiziert. Geeignete autokatalytische Spaltstellen sind für bevorzugte Enzyme in nachfolgender Tabelle angegeben:

Restriktionsendoprotease / Spaltstelle

- Enterokinase	(Asp) ₄ Lys↓
- Faktor Xa (Rind)	IleGluGlyArg↓
- Faktor Xa (Mensch)	IleAspGlyArg↓
- Thrombin	ArgGlyProArg↓
- TEV Protease	GluAsnLeuTyrPheGln↓Gly/Ser
- IgA Protease	YyyPro↓XxxPro, Yyy = Pro, Ala, Gly, Thr; Xxx = Thr, Ser, Ala
- Kex2p Protease	2 benachbarte basische Aminosäuren (Lys oder Arg)
- LysC Endoprotease	Lys↓
- Trypsin	Lys↓ oder Arg↓
- Clostripain	Arg↓
- S. aureus V8	Glu↓

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist eine autokatalytisch aktivierbare zymogene Vorstufe von Faktor X. Faktor X ist eine komplexe aus mehreren Domänen bestehende glycosyierte Protease. Er gehört mechanistisch zur Familie der Serinproteasen. FX wird in der Leber als inaktives Proenzym (Zymogen) synthetisiert, ins Blut sezerniert und bei Bedarf durch spezifische Proteolyse aktiviert. Der Faktor X ist hinsichtlich der Proteindomänenanordnung analog wie der Faktor VII, IX und Protein C aufgebaut. Zudem sind die Aminosäuresequenzen dieser 4 Proteasen sehr homolog (Aminosäuresequenz-Identität: ca. 40%). Sie werden zu einer Proteaseunterfamilie, der Faktor IX-Familie, zusammengefaßt.

Ebenfalls erfindungsgemäß bevorzugt werden die Proteasen der Faktor IX-Familie (Faktor VII, IX, X und Protein C) Diese Proteasen bestehen gemäß Furie, B. und Furie, B.C. (Cell 53 (1988) 505- 518) aus

- einem Propeptid,
- einer GLA-Domäne,
- einer "aromatic amino acid stack" Domäne,

- 10 -

- zwei EGF-Domänen (EGF1 und EGF2),
- einer Zymogen Aktivierungsdomäne (Aktivierungspeptid, AP) und
- einer katalytischen Proteasedomäne (CD).

Zudem werden die Blutplasmaproteasen während der Sekretion posttranslational modifiziert:

- 11 - 12 Disulfidbrücken
- N- und/oder O-Glycosylierung (GLA-Domäne und Aktivierungspeptid)
- Bharadwaj, D. et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 6537-6542
- Medved, L.V. et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 13652-13659
- Abspaltung des Propeptides
- γ -Carboxylierung von Glu-Resten (GLA-Domäne)
- β -Hydroxylierung eines Asp-Restes (EGF-Domänen)

Nach Aktivierung der Zymogene (zymogene Form des Proteins) durch spezifische Spaltung von ein oder zwei Peptidbindungen (Abspaltung eines Aktivierungspeptids) bestehen die enzymatisch aktiven Proteasen aus 2 Ketten, die entsprechend ihrem Molekulargewicht mit schwerer und leichter Kette bezeichnet werden. Die beiden Ketten werden in der Faktor IX-Proteasefamilie durch eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen der EGF2-Domäne und der Proteasedomäne zusammengehalten. Die Zymogen-Enzym Transformation (Aktivierung) führt zu Konformationsänderungen innerhalb der Proteasedomäne. Dadurch kann sich eine für die Proteaseaktivität notwendige essentielle Salzbrücke zwischen der $\alpha\text{-NH}_3^+$ -Gruppe der N-terminalen Aminosäure der Proteasedomäne und einem Asp-Rest innerhalb der FXa-Proteasedomäne ausbilden. Für diese Untergruppe von Serinproteasen ist der N-terminale Bereich sehr kritisch und darf nicht modifiziert werden. Nur dann kann sich die für Serinproteasen typische "active site" mit der katalytischen Triade aus Ser, Asp und His ausbilden (Blow, D.M.: Acc. Chem. Res. 9 (1976) 145-152; Polgar, L.: In: Mechanisms of protease action. Boca Raton, Florida, CRC Press, chapter 3 (1989)).

Die FX Aktivierungspeptid-Prozessierung beginnt bereits in der Zelle während der Sekretion (erste Spaltung zwischen der EGF2-Domäne und dem Aktivierungspeptid). Durch eine zweite FIXa- oder FVIIa-katalysierte Spaltung an der Membran im Komplex mit dem Cofaktor FVIIIa bzw. "tissue factor" wird dann FX zu FXa aktiviert (Mann, K. G. et al., Blood 76 (1990) 1-16).

Die katalytische Domäne von FXa besteht aus 254 Aminosäuren, ist nicht glycosyliert und bildet 4 Disulfidbrücken aus. Sie ist strukturell aus 2 "tonnenförmigen" β -Faltblättern aufgebaut, den sogenannten Halbseiten.

Die Herstellung von verkürzten posttranslational nicht modifizierten Blutplasmaprotease-varianten der Faktor IX-Familie (Faktor VII, IX, X und Protein C) bestehend aus EGF2-Domäne, Aktivierungspeptid (AP) und katalytischer Domäne (CD) durch Expression der entsprechenden Gene in *E. coli* und anschließende Naturierung und Aktivierung der inaktiven Proteaseproteine *in vitro* ist in der WO 97/03027 umfassend beschrieben.

Ebenfalls erfindungsgemäß bevorzugt sind autokatalytisch spaltbare zymogene Vorstufen von Trypsinproteasen. Die Trypsinproteasen werden in den exokrinen Acinuszellen des Pankreas als inaktive Proenzyme (Zymogene) den sogenannten Trypsinogenen gebildet. Aus dem menschlichen Pankreassekret wurden 4 unterschiedliche Trypsinogenen (Trypsinogen I, II, III und IV) isoliert, enzymatisch charakterisiert und die Aminosäuresequenzen ermittelt. Die 2 am stärksten exprimierten Trypsinogen Gene TRYI (Trypsinogen I) und TRYII (Trypsinogen II) sind bekannt. Sie wurden durch Klonierung der entsprechenden cDNAs (Emi, M. et al., Gene 41 (1986) 305-310) isoliert. Die humanen Trypsinogen Gene TRYI und TRYII kodieren gemäß einem sezernierten Protein für ein übliches Signalpeptid aus 15 Aminosäureresten. Danach folgt ein für die Trypsinogen Gene charakteristisches Prosegment, das im Falle der humanen Trypsinogen I und II aus dem N-terminalen Aktivierungspeptid AlaProPheAspAspAspLys besteht (Guy, O. et al., Biochem. 17 (1978) 1669-1675). Dieses Prosegment wird von der aus den Dünndarm-Mucosazellen in den Dünndarm sezernierten Glycoprotease Enterokinase erkannt und in Gegenwart von Calcium abgespalten, wodurch die inaktiven Trypsinogen in die aktive Form, die Trypsine überführt werden. Die Aktivierung der Trypsinogen verläuft teilweise autokatalytisch. Die Spaltung durch Enterokinase ist jedoch über 1000 mal schneller.

Die Trypsine gehören wie der Faktor Xa zur Familie der Serinproteasen. Die Aktivierung der Trypsinogen durch Abspaltung des N-terminalen Aktivierungspeptids führt auch hier zu einer Konformationsänderung innerhalb der Proteasedomäne unter Beteiligung des freien N-Terminus (Ausbildung einer essentiellen Salzbrücke zwischen der $\alpha\text{-NH}_3^+$ -Gruppe der N-terminalen Aminosäure von Trypsin und dem Asp194-Rest innerhalb der Proteasedomäne), wodurch sich die für Serinproteasen typische "active site" mit der katalytischen Triade aus Ser, Asp und His ausbilden kann.

Das humane am stärksten exprimierte Trypsinogen I Gen (TRYI) kodiert für 247 Aminosäuren inklusive einer Signalsequenz aus 15 Aminosäuren und einem Aktivierungspeptid aus 8 Aminosäuren. Das reife Trypsin I Isoenzym besteht somit aus 224 Aminosäureresten. Es enthält 10 Cysteinreste, die 5 Disulfidbrücken ausbilden (Emi, M. et al., Gene 41 (1986) 305-310). Die katalytische Domäne von Trypsin ist analog wie FXa strukturell aus 2 "tonnenförmigen" β-Faltblättern aufgebaut.

Das humane Trypsinisoenzym I besitzt zu dem humanen Trypsinisoenzym II eine Sequenzhomologie von 89%, zu Rindertrypsin eine Sequenzhomologie von ca. 75% und zu der katalytischen Domäne des humanen Faktors Xa eine Sequenzhomologie von ca. 43%.

Die folgenden Beispiele, Publikationen, das Sequenzprotokoll und die Figuren erläutern die Erfindung, deren Schutzzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Im Sequenzprotokoll bedeuten:

SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:10	Primer N1 - N10.
SEQ ID NO:11	das native FX Aktivierungspeptid.
SEQ ID NO:12	die Nukleotidsequenz des klonierten TRYI-Variantengens.

Fig. 1

zeigt die Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des klonierten TRYI Trypsin-Variantengens mit verkürztem Prosegment. Die modifizierten Aktivierungspeptide der autokatalytisch aktivierbaren Trypsinvarianten rTRYI-GPK und rTRYI-VGR sind eingezeichnet. Die in der TRYI-GPK-SS Variante zusätzlich eingeführten Mutationen (P132C, P133A und Y233C; Aminosäuresequenz-Nummerierung entsprechend der Publikation von Emi, M. et al. (Gene 41 (1986) 305-310) sind hervorgehoben.

Beispiele

Methoden

Rekombinante DNA-Technik

Zur Manipulation von DNA wurden Standardmethoden benutzt, wie sie bei Sambrook, J. et al. (1989) In: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben sind. Die verwendeten molekularbiologischen Reagenzien wurden nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Proteasen und Proteasevarianten wurde durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 280 nm unter Verwendung des anhand der Aminosäuresequenz errechneten molaren Extinktionskoeffizienten ermittelt.

Expressionsvektor

Der Vektor zur Expression der autokatalytisch aktivierbaren Proteasen basiert auf dem Expressionsvektor pSAM-CORE für core-Streptavidin. Die Herstellung und Beschreibung des Plasmids pSAM-CORE ist in der WO 93/09144 von Kopetzki, E. et al. beschrieben. Das core-Streptavidin Gen wurde durch das gewünschte Proteasegen im pSAM-CORE Vektor ersetzt.

Beispiel 1

Klonierung des humanen Trypsinogen I Gens (Plasmid: pTRYI)

Die Trypsinogen I cDNA von Bp-Position 61-750, kodierend für Trypsinogen I von Aminosäureposition 19-247 (cDNA Sequenz- und Aminosäuresequenz-Nummerierung entsprechend der Publikation von Emi, M. et al. (Gene 41 (1986) 305-310) wurde in einer "Polymerase Chain Reaktion" (PCR) gemäß der Methode von Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (Methods Enzymol. 155 (1987) 355-350) unter Verwendung der PCR Primer N1 (SEQ ID NO: 1) und N2 (SEQ ID NO: 2)

N1 : 5' -AAAAAACCAATGGATGATGATGACAAGATCGTTGGG-3'
MetAspAspAspAspLysIleValGly...

- 14 -

N2: 5'-AAAAAAAAAGCTTCATTAGCTATTGGCAGCTATGGTGTTC-3'

und einer kommerziell erhältlichen humanen Leber cDNA Genbank (Vektor: Lambda ZAP® II) der Firma Stratagene (La Jolla, CA, U.S.A.) als Template DNA amplifiziert. Mittels der PCR Primer wurde am 5'-Ende der kodierenden Region eine singuläre NcoI Schnittstelle und ein ATG-Startkodon und am 3'-Ende der kodierenden Region eine singuläre HindIII Schnittstelle eingeführt (Fig. 1).

Das ca. 715 Bp lange PCR Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und HindIII verdaut und das ca. 700 Bp lange NcoI/HindIII-Trypsinogen I Fragment nach Reinigung durch Agarosegelektrophorese in das ca. 2,55 kBp lange NcoI/HindIII-pSAM-CORE Vektorfragment ligiert. Das gewünschte Plasmid pTRYI wurde durch Restriktionskartierung identifiziert und die durch PCR isolierte TRYI cDNA Sequenz durch DNA Sequenzierung überprüft.

Beispiel 2

Konstruktion des Trypsinvariantengens TRYI-GPK

(autokatalytisch aktivierbare Trypsinvariante; Plasmid: pTRYI-GPK)

Das N-terminale native Trypsinogen I Prosegment AlaProPheAspAspAspAspLys (Guy, O. et al., Biochem. 17 (1978) 1669-1675) wurde durch das Aktivierungspeptid GlyProLys ersetzt. Das gewünschte TRYI-GPK Trypsinvariantengen wurde mittels PCR-Technik hergestellt.

Dazu wurde die humane Trypsinogen I cDNA von Bp-Position 73-750, kodierend für Lys-Trypsin I von Aminosäureposition 23-247 (cDNA Sequenz- und Aminosäuresequenz-Numerierung entsprechend der Publikation von Emi, M. et al. (Gene 41 (1986) 305-310) mittels PCR unter Verwendung der Primer N3 (SEQ ID NO: 3) und N2 (SEQ ID NO: 2, Beispiel 1)

NcoI	MunI
N3 : 5' -AAAAAA <u>ACCATGGTCCGAAAATCGTTGGtGGtTACAatTGTGAGGAGAATTCTGTCC-5'</u>	
	MetGlyProLysIleValGlyGlyThrAsnCysGluGluAsnSerVal

und dem Plasmid pTRYI (Beispiel 1) als Template DNA amplifiziert. Mittels des 5'-überhängenden Endes des PCR Primers N3 wurde eine DNA Sequenz kodierend für ein ATG-Startkodon und das Aktivierungspeptid GlyProLys mit einer singulären NcoI Schnittstelle am 5'-Ende eingeführt. Zudem wurde mit dem PCR Primer N3 innerhalb der kodierenden N-termini-

nalen Region des Trypsin I Strukturgens eine zusätzliche MunI Schnittstelle eingeführt und teilweise die "Codonusage" (Aminosäurepositionen: 7, 8 und 10) an die in E. coli bevorzugt benutzten Kodons angepaßt ("ATG-Umgebung mit optimierter Codonusage", gekennzeichnet durch Kleinschreibung der Basen im N3 Primer), ohne die Proteinsequenz zu verändern.

Das ca. 700 Bp lange PCR Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und HindIII verdaut und das ca. 685 Bp lange NcoI/HindIII-TRYI-GPK Fragment nach Reinigung durch Agarosegelektrophorese in das ca. 2,55 kBp lange NcoI/HindIII-pSAM-CORE Vektorfragment ligiert. Das gewünschte Plasmid pTRYI-GPK wurde durch Restriktionskartierung identifiziert (zusätzliche MunI Schnittstelle) und das durch PCR amplifizierte TRPI-GPK Gen durch DNA Sequenzierung überprüft.

Beispiel 3

Konstruktion des Trypsinvariantengens TRYI-VGR (autokatalytisch aktivierbare Trypsinvariante; Plasmid: pTRYI-VGR)

Das N-terminale native Trypsinogen I Prosegment AlaProPheAspAspAspAspLys wurde durch das Aktivierungspeptid ValGlyArg ersetzt. Das TRYI-VGR Trypsinvariantengen wurde analog wie das TRYI-GPK Trypsinvariantengen mittels PCR-Technik hergestellt.

Dazu wurde die humane Trypsinogen I cDNA von Bp-Position 76-750, kodierend für Trypsin I von Aminosäureposition 24-247 (cDNA Sequenz- und Aminosäuresequenz-Nummerierung entsprechend der Publikation von Emi, M. et al. (Gene 41 (1986) 305-310) mittels PCR unter Verwendung der Primer N4 (SEQ ID NO: 4) und N2 (SEQ ID NO: 2, Beispiel 1)

N4 : 5' -AAAAAAACCATGGTGGTCGTATCGTTGGtGGtTACAAtTGTGAGGAGAATTCTGTCC-3'
MetValGlyArgIleValGlyGlyThrAsnCysGluGluAsnSerVal

und dem Plasmid pTRYI (Beispiel 1) als Template DNA amplifiziert. Mittels des 5'-überhängenden Endes des PCR Primers N4 wurde eine DNA Sequenz kodierend für ein ATG-Startkodon und das Aktivierungspeptid ValGlyArg mit einer singulären NcoI-Schnittstelle am 5'-Ende eingeführt. Zudem wurde mit dem PCR Primer N4 innerhalb der kodierenden N-terminalen Region des Trypsin I Strukturgens eine zusätzliche MunI Schnittstelle eingeführt und teilweise die "Codonusage" (Aminosäurepositionen: 7, 8 und 10) an die in E. coli bevorzugt benutzten Kodons angepaßt ("ATG-Umgebung mit optimierter Codonusage", gekennzeichnet durch Kleinschreibung der Basen im N4 Primer), ohne die Proteinsequenz zu verändern.

Das ca. 700 Bp lange PCR Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und HindIII verdaut und das ca. 685 Bp lange NcoI/HindIII-TRYI-VGR Fragment nach Reinigung durch Agarosegelektrophorese in das ca. 2,55 kBp lange NcoI/HindIII-pSAM-CORE Vektorfragment ligiert. Die Herstellung und Beschreibung des Plasmids pSAM-CORE ist in der WO 93/09144 von Kopetzki, E. et al. beschrieben. Das gewünschte Plasmid pTRYI-VGR wurde durch Restriktionskartierung identifiziert (zusätzliche MunI Schnittstelle) und das durch PCR amplifizierte TRPI-VGR Gen durch DNA Sequenzierung überprüft.

Beispiel 4

Konstruktion des Trypsinvariantengens TRYI-GPK-SS (autokatalytisch aktivierbare Trypsinvariante mit einer zusätzlichen Disulfidbrücke; Plasmid: pTRYI-GPK-SS)

Durch Einführung einer zusätzlichen Disulfidbrücke wurde das humane Trypsin I Isoenzym verändert. Dazu wurde die Aminosäure Pro an Position 132 und die Aminosäure Tyr an Position 233 zu Cys mutiert (Aminosäuresequenz-Nummerierung entsprechend der Publikation von Emi, M. et al. (Gene 41 (1986) 305-310)). Durch diese 2 Punktmutationen (P132C und Y233C) kann sich eine zusätzliche 6-te Disulfidbrücke zwischen den erfindungsgemäß eingeführten Cysteinresten an Position 132 und 233 ausbilden. Zudem wurde die Aminosäure Pro an der Position 133 zu Ala mutiert (P133A).

Dazu wurde die Trypsinogen I cDNA von Bp-Position 353-750, kodierend für Trypsinogen I von Aminosäureposition 116-247 (cDNA Sequenz- und Aminosäuresequenz-Nummerierung entsprechend der Publikation von Emi, M. et al. (Gene 41 (1986) 305-310), mittels PCR unter Verwendung der Primer N5 (SEQ ID NO: 5) und N6 (SEQ ID NO: 6)

N5 : BsgI
 5' -AAAAAAAGTCAGTAATCACGCCCGGTGTCACCATCTCTGCCCCACCGCCtgcgcgtGCCACTGG
 CysAla
 (DraIII)
tACGAAGTGC-3'

N6 : HindIII
 5' -AAAAAAAAGCTTCATTAGCTATTGGCAGCTATGGTGTCTTAATCCATTTCACATAGTTGcAGACCT
 TGGTGTAGACTCC-3'

und dem Plasmid pTRYI (Beispiel 1) als Template DNA amplifiziert. Mittels des PCR Primers N5 wurde die P132C und die P133A Mutation und mit dem Primer N6 die Y233C Mutation ein-

geführt. Die Mutationen sind durch Kleinschreibung der Basen in den PCR Primern gekennzeichnet.

Das ca. 420 Bp lange PCR Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen BsgI und HindIII verdaut und das ca. 405 Bp lange BsgI/HindIII-TRYI Fragment nach Reinigung durch Agarosegelektrophorese in das ca. 2,85 kBp lange BsgI/HindIII-pTRPI-GPK Vektorfragment ligiert (Beispiel 2). Das gewünschte Plasmid pTRYI-GPK-SS wurde durch Restriktionskartierung identifiziert (fehlende DraIII Schnittstelle) und die durch PCR amplifizierte TRYI DNA Sequenz durch DNA Sequenzierung überprüft.

Beispiel 5

Konstruktion des FX Proteasevariantengens FX-EGF2-APau-CD (autokatalytisch aktivierbare FX-EGF2-AP-CD Variante; Plasmid: pFX-EGF2-APau-CD)

Die Klonierung des FX Gens und die Konstruktion des Plasmids pFX-EGF2-AP-CD ist in der WO 97/03027, Beispiel 3) ausführlich beschrieben. Die FX-EGF2-AP-CD Expressionseinheit auf dem Plasmid pFX-EGF2-AP-CD kodiert für eine N-terminal verkürzte FX Proteasevariante aus EGF2-Domäne, Aktivierungspeptid und katalytischer Proteasedomäne.

Im DNA Segment kodierend für das native FX Aktivierungspeptid (AP) (SEQ-ID-NO:11)

SerValAlaGlnAlaThrSerSerGlyGluAlaProAspSerIleThrTrpLysPro
TyrAspAlaAlaAspLeuAspProThrGluAsnProPheAspLeuLeuAspPheAsnGln
ThrGlnProGluArgGlyAspAsnAsnLeuThrArg

wurden die C-terminalen drei Aminosäuren Asn, Leu, Thr durch Ile, Asp, Gly ersetzt, wobei das modifizierte FX-Aktivierungspeptid APau entstand.

Die gewünschte NLT zu IDG Aminosäuresequenzänderung wurde mittels einer Fusions-PCR eingeführt.

Dazu wurde in einer ersten PCR die FX DNA von Bp-Position 330-629, kodierend für die EGF2-Domäne und das Aktivierungspeptid von Aminosäureposition 111-209 (Sequenz- und Aminosäuresequenz-Nummerierung entsprechend Fig. 3, WO 97/03027) unter Verwendung der PCR Primer N7 (SEQ ID NO: 7) und N8 (SEQ ID NO: 8)

- 18 -

PstI
N7: 5' -AAAAAAAGGCCTGCATTCCCACAGGGCCC-3'

Van91I
N8: 5' -AAAAAACCaCgCTCGGCTGCGTCTGGTTGAAGTCAAG-3'

und des Plasmids pFX-EGF2-AP-CD (Herstellung und Beschreibung siehe: WO 97/03027, Beispiel 3) als Template DNA amplifiziert. Mittels des PCR Primers N8 wurde am 3'-Ende eine singuläre Van91I Schnittstelle eingeführt, ohne die Aminosäuresequenz zu verändern.

In einer zweiten PCR wurde die FX DNA von Bp-Position 619-1362 kodierend für die C-terminale Region des modifizierten FX Aktivierungspeptids und der FX Proteasedomäne von Aminosäureposition 207-454 (Sequenz- und Aminosäuresequenz-Nummerierung entsprechend Fig. 3, WO 97/03027) unter Verwendung der PCR Primer N9 (SEQ ID NO: 9) und N10 (SEQ ID NO: 10)

N9: Van91I
5' -AAAAAACCaGAGCtGGCGACAACatcgacggtAGGatcGTGGGAGGCCAGGAATGCAAG-3'
ProGluArgGlyAspAsnIleAspGlyArgIleValGlyGlnGluCysLys

N10: HindIII
5' -AAAAAAAGCTTCATTACTTGGCTTGGGCAAGCCCCTGGT-3'

und des Plasmids pFX-EGF2-AP-CD als Template DNA amplifiziert. Mittels des PCR Primers N9 wurde am 5'-Ende eine singuläre Van91I Schnittstelle und die gewünschte NLT zu IDG Aminosäuresequenzveränderung eingeführt.

Das ca. 300 Bp lange EGF2-AP DNA Fragment der 1-ten PCR wurde mit den Restriktionsendonukleasen PstI und Van91I und das ca. 750 Bp lange FX DNA Fragment der 2-ten PCR wurde mit den Restriktionsendonukleasen Van91I und HindIII verdaut. Nach Reinigung durch Agarosegelektrophorese wurde das ca. 285 Bp lange PstI/Van91I-EGF2-AP DNA Fragment mit dem 740 Bp langen Van91I/HindIII-FX DNA Fragment und dem ca. 2,56 kBp PstI/HindIII pFX-EGF2-AP-CD Vektorfragment in einer Dreifragmentligation ligiert. Das gewünschte Plasmid pFX-EGF2-APau-CD wurde durch Restriktionskartierung identifiziert (zusätzliche Van91I Schnittstelle) und das FX-EGF2-APau-CD Gen durch DNA Sequenzierung überprüft.

Beispiel 6**a) Expression der Proteasegene in E. coli**

Zur Expression der Trypsin- und FX Variantengene wurde ein E. coli K12 Stamm (z.B. UT5600; Grodberg, J. und Dunn, J.J., J. Bacteriol. 170 (1988) 1245-1253) jeweils mit einem der in den Beispielen 2-5 beschriebenen Expressionsplasmiden pTRYI-GPK, pTRYI-VGR, pTRYI-GPK-SS und pFX-EGF2-APau-CD (Ampicillin-Resistenz) und dem lacI^q-Repressorplasmid pUBS520 (Kanamycin-Resistenz, Herstellung und Beschreibung siehe: Brinkmann, U. et al., Gene 85 (1989) 109-114) transformiert.

Die mit den Expressionsplasmiden transformierten UT5600/pUBS520/Zellen wurden in Schüttelkultur in DYT-Medium (1% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) Bacto Tryptone, Difco, und 0,5% NaCl) mit 50-100 mg/l Ampicillin und 50 mg/l Kanamycin bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 550 nm (OD₅₅₀) von 0,6-0,9 angezogen und anschließend mit IPTG (1-5 mmol/l Endkonzentration) induziert. Nach einer Induktionsphase von 4 - 8 Stunden (Std.) bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall RC-5B Zentrifuge, GS3 Rotor, 6000 UPM, 15 min) geerntet, mit 50 mmol/l Tris-HCl Puffer, pH 7,2 gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Die Zellausbeute aus einer 1 l Schüttelkultur betrug 4-5 g (Naßgewicht).

b) Expressionsanalyse

Die Expression der mit den Expressionsplasmiden pTRYI-GPK, pTRYI-VGR, pTRYI-GPK-SS und pFX-EGF2-APau-CD transformierten UT5600/pUBS520/Zellen wurde analysiert. Dazu wurden Zellpellets aus jeweils 1 ml abzentrifugiertem Anzuchtmittel in 0,25 ml 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,2 resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung (2 Pulse a 30 s mit 50% Intensität) mit einem Sonifier® Cell Disruptor B15 der Firma Branson (Heusenstamm, Deutschland) aufgeschlossen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden sedimentiert (Eppendorf 5415 Zentrifuge, 14000 UPM, 5 min) und der Überstand mit 1/5 Volumen (Vol) 5xSDS-Probenpuffer (1xSDS-Probenpuffer: 50 mmol/l Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 1% Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0,001% Bromphenolblau) versetzt. Die unlösliche Zelltrümmerfraktion (Pellet) wurde in 0,3 ml 1xSDS-Probenpuffer mit 6-8 M Harnstoff resuspendiert, die Proben 5 min bei 95°C inkubiert und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Proteine durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685) und mit Coomassie Brilliant Blue R Farbstoff angefärbt.

Die in *E. coli* synthetisierten Proteasevarianten waren homogen und wurden ausschließlich in der unlöslichen Zelltrümmerfraktion gefunden ("inclusion bodies", IBs). Die Expressionshöhe betrug 10-50% bezogen auf das *E. coli* Gesamtprotein.

Beispiel 7

Zell-Lyse, Solubilisierung und Naturierung der Proteasegene

a) Zell-Lyse und Präparation der "inclusion bodies" (IBs)

Das Zellpellet aus 3 l Schüttelkultur (ca. 15 g Naßgewicht) wurde in 75 ml 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,2, resuspendiert. Die Suspension wurde mit 0,25 mg/ml Lysozym versetzt und 30 min bei 0°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 mmol/l MgCl₂ und 10 mg/ml DNase I (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 104159) wurden die Zellen mechanisch mittels Hochdruckdispersion in einer French® Press der Firma SLM Amico (Urbana, IL, U.S.A.) aufgeschlossen. Anschließend wurde die DNA 30 min bei Raumtemperatur (RT) verdaut. Der Ansatz wurde mit 37,5 ml 50 mmol/l Tris-HCl pH 7,2, 60 mmol/l EDTA, 1,5 mol/l NaCl, 6% Triton X-100 versetzt, weitere 30 min bei RT inkubiert und in einer Sorvall RC-5B Zentrifuge (GSA Rotor, 12000 UPM, 15 min) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 100 ml 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,2, 20 mmol/l EDTA versetzt, 30 min unter Rühren bei 4°C inkubiert und erneut sedimentiert. Der letzte Waschschritt wurde wiederholt. Die gereinigten IBs (1,5-2,0 g Naßgewicht, 25-30% Trockenmasse, 100-150 mg Protease) wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

b) Solubilisierung und Derivatisierung der IBs

Die gereinigten IBs wurden in einer Konzentration von 100 mg IB-Pellet (Naßgewicht)/ml entsprechend 5-10 mg/ml Protein in 6 mol/l Guanidin-HCl, 100 mmol/l Tris-HCl, 20 mmol/l EDTA, 150 mmol/l GSSG und 15 mmol/l GSH, pH 8,0 unter Rühren bei RT in 1-3 Std. gelöst. Anschließend wurde der pH auf pH 5,0 eingestellt und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (Sorvall RC-5B Zentrifuge, SS34 Rotor, 16000 UPM, 10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde gegen 100 Vol. 4-6 mol/l Guanidin-HCl pH 5,0 für 24 Std. bei 4°C dialysiert.

c) Naturierung

Die Naturierung der in 6 mol/l Guanidin-HCl solubilisierten und mit GSSG/GSH derivatisierten Proteasevarianten wurde bei 4°C durch wiederholte (z.B. 5-fache) Zugabe von jeweils 0,5 ml IB-Solubilisat/Derivat zu 50 ml 50 mmol/l Tris-HCl, 0,5 mol/l Arginin, 20 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l EDTA und 0,5 mmol/l Cystein, pH 8,5 im Zeitabstand von 3-5 Std. und anschließende Inkubation für 10-16 Std. bei 4°C bewirkt. Nach Abschluß der Naturierungsreaktion wurden unlösliche Bestandteile durch Filtration mit einem Filtrationsgerät der Firma Satorius (Göttingen, Deutschland) bestückt mit Tiefenfilter K 250 der Firma Seitz (Bad Kreuznach, Deutschland) abgetrennt.

d) Konzentrierung und Dialyse der Naturierungsansätze

Der klare proteasehaltige Überstand wurde durch Cross-Flow-Filtration in einer Minisette (Membran Typ: Omega 3K) der Firma Filtron (Karlstein, Deutschland) 10-15-fach konzentriert und zur Entfernung von Guanidin-HCl und Arginin gegen 100 Vol. 20 mmol/l Tris-HCl und 50 mmol/l NaCl, pH 8,2 für 12-24 Std. bei 20-25°C dialysiert. Präzipitiertes Protein wurde durch Zentrifugation abgetrennt (Sorvall RC-5B Zentrifuge, SS34 Rotor, 16000 UPM, 20 min) und der klare Überstand mit einer Nalgene® Einmalfiltrationseinheit (Porendurchmesser: 0,2 mm) der Firma Nalge (Rochester, NY, U.S.A.) filtriert.

Beispiel 8**Reinigung der naturierten aktiven Trypsin- und FXa Proteasevarianten**

Die Aktivierung der Trypsin- und rFX-Proteasevarianten rTRYI-GPK, rTRYI-VGR, rTRYI-GPK-SS und rFX-EGF2-APau-CD durch Autokatalyse erfolgt bereits bei der Naturierung und der anschließenden Konzentrierung und Dialyse des Naturierungsansatzes.

Die aktiven Trypsin- und rFXa Proteasevarianten rTRYI-GPK, rTRYI-VGR, rTRYI-GPK-SS und rFX-EGF2-APau-CD aus den Naturierungsansätzen können bei Bedarf mit chromatographischen Methoden, die dem Fachmann bekannt sind, weiter gereinigt werden.

- 22 -

Reinigung der Proteasevarianten durch Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose ff

Der konzentrierte und gegen 20 mmol/l Tris-HCl und 50 mmol/l NaCl, pH 8,2 dialysierte Naturierungsansatz wurde auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Q-Sepharose-ff-Säule (1,5 x 11 cm, V = 20 ml; Beladungskapazität: 10 mg Protein / ml Gel) der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) aufgetragen (2 Säulenvolumen/Stunde, 2 SV/Std.) und so lange mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats bei 280 nm den Leerwert des Puffers erreichte. Die Elution des gebundenen Materials erfolgte durch einen Gradienten von 50-500 mmol/l NaCl in 20 mmol/l Tris-HCl, pH 8,2 (2 SV/Std.). Die Proteasen wurden bei einer NaCl Konzentration von 100-200 mmol/l eluiert. Die proteasehaltigen Fraktionen wurden durch nicht-reduzierende und reduzierende SDS PAGE identifiziert und der Elutionspeak vereinigt.

Beispiel 9

Reinigung der aktiven Proteasevarianten durch Affinitätschromatographie an Benzamidin-Sepharose-CL-6B

Der konzentrierte und gegen 20 mmol/l Tris-HCl und 50 mmol/l NaCl, pH 8,2 dialysierte Naturierungsansatz wurde auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Benzamidin-Sepharose-CL-6B-Säule (1,0 x 10 cm, V = 8 ml; Beladungskapazität: 2-3 mg Protein / ml Gel) der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) aufgetragen (2 SV/Std.) und so lange mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats bei 280 nm den Leerwert des Puffers erreichte. Die Elution des gebundenen Materials erfolgte durch 10 mmol/l Benzamidin in 20 mmol/l Tris-HCl und 200 mmol/l NaCl, pH 8,2 (2 SV/Std.). Die proteasehaltigen Fraktionen wurden durch nicht-reduzierende und reduzierende SDS PAGE und Aktivitätsbestimmung identifiziert (siehe: Beispiel 10).

Der zur Elution verwendete Serinprotease-Inhibitor Benzamidin wurde durch Dialyse gegen 1 mmol/l HCl (Trypsin) bzw. 50 mmol/l Natriumphosphat-Puffer, pH 6,5 (FXa) entfernt.

Beispiel 10**Charakterisierung der gereinigten Proteasevarianten****a) SDS-PAGE**

Sowohl die Oligomeren- und Aggregatbildung durch intermolekulare Disulfidbrückenbildung als auch die Homogenität und Reinheit der natürlichen autokatalytisch aktivierten und gereinigten Trypsin- und rFXa Proteasevarianten wurde durch nicht-reduzierende (minus Mercaptoethanol) und reduzierende (plus Mercaptoethanol) SDS PAGE (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685) untersucht.

b) Aktivitätsbestimmung, Bestimmung der kinetischen Konstanten Kcat und KmBestimmung der Trypsin Aktivität mit N-Benzoyl-L-argininethylester (BAEE)

Die Aktivitätsbestimmung von Trypsin wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Walsh, K.A. und Wilcox, P.E. (Methods Enzymol. XIX (1970) 31-41) in einem Volumen von 1 ml in 63 mmol/l Natriumphosphat-Puffer, pH 7,6 und 0,23 mmol/l N-Benzoyl-L-argininethyl-ester Hydrochlorid (BAEE; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland, Kat.-Nr. B-4500) bei 25°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Trypsinhaltiger Probe (gelöst in 1 mmol/l HCl, 300-600 U/ml) gestartet und die Absorptionsänderung/min ($\Delta A/min$) bei 253 nm bestimmt. 1 BAEE Unit Trypsin ist definiert als die Menge Enzym, die unter den angegebenen Testbedingungen eine Absorptionsänderung ($\Delta A/min_{253}$) von 0,0032 bewirkt. Die spezifische Aktivität von gereinigtem humanem Trypsin beträgt unter diesen Testbedingungen ca. 12000 U/mg Protein. Die Aktivität und die kinetischen Konstanten wurden aus der linearen Anfangssteigung gemäß der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt.

Bestimmung der Trypsin Aktivität mit Chromozym® TH als Substrat

Die Aktivitätsbestimmung von Trypsin wurde in einem Volumen von 1 ml in 50 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 5 mmol/l CaCl₂, 0,1% PEG 8000, pH 8,0 und 0,1 mmol/l des chromogenen Substrats Chromozym® TH (Tosyl-Gly-Pro-Arg-4-pNA, Kat.-Nr. 838268, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) bei 25°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1-10 µl Trypsin-haltiger Probe (0,4-4 U/ml, gelöst in 1 mmol/l HCl) gestartet und die Absorptionsänderung/min ($\Delta A/min$) bei 405 nm ($\epsilon_{405} = 9,75$

[mmol⁻¹ x 1 x cm⁻¹]) bestimmt. 1 Chromozym® TH Unit Trypsin ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol pNitroanilin (pNA) pro min bei 25°C aus dem chromozymen Substrat freisetzt.

Bestimmung der Faktor Xa Aktivität

Die FXa Aktivitätsbestimmung wurde mit dem chromogenen Substrat Chromozym® X (0,1 mmol/l, N-Methoxycarbonyl-D-Nle-Gly-Arg-pNA, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Kat.-Nr. 789763) in einem Volumen von 1 ml bei 25°C in 50 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 5 mmol/l CaCl₂, 0,1% PEG 8000, pH 8,0, durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1-10 µl rFXa-haltiger Probe (0,4-4 U/ml) gestartet und die Absorptionsänderung/min (ΔA/min) bei 405 nm ($\epsilon_{405} = 9,75$ [mmol⁻¹ x 1 x cm⁻¹]) gemessen. 1 Unit (U) FXa Aktivität ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol pNA pro min bei 25°C aus dem chromozymen Substrat freisetzt. Die Aktivität und die kinetischen Konstanten wurden aus der linearen Anfangssteigung gemäß der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt.

Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1

Protease	spez. Aktivität [U/mg]	kcat [1/s]	Km [µM]	kcat/Km [1/µM/s]
Rinder Trypsin ¹⁾³⁾	230	112±2	14±1	8,0
Schweine Trypsin ²⁾³⁾	222	97±3	8,5±0,9	11,4
rTRYI-GPK ³⁾	209	95±1	13±1	7,3
rTRYI-VGR ³⁾	210	95±1	13±1	7,3
rTRYI-GPK-SS ³⁾	213	99±2	19±1	5,2
rEGF2-AP-CD ⁴⁾	206	---	---	---
rEGF2-APau-CD ⁴⁾	211	---	---	---

¹⁾, Rinder Trypsin (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland, Kat.-Nr. 109827)

²⁾, Schweine Trypsin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland, Kat.-Nr. T-7418)

³⁾, Substrat: Chromozym® TH

⁴⁾, Substrat: Chromozym® X

c) Ermittlung der Trypsin Temperaturstabilität (Tm-Werte)

Die Temperaturstabilität der unterschiedlichen Trypsine wurde durch "differential scanning calorimetry" (DSC) ermittelt. Dazu wurde der Denaturierungspunkt (Tm) der Trypsine in einem definierten Lösungsmittel (1 mmol/l HCl), bei definierter Proteinkonzentration (40 mg/ml) und definierter Aufheizrate (1°C/min) bestimmt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2

Enzym	Tm [°C] (DSC)
Rinder Trypsin ¹⁾	64
Schweine Trypsin ²⁾	74
rTRYI-GPK	70
rTRYI-VGR	70
rTRYI-GPK-SS	64

¹⁾, Rinder Trypsin (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland, Kat.-Nr. 109827)

²⁾, Schweine Trypsin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland, Kat.-Nr. T-7418)

d) Bestimmung der Trypsin Restaktivität nach Temperaturbelastung

Zur Ermittlung der Temperaturstabilität wurden die Trypsine in einer Konzentration von 3,5 U/ml in 50 mol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl und 5 mmol/l CaCl₂, pH 8,0, bei 45°C inkubiert und nach 3, 6 und 29 Std. die Trypsin Restaktivität mit Chromozym® TH als Substrat, wie in Beispiel 10 b beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.

- 26 -

Tabelle 3

Enzym	Trypsin Restaktivität [%]		
	3 [Std.]	6 [Std.]	29 [Std.]
Rinder Trypsin ¹⁾	80	69	22
Schweine Trypsin ²⁾	96	98	71
rTRYI-GPK	96	97	96
rTRYI-VGR	97	96	97
rTRYI-GPK-SS	90	87	84

¹⁾, Rinder Trypsin (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland, Kat.-Nr. 109827)

²⁾, Schweine Trypsin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland, Kat.-Nr. T-7418)

Referenzliste

- Bharadwaj, D. et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 6537-6542
- Blow, D.M.: Acc. Chem. Res. 9 (1976) 145-152
- Brewer, S.J. und Sassenfeld, H.M., Trends in Biotechnology 3 (1985) 119-122
- Brinkmann, U. et al., Gene 85 (1989) 109-114
- Bristow, A.F.: The current status of therapeutic peptides and proteins. In: Hider, R.C.; Barlow, D., eds., Polypeptides and Protein Drugs. Production, Characterization and Formulation. London, Ellis Horwood, pp. 54-69 (1991)
- Carter, P.: Site-specific proteolysis of fusion proteins. In: Ladisch, M.R.; Willson, R.C.; Painton, C.C.; Builder, S.E. eds., Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes. ACS Symposium Series No. 427, American Chemical Society, pp. 181-193 (1990)
- Creighton, T.E., Progress Biophys. Molec. Biol. 33 (1978) 231 - 291
- Davie, E.W. et al., Biochem. 30 (1991) 10363-10370
- DiBella, E.E. et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 163-169
- Emi, M. et al., Gene 41 (1986) 305-310
- EP-A 0 597 681
- EP-A 0 089 626

- EP-A 0 189 998
EP-A 0 367 302
EP-B 0 114 506
EP-B 0 219 874
EP-B 0 241 022
EP-B 0 393 725
EP-A 0 408 764
EP-A 0 467 839
EP-B 0 513 073
- Flaschel, E. und Friehs, K., Biotech. Adv. 11 (1993) 31-78
Forsberg, G. et al., J. Prot. Chem. 10 (1991) 517-526
Forsberg, G. et al., J. Prot. Chem. 11 (1992) 201-211
Furie, B. und Furie, B.C., Cell 53 (1988) 505- 518
Graf, E. et al. (Biochem. 26 (1987) 2616-2623
Graf, E. et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 4961-4965
Grodberg, J. und Dunn, J.J., J. Bacteriol. 170 (1988) 1245-1253
Guy, O. et al., Biochem. 17 (1978) 1669-1675
Hedstrom, L. et al., Science 255 (1992) 1249-1253
Higaki, J.N. et al., Biochem. 28 (1989) 9256-9263
Jonasson, P. et al., Eur. J. Biochem. 236 (1996) 656-661
Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685
Mann, K. G. et al., Blood 76 (1990) 1-16
Marston, F.A.O., Biochem. J. 240 (1986) 1-12
Medved, L.V. et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 13652-13659
Meyer-Ingold, W., TIBTECH 11(1993) 387-392
Miller, C.G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 2718-2722
Mitraki, A. und King, J., Bio/Technology 7 (1989) 690 - 697
Mullis, K.B. und Faloona, F.A., Methods Enzymol. 155 (1987) 355-350
Nilsson, B. et al., Methods Enzymol. 185 (1991) 3-16
Parks, T.D. et al., Anal. Biochem. 216 (1994) 413-417
Perona, J.J. und Craik, C.S., Protein Science 4 (1995) 337-360
Pohlner, J. et al., Nature 325 (1987) 458-462
Polgar, L.: Structure and function of serine proteases. In: Mechanisms of protein action. Boca Raton, Florida, CRC Press, chapter 3 (1989)
Rote Liste, 1997

- 28 -

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, (1989)
- Sassenfeld, H.M., Trends Biotechnol. 8 (1990) 88-93
- Schein, C.H., Bio/Technology 8 (1990) 308 - 317
- Stryer, L., Biochemistry, Freeman and Company, W.H., San Francisco, 1975, Seiten 24 - 30
- Takeya, H. et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 14109-14117
- The United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP23-NF18, 1995
- US Patent 4,634,671
- US Patent 5,432,062
- Vasquez, J.R. et al. (J. Cell. Biochem. 39 (1989) 265-276
- Walsh, K.A. und Wilcox, P.E., Methods Enzymol. XIX (1970) 31-41
- Wang, E.A., TIBTECH 11 (1993) 379-383
- Willett, W.S. et al., Biochem. 34 (1995) 2172-2180
- WO 93/09144
- WO 96/17942
- WO 96/20724
- WO 97/03027
- WO 97/11186
- WO 97/18314
- WO 97/00316
- Yee, L. und Blanch, H.W., Biotechnol. Bioeng. 41 (1993) 781-790

Patentansprüche

1. Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer Protease, gekennzeichnet durch:
 - a) Transformation einer Wirtszelle mit einer rekombinanten Nukleinsäure, welche für eine zymogene Vorstufe einer Protease codiert, die eine natürlicherweise nicht vorkommende autokatalytische Spaltstelle enthält, wobei diese Spaltstelle von der aktiven Form der genannten Protease erkannt und dabei die Vorstufe zur aktiven Protease gespalten wird,
 - b) Kultivierung der Wirtszelle in der Weise, daß die zymogene Vorstufe der Protease in Form von inclusion bodies in der Wirtszelle entsteht,
 - c) Isolierung der inclusion bodies und Naturierung unter Bedingungen, bei denen der Proteaseteil der zymogenen Vorstufe in seiner natürlichen Konformation entsteht und
 - d) autokatalytische Spaltung der naturierten, zymogenen Vorstufe in die aktive Protease.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Protease eine Serinprotease ist.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Protease Trypsin, Thrombin, Faktor Xa oder Lysyl-Endopeptidase ist.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle eine prokaryontische Zelle ist.
5. Autokatalytisch spaltbare zymogene Vorstufe einer Protease, wobei die zymogene Vorstufe eine natürlicherweise nicht vorkommende autokatalytische Spaltstelle enthält, welche eine Spaltstelle der natürlich vorkommenden Form ersetzt.
6. Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Trypsin, dadurch gekennzeichnet, daß eine prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle mit einer Nukleinsäure transfor-

miert wird, welche für ein Trypsin der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:12 codiert, die Nukleinsäure exprimiert und das dabei entstandene Protein isoliert wird.

7. Präparation eines Trypsins frei von Säugerzellproteinen und/oder frei von Proteinen, die natürlicherweise als Verunreinigung von Trypsin bei Isolierung aus natürlichen Quellen gefunden werden.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis der proteolytischen Aktivität der zymogenen Vorstufe und der aktiven Protease 1 : 5 oder weniger beträgt.
9. Präparation einer autokatalytisch spaltbaren zymogenen Vorstufe einer Protease, welche in ihrer natürlich vorkommenden Form keine autokatalytische Spaltstelle enthält, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein inaktiv und denaturiert in der Form von inclusion bodies in einer prokaryontischen Zelle vorliegt.
10. Präparation von inclusion bodies, welche im wesentlichen eine autokatalytisch spaltbare zymogene Vorstufe einer Protease enthalten, wobei die genannte Protease in ihrer natürlich vorkommenden Form keine autokatalytische Spaltstelle enthält.
11. Wäßrige Lösung einer autokatalytisch spaltbaren inaktiven zymogenen Form einer Protease, welche in ihrer natürlich vorkommenden Form keine autokatalytische Spaltstelle enthält, und eines Denaturierungsmittels in einer Konzentration, die geeignet ist, die genannte denaturierte unlösliche zymogene Form der Protease aufzulösen.

Fig. 1

NcoI

ATGgATGATGATGACAAGATCGTTGGGGCTACAACTGTGAGGAGAATTCTGTCCCCTAC 60
MetAspAspAspLysIleValGlyGlyTyrAsnCysGluGluAsnSerValProTyr 20

MetGlyProLys... (rTRYI-GPK)

MetValGlyArg... (rTRYI-VGR)

CAGGTGTCCTGAATTCTGGCTACCACTCTGTGGTGGCTCCCTCATCAACGAAACAGTGG 120
 GlnValSerLeuAsnSerGlyTyrHisPheCysGlySerLeuIleAsnGluGlnTrp 40

GTGGTATCAGCAGGCCACTGCTACAAGTCCCGATCCAGGTGAGACTGGGAGAGCACAAAC 180
 ValValSerAlaGlyHisCysTyrLysSerArgIleGlnValArgLeuGlyGluHisAsn 60

ATCGAAGTCCTGGAGGGGAATGAGCAGTTCATCAATGCAGCCAAGATCATCCGCCACCCC 240
 IleGluValLeuGluGlyAsnGluGlnPheIleAsnAlaAlaLysIleIleArgHisPro 80

BsgI

CAATACGACAGGAAGACTCTGAACAATGACATCATGTTAACATCAAGCTCTCCTCACGTGCA 300
 GlnTyrAspArgLysThrLeuAsnAsnAspIleMetLeuIleLysLeuSerSerArgAla 100

GTAATCAACGCCCGGTCCACCATCTCTGCCAACCGCCCCCTCCAGCCACTGGCACCG 360
 ValIleAsnAlaArgValSerThrIleSerLeuProThrAlaProProAlaThrGlyThr 120

P132C | P133A

AAGTGCCTCATCTCTGGCTGGGCAACACTGCGAGCTCTGGCGCCACTACCCAGACGAG 420
 LysCysLeuIleSerGlyTrpGlyAsnThrAlaSerSerGlyAlaAspTyrProAspGlu 140

CTGCAGTGCCTGGATGCTCCTGTGCTGAGCCAGGCTAACGTGTGAAGCCTCCTACCCTGG 480
 LeuGlnCysLeuAspAlaProValLeuSerGlnAlaLysCysGluAlaSerTyrProGly 160

AAGATTACCAGAACATGTTCTGTGTGGCTTCTTGAGGGAGGCAAGGATTCATGTCAG 540
 LysIleThrSerAsnMetPheCysValGlyPheLeuGluGlyLysAspSerCysGln 180

GGTGATTCTGGTGGCCCTGGTCTGCAATGGACAGCTCAAGGAGTTGTCTCCTGGGGT 600
 GlyAspSerGlyGlyProValValCysAsnGlyGlnLeuGlnGlyValValSerTrpGly 200

GATGGCTGTGCCAGAAGAACAGCCTGGAGTCTACACCAAGGTCTACAACGTGAAA 660
 AspGlyCysAlaGlnLysAsnLysProGlyValTyrThrLysValTyrAsnTyrValLys 220

Y233C

HindIII

TGGATTAAGAACACCATAGCTGCCAATAGCTAATGAAGCTT 701
 TrpIleLysAsnThrIleAlaAlaAsnSer***** 230

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
- (B) STRASSE: Sandhofer Str. 116
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-68305
- (G) TELEFON: 08856/60-3446
- (H) TELEFAX: 08856/60-3451

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Autokatalytisch aktivierbare zymogene Vorstufen von Proteasen und deren Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer "N1""

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AAAAAACCAT GGATGATGAT GACAAGATCG TTGGG

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer "N2""

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

AAAAAAAAGC TTCATTAGCT ATTGGCAGCT ATGGTGTTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 58 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer "N3""

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AAAAAAACCA TGGGTCCGAA AATCGTTGGT GGTTACAATT GTGAGGGAGAA TTCTGTCC

58

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 58 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer "N4""

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

AAAAAAACCA TGGTTGGTCG TATCGTTGGT GGTTACAATT GTGAGGGAGAA TTCTGTCC

58

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 77 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer "N5""

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

AAAAAAAGTGC AGTAATCAAC GCCCGCGTGT CCACCATCTC TCTGCCACC GCCTGCGCTG	60
CCACTGGTAC GAAGTGC	77

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 80 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer "N6""

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AAAAAAAAGC TTCATTAGCT ATTGGCAGCT ATGGTGTTCT TAATCCATT CACATAGTTG	60
CAGACCTTGG TGTAGACTCC	80

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer "N7""

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

AAAAAAAAGGC CTGCATTCCC ACAGGGCCC	29
----------------------------------	----

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer "N8""

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

AAAAAAACCAC GCTCTGGCTG CGTCTGGTTG AAGTCAAG

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 60 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer "N9""

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AAAAAAACCAG AGCGTGGCGA CAACATCGAC GGTAGGATCG TGGGAGGCCA GGAATGCAAG 60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer "N10""

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

AAAAAAAAAGC TTCATTACTT GGCCTTGGGC AAGCCCCTGG T

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 52 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 701 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

ATGGATGATG	ATGACAAGAT	CGTTGGGGC	TACAACTGTG	AGGAGAATTTC	TGTCCCCTAC	60
CAGGTGTCCC	TGAATTCTGG	CTACCACITTC	TGTGGTGGCT	CCCTCATCAA	CGAACAGTGG	120
GTGGTATCAG	CAGGCCACTG	CTACAAGTCC	CGCATCCAGG	TGAGACTGGG	AGAGCACAAAC	180
ATCGAAGTCC	TGGAGGGAA	TGAGCAGTTC	ATCAATGCAG	CCAAGATCAT	CCGCCACCCC	240
CAATACGACA	GGAAGACTCT	GAACAATGAC	ATCATGTTAA	TCAAGCTCTC	CTCACGTGCA	300
GTAATCAACG	CCCGCGTGTC	CACCATCTCT	CTGCCACCG	CCCCTCCAGC	CACTGGCACG	360
AAGTGCCTCA	TCTCTGGCTG	GGGCAACACT	GCGAGCTCTG	GCGCCGACTA	CCCAGACGAG	420
CTGCAGTGCC	TGGATGCTCC	TGTGCTGAGC	CAGGCTAAGT	GTGAAGCCTC	CTACCCTGGA	480
AAGATTACCA	GCAACATGTT	CTGTGTGGC	TTCCTTGAGG	GAGGCAAGGA	TTCATGTCAG	540
GGTGATTCTG	GTGGCCCTGT	GGTCTGCAAT	GGACAGCTCC	AAGGAGTTGT	CTCCTGGGT	600
GATGGCTGTG	CCCAGAAGAA	CAAGCCTGGA	GTCTACACCA	AGGTCTACAA	CTACGTGAAA	660
TGGATTAAGA	ACACCATAGC	TGCCAATAGC	TAATGAAGCT	T		701

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/EP 98/05094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 6	C12N15/57	C12N9/50	C12N9/64	C12N9/76	C12P21/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 597 681 A (LILLY CO ELI) 18 May 1994 cited in the application see abstract see page 1 see page 7, line 46 - line 55 --- WO 97 00316 A (NOVONORDISK AS ;WOELDIKE HELLE FABRICIUS (DK); KJELDSEN THOMAS BOE) 3 January 1997 cited in the application see abstract; example 4 see page 1, paragraph 5 see page 2, paragraph 5 - page 3, paragraph 4 see page 6, paragraph 4 - paragraph 5 see page 7, paragraph 6 - page 8, paragraph 2 --- -/-/	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 November 1998

Date of mailing of the international search report

08.02.99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/EP 98/05094

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 319 944 A (ZYMOGENETICS INC) 14 June 1989 see abstract see page 2, paragraph 3 - page 3, paragraph 3 see page 4, paragraph 3 see claims 1-5,12 ---	
A	EP 0 495 398 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 22 July 1992 see abstract; examples 3,4 see page 2 see page 3, line 24 - line 31 ---	
A	WO 96 17943 A (NOVONORDISK AS ;FABRICIUS WOELDIKE HELLE (DK); HASTRUP SVEN (DK)) 13 June 1996 cited in the application see abstract see page 3, paragraph 5 see page 4, paragraph 3 see page 9, paragraph 2; example 2 ---	
A	BRODRICK J.W. ET AL.: "Human cationic trypsinogen" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 253, no. 8, 25 April 1978, pages 2732-2736, XP002055238 see abstract; figure 2 see page 2732, paragraph 3 see page 2733, paragraph 10 - page 2734, paragraph 2 see page 2735, paragraph 2 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05094

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-6 ,8-11

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Appl. No.

PCT/EP 98/05094

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0597681	A 18-05-1994	CA 2102673 A JP 6225772 A MX 9307007 A		14-05-1994 16-08-1994 31-01-1995
WO 9700316	A 03-01-1997	AU 6121796 A EP 0833898 A		15-01-1997 08-04-1998
EP 0319944	A 14-06-1989	AT 111956 T AU 651680 B AU 1492692 A AU 2670688 A DE 3851613 D DE 3851613 T DK 684388 A ES 2059478 T FI 885679 A JP 2002338 A JP 2769170 B US 5516650 A US 5648254 A		15-10-1994 28-07-1994 29-10-1992 08-06-1989 27-10-1994 19-01-1995 11-08-1989 16-11-1994 09-06-1989 08-01-1990 25-06-1998 14-05-1996 15-07-1997
EP 0495398	A 22-07-1992	DE 4140699 A AT 174627 T AU 636261 B AU 9011691 A CA 2058872 A DE 59209590 D FI 920117 A HU 215188 B JP 2509410 B JP 5168478 A		16-07-1992 15-01-1999 22-04-1993 10-09-1992 12-07-1992 28-01-1999 12-07-1992 28-10-1998 19-06-1996 02-07-1993
WO 9617943	A 13-06-1996	AU 4114596 A EP 0797671 A JP 10511845 T		26-06-1996 01-10-1997 17-11-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PC1/EP 98/05094

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/57 C12N9/50 C12N9/64 C12N9/76 C12P21/06

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräzisierung (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräzisierung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 597 681 A (LILLY CO ELI) 18. Mai 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung siehe Seite 1 siehe Seite 7, Zeile 46 - Zeile 55 ---	
A	WO 97 00316 A (NOVONORDISK AS ;WOELDIKE HELLE FABRICIUS (DK); KJELDSEN THOMAS BOE) 3. Januar 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung; Beispiel 4 siehe Seite 1, Absatz 5 siehe Seite 2, Absatz 5 - Seite 3, Absatz 4 siehe Seite 6, Absatz 4 - Absatz 5 siehe Seite 7, Absatz 6 - Seite 8, Absatz 2 --- -/-	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24. November 1998

08.02.99

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Oderwald, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/05094

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 319 944 A (ZYMOGENETICS INC) 14. Juni 1989 siehe Zusammenfassung siehe Seite 2, Absatz 3 - Seite 3, Absatz 3 siehe Seite 4, Absatz 3 siehe Ansprüche 1-5,12 --- EP 0 495 398 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 22. Juli 1992 siehe Zusammenfassung; Beispiele 3,4 siehe Seite 2 siehe Seite 3, Zeile 24 - Zeile 31 --- WO 96 17943 A (NOVONORDISK AS ;FABRICIUS WOEILDIKE HELLE (DK); HASTRUP SVEN (DK)) 13. Juni 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung siehe Seite 3, Absatz 5 siehe Seite 4, Absatz 3 siehe Seite 9, Absatz 2; Beispiel 2 --- BRODRICK J.W. ET AL.: "Human cationic trypsinogen" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 253, Nr. 8, 25. April 1978, Seiten 2732-2736, XP002055238 siehe Zusammenfassung; Abbildung 2 siehe Seite 2732, Absatz 3 siehe Seite 2733, Absatz 10 - Seite 2734, Absatz 2 siehe Seite 2735, Absatz 2 -----	
1		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int...duales Aktenzeichen
PCT/EP 98/05094

Feld I Bemerkungen zu den Anforderungen, die sich als nicht rechnergierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 11)

Gemäß Artikel 17(2)(a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprache Nr.
wenn sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

 2. Ansprache Nr.
wenn sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorderschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

 3. Ansprache Nr.
wenn es sich dabei um sogenannte Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld II: Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Anmeldungsbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbenachricht auf alle rechnerierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
 2. Da für alle rechnerierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbenachricht nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
 3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbenachricht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
 4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbenachricht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen er-

fazt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerstrebens

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05094

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0597681 A	18-05-1994	CA	2102673 A	14-05-1994
		JP	6225772 A	16-08-1994
		MX	9307007 A	31-01-1995
WO 9700316 A	03-01-1997	AU	6121796 A	15-01-1997
		EP	0833898 A	08-04-1998
EP 0319944 A	14-06-1989	AT	111956 T	15-10-1994
		AU	651680 B	28-07-1994
		AU	1492692 A	29-10-1992
		AU	2670688 A	08-06-1989
		DE	3851613 D	27-10-1994
		DE	3851613 T	19-01-1995
		DK	684388 A	11-08-1989
		ES	2059478 T	16-11-1994
		FI	885679 A	09-06-1989
		JP	2002338 A	08-01-1990
		JP	2769170 B	25-06-1998
		US	5516650 A	14-05-1996
		US	5648254 A	15-07-1997
EP 0495398 A	22-07-1992	DE	4140699 A	16-07-1992
		AT	174627 T	15-01-1999
		AU	636261 B	22-04-1993
		AU	9011691 A	10-09-1992
		CA	2058872 A	12-07-1992
		DE	59209590 D	28-01-1999
		FI	920117 A	12-07-1992
		HU	215188 B	28-10-1998
		JP	2509410 B	19-06-1996
		JP	5168478 A	02-07-1993
WO 9617943 A	13-06-1996	AU	4114596 A	26-06-1996
		EP	0797671 A	01-10-1997
		JP	10511845 T	17-11-1998