



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäÙ § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

210 303

Int.Cl.³

3(51)

C 12 N 15/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2506 114
(31) 374,860;398,003
483,052

(22) 04.05.83
(32) 05.05.82;14.07.82
07.04.83

(44) 06.06.84
(33) US;US
US

(71) siehe (73)
(72) GOEDDEL, DAVID V.; KOHR, WILLIAM J.; PENNICA, DIANE; VEHAR, GORDON A.; US;
(73) GENENTECH, INC., SOUTH SAN FRANCISCO, US

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON HUMANGEWEBE-PLASMINOGEN-AKTIVATOR

(57) Humangewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA) wird in brauchbaren Mengen unter Verwendung von Rekombinationstechniken gebildet. ErfindungsgemäÙ ist die Bildung von t-PA möglich, der frei von Verunreinigungen ist, mit denen er in seiner nativen zellulären Umgebung assoziiert ist. Ferner werden Verfahren, Expressionsvehikel und verschiedene Wirtszellen, die sich zur Herstellung von t-PA eignen, beschrieben.

Verfahren zur Herstellung von Humangewebe-Plasminogen-Aktivator

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Herstellung von Human-Plasminogen-Aktivator, der dem in Humanserum und/oder -geweben gefundenen Aktivator entspricht, sowie neue Formen und Zusammensetzungen davon. Insbesondere betrifft die Erfindung Mittel und Verfahren, mit dem dieser Aktivator in homogener Form in therapeutisch erheblichen Mengen hergestellt werden kann.

Die Erfindung beruht zum Teil auf der Ermittlung der DNA-Sequenz und abgeleiteten Aminosäuresequenz von Human-Plasminogen-Aktivator. Diese Ermittlung ermöglichte die Bildung von Human-Plasminogen-Aktivator unter Anwendung der rekombinanten DNA-Technik, die wiederum die Bildung von Material in ausreichender Qualität und Menge möglich machte, um Tierversuche und klinische Untersuchungen als Voraussetzung für eine Markteinführung durchzuführen, wobei keine Beschränkungen vorlagen, mit denen bisherige Isolationsverfahren unter Produktion und Extraktion vorhandener Zellkulturen notwendigerweise behaftet sind. Gegenstand der Erfindung sind sämtliche vorstehend angedeuteten Ausführungsformen.

Bekannte technische Lösungen

Druckschriftliche Veröffentlichungen und andere Materialien, die den technischen Hintergrund der Erfindung erläutern und in speziellen Fällen auch zusätzliche Einzelheiten bezüglich

-1a-

14.11.1983

AP C 12 N/250 611/4

62 422/12

der praktischen Durchführung der Erfindung liefern, sind in der nachstehenden Beschreibung mit Nummern gekennzeichnet. Diese Nummern beziehen sich auf die Bibliographie am Schluß der Beschreibung.

1 A. Humangewebe-Plasminogen-Aktivator

Das fibrinolytische System befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem Koagulationssystem, wodurch ein intaktes, offenes Gefäßbett aufrechterhalten wird. Das Koagulationssystem lagert Fibrin als eine Matrix ab, die zur Wiederherstellung eines hämostatischen Zustands dient. Das fibrinolytische System entfernt das Fibrinnetzwerk, nachdem der hämostatische Zustand erreicht ist. Der fibrinolytische Prozess wird durch das proteolytische Enzym Plasmin, das aus dem Plasmaprotein-Vorläuferprodukt Plasminogen gebildet wird, hervorgerufen. Plasminogen wird durch Aktivierung mittels eines Aktivators in Plasmin umgewandelt.

Gegenwärtig sind im Handel zwei Aktivatoren erhältlich, nämlich Streptokinase und Urokinase. Beide sind zur Behandlung von akuten Gefässerkrankungen, wie Myokardinfarkt, Schlaganfall, Lungenembolie, tiefe Venenthrombose, peripherer Arterienverschluss und andere venöse Thrombosen, indiziert. Insgesamt stellen diese Krankheiten schwerwiegende Gesundheitsrisiken dar.

Die diesen Krankheiten zugrunde liegende ätiologische Basis besteht in einem partiellen oder - in schweren Fällen - totalen Verschluss eines Blutgefäßes durch ein Gerinnsel, d.h. Thrombus oder Thromboembolus. Bei der herkömmlichen Antikoagulationstherapie, zum Beispiel mit Heparin und Cumarin, wird nichts getan, um die Auflösung von Thrombi oder Thromboemboli direkt zu fördern. Die vorstehend erwähnten thrombolytischen Mittel Streptokinase und Urokinase werden in der Praxis eingesetzt, unterliegen aber beide starken Beschränkungen. Keines der beiden Mittel besitzt eine hohe Affinität für Fibrin, so dass sie zirkulierendes und fibrin gebundenes Plasminogen relativ wahllos aktivieren. Das im zirkulierenden Blut gebildete Plasmin wird relativ rasch neutralisiert und ist für die Thrombolyse verloren. Restliches Plasmin baut verschiedene Gerinnungsfaktorproteine ab, zum Beispiel Fibrinogen, Faktor V und Faktor VIII, was ein hämorrhagisches Potential verursacht. Ferner ist Streptokinase

1 stark antigen, und Patienten mit hohen Antikörpertitern reagieren ungenügend auf die Behandlung und können nicht unter Dauerbehandlung bleiben. Die Urokinasetherapie ist teuer, was auf die Isolierung aus menschlichem Urin oder Gewebekulturen zurückzuführen ist, so dass sie sich in der klinischen Praxis nicht allgemein durchgesetzt hat. Urokinase ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen; vgl. zum Beispiel Literaturstellen 1-6.

10 Sogenannte Plasminogen-Aktivatoren wurden aus verschiedenen Humangeweben, zum Beispiel Uterusgewebe, Blut, Serum (vgl. allgemein Literaturstellen 7-11) und Zellkulturen isoliert (94). Zusammensetzungen davon wurden ebenfalls beschrieben (vgl. Literaturstellen 12, 13 und 14-18). Die aus diesen Quellen abgeleiteten Plasminogen-Aktivatoren wurden in zwei Hauptgruppen eingeteilt: Plasminogen-Aktivatoren vom Urokinasetyp (u-PA) und Plasminogen-Aktivatoren vom Gewebetyp (t-PA), basierend auf Unterschieden in den immunologischen Eigenschaften. (Die Abkürzungen t-PA und u-PA wurden beim XXVIII Meeting of the International Committee on Thrombosis and Hemostasis, Bergamo, Italien, 27. Juli 1982, vorgeschlagen.)

Kürzlich wurde eine Humanmelanomlinie identifiziert, die t-PA sekretiert. Die Charakterisierung dieses Melanom-Plasminogen-Aktivators ergab, dass er sich sowohl immunologisch als auch im Hinblick auf die Aminosäurezusammensetzung von aus normalem Humangewebe isoliertem Plasminogen-Aktivator nicht unterscheiden lässt (Literaturstellen 19, 88).

30

Das Produkt wurde in relativ reiner Form isoliert und charakterisiert. Es wurde festgestellt, dass es sich um ein hochaktives, fibrinolytisches Mittel handelt (20).

35 Einige Untersuchungen (vgl. zum Beispiel Literaturstellen 95-98), die aus Melanomzelllinien gereinigte t-PA verwendeten, ergaben für dieses Produkt im Vergleich zu Plasminogen-Aktivatoren vom Urokinasetyp eine höhere Affinität für Fibrin.

1 Eingehendere Untersuchungen von human-t-PA als potentiell-
thrombolytisches Mittel wurden jedoch durch dessen äusserst
niedrige Konzentration in Blut, Gewebeextrakten, Gefässper-
fusionsprodukten und Zellkulturen behindert.

5

Man nahm an, dass die Anwendung der rekombinanten DNA-Tech-
nik einen sehr wirksamen Weg zur Bereitstellung der erfor-
derlichen, grossen Mengen an qualitativ hochwertigem Plas-
minogen-Aktivator vom Humangewebetyp (vorher als Human-Plas-
10 minogen-Aktivator bezeichnet), der im wesentlichen frei von
anderem Humanprotein ist, darstellt. Diese Materialien soll-
ten vermutlich biologisch aktiv sein, was ihre klinische
Verwendung bei der Behandlung verschiedener kardiovaskulärer
Zustände oder Krankheiten ermöglichen würde.

15

Zufriedenstellende Mengen an Human-t-PA werden von Zellkul-
turen gebildet, wobei jedoch weitere Verfeinerungen unter
Anwendung einer sekundären, kodierenden Sequenz dazu dienen,
die Produktionsmengen noch weiter zu erhöhen. Die sekundäre,
20 kodierende Sequenz umfasst Dihydrofolat-reduktase (DHFR), die
durch einen extern gesteuerten Parameter, wie Methotrexat,
beeinflusst wird, wodurch die Steuerung der Expression durch
Steuerung der Methotrexat (MTX)-Konzentration ermöglicht
wird.

25

B. Rekombinante DNA-Technik

Die rekombinante DNA-Technik hat in letzter Zeit eine er-
hebliche Verfeinerung erfahren. Die Molekularbiologen sind
30 in der Lage, verschiedene DNA-Sequenzen relativ leicht zu
rekombinieren und neue DNA-Einheiten zu schaffen, die zur
Bildung von erheblichen Mengen an exogenen Proteinprodukten
in transformierten Mikroben und Zellkulturen fähig sind. Es
stehen allgemeine Mittel und Verfahren zur in vitro-Liga-
35 tion von verschiedenen DNA-Fragmenten mit stumpfen oder ko-
häsiven Enden zur Verfügung, die zur Bildung von leistungs-
fähigen Expressionsvehikeln führen, mit denen spezielle
Organismen transformiert werden können, so dass deren Syn-

1 theseleistung auf das gewünschte, exogene Produkt gerichtet
 wird. Bei einzelnen Produkten ist dieses Verfahren jedoch
 recht umständlich. Die Kenntnisse sind noch nicht so weit
 fortgeschritten, dass regelmässige Vorhersagen über die Er-
 5 folgsaussichten gemacht werden können. Versucht man Erfolge
 ohne entsprechende, experimentelle Basis vorherzusagen, so
 läuft man Gefahr zu scheitern.

Die DNA-Rekombination der wesentlichen Elemente, d.h. ein
 10 Startpunkt der Replikation, eine oder mehrere phänotypi-
 sche Selektionscharakteristiken, ein Expressionspromotor,
 heterologes Geninsert und restlicher Vektor, findet im all-
 gemeinen ausserhalb der Wirtszelle statt. Das erhaltene, re-
 kombinante, replizierbare Expressionsvehikel oder Plasmid
 15 werden in die Zellen durch Transformation eingeführt und
 grosse Mengen des rekombinanten Vehikels durch Wachstum des
 Transformanten erhalten. Wird das Gen in Bezug auf die Teile,
 die die Transkription und Translation der einkodierten DNA-
 Botschaft steuern, in geeigneter Weise mit Inserts versehen,
 20 so eignet sich das erhaltene Expressionsvehikel zur tatsäch-
 lichen Bildung der Polypeptidsequenz, für die das eingesetzte Gen
 kodiert; ein Vorgang der als Expression bezeichnet wird. Das
 gebildete Produkt kann gegebenenfalls durch Lysis der Wirts-
 zelle in mikrobiellen Systemen und Gewinnung des Produkts
 25 durch entsprechende Reinigung von anderen Proteinen erhalten
 werden.

In der Praxis kann die Verwendung der rekombinanten DNA-
 Technik zur Expression von vollkommen heterologen Polypep-
 30 tiden - sogenannte direkte Expression - oder zur Expression
 eines heterologen Polypeptids führen, das mit einem Teil der
 Aminosäuresequenz eines homologen Polypeptids verschmolzen
 ist. In den letztgenannten Fällen wird das gewünschte, bio-
 aktive Produkt gelegentlich innerhalb des verschmolzenen,
 35 homolog/heterologen Polypeptids biologisch inaktiv, bis es in
 einer extrazellulären Umgebung gespalten wird; vgl. (21) und
 (22).

In ähnlicher Weise ist die Technik von Zell- oder Gewebekulturen für genetische und zellphysiologische Untersuchungen gut eingeführt. Mittel und Methoden zur Erhaltung von permanenten Zelllinien, die durch sukzessive Serienübertragungen von isolierten, normalen Zellen hergestellt werden, stehen zur Verfügung. Für Forschungszwecke werden derartige Zelllinien auf einem festen Träger in einem flüssigen Medium gehalten oder in Suspension mit einem Gehalt an erhaltenden Nährstoffen gezüchtet. Eine Vergrößerung des Herstellungsmaßstabs zur Herstellung von großen Präparatemengen scheint nur eine Frage der mechanischen Möglichkeiten zu sein. Zur Vertiefung wird in diesem Zusammenhang auf die Literaturstellen (23) und (24) verwiesen.

Ebenso stellt die Proteinbiochemie ein wertvolles, ja notwendiges Hilfsmittel in der Biotechnologie dar. Zellen, die das gewünschte Protein bilden, bilden darüber hinaus noch Hunderte von anderen Proteinen, endogenen Produkten des Zellstoffwechsels. Diese verunreinigenden Proteine sowie andere Verbindungen können, wenn sie nicht vom gewünschten Protein abgetrennt werden, bei Verabreichung an Tiere oder Menschen im Verlauf einer therapeutischen Behandlung mit dem gewünschten Protein toxisch wirken. Hier kommen die Methoden der Proteinbiochemie zum Tragen, die die Bereitstellung von Trennungsverfahren ermöglichen, die für das spezielle, in Betracht kommende System geeignet sind und zur Bildung eines für den beabsichtigten Verwendungszweck sicheren, homogenen Produkts führen. Die Proteinbiochemie ermöglicht auch eine Identifizierung und Charakterisierung dieses Produkts und stellt sicher, daß die gebildeten Zellen das Produkt ohne Veränderungen oder

Mutationen gebildet haben. Dieser Zweig der Wissenschaft befaßt sich auch mit der Ausarbeitung von Bioassays, Stabilitätsuntersuchungen und anderen Verfahren, die durchgeführt werden müssen, bevor erfolgreiche, klinische Untersuchungen oder eine Markteinführung möglich sind.

Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung, die rekombinante DNA-Technik zur Herstellung von Humangewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA) miteinzubeziehen, vorzugsweise in direkter Form und in Mengen, die ausreichen, Tierversuche und klinische Untersuchungen, die eine Voraussetzung für eine Marktzulassung sind, zu initiieren und durchzuführen. Das gebildete human t-PA eignet sich für alle Formen der prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung des Menschen bei verschiedenen kardiovaskulären Zuständen oder Krankheiten. Die Verwendung von t-PA und von geeigneten pharmazeutischen Zusammensetzungen davon stellen bei der Behandlung vaskulärer Störungen beim Menschen einen wichtigen Gesichtspunkt dar.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Humangewebe-Plasminogen-Aktivator bereitzustellen. Der durch genetische Manipulation von Mikroorganismen oder Zellkulturen gebildete Human-Plasminogen-Aktivator eröffnet die Möglichkeit, Humangewebe-Plasminogen-Aktivator effizienter als bisher herzustellen, wodurch die bisher schwer durchführbare, wirtschaftliche Verwertung ermöglicht wird. Ferner kann der erfindungsgemäß hergestellte Humangewebe-Plasminogen-Aktivator je

nach Art der Wirtszelle im Vergleich zu nativem Material in größerem oder geringerem Umfang assoziierte Glycosylierung enthalten. Auf jeden Fall ist das t-PA frei von Verunreinigungen, von denen es normalerweise in nicht-rekombinanter, zellulärer Umgebung begleitet ist.

Für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind ferner replizierbare DNA-Expressionsvehikel erforderlich, die Gensequenzen beherbergen, welche Humangewebe-Plasminogen-Aktivator in expressionsfähiger Form kodieren sowie Mikroorganismenstämme oder Zellkulturen, die mit den vorstehenden Expressionsvehikeln transformiert sind, sowie Mikroben- oder Zellkulturen von derart transformierten Stämmen oder Kulturen, die zur Bildung von Humangewebe-Plasminogen-Aktivator in der Lage sind.

A. Definitionen

Die Ausdrücke "Humangewebe-Plasminogen-Aktivator" oder "human t-PA" oder "t-PA" betreffen den durch Mikroorganismen- oder Zellkultursysteme gebildeten, exogenen (Gewebetyp) Plasminogen-Aktivator in bioaktiven Formen, der einen Proteaseteil umfaßt und den für Humangewebe nativen Gewebe-Plasminogen-Aktivatoren entspricht. Das erfindungsgemäß gebildete Humangewebe-Plasminogen-Aktivatorprotein wurde mittels eines bestimmten DNA-Gens und der abgeleiteten Aminosäuresequenz definiert. Es ist klar, daß natürliche allele Variationen vorkommen und von Individuum zu Individuum auftreten. Diese Variationen können sich durch eine oder mehrere unterschiedliche Aminosäuren in der Gesamtsequenz oder durch Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Inversionen oder Additionen von einer oder mehreren Aminosäuren dieser Sequenz

14.11.1983

AP C 12 N/250 611/4

62 422/12

bemerkbar machen. Ferner hängt die Stellung und das Ausmaß der Glycosylierung von der Natur der Wirtszellen-umgebung ab.

Bei der Anwendung rekombinanter DNA-Technik besteht die Möglichkeit zur Herstellung verschiedener Humangewebe-Plasminogen-Aktivatorderivate, die in verschiedener Weise durch einfache oder mehrfache Substitution, Deletion, Addition oder Ersatz von Aminosäuren modifiziert sind, beispielsweise durch gezielte Mutagenese der zugrunde liegenden DNA. Umfaßt wird auch die Herstellung von Derivaten, bei denen der wesentli-

1 che "kringle"-Bereich und der Serinprotease-Bereich, die im
 allgemeinen für den hier speziell beschriebenen Humangewebe-
 Plasminogen-Aktivator charakteristisch sind, erhalten sind,
 die aber ansonsten auf die vorstehend beschriebene Weise
 5 modifiziert sind. Sämtliche derartigen allelen Variationen
 und Modifikationen, die zu Derivaten von Humangewebe-Plas-
 minogen-Aktivator führen, fallen unter den Gegenstand der
 Erfindung, desgleichen auch andere verwandte, exogene (Ge-
 webetyp) Human-Plasminogen-Aktivatoren, die physikalisch
 10 und chemisch ähnlich sind, sofern die wesentliche charak-
 teristische Aktivität von Humangewebe-Plasminogen-Aktivator
 in ihrer Art unbeeinträchtigt bleibt.

Es wird Humangewebe-Plasminogen-Aktivator hergestellt, 1)
 15 der Methionin als erste Aminosäure (vorhanden auf Grund der
 ATG-Startsignalcodoninsertion zu Beginn des Strukturgens) oder
 2) der, wenn das Methionin intra- oder extrazellulär gespal-
 ten ist, seine normalerweise erste Aminosäure aufweist oder
 3) der zusammen entweder mit seinem Signalpolypeptid oder
 20 einem sich vom herkömmlichen Signalpolypeptid unterscheiden-
 den, konjugierten Protein vorliegt, wobei das Signalpolypep-
 tid oder das Konjugat spezifisch in einer intra-oder extra-
 zellulären Umgebung abspaltbar sind (vgl. Literaturstelle
 21), oder 4) der durch direkte Expression in reifer Form
 25 erhältlich ist, ohne dass die Notwendigkeit zur Abspaltung
 eines nicht dazugehörigen, überflüssigen Polypeptids be-
 steht. Das letztgenannte Produkt ist besonders wichtig,
 wenn ein bestimmter Wirt nicht oder nicht in ausreichendem
 Umfang zur Entfernung eines Signalpeptids in der Lage ist,
 30 sofern das Expressionsvehikel so aufgebaut ist, dass es den
 Gewebe-Plasminogen-Aktivator zusammen mit dessen Signalpep-
 tid exprimiert. Auf jeden Fall wird der auf diese Weise ge-
 bildete human t-PA in seinen verschiedenen Formen gewonnen
 und soweit gereinigt, dass er sich zur Behandlung verschie-
 35 dener vaskulärer Zustände oder Krankheiten eignet.

1 Ferner besitzt t-PA Formen, die sowohl das Einzelketten-
 (1-Kette)-Protein als auch das 2-Ketten-Protein umfassen.
 Das letzt genannte Produkt leitet sich proteolytisch von
 der 1-Ketten-Verbindung ab. Es wird angenommen, dass das 2-
 5 Ketten-Protein mit dem gebildeten Fibrin assoziiert ist und
 dass die proteolytische Umwandlung vom 1- in das 2-Ketten-
 Material am Ort der Umwandlung vom Plasminogen zu Plasmin
 erfolgt. Erfindungsgemäss kommt die Verabreichung des 1-
 Ketten-Proteins zur vorstehend beschriebenen in vivo-Umwand-
 10 lung oder die Verabreichung des 2-Ketten-Proteins, das sich
 ebenfalls als aktiv erwiesen hat, in Frage. Das 2-Ketten-
 Protein kann durch in vitro-proteolytische Umwandlung her-
 gestellt werden, nachdem das 1-Ketten-Material gebildet ist.
 Ein sogenannter "kringle"-Bereich findet sich oberhalb des
 15 Serinproteasebereichs. Es wird angenommen, dass dieser eine
 wichtige Funktion bei der Bindung des Gewebe-Plasminogen-
 Aktivators an eine Fibrinmatrix spielt. Darauf beruht die
 beobachtete, spezifische Aktivität des erfindungsgemässen
 Gewebe-Plasminogen-Aktivators gegen fühlbare vorhandene
 20 Thromben. Der erfindungsgemässe Gewebe-Plasminogen-Aktivator
 wird mit einem Gehalt an dem enzymatisch aktiven Bereich
 gebildet, der dem nativen Material entspricht. Der Ausdruck
 Humangewebe-Plasminogen-Aktivator definiert Produkte, die diesen
 Bereich allein oder zusammen mit zusätzlichen Aminosäure-
 25 sequenzen bis zur vollen Länge des Moleküls umfassen.

Zusammenfassend lässt sich für die vorliegende Erfindung
 human t-PA folgendermassen funktionell definieren: Es ist
 in der Lage, die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin zu
 30 katalysieren, geht eine Bindung mit Fibrin ein und wird auf
 Grund der vorstehend dargelegten immunologischen Eigenschaf-
 ten als t-PA klassifiziert.

Der Ausdruck "in im wesentlichen reiner Form" beschreibt
 35 den Zustand von erfindungsgemäss gebildetem human t-PA, das
 frei von Protein oder anderen normalerweise mit human t-PA
 assoziierten Materialien ist, die bei Bildung durch nicht-
 rekombinante Zellen, d.h. in der "nativen" Umgebung, ent-

1 stehen.

Der Ausdruck "DHFR-Protein" bezieht sich auf ein Protein, das die mit Dihydrofolat-reductase (DHFR) assoziierte Aktivität entfaltet und das daher von Zellen gebildet werden muss, die in einem Medium mit einem Mangel an Hypoxanthin, Glycin und Thymidin (-HGT-Medium) nicht lebensfähig sind. Im allgemeinen können Zellen mit einem Mangel an DHFR-Protein auf diesem Medium nicht wachsen, während Zellen mit einem Gehalt an DHFR-Protein dazu in der Lage sind.

Der Ausdruck "gegenüber MTX empfindliche Zellen" betrifft Zellen, die nicht in der Lage sind, auf Medien, die den DHFR-Inhibitor Methotrexat (MTX) enthalten, zu wachsen. Bei diesen "gegenüber MTX empfindlichen Zellen" handelt es sich um solche Zellen, die ohne eine genetische Veränderung oder eine anderweitige Ergänzung nicht in der Lage sind, unter Bedingungen, die für den Zelltyp in Bezug auf Umgebung und Medium an sich geeignet sind, zu wachsen, wenn die MTX-Konzentration 0,2 µg/ml oder mehr beträgt. Einige Zellen, zum Beispiel Bakterien, besitzen keine MTX-Empfindlichkeit, was darauf zurückzuführen ist, dass sie MTX nicht in ihre Zellbegrenzungen gelangen lassen, selbst wenn sie DHFR enthalten, das ansonsten gegenüber diesem Arzneistoff empfindlich wäre. Im allgemeinen sind Zellen, die als DHFR-Protein Wildtyp-DHFR enthalten, gegenüber Methotrexat empfindlich, wenn sie in Bezug auf MTX durchlässig oder zu dessen Aufnahme in der Lage sind.

Der Ausdruck "Wildtyp-DHFR" bezieht sich auf Dihydrofolat-reductase, wie sie üblicherweise in dem speziellen in Frage kommenden Organismus gefunden wird. Wildtyp-DHFR ist im allgemeinen in vitro empfindlich gegenüber niedrigen Konzentrationen an Methotrexat.

35

Der Ausdruck "DHFR-Protein mit geringer Bindungsaffinität für MTX" ist funktionell definiert. Es handelt sich um ein DHFR-Protein, das bei Bildung innerhalb von Zellen das Wachs-

1 tum von MTX-empfindlichen Zellen in einem Medium mit einem
 Gehalt an 0,2 µg/ml oder mehr MTX ermöglicht. Es ist ersicht-
 lich, dass eine derartige funktionelle Definition von der
 Leichtigkeit, mit der der Organismus das "DHFR-Protein mit nied-
 5 riger Bindungsaktivität für MTX" bildet sowie vom Protein
 selbst abhängt. Jedoch sollte im Rahmen der vorliegenden Er-
 findung ein derartiger Ausgleich zwischen diesen beiden Me-
 chanismen keine Schwierigkeiten bereiten. Erfindungsgemäss
 wird eine Überlebensfähigkeit bei diesen MTX-Konzentrationen
 10 gewährleistet. Es ist belanglos, ob die Fähigkeit hierzu
 zusätzlich zur vorhandenen Natur des gebildeten DHFR durch
 erhöhte Expression beeinflusst wird. Ein geeignetes DHFR-
 Protein, das dieser Definition entspricht, ist in der US-
 Anmeldung 459 151 vom 19. Januar 1983 beschrieben.

15

Der Ausdruck "Expressionsvektor" umfasst Vektoren, die zur
 Expression von hier in Betracht kommenden DNA-Sequenzen in
 der Lage sind, wobei diese Sequenzen funktionell mit anderen
 Sequenzen verknüpft sind, die zur Durchführung von deren Ex-
 20 pression in der Lage sind. Es wird stillschweigend angenom-
 men, wenn auch nicht immer ausdrücklich erwähnt, dass diese
 Expressionsvektoren in den Wirtsorganismen entweder als Epi-
 somen oder als integrierender Bestandteil der chromosomalen
 DNA replizierbar sein müssen. Ein Mangel an Replikationsfä-
 25 higkeit würde sie ganz eindeutig unbrauchbar machen. Zusam-
 mengefasst ist der Ausdruck "Expressionsvektor" funktionell
 definiert. Jede DNA-Sequenz, die zur Expression eines be-
 stimmten, hier in Frage kommenden DNA-Codes in der Lage ist,
 fällt unter diesen Ausdruck, sofern er auf die bestimmte
 30 Sequenz angewandt wird. Im allgemeinen liegen für rekombinan-
 te DNA-Techniken geeignete Expressionsvektoren häufig in
 Form von "Plasmiden" vor, wobei dieser Ausdruck sich auf
 kreisförmige, doppelsträngige DNA-Schleifen bezieht, die in ih-
 rer Vektorform nicht an das Chromosom gebunden sind. In der
 35 vorliegenden Beschreibung werden die Ausdrücke "Plasmid"
 und "Vektor" wechselweise verwendet, da das Plasmid die am
 häufigsten verwendete Vektorform ist. Jedoch umfasst die
 Erfindung auch solche andere Formen von Expressionsvektoren,

1 die äquivalente Funktionen erfüllen und die noch aufgefunden werden.

Der Ausdruck "rekombinante Wirtszellen" betrifft Zellen, die
 5 mit Vektoren, die durch rekombinante DNA-Techniken aufgebaut sind, transformiert sind. Entsprechend der hier gegebenen Definition wird t-PA in den auf Grund dieser Transformation erreichten Mengen gebildet und nicht in den geringen Mengen, die durch den untransformierten Wirt entstehen, die häufig
 10 unter der Nachweisgrenze liegen. Durch derartige Zellen gebildeter t-PA kann auch als "rekombinanter t-PA" bezeichnet werden.

B. Wirtszellkulturen und Vektoren

15

Die hier beschriebenen Vektoren und Methoden eignen sich zur Anwendung in Wirtszellen innerhalb eines breiten Bereichs von prokaryontischen und eukaryontischen Organismen.

20 Selbstverständlich werden im allgemeinen Prokaryonten zum Klonen von DNA-Sequenzen beim Aufbau der erfindungsgemäss geeigneten Vektoren bevorzugt. Beispielsweise ist E. coli K12 Stamm 294 (ATCC 31446) besonders geeignet. Es können auch andere Mikroorganismenstämme verwendet werden, darunter
 25 die E. coli-Stämme E. coli B und E. coli X1776 (ATCC 31537). Diese Beispiele dienen jedoch nur zur Erläuterung und stellen keine Beschränkung dar.

Prokaryonten können ebenfalls zur Expression verwendet werden.
 30 Die vorerwähnten Stämme sowie E. coli W3110 (F^- , λ^- , prototroph, ATCC 27325), Bazillen, wie Bacillus subtilis und andere Enterobacteriaceae, wie Salmonella typhimurium oder Serratia marcescens und verschiedene Pseudomonas-Spezies können verwendet werden.

35

1 Im allgemeinen werden Replikon und Kontrollsequenzen enthal-
 tende Plasmidvektoren, die von mit der Wirtszelle verträg-
 lichen Spezies abgeleitet sind, in Verbindung mit diesen
 Wirten verwendet. Der Vektor trägt üblicherweise eine Repli-
 5 kationsstelle sowie markierende Sequenzen, die in der Lage
 sind, eine phänotypische Selektion in transformierten Zellen
 zu gewährleisten. Beispielsweise wird *E. coli* typischerweise
 unter Verwendung von pBR 322, einem von einer *E. coli*-Spezies
 abgeleiteten Plasmid (Bolivar et al., Gene 2, (1977), Seite
 10 95) transformiert. pBR 322 enthält
 Gene für Ampicillin- und Tetracyclinresistenz und erlaubt
 somit eine leichte Identifizierung von transformierten Zel-
 len. Das pBR 322-Plasmid oder andere mikrobielle Plasmid
 muss auch Promotoren enthalten, die vom mikrobiellen Orga-
 15 nismus zur Expression seiner eigenen Proteine verwendet
 werden können, oder es muss so modifiziert sein, dass es
 diese Promotoren enthält. Diese Promotoren, die sehr häufig
 beim rekombinanten DNA-Aufbau verwendet werden, umfassen
 β -Lactamase (Penicillinase) und Lactose-Promotorsysteme
 20 (Chang et al., Nature, Bd. 275 (1978), S. 615; Itakura et
 al., Science, Bd. 198 (1977), S. 1056; Goeddel et al.,
 Nature, Bd. 281 (1979), S. 544) sowie ein Tryptophan (trp)-
 Promotorsystem (Goeddel et al., Nucleic Acids Res., Bd. 8
 (1980), S. 4057; EP-Veröffentlichungsnummer 0 036 776).
 25 Neben diesen besonders gebräuchlichen Promotoren wurden
 auch andere mikrobielle Promotoren aufgefunden und einge-
 setzt. Einzelheiten bezüglich der Nukleotidsequenzen dieser
 Promotoren wurden veröffentlicht, was es dem Fachmann erlaubt,
 sie funktionell mit Plasmidvektoren zu verknüpfen (Sieben-
 30 list et al., Cell, Bd. 20 (1980), S. 269).

Neben Prokaryonten können auch eukaryontische Mikroben, wie
 Hefekulturen, verwendet werden. Unter den eukaryontischen
 Mikroorganismen wird am häufigsten *Saccharomyces cerevisiae*
 35 oder übliche Bäckerhefe verwendet, wenngleich auch zahlrei-
 che andere Stämme verfügbar sind. Für die Expression in
Saccharomyces wird im allgemeinen das Plasmid YRp7 (Stinch-
 comb et al., Nature, Bd. 282 (1979), S. 39; Kingsman et al.,

1 Gene, Bd. 7 (1979), S. 141; Tschember et al., Gene, Bd. 10
 (1980), S. 157) verwendet. Dieses Plasmid enthält bereits
 das trp1-Gen, das einen Selektionsmarker für einen Mutanten-
 stamm von Hefe, dem die Fähigkeit zum Wachstum in Tryptophan
 5 fehlt, zum Beispiel ATCC 44076 oder PEP4-1 (Jones, Genetics,
 Bd. 85 (1977), S. 12), bereitstellt. Die Anwesenheit der
 trp1-Läsion als Charakteristikum für das Hefewirtszellen-
 genom stellt dann eine wirksame Umgebung zum Nachweis der
 Transformation durch Wachstum in Abwesenheit von Tryptophan
 10 dar.

Beispiele für geeignete Promotorsequenzen in Hefevektoren
 sind die Promotoren für 3-Phosphoglycerat-kinase (Hitzeman
 et al., J. Biol. Chem., Bd. 255 (1980), S. 2073) oder ande-
 15 re glycolytische Enzyme (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg.,
 Bd. 7 (1968), S. 149; Holland et al., Biochemistry, Bd. 17
 (1978), S. 4900), wie Enolase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-
 dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvat-decarboxylase, Phospho-
 fructokinase, Glukose-6-phosphat-isomerase, 3-Phosphogly-
 20 cerat-mutase, Pyruvat-kinase, Triosephosphat-isomerase,
 Phosphoglucose-isomerase und Glucokinase. Beim Aufbau von
 geeigneten Expressionsplasmiden werden die mit diesen Genen
 assoziierte Terminationssequenzen ebenso in den Expressions-
 vektor 3' der gewünschten, zu exprimierenden Sequenz ligiert,
 25 um für die Polyadenylierung von mRNA und Termination zu sor-
 gen. Weitere Promotoren, die den zusätzlichen Vorteil der
 durch die Wachstumsbedingungen kontrollierten Transkrip-
 tion aufweisen, sind die Promotorbereiche für Alkohol-de-
 hydrogenase 2, Isocytochrom C, saure Phosphatase, mit dem
 30 Stickstoffstoffwechsel assoziierte, abbauende Enzyme und die vorer-
 wähnten Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase sowie Enzyme,
 die für die Verwertung von Maltose und Lactose verantwor-
 tlich sind (Holland a.a.O.). Beliebige Plasmidvektoren mit
 einem Gehalt an hefeverträglichen Promotor-Replikationsstart-
 35 stellen- und Terminationssequenzen sind geeignet.

Neben Mikroorganismen können auch Kulturen von Zellen, die
 sich von mehrzelligen Organismen ableiten, als Wirte ver-

1 wendet werden. Im Prinzip sind beliebige, derartige Zell-
 kulturen geeignet, unabhängig davon, ob sie von Wirbeltieren
 oder wirbellosen Tieren stammen. Das grösste Interesse be-
 steht jedoch für Wirbeltierzellen. Die Vermehrung von Wir-
 5 beltierzellen in Kulturen (Gewegekulturen) ist in den letz-
 ten Jahren zu einem routinemässigen Verfahren geworden
 (Tissue Culture, Academic Press, Herausgeber Kruse und Pat-
 terson, 1973). Beispiele für derartige, geeignete Wirtszell-
 linien sind VERO- und HeLa-Zellen, Zelllinien aus den Ovarien
 10 des Chinesischen Hamsters (CHO) und W138-, BHK-, COS-7-
 und MDCK-Zelllinien. Expressionsvektoren für derartige Zellen
 umfassen im allgemeinen (soweit erforderlich) eine Repli-
 kationsstartstelle, einen vor dem zu exprimierenden Gen be-
 findlichen Promotor zusammen mit eventuell erforderlichen
 15 Ribosomenbindungsstellen, RNA-Spleissstellen, eine Polyade-
 nylierungsstelle und transkriptionale Terminatorsequenzen.

Bei Säugetierzellen werden die Kontrollfunktionen an den
 Expressionsvektoren häufig durch virales Material bereitge-
 20 stellt. Beispielsweise leiten sich üblicherweise Promotoren
 von Polyoma, Adenovirus 2 und sehr häufig von Simian Virus
 40 (SV 40) ab. Die frühen und späten Promotoren des SV 40-
 Virus sind besonders geeignet, da sie beide leicht aus dem
 Virus als ein Fragment erhalten werden, das auch die SV 40-
 25 virale Replikationsstartstelle enthält (Fiers et al., Natu-
 re, Bd. 273 (1978), S. 113). Kleinere oder grössere SV 40-
 Fragmente können ebenfalls verwendet werden, vorausgesetzt
 es ist die etwa 250 bp umfassende Sequenz von der Hind III-
 Stelle bis zur Bgl I-Stelle, die sich in der viralen Repli-
 30 kationsstartstelle befindet, vorhanden. Ferner ist es auch
 möglich und häufig erwünscht, Promotor- oder Kontrollsequen-
 zen zu verwenden, die normalerweise mit der erwünschten Gen-
 sequenz assoziiert sind, vorausgesetzt diese Kontrollsequen-
 zen sind mit den Wirtszellsystemen verträglich.

35

Eine Replikationsstartstelle kann entweder durch Aufbau des
 Vektors einer exogenen Startstelle, abgeleitet beispiels-
 weise von SV 40 oder einer anderen viralen Quelle (zum Bei-

1 spiel Polyoma, Adeno, VSV, BPV und dergleichen), oder durch
den chromosomalen Replikationsmechanismus der Wirtszelle
bereitgestellt werden. Ist der Vektor in das Wirtszellen-
chromosom integriert, ist dieses Chromosom häufig ausrei-
5 chend.

Bei der Auswahl einer bevorzugten Wirtszelle für die Trans-
fektion durch die erfindungsgemässen Vektoren, die sowohl
t-PA als auch DHFR-Protein kodierende DNA- Sequenzen umfas-
10 sen, ist es angebracht, den Wirt entsprechend dem Typ des
verwendeten DHFR-Proteins auszuwählen. Wird Wildtyp-DHFR-
Protein verwendet, wählt man vorzugsweise eine Wirtszelle
mit einem Mangel an DHFR, was die Verwendung der DHFR kodieren-
den Sequenz als Marker für die erfolgreiche Transfektion im
15 selektiven Medium mit Mangel an Hypoxanthin, Glycin und
Thymidin ermöglicht. Eine geeignete Wirtszelle in diesem
Fall ist die Zelllinie aus den Ovarien des Chinesischen Ham-
sters (CHO) mit einem Mangel an DHFR-Aktivität. Diese Zell-
linie lässt sich gemäss Urlaub und Chasin, Proc. Natl. Acad.
20 Sci. (USA), Bd. 77 (1980), S. 4216) herstellen und vermeh-
ren.

Wird andererseits DHFR-Protein mit niedriger Bindungsaffi-
nität für MTX als Kontrollsequenz verwendet, ist es nicht
25 erforderlich, DHFR-resistente Zellen zu verwenden. Da die
mutante DHFR gegen Methotrexat resistent ist, können Medien
mit einem Gehalt an MTX als Selektionsmittel verwendet wer-
den, vorausgesetzt die Wirtszellen sind selbst gegen Metho-
trexin empfindlich. Die meisten eukaryontischen Zellen, die
30 zur Absorption von MTX fähig sind, scheinen gegenüber Metho-
trexat empfindlich zu sein. Eine geeignete derartige Zell-
linie ist eine CHO-Linie, CHO-K1 ATCC CCL 61.

Die nachstehenden Beispiele beschreiben die Verwendung von
35 E. coli mit dem trp-Promotorsystem und CHO-Zellen als Wirts-
zellen und von Expressionsvektoren, die die SV 40-Replika-
tionsstartstelle als Promotor enthalten. Der Fachmann kann
jedoch auf Grund seines Fachwissens analoge Techniken anwen-

iden, um Expressionsvektoren zur Expression der gewünschten Proteinsequenzen in anderen prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellkulturen aufzubauen.

5 C. Angewandte Verfahren

Werden Zellen ohne erhebliche Zellwandbarrieren als Wirtszellen verwendet, wird die Transfektion gemäss dem Calciumphosphat-Fällungsverfahren nach Graham und Van der Eb, *Virology*, Bd. 52 (1978), S. 546 durchgeführt. Doch können auch andere Verfahren zur Einführung von DNA in Zellen zum Beispiel durch nukleare Injektion oder durch Protoplastenfusion angewandt werden.

15 Werden prokaryontische Zellen oder Zellen, die wesentliche Zellwandkonstruktionen enthalten, verwendet, so besteht die bevorzugte Transfektionsmethode in der Calciumbehandlung unter Verwendung von Calciumchlorid gemäss F.N. Cohen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, Bd. 69 (1972), S. 2110.

20

Beim Aufbau von geeigneten Vektoren mit einem Gehalt an diesen Kodierungs- und Kontrollsequenzen werden übliche Ligationsstechniken angewandt. Isolierte Plasmide oder DNA-Fragmente werden zur Bildung der gewünschten Form der erforderlichen Plasmide gespalten, geschnitten und religiert.

Die Spaltung wird durch Behandlung mit Restriktionsenzym (oder Enzymen) in einem geeigneten Puffer durchgeführt. Im allgemeinen werden etwa 1 µg Plasmid oder DNA-Fragmente mit
30 etwa 1 unit Enzym in etwa 20 µl Pufferlösung verwendet.

(Entsprechende Puffer und Substratmengen für bestimmte Restriktionsenzyme werden vom Hersteller angegeben.) Inkubationszeiten von etwa 1 Stunde bei 37°C sind geeignet. Nach der Inkubation wird das Protein durch Extraktion mit Phenol
35 und Chloroform entfernt. Die Nucleinsäure wird aus der wässrigen Fraktion durch Fällung mit Äthanol gewonnen.

Sind stumpfe Enden erforderlich, wird das Präparat 15 Minu-

1 ten bei 15°C mit 10 units Polymerase I (Klenow) behandelt,
mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Äthanol gefällt.

Die Auftrennung der gespaltenen Fragmente nach der Grösse
5 wird unter Verwendung von 6 prozentigem Polyacrylamidgel
gemäss D. Goeddel et al., Nucleic Acids Res., Bd. 8 (1980),
S. 4057 durchgeführt.

Zur Ligation werden etwa äquimolare Mengen der gewünschten
10 Komponenten, die am Ende in geeigneter Weise geschnitten
sind, um eine korrekte Übereinstimmung zu gewährleisten,
mit etwa 10 units T4 DNA-Ligase pro 0,5 µg DNA behandelt.
(Wenn gespaltene Vektoren als Bestandteile verwendet wer-
den, kann zur Verhinderung der Religation des gespaltenen
15 Vektors eine Vorbehandlung mit bakterieller, alkalischer
Phosphatase durchgeführt werden.)

Für eine Analyse zur Bestätigung der korrekten Sequenzen in
den aufgebauten Plasmiden werden die Ligationsgemische zur
20 Transformation von E. coli K12-Stamm 294 (ATCC 31446) ver-
wendet. Erfolgreiche Transformanten werden gegebenenfalls
auf Grund von Ampicillinresistenz ausgewählt. Von den Trans-
formanten werden Plasmide hergestellt, durch Restriktion
analysiert und /oder nach dem Verfahren von Messing et al.,
25 Nucleic Acids Res., Bd. 9 (1981), S. 309 oder nach dem Ver-
fahren von Maxam et al., Methods in Enzymology, Bd. 65
(1980), S. 499 sequenziert.

Die Amplifikation von DHFR-Protein kodierenden Sequenzen
30 wird durchgeführt, indem man Wirtszellkulturen in Gegen-
wart von Methotrexat, einem kompetitiven Inhibitor der DHFR-
Aktivität in Konzentrationen von etwa 20-500.000 nanomolar
züchtet. Der wirksame Konzentrationsbereich hängt natür-
lich stark von der Art des DHFR-Gens, dem Protein und den
35 Eigenschaften des Wirts ab. Im allgemeinen lassen sich klar
definierte obere und untere Grenzen nicht feststellen. Es
können auch geeignete Konzentrationen von anderen Folsäure-
analogen oder anderen Verbindungen, die DHFR hemmen, ver-

1 wendet werden. MTX selbst ist jedoch besonders zweckmässig,
leicht zugänglich und wirksam.

D. Allgemeine Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen

5

Humangewebe-Plasminogen-Aktivator wurde auf folgende Weise erhalten:

1. Humanmelanomzellen, die aktiv Gewebe-Plasminogen-Aktiva-
tor bildeten, wurden bis zur Konfluenz gezüchtet.

10

2. Zellpellets aus diesen Zellkulturen wurden in Gegenwart
von Ribonuclease-Inhibitoren gezüchtet, um die gesamte,
zytoplasmatische RNA zu isolieren.

15 3. Eine oligo-dT-Säule isolierte die gesamte messenger-RNA
(mRNA) in polyadenylierter Form. Diese mRNA wurde der
Grössenfraktionierung unter Anwendung der Säure-Harnstoff-
Agarosegel-Elektrophorese unterzogen.

20 4. Die Gelfraktion mit einem Gehalt an Gewebe-Plasminogen-
Aktivator-spezifischer RNA wurde auf folgende Weise
identifiziert: Die RNA der einzelnen Gelfractionen wurde
in einem Kaninchen-Reticulocytenlysat- in vitro- System,
ergänzt mit Hundepankreas-Mikrisomen, translatiert. Die
25 erhaltenen Translationsprodukte wurden dann mit Humange-
webe-Plasminogen-Aktivator-spezifischem IgG-Antikörper
immunopräzipitiert.

30 5. Die geeignete RNA (21 bis 24S) wurde in die entsprechende
einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) übergeführt,
aus der doppelsträngige cDNA gebildet wurde. Nach poly-
dC-Schwänzen wurde es in einen Vektor eingesetzt, bei-
spielsweise in ein Plasmid, das einen oder mehrere phä-
notypische Marker trug.

35

6. Die auf diese Weise hergestellten Vektoren wurden zur
Transformation von Bakterienzellen unter Bildung einer
geklonten cDNA-Bibliothek verwendet. Ein Pool von radio-

- 1 aktiv markierten, synthetischen Desoxyoligonucleotiden,
die komplementär zu den Kodons für bekannte Aminosäure-
sequenzen in t-PA waren, zum Beispiel der Pool von
8 14-meren
- 5 5'-dtC(^A_G)CA(^A_G)TA(^C_T)TCCCA-3' (komplementär zu den Sequen-
zen, die für die bekannte (vgl. unten) Aminosäuresequenz:
Tryptophan-Glutaminsäure-Tyrosin-Cystein-Asparaginsäure
(W-E-Y-C-D) kodieren) wurde hergestellt und zur Markie-
10 rung der Koloniebibliothek verwendet.
7. Aus den positiven cDNA-Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert
und sequenziert.
- 15 8. Die sequenzierte DNA wurde dann in vitro zur Insertion
in ein geeignetes Expressionsvehikel, das zur Transfor-
mation einer geeigneten Wirtszelle verwendet wurde, ge-
schnitten. Die Wirtszelle wurde in einer Kultur gezüch-
tet, wodurch der gewünschte Humangewebe-Plasminogen-Ak-
20 tivator gebildet wurde.
9. Der auf diese Weise gebildete Humangewebe-Plasminogen-
Aktivator weist in seinem enzymatischen Serinprotease-
teil etwa 251 Aminosäuren auf. Ferner besitzt er ober-
halb davon eine einen "kringle" enthaltende Sequenz, von
25 der zur Zeit angenommen wird, dass sie für die Fibrin-
bindung verantwortlich ist. Das reife Protein zuzüglich
dessen Signalpräsequenz weist insgesamt 562 Aminosäuren
auf.
- 30 Das vorstehende Verfahren selbst gewährleistet die erfolg-
reiche Bildung von reinem t-PA. Erfindungsgemässe Verfahren
unter Anwendung einer zusätzlichen kodierenden, gegenüber
Methotrexat empfindlichen Sequenz erlauben die Bildung von
antigenaktivem t-PA-Protein in Wirtszellkulturen in Mengen
35 von mehr als 0,1 pg pro Zelle pro Tag. Bei entsprechender
Anwendung von amplifizierenden Bedingungen können Mengen
von mehr als 20 pg erhalten werden. Mit anderen Worten, es

1 lassen sich Genexpressionsgrade erreichen, die zur Bildung
 von mehr als 9×10^6 Plough-Einheiten oder bei entsprechen-
 der Amplifikation von mehr als 18×10^{-4} Plough-Einheiten an
 t-PA-Aktivität führen.

5

Gemäss dieser Ausführungsform der Erfindung bedient man sich
 des Arzneistoffs Methotrexat, der zwar normalerweise für
 zur Aufnahme dieses Wirkstoffs fähige Zellen tödlich ist,
 der in Gegenwart von kontrollierten Konzentrationen an MTX

10 durch Amplifikation des Gens, das für die DHFR-kodierende
 Sequenz kodiert, Zellwachstum ermöglicht (R. T. Schimke et
 al., Science, Bd. 202 (1978), S. 1051; J. L. Biedler et al.,
 Cancer Res., Bd. 32 (1972), S. 153; S. E. Chang et al., Cell,
 Bd. 7 (1976), S. 391).

15

Diesbezüglich ist der Befund von Bedeutung, dass die Ampli-
 fikation des Gens für DHFR die Amplifikation von assoziierten
 Sequenzen, die für andere Proteine kodieren, verursachen
 kann. Dies erscheint der Fall zu sein, wenn es sich beim

20 assoziierten Protein um Hepatitis B-Oberflächenantigen
 (HBsAg) (J. Christman et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Bd. 79
 (1982), S. 1815), E. coli-Protein XGPRT (G. Ringold et al.,
 J. Molec. and Appl. Gen., Bd. 1 (1981), S. 165) und eine
 endogene Sequenz aus einer DHFR/SV 40-Plasmidkombination
 25 (R. F. Kaufman et al., J. Molec. Biol., Bd. 159 (1982),
 S. 601) handelt.

Andere Mechanismen, durch die eine Methotrexat-Resistenz
 verliehen werden kann, umfassen die Verminderung der Bin-
 30 dungsaffinität für das DHFR-Protein, so dass es gegenüber
 Methotrexat weniger empfindlich wird (W. F. Flintoff et al.,
 Somat. Cell Genet., Bd. 2 (1976), S. 245), aber in diesem
 Fall Amplifikation ebenfalls stattfindet.

35 Es scheint, dass die Gene für Wildtyp-DHFR und für DHFR,
 die gegenüber MTX resistent ist, auf Grund ihrer eigenen
 verminderten Bindungskapazität durch die Gegenwart von MTX
 amplifiziert werden. Somit wird gemäss dieser Ausführungs-

form der Erfindung die Einwirkung der DHFR-Sequenzamplifikation auf assoziierte, proteinkodierende Sequenzen angewendet, um einen Kontrollmechanismus bereitzustellen, der verstärkte Expressionsgrade von t-PA-Sequenzen in Gegenwart von MTX oder aufgrund einer vorherigen Behandlung von transformierten Zellen mit MTX erlaubt.

Die Erfindung soll nachstehend durch Beispiele näher erläutert werden. In der dazugehörigen Zeichnung bedeuten:

Fig. 1: zeigt 10 % SDS PAGE von mit anti t-PA IgG fällbaren ³⁵S-markierten Proteinen, extrahiert aus Melanomzellen mit und ohne Proteaseinhibitor;

Fig. 2: zeigt die Elektrophorese der immunpräzipitierten Translationsprodukte von aus Melanomzellen abgeleiteten mRNA-Fractionen;

Fig. 3: zeigt das Hybridisierungsmuster von 96 mit cDNA transformierten Kolonien unter Verwendung des Pools von ³²P-markiertem 14-mer als Tracer, hergestellt auf der Basis einer 5-Aminosäuresequenz von human t-PA;

Fig. 4: zeigt eine Restriktionsendonucleasekarte von human t-PA cDNA in voller Länge;

Fig. 5a, 5b und 5c zeigen die Nucleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von human t-PA cDNA in voller Länge;

- Fig. 6: zeigt ein Schema des Aufbaus des Expressionsplasmids $p\Delta RIPA^0$;
- Fig. 7: zeigt die Ergebnisse eines Fibrin-Plattentests zur Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität der mit $p\Delta RIPA^0$ transformierten Zellen;
- Fig. 8: ist ein HPLC-Diagramm von Peptiden eines Trypsin-verdauungsprodukts von human t-PA;
- Fig. 9: zeigt den Aufbau eines für die direkte Expression von reifem human t-PA in E. coli kodierenden Plasmids;
- Fig. 10: zeigt die Ergebnisse eines Fibrin-Plattentests zur Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität von human t-PA, das durch mit $pt-PAt rp12$ transformiertes E. coli gebildet ist;
- Fig. 11: zeigt den Aufbau von DHFR (Mutante oder Wildtyp)/t-PA, das zur Transformation in Säugetiergewebekulturzellen geeignete Plasmide kodiert;
- Fig. 12: ist ein schematisches Diagramm des Humangewebe-Plasminogen-Aktivators, der gemäß der hier in E.1 erläuterten Methode hergestellt worden ist.

Ausführungsbeispiel

In den Beispielen wurden eine E. coli-Wirtskultur und eine CHO-Zelllinie, die sich für den Typ der einzuführenden DHFR-proteinkodierenden Sequenz eignet als Wirtszellkultur verwendet. Jedoch eignen sich auch andere eukaryontische und prokaryontische Zellen für das erfindungsgemäße Verfahren.

E.1 Expression von human t-PA-Gen in E. coli

E.1.A Beschreibung der Figuren

Fig. 1 ist ein Autoradiogramm eines 10prozentigen SDS-Acrylamidgels, das das oder die immunpräzipitierte(n) [^{35}S]-Methionin-markierte(n) Protein(e), darstellt, die aus Humanmelanomzellen in vivo während 3 Stunden sekretiert wurden, und zwar in Gegenwart (Reihe b) oder Abwesenheit (Reihe a) des Proteaseinhibitors Aprotinin. Nach der Immunopräzipitation mit Gewebe-Plasminogen-Aktivator-spezifischem IgG wurden drei Banden beobachtet (Reihe a), die Molekulargewichte von etwa 65 000, 63 000 bzw. 35 000 aufwiesen. In Gegenwart des Proteaseinhibitors wurde jedoch die Spezies mit einem Molekulargewicht von 35 000 nicht festgestellt. Durch die Immunopräzipitation wurden keine Produkte ausgefällt, wenn Präimmunserum verwendet wurde (Reihe c). Die Veränderungen und die Molekulargewichte von ^{14}C -markierten Proteinstandards sind links von Reihe a wiedergegeben.

Fig. 2 zeigt die Elektrophorese der immunpräzipitierten Translationsprodukte von aus einem Säure-Harnstoff-Agarose-

1 gel isolierten RNA-Fraktionen. Eine Hauptbande wurde in den
 Fraktionen 7 und 8 nach Translation in Gegenwart von Hunde-
 pankreas-Mikrosomen unter anschliessender Immunopräzipita-
 tion mit Gewebe-Plasminogen-Aktivator- spezifischem IgG beo-
 5 bachtet. Diese Bande weist ein Molekulargewicht von etwa
 63 000 Dalton auf. Die Grösse der in den Fraktionen 7 und 8
 wandernden mRNA beträgt etwa 21 bis 24 S. Die Positionen der
 ribosomalen RNA-Marker, die nach Elektrophorese am RNA-Harn-
 stoff-Gel bestimmt und durch Färben mit Ethidiumbromid sicht-
 10 bar gemacht wurden, sind über den entsprechenden Gelreihen
 angegeben.

Fig. 3 zeigt das Hybridisierungsmuster von 96 Kolonien mit
 dem ^{32}P -dTTC(A_G)CA(A_G)TA(C_T)TCCCA (W-E-Y-C-D)-Marker. 96 indi-
 15 viduelle Transformanten wurden auf einer Mikrotiterplatte
 gezüchtet, replikaplattiert und auf einer Nitrocellulose-
 membran gezüchtet. Die Kolonien wurden sodann lysiert, die
 bakterielle DNA fixiert und die Filter mit ^{32}P -14-mer (W-
 20 E-Y-C-D)-Markern hybridisiert. Die Filter wurden zur Entfer-
 nung von nicht-hybridisiertem Marker gewaschen und auf Rönt-
 genfilm aufgelegt. Das Autoradiogramm stellt die Muster von
 48 einzelnen Filtern (4600 unabhängige Kolonien) dar. Ein
 Beispiel für einen positiven Gewebe-Plasminogen-Aktivator-
 25 cDNA-Klon auf Filter Nummer 25 ist als E10 (Pfeil) gekenn-
 zeichnet.

Fig. 4 ist eine Restriktionsendonuclease-Karte der vollen
 Länge von Humangewebe-Plasminogen-Aktivator-cDNA. Die An-
 30 zahl und die Grösse der durch die Spaltung mit Restriktions-
 endonuclease gebildeten Fragmente wurde durch Elektrophore-
 se an 6 prozentigen Acrylamidgelen bestimmt. Die Positionen
 der Stellen wurden durch Nucleinsäuresequenz (in Fig. 5
 wiedergegeben) bestätigt. Der kodierende Bereich des grös-
 35 ten offenen Leserasters ist durch ein Kästchen gekennzeich-
 net. Der schraffierte Bereich stellt die mutmassliche Sig-
 nalpeptidsequenz dar, während der punktierte Bereich die
 mutmassliche Sequenz von reifem Gewebe-Plasminogen-Aktivator

1 (527 Aminosäuren) wiedergibt. Das 5'-Ende von mRNA befindet sich auf der linken Seite und das 3'-Ende auf der rechten Seite.

5 Die Figuren 5A, 5B und 5C erläutern die Nucleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz von Humangewebe-Plasminogen-Aktivator-cDNA in voller Länge. Die der reifen Sequenz vorhergehenden 35 Aminosäuren (-35 bis -1) sind als ununterbrochene Sequenz dargestellt. Es wird angenommen, dass die-
 10 se Sequenz mit 35 Aminosäuren aus einer hydrophilen "pro"-Sequenz mit etwa 12 bis 15 Aminosäuren, die dem Serin (+1) des reifen Proteins vorausgeht, und einem dieser "pro"-Sequenz vorausgehenden "herkömmlichen" hydrophoben Signal (sich erstreckend von 5' bis -35) besteht. Dieser Typ von
 15 prä-pro-Struktur an sekretierten Proteinen wurde bereits früher beschrieben, zum Beispiel für Präproalbumin. Gemäss dieser Theorie beginnen sämtliche sekretierten Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Moleküle mit dem Serin (+1) als Aminoende. Eine zweite Theorie besteht darin, dass die hydrophile Se-
 20 quenz an der Funktion von Gewebe-Plasminogen-Aktivator auf analoge Weise beteiligt sein kann, wie sie ein bei Plasminogen, bei dem ein Peptid mit 10 000 Dalton vom aminoterminalen Bereich des nativen Plasminogen (Glu-Plasminogen, benannt nach dem aminoterminalen Ende) gespalten werden kann,
 25 beobachtet wurde, wodurch ein kleineres Molekül mit einem neuen Aminoende, bezeichnet als Lys-Plasminogen, erhalten wird. Lys-Plasminogen wird leichter zu Plasmin aktiviert und hat auch eine grössere Affinität für Fibrin als Glu-Plasminogen. Es wurde gezeigt, dass Plasmin die Umwandlung
 30 von Glu- in Lys-Plasminogen katalysiert. Diese Art von Kontrollmechanismus bewirkt einen "positiven feedback"-Mechanismus. Die ersten Mengen an gebildetem Plasmin bewirken neben dem Abbau von Fibrin auch eine Bildung von Plasminogenmolekülen, die leichter aktiviert werden, und gehen
 35 auch eine festere Bindung mit ihrem Substrat als natives Plasminogen ein. Es ergibt sich ein rascherer Abbau von Fibrin. Das hydrophile Peptid des Gewebeplasminogen-Aktivators könnte an einem ähnlichen Mechanismus beteiligt sein, so

1 dass dessen Spaltung eine modifizierte Bindung des Enzyms an Fibrin ergibt. In jedem Fall wird die 35-Aminosäuresequenz als Präsequenz für das reife Protein angesehen.

5 Fig. 6 ist ein schematisches Diagramm des Aufbaus eines Gewebepasminogen-Aktivators-Expressionsplasmids p Δ RIPA°. Das Ausgangsplasmid pPA25E10 wurde zunächst mit PstI verdaut, um ein 376 bp-Fragment zu isolieren, das sodann gemäss den Angaben dieser Figur verdaut wurde.

10

Fig. 7 zeigt das Ergebnis eines Fibrinplattentests zur Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität des über p Δ RIPA° in transformierten Zellen erhaltenen Expressionsprodukts.

15 Fig. 8 ist ein HPLC-Diagramm von Peptiden aus einem Trypsin-Verdauungsprodukt von Gewebe-Plasminogen-Aktivator (Absorption bei 210 nm). Der Pfeil identifiziert den Peak, der dem Peptid entspricht, das zur Bezeichnung des bei der Koloniebibliothek verwendeten Nucleotid-Markers verwendet wurde.

20 Das diesem Peak entsprechende Peptid wies folgende vollständige Sequenz auf: L-T-W-E-Y-C-D-V-P-S-C-S-T-C-G-L. Die anderen Hauptpeaks wurden in ähnlicher Weise sequenziert und führten zu einer Bestätigung der korrekten Aminosäuresequenz von Humangewebe-Plasminogen-Aktivator. Zur Bezeichnung der Aminosäuren in den Peptiden wurden folgende, einbuchstabige Symbole verwendet:

Asp	D	Asparaginsäure	Ile	I	Isoleucin
Thr	T	Threonin	Leu	L	Leucin
30 Ser	S	Serin	Tyr	Y	Tyrosin
Glu	E	Glutaminsäure	Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin	His	H	Histidin
Gly	G	Glycin	Lys	K	Lysin
Ala	A	Alanin	Arg	R	Arginin
35 Cys	C	Cystein	Trp	W	Tryptophan
Val	V	Valin	Gln	Q	Glutamin
Met	M	Methionin	Asn	N	Asparagin

1 Fig. 9 zeigt den Aufbau eines für die direkte Expression
 von reifem Humangewebe-Plasminogen-Aktivator in *E. coli* ko-
 dierenden Plasmids. 50 µg Plasmid pPA17 wurden mit Sau3AI,
 HincII und HhaI verdaut und der Elektrophorese an 6 prozen-
 5 tigem Polyacrylamidel unterworfen. Etwa 0,5 µg des 55 bp
 Sau3AI-HhaI-Fragments wurden gewonnen. In ähnlicher Weise
 wurden etwa 3 µg des 263 bp HhaI-NarI-Fragments aus 80 µg
 des Ions pPA25E10 gereinigt, indem zunächst ein 300 bp
 PstI-NarI-Fragment isoliert und dieses Fragment mit HhaI
 10 verdaut wurde. Sämtliche Verdauungsvorgänge wurden 1 Stunde
 bei 37°C durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden aufge-
 trennt und der Elektroelution an 6 prozentigem Polyacrylamid-
 gel unterworfen. Die beiden angegebenen Desoxyoligonucleoti-
 de 5' dAATTCATGTCTTATCAAGT (I) und 5' GATCACTTGATAAGACATG
 15 (II) wurden nach der Festphasen-phosphotriester-Methode
 (51) synthetisiert. 100 pMol des Oligonucleotids II wurden in
 einem 30 µl fassenden Reaktionsgemisch mit einem Gehalt an
 60 millimolar Tris (ph-Wert 8), 10 millimolar MgCl₂, 15 mil-
 limolar β-Mercaptoäthanol und 50 µCi γ -³²P7ATP (Amersham
 20 5000 Ci mMol⁻¹) phosphoryliert. 12 units T4-Polynucleotid-
 kinase wurden zugesetzt. Die Umsetzung wurde 15 Minuten bei
 37°C durchgeführt. 1 µl 10 millimolar ATP und 12 units T4-
 Kinase wurden sodann zugesetzt und die Umsetzung wurde wei-
 tere 30 Minuten fortgesetzt. Nach Phenol/CHCl₃-Extraktion
 25 wurden das phosphorylierte Oligomer II und das 5'-Hydroxyl-
 oligomer I mit 0,5 µg des eluierten 55 bp Sau3AI-HhaI-Frag-
 ments und 2 µg des 263 bp HhaI-NarI-Fragments vereinigt und
 mit Äthanol gefällt. Diese Fragmente wurden 4 Stunden bei
 Raumtemperatur in 60 µl 20 millimolar Tris-HCl (ph-Wert 7,5),
 30 10 millimolar MgCl₂, 10 millimolar Dithiothreitol, 0,5 milli-
 molar ATP und 1000 units T4-DNA-Ligase verknüpft. Das Ge-
 misch wurde 1 Stunde mit 48 units NarI, 20 units EcoRI und
 40 units BglII (zur Beseitigung der Polymerisation durch
 Ligation von kohäsiven Sau3AI-Enden) verdaut und der Elek-
 35 trophorese an 6 prozentigem Gel unterworfen. Das 338 bp-
 Produkt (etwa 0,1 µg) wurde durch Elektroelution gewonnen.
 Der Rest der t-PA-kodierenden Sequenzen (Aminosäuren 111 bis
 528) wurden an einem 1645 bp-Fragment durch Verdauen des

1 Plasmids pPA25E10 mit NarI und BglII isoliert. Das Plasmid
 pLeIFAtRp103 ist ein Derivat des Plasmids pLeIFA25 (52),
 bei dem die EcoRI-Stelle distal zum LeIF A-Gen entfernt
 worden ist (53). 3 µg pLeIFAtRp103 wurden mit 20 units EcoRI
 5 und 20 units BglII 90 Minuten bei 37°C verdaut, der Elektro-
 phorese an 6 prozentigem Polyacrylamidgel unterworfen. Das
 grosse Vektorfragment (4200 bp) wurde durch Elektroelution
 gewonnen. Für den endgültigen Aufbau wurden 80 ng EcoRI-
 BglII pLeIFAtRp103 mit 100 ng des 1645 bp-NarI-BglII-Frag-
 10 ments und 20 ng des 338 bp-EcoRI-NarI-Fragments 10 Stunden
 bei Raumtemperatur verknüpft. Dieses Verknüpfungsgemisch
 wurde zur Transformation von E. coli K-12 Stamm 294 verwen-
 det. Plasmid-DNA wurde aus 38 dieser Transformanten herge-
 stellt mit EcoRI verdaut. 10 dieser Plasmide enthielten die
 15 gewünschten 600 bp- und 472 bp-EcoRI-Fragmente. Die DNA-Se-
 quenzanalyse bestätigte, dass eines dieser Plasmide
 (pt-PAtRp12) die gewünschte Nucleotidsequenz an den Ver-
 bindungen zwischen trp-Promotor, synthetischer DNA und cDNA
 aufwies.

20

Fig. 10 zeigt das Ergebnis eines Fibrinplattentests zur Be-
 stimmung der fibrinolytischen Aktivität des erfindungsgemä-
 ssen Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Expressionsprodukts. Eine
 über Nacht gezüchtete Kultur von E. coli W3110/pt-PAtRp12
 25 in Luria-Brühe mit einem Gehalt an 5 µg ml⁻¹ Tetracyclin
 wurde 1:100 in M9-Medium mit einem Gehalt an 0,2 Prozent
 Glucose, 0,5 Prozent Casaminsäuren und 0,5 µg ml⁻¹ Tetra-
 cyclin verdünnt. Die Zellen wurden bei 37°C bis zu einem
 A₅₅₀-Wert von 0,2 gezüchtet. Indolacrylsäure wurde in einer
 30 Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt. Die Proben wurden
 bei einem A₅₅₀-Wert von 0,5 bis 0,6 (~2 x 10⁸ Zellen ml⁻¹)
 durch Zentrifugation gewonnen und sofort eingefroren. Die
 Zellpellets wurden in 6m Guanidin-hydrochlorid in einer
 Konzentration von 5 x 10⁸ Zellen /ml suspendiert, 10 Sekun-
 35 den mit Ultraschall behandelt, 30 Minuten bei 24°C inkubiert
 und sodann 4 Stunden gegen 25 millimolar Tris-HCl vom pH-
 Wert 8,0 mit einem Gehalt an 250 millimolar NaCl, 0,25 mil-
 limolar EDTA und 0,01 Prozent Tween 80 dialysiert. Nach der

1 Dialyse wurden die Proben 2 Minuten bei 13 000 g zentrifugiert und 10 µl der Überstände wurden jeweils auf ihre Aktivität an Gewebe-Plasminogen-Aktivator analysiert. Gemäss dem Verfahren von Granelli-Piperno und Reich (87) wurde die 5 Platte 3,5 Stunden bei 37°C inkubiert, und die Lysiszonen wurden gemessen. Ein quantitativer Befund wurde durch Vergleich mit Verdünnungen einer Lösung von gereinigtem Melanomgewebe-Plasminogen-Aktivator erhalten.

10-E.1.B Quelle für Gewebe-Plasminogen-Aktivator-mRNA

Es wurden Humanmelanomzellen (Bowes) verwendet. Die Melanomzellen wurden bis zur Bildung von konfluenten Monolayers in 100 ml Earles-Minimal-Essentiell-Medien, die mit Natrium-15 hydrogencarbonat (0,12 Prozent Endkonzentration), 2 millimolar Glutamin und 10 Prozent wärmeinaktiviertes, fötales Kälberserum ergänzt waren, gezüchtet. Zur Bestätigung, dass die Melanomzellen in Bezug auf die Bildung von Humangewebe-Plasminogen-Aktivator aktiv waren, wurden die Humanmelanom-20 zellen bis zur Konfluenz in einer 24 Vertiefungen aufweisenden Mikrotiterplatte entweder in Gegenwart oder Abwesenheit von 0,33 mikromolar Protease-Inhibitor Aprotinin gezüchtet. Die Zellen wurden einmal mit gepufferter Kochsalzlösung gewaschen und mit 0,3 ml serumfreiem, methioninfreiem Medium 25 versetzt. 75 µCi ^{-35}S -Methionin wurden zugesetzt. Die Zellen wurden 3 Stunden bei 37°C markiert. Nach der dreistündigen Markierungsdauer wurden die Medien von den Zellen abgetrennt und zur Immunpräzipitation entweder mit Gewebe-Plasminogen-Aktivator-spezifischem IgG oder Präimmunserum 30 behandelt (54). Die immunpräzipitierten Produkte wurden der Elektrophorese an einem 10 prozentigen SDS-Acrylamidgel unterworfen. Das Scheibengöl wurde fixiert, getrocknet und der Fluorigraphie unterworfen.

35 E.1.C. Isolierung und Grössenfraktionierung von Messenger-mRNA

Die gesamte RNA aus Melanomzellkulturen wurde im wesentli-

lichen nach dem Verfahren von Ward et al. (55) extrahiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletisiert und sodann in 10 millimolar NaCl, 10 millimolar Tris-HCl vom pH-Wert 7,5, 1,5 millimolar $MgCl_2$ resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von NP-40 (Endkonzentration 1 Prozent) lysiert. Die Kerne wurden durch Zentrifugation pelletisiert. Der die gesamte RNA enthaltende Überstand wurde durch mehrfache Phenol- und Chloroform-Extraktionen weiter gereinigt. Die wässrige Phase wurde auf eine NaCl-Konzentration von 0,2 m gebracht. Anschliessend wurde die gesamte RNA durch Zugabe von 2 Volumina Äthanol ausgefällt. Zur Reinigung von mRNA aus den Gesamt-RNA-Präparaten wurde die oligo-dT-Cellulose-chromatographie angewandt (51). Typische Ausbeuten aus 10 g gezüchteten Melanomzellen betrugen 5 bis 10 mg Gesamt-RNA und 50 bis 200 μg Poly(A)⁺-mRNA.

Die Fraktionierung von PolyA⁺-mRNA (200 μg) (56) wurde durch Elektrophorese an Harnstoff-Agarosegelen durchgeführt. Das Scheibenagarosegel (57, 58) bestand aus 1,75 Prozent Agarose, 0,025 m Natriumcitrat, pH-Wert 3,8 und 6 m Harnstoff. Die Elektrophorese wurde 7 Stunden bei 25 mA und 4°C durchgeführt. Das Gel wurde sodann mit einer Rasierklinge fraktioniert. Die einzelnen Scheiben wurden bei 70°C geschmolzen und zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert. Die Fraktionen wurden sodann mit Äthanol gefällt und anschliessend durch in vitro-Translation in einem Kaninchen-Reticulocytenlysat-System, Bethesda Research Lab. (59, 60), ergänzt mit Hundepankreas-Mikrosomen folgendermassen getestet: Translationen wurden unter Verwendung von 25 μCi an ³⁵S-Methionin und 500 ng der einzelnen Gelscheiben-RNA in einem Endvolumen von 30 μl mit einem Gehalt an 25 millimolar HEPES, 48,3 millimolar KCl, 10 millimolar Kreatinphosphat, 19 Aminosäuren jeweils 50 millimolar, 1,1 millimolar Magnesiumchlorid, 16,6 millimolar EDTA, 0,16 millimolar Dithiothreitol, 8,3 millimolar Häm, 16,6 $\mu g/ml$ Kreatin-kinase, 0,33 millimolar Calciumchlorid, 0,66 millimolar EGTA, 23,3 millimolar Natriumchlorid durchgeführt.

- 1 Die Inkubationen wurden 90 Minuten bei 30°C durchgeführt.
 Hundepankreas-Mikrosomenmembranen, die aus rohen Mikroso-
 men unter Verwendung von EDTA zur Entfernung der Ribosomen
 hergestellt waren (61), wurden gemäss (62) mit Nuclease be-
 5 handelt. Sie lagen im Translationsgemisch in einer Endkonzentration von $7A_{260}$ units/ml vor. Die Translationsprodukte oder immunpräzipitierten Translationsprodukte wurden durch Elektrophorese an 10 prozentigen Polacrylamidgelen gemäss den nachstehenden Angaben in Natriumdodecylsulfat analysiert (63).
- 10 Die ungefärbten Plattengele wurden fixiert, getrocknet und der Fluorigraphie unterworfen (64).

Die erhaltenen Translationsprodukte aus den einzelnen Gelfraktionen wurden mit Kaninchen-anti-Humangewebe-Plasminogen-Aktivator-spezifischem IgG immunpräzipitiert. Eine immunpräzipitierte Polypeptidhauptbande wurde bei der Translation der RNA-Fraktionsnummern 7 und 8 (Wanderung von 21 bis 24 S) mit einem Molekulargewicht von etwa 63 000 Dalton beobachtet. Diese Bande wurde nicht beobachtet, wenn 20 Präimmun-IgG zur Immunopräzipitation verwendet wurde, was darauf schliessen liess, dass diese Polypeptide für Gewebe-Plasminogen-Aktivator spezifisch waren.

25 E.1.D Herstellung einer Koloniebibliothek mit einem Gehalt an Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Sequenzen

5 µg gelfraktionierte mRNA (Gelscheibe 7 mRNA) wurden zur Herstellung von doppelsträngiger cDNA nach üblichen Verfahren (52,65,66) verwendet. Die cDNA wurde an 6 prozentigem 30 Polyacrylamidgel der Grössenfraktionierung unterworfen. cDNA mit mehr als 350 bp Länge (125 ng) wurde der Elektroelution unterzogen. 30 ng cDNA wurden mit desoxy(C)-Resten unter Verwendung von terminaler Desoxynucleotidyl-transferase (67) erweitert und mit 300 ng Plasmid-pBR322 (68), das in 35 ähnlicher Weise mit desoxy(C)-Resten an der Pst I-Stelle geschnitten war (67), verschweisst. Das verschweisste Gemisch wurde sodann in E. coli K12 Stamm 294 (ATCC 31446) transformiert. Es wurden etwa 4600 Transformanten erhalten.

1 E.1.E Herstellung eines DNA-Markers

Gereinigter Humangewebe-Plasminogen-Aktivator wurde gemäss dem Verfahren der Literaturstellen 19 und 20 erhalten.

5

Das Molekül wurde zur Feststellung der Bereiche, die sich am besten zur Herstellung von synthetischen Markern eigneten, auf folgende Weise zerlegt:

10 Um die Proteine gegenüber einer Verdauung durch Trypsin empfindlich zu machen, wurden sie reduziert und carboxymethyliert. Eine 2 µg-Probe an Gewebe-Plasminogen-Aktivator wurde zunächst über Nacht bei Raumtemperatur gegen 0,01 Prozent Tween 80 dialysiert. Das lyophilisierte Protein wurde
15 sodann in 12 ml 0,56 m Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 8,6) mit einem Gehalt an 8 m Harnstoff und 5 millimolar EDTA gelöst. Die Disulfidbindungen wurden durch Zugabe von 0,1 ml β -Mercaptoäthanol reduziert. Diese Reaktion wurde 2 Stunden bei 45°C unter Stickstoff durchgeführt. Die reduzierten Disulfide wurden sodann durch Zugabe von 1,0 ml 1,4 m Jodessigsäure in 1 m NaOH zum Carboxymethylderivat alkyliert. Nach
20 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Umsetzung durch 18-stündige Dialyse bei Raumtemperatur gegen 0,01 Prozent Tween 80 gestoppt. Sodann dann wurde lyophilisiert.

25

Das erhaltene, lyophilisierte, carboxymethylierte Protein wurde in 3 ml 0,1 m Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,5) gelöst. Trypsin (TPCK) wurde in einem Verhältnis von 1:50 zugesetzt. Die Verdauung wurde bei 37°C durchgeführt. Nach
30 3, 6 bzw. 12 Stunden wurden jeweils Aliquotanteile (0,1 ml) entnommen. Eine zweite Trypsinzugabe erfolgte nach 12 Stunden. Nach 24 Stunden wurde die Umsetzung durch Einfrieren gestoppt. Sie wurde bis zur Injektion in die HPLC-Vorrichtung in gefrorenem Zustand gehalten. Der Verdauungsablauf wurde
35 durch SDS-Gele der Aliquotanteile ermittelt. Sämtliche Gele waren leer mit Ausnahme einer schwachen Bande am 3-Stunden-Aliquotanteil. Dies zeigt, dass das 24 Stunden-Verdauungsprodukt vollständig war und keine grossen Peptide enthielt.

1 Eine Probe (etwa 0,5 ml) wurde in eine hochauflösende Altex
C-8-Ultrasphere 5 μ -Säule mit zwei Durchläufen injiziert.
Ein Acetonitrilgradient (1 bis 5 Prozent in 5 Minuten, 5 bis
35 Prozent in 100 Minuten, 35 bis 50 Prozent in 30 Minuten)
5 wurde angewandt. In einer der beiden präparativen Durchläufe
wurde das eluierte Produkt bei zwei Wellenlängen (210 und
280 nm) überprüft. Das Verhältnis der Absorptionen bei den
beiden Wellenlängen wurde als Mass für den Tryptophangehalt
der Peptide herangezogen.

10

Die Peptidpeaks, bei denen ein Tryptophangehalt am wahr-
scheinlichsten war, oder solche Peaks, die aus anderen Grün-
den als geeignet erschienen wurden, zuerst sequenziert. Dies
ermöglichte die Bestimmung der Sequenz um die meisten der
15 Tryptophanreste. Nach Sequenzieren von etwa 25 der bestge-
eigneten Peptidpeaks wurden sämtliche zusammenpassenden
Sequenzdaten zu einem vorläufigen Modell der Primärstruktur
von Gewebe-Plasminogen-Aktivator vereinigt. Aus diesen Daten
und dem Modell konnten mehrere mögliche Tracer festgestellt
20 werden.

E.1.F Identifikation von Bakterienklonen mit einem Gehalt an Gewebe-Plasminogen-Aktivator-cDNA-Sequenzen

25 Die Kolonien wurden einzeln in Vertiefungen von Mikrotiter-
platten mit einem Gehalt an LB (93) + 5 μ g/ml Tetracyclin
gebracht und nach Zugabe von DMSO auf eine Konzentration von
7 Prozent bei -20°C gelagert. Zwei Kopien der Koloniebiblio-
thek wurden auf Nitrocellulosefiltern gezüchtet. Die DNA
30 einer jeden Kolonie wurde gemäss dem Grunstein-Hogness-Ver-
fahren (69) am Filter fixiert.

Der 32 P-markierte TC($\overset{A}{G}$)CA($\overset{A}{G}$)TA($\overset{C}{T}$)TCCCA-Tracer wurde gemäss
den vorstehenden Ausführungen aus dem synthetischen Oligo-
35 meren (W-E-Y-C-D) 14-mer-Pool hergestellt. Filter mit einem
Gehalt an 4600 Transformanten wurden 2 Stunden bei Raum-
temperatur in 50 millimolar Natriumphosphat vom pH-Wert 6,8
5x SSC (80), 150 μ g/ml mit Ultraschall behandeltes Lachs-

1 sperma-DNA, 5x Denhardt-Lösung (85), 10 Prozent Formamid
 prähybridisiert und anschliessend mit 50×10^6 cpm des mar-
 kierten Tracers in der gleichen Lösung hybridisiert. Nach
 Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur 30 Minuten in 6x
 5 SSC, 0,1 Prozent SDS, einmal in 2x SSC gewaschen und sodann
 16 Stunden auf Kodak XR-5-Röntgenfilm unter Verwendung von
 Dupont Lightning Plus-Verstärkungsfiltern gelegt.

Plasmid-DNA wurde aus sämtlichen Kolonien nach einem
 10 Schnellverfahren (71) isoliert, wobei sich eine positive
 Hybridisierungsreaktion ergab. Die cDNA-Inserts aus diesen
 Klonen wurden sodann nach Subklonierung von Fragmenten in
 den M13-Vektor mp 7 (73) und nach dem chemischen Verfahren
 gemäss Maxam Gilbert (74) sequenziert. Fig. 3 zeigt, dass
 15 Filter Nummer 25 das Hybridisierungsmuster eines positiven
 Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Klons aufweist. Das cDNA-In-
 sert im Klon 25E10 erwies sich als DNA-kodierend für Gewebe-
 Plasminogen-Aktivator, was durch einen Vergleich von dessen
 Aminosäuresequenzen der Peptidsequenz (vgl. oben) von ge-
 20 reinigtem Gewebe-Plasminogen-Aktivator und durch dessen in
 E. coli gemäss den vorstehenden, näheren Angaben gebildeten
 Expressionsprodukt gezeigt wurde. Der Klon 25E10 war 2304
 Basenpaare lang, wobei der längste, offene Ableseraster ein
 Protein von 508 Aminosäuren (Molekulargewicht 56 756) kodier-
 25 te und einen 772 bp-3'-nicht-translatierten Bereich enthielt.
 Diesem cDNA-Klon fehlten die N-terminalen, kodierenden Se-
 quenzen.

30 E.1.G Direkte Expression von Humangewebe-Plasminogen- Akti- vator-Klon in E. coli

Bezugnehmend auf Fig. 6 wurden 50 µg pPA25E10 (vgl. oben)
 mit PstI verdaut. Das 376 bp-Fragment wurde durch Elektro-
 phorese an 6 prozentigem Polyacrylamidgel isoliert. Etwa
 35 3 µg dieses Fragments wurden durch Elektroelution aus dem
 Gel isoliert, mit 30 units Dde I 1 Stunde bei 37°C verdaut,
 mit Phenol und Chloroform extrahiert und mit Äthanol ge-
 fällt. Die erhaltenen Dde I-kohäsiven Enden wurden durch

1 Zusatz von 5 units DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) und
 jeweils 0,1 millimolar dATP, dCTP, dGTP, dTTP zum Reaktions-
 gemisch und 8-stündige Inkubation bei 4°C zu stumpfen Enden
 erweitert. Nach Extraktion mit Phenol und Chloroform wurde
 5 die DNA 2 Stunden mit 15 units Nar I verdaut. Das Reaktions-
 gemisch wurde der Elektrophorese an 6 prozentigem Polyacryl-
 amidgel unterworfen. Etwa 0,5 µg des gewünschten 125 bp-
 stumpfendigen Nar I-Fragments wurden gewonnen. Dieses Frag-
 ment kodiert für die Aminosäuren Nummer 69 bis 110 von rei-
 10 fem Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Protein voller Länge.

Zur Isolation des 1645 bp-Nar I - Bgl II-Fragments wurden
 30 µg pPa25E10 mit 30 units Nar I und 35 units Bgl II
 2 Stunden bei 37°C verdaut. Das Reaktionsgemisch wurde der
 15 Elektrophorese an 6 prozentigem Polyacrylamidgel unterwor-
 fen. Etwa 6 µg des gewünschten 1645 bp-Nar I - Bgl II-Frag-
 ments wurden gewonnen.

Das Plasmid pΔR1SRC ist ein Derivat des Plasmids
 20 pSRCex16 (79), bei dem die Eco RI-Stellen proximal zum trp-
 Promotor und distal zum SRC-Gen durch Reparatur mit DNA-
 Polymerase I (28) entfernt waren. Das selbst-komplementäre
 Oligodesoxynucleotid AATTATGAATTCAT (hergestellt nach dem
 Phosphortriester-Verfahren (75)) wurde in die verbleibende
 25 Eco RI-Stelle unmittelbar neben der Xba I-Stelle einge-
 setzt. 20 µg pΔR1SRC wurden vollständig mit Eco RI ver-
 daut, mit Phenol und Chloroform extrahiert und mit Äthanol
 gefällt. Das Plasmid wurde sodann mit 100 units Nuclease
 SI 30 Minuten bei 16°C in 25 millimolar Natriumacetat (pH-
 30 Wert 4,6) mit einem Gehalt an 1 millimolar ZnCl₂ und 0,3 m
 NaCl verdaut, um ein stumpfes Ende mit der Sequenz ATG zu
 schaffen. Nach Extraktion mit Phenol und Chloroform und nach
 Äthanol-fällung wurde die DNA mit Bam HI verdaut, der Elek-
 trophorese an 6 prozentigem Polyacrylamidgel unterworfen,
 35 und das grosse Vektorfragment (4300 bp) wurde durch Elektro-
 elution gewonnen.

1 Das Expressionsplasmid wurde durch 7-stündige Ligation bei
 Raumtemperatur von 0,2 µg Vektor, 0,06 µg des 125 bp-stumpf-
 endigen Nar I-Fragments und 0,6 µg des 1645 bp-Nar I -
 Bgl II-Fragments mit 10 units T₄-DNA-Ligase aufgebaut. Die-
 5 ses wurde zur Transformation von E. coli Stamm 294 (ATCC
 31446) zur Verleihung von Ampicillinresistenz verwendet.
 Plasmid-DNA wurde aus 26 der Kolonien hergestellt und mit
 Xba I und Eco RI verdaut. 12 dieser Plasmide enthielten die
 gewünschten 415 bp Xba I-Eco RI- und 472 bp-Eco RI-Fragmen-
 10 te. Die Analyse der DNA-Sequenz ergab, dass einige dieser
 Plasmide ein ATG-Initiationscodon aufwiesen, das korrekt
 am Start der Aminosäure Nummer 69 (Serin) plaziert war.
 Eines dieser Plasmide, p-RIPA°, wurde untersucht. Es ergab
 den gewünschten Gewebe-Plasminogen-Aktivator (Fig. 7).

15

E.1.H Gewebe-Plasminogen-Aktivator-cDNA von voller Länge

a.) Herstellung einer Koloniebibliothek mit einem Gehalt an N-terminalen Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Sequenzen

20

0,4 µg des synthetischen Oligonucleotids
 5'-TTCTGAGCACAGGGCG-3' wurden zum "Primen" von 7,5 µg
 Gelfraktion Nummer 8 mRNA (vgl. oben) verwendet, um
 nach üblichen Verfahren (65, 66) doppelsträngige cDNA
 25 herzustellen. Die cDNA wurde der Grössenfraktionierung
 an 6 prozentigem Polyacrylamidgel unterworfen. Eine
 Fraktion von mehr als 300 bp (36 ng) wurde der Elektro-
 elution unterworfen. 5 ng cDNA wurden mit desoxy(C)-
 Resten unter Verwendung von terminaler Desoxycytidyl-
 30 transferase (67) erweitert und mit 50 ng des Plasmids
 pBR322 (68), das in ähnlicher Weise mit desoxy(G)-Resten
 an der Pst I-Stelle geschnitten war (67), verschweisst.
 Das verschweisste Gemisch wurde sodann in E. coli K12
 Stamm 294 transformiert. Es wurden etwa 1500 Transfor-
 35 manten erhalten.

1 b.) Southern-Hybrisierung von Humangenom-DNA

Da die cDNA-Primer-Reaktion unter Verwendung eines synthetischen Fragments, das 13 bp vom N-Ende des Klons pPA25E10 hybridisierte, durchgeführt worden war, stand in diesem 29 bp-Bereich (der die 16-mer Sequenz umfasst) kein geeignetes Restriktionsfragment zum Screening der cDNA-Klone zur Verfügung. Daher war es erforderlich, ein Humangewebe-Plasminogen-Aktivator-Genom-Klon zu isolieren, um alle Primer-erweiterten cDNA-Klone mit einem Gehalt an N-terminalen Gewebe-Plasminogen-Aktivator-kodierenden Sequenzen zu identifizieren.

Bei der ersten Stufe dieses Verfahrens wurde festgestellt, dass in Humangenom-DNA nur ein einziges, homologes Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Gen vorhanden ist. Um dies festzustellen, wurde eine Southern-Hybridisierung durchgeführt. Bei diesem Verfahren (77) wurden 5 µg hochmolekulare Humanlymphocyten-DNA (hergestellt gemäss 80) vollständig mit verschiedenen Restriktionsendonucleasen verdaut, der Elektrophorese an 1,0 prozentigen Agarosegelen unterworfen (81) und auf ein Nitrocellulosefilter geblottet (77). Ein ³²P-markierter DNA-Tracer wurde aus dem 5'-Ende des cDNA-Iserts des cDNA-Klons pPA25E10 (ein 230 bp-Hpa II -RSA I-Fragment) hergestellt (76) und mit dem Nitrocellulosefilter hybridisiert (82). 35 x 10⁶ cpm des Tracers wurden 40 Stunden hybridisiert und sodann gemäss (82) gewaschen. Zwei Endonuclease-Verdauungsmuster zeigen nur ein einziges, hybridisierendes DNA-Fragment: Bgl II (5,7 Kbp) und Pvu II (4,2 kbp). Zwei hybridisierende DNA-Fragmente wurden mit Hinc II (5,1 Kbp und 4,3 Kbp) beobachtet. Zusammen lassen diese Daten den Schluss zu, dass im Humangenom nur ein einziges Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Gen vorhanden ist und dass dieses Gen mindestens eine Zwischensequenz (intervening sequence) enthält.

1 c.) Screening der Human- λ -Phagenbibliothek auf Plasminogen-Aktivator-Gene

Die zur Identifizierung der λ -Phagenrekombinanten, die die Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Gene tragen, angewandte Strategie bestand im Nachweis der Nucleotidhomologie mit einem aus dem Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Klon pPA25E10 hergestellten, radioaktiven Tracern. 1 Million rekombinante λ -Phagen wurden in einer Dichte von 10 000 pfu/15 cm Platte auf DP 50 Sup F ausgestrichen. Nitrocellulosefilter-Replikplattierungen wurden von jeder Platte gemäss dem Verfahren von Benton und Davis (78) hergestellt. Eine ^{32}P -markierte DNA-Probe wurde nach üblichen Verfahren (83) aus einem 230 bp-Hpa II - Rsa I-Fragment, das sich in einer Entfernung von 34 bp vom 5'-Ende des Klons p25E10 befand, hergestellt. Jeder Nitrocellulosefilter wurde bei 42°C zwei Stunden in 50 millimolar Natriumphosphat (pH-Wert 6,5), 5x SSC (77), 0,05 mg/ml mit Ultraschall behandelter Lachssperma-DNA, 5x Denhardt-Lösung (84), 50 Prozent Formamid prähybridisiert und sodann mit 50×10^6 cpm der markierten Probe in der gleichen Lösung mit einem Gehalt an 10 Prozent Natriumdextransulfat hybridisiert (85). Nach Inkubation über Nacht bei 42°C wurden die Filter viermal bei 50°C 30 Minuten in 0,2x SSC, 0,1 Prozent SDS, einmal bei Raumtemperatur in 2x SSC gewaschen und sodann über Nacht auf Kodak XR-5-Röntgenfilme unter Verwendung von Dupont-Cronex-Verstärkungsfiltern aufgelegt. Insgesamt wurden 19 mit dem Tracer hybridisierte Klone erhalten. Phagen-DNA wurde gemäss den vorstehenden Angaben (86) aus 6 Rekombinanten hergestellt. Der λ -Klon C wurde zur Herstellung eines Pvu II-Fragments zum Kolonien Screening verwendet. 30 μg DNA wurden 1 Stunde bei 37°C mit Pvu II verdaut und der Elektrophorese an 1,0 prozentigem Agarosegel unterworfen. Ein 4,2 Kbp-Fragment, in dem vorher der Gehalt an Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Sequenzen nachgewiesen worden war, wurde der Elektroelution unterworfen und gereinigt. Ein ^{32}P -markierter Tracer

1 wurde nach üblichen Verfahren (83) für Kolonienhybridisierungen gemäss den vorstehenden Angaben hergestellt.

d.) Screening der Koloniebibliothek für 5'-Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Sequenzen

Die Kolonien wurden von Platten übertragen und auf Nitrocellulosefiltern gezüchtet. Die DNA der einzelnen Kolonien wurden am Filter gemäss dem Verfahren von Grunstein-Hogness (69) fixiert. Ein ^{32}P -markierter Tracer wurde durch Kalbsthymus-Primen (83) eines 4,2 kbp-Pvu II-Fragments aus einem isolierten Gewebe-Plasminogen-Aktivator- λ -Genomklon hergestellt. Filter mit einem Gehalt an 1500 Transformaten wurden mit 112×10^6 cpm des ^{32}P -Genom-Pvu II-Fragments hybridisiert.

Die Hybridisierung wurde 16 Stunden unter den Bedingungen gemäss Fritsch et al. (82) durchgeführt. Die Filter wurden gründlich gewaschen und sodann 16 bis 48 Stunden auf Kodak XR-5-Röntgenfilme unter Verwendung von Dupont-Lightning-Plus-Verstärkungsfiltern aufgelegt. 18 Kolonien hybridisierten klar mit der Genomprobe. Plasmid-DNA wurde aus jeder dieser Kolonien isoliert, an Nitrocellulosefilter gebunden und mit den für die ursprüngliche Primer-Reaktion verwendeten ^{32}P -markierten, synthetischen Oligonucleotid (16-mer) hybridisiert. Von den 18 Klonen hybridisierten 7 mit dem der Kinasebehandlung unterworfenen 16-mer. Bei der Sequenzanalyse nach Subklonierung der Fragmente in den m13-Vektor mp⁷ (73) ergab sich für einen Klon (pPA17), dass er den korrekten 5'-N-terminalen Bereich von Gewebe-Plasminogen-Aktivator, eine Signalleitsequenz (signal leader sequence) und einen 84 bp-5'-nicht-translatierten Bereich enthielt. Aus den beiden Klonen pPA25E10 und pPA17 wurde die vollständige Nucleotidsequenz gemäss Fig. 5 und das Restriktionsmuster (Fig. 4) von Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Klon von voller Länge bestimmt.

1 Beim nativen Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Molekül be-
steht die Möglichkeit zur Stabilisierung durch 17 Di-
sulfidbrücken, basierend auf der Homologie mit anderen
Serinproteasen. Es gibt vier potentielle N-Glykosylier-
5 rungsstellen, drei in den "kringle"-Bereichen bei asn₁₁₇,
asn₁₈₄, asn₂₁₈ und eine potentielle Stelle im gleichen
Kettenbereich bei asn₄₄₈. Variationen in der Struktur
der Oligosaccharid-Liganden können für die unterschied-
lichen molekularen Formen (mit Molgewichten von 65 000
10 bzw. 63 000) verantwortlich sein.

E.1.I Direkte Expression von Gewebe-Plasminogen-Aktivator- cDNA-Klon voller Länge in E. coli

15 Eine Rekonstruktion der gesamten kodierenden Sequenz war
unter Verwendung der gemeinsamen Hha I-Restriktionsendo-
nuclease-Stelle, die beide partiellen Klone pPA17 und
pPA25E10 gemeinsam besitzten, möglich. Ein 55 bp-Sau3AI-
HhaI-Restriktionsfragment, das den Aminosäuren 5-23 ent-
20 sprach, wurde aus dem Plasmid pPA17 isoliert. Die Sau3AI-
Restriktionsstelle befand sich am Kodon 4 der angenommenen
reifen, kodierenden Sequenz und wurde zur Entfernung des das
Signalpeptid kodierenden Bereichs verwendet. Ein 263 bp-
HhaI - NarI-Fragment (kodierend für die Aminosäuren 24-110)
25 wurde ebenfalls aus dem Plasmid pPA25E10 isoliert. Zwei
synthetische Desoxyoligonucleotide wurden hergestellt, die
die Kodons für die Aminosäuren 1-4 wiederherstellen, ein ATG-
translationales Initiationskodon einverleiben und ein Eco
RI-kohäsives Ende schaffen. Diese drei Fragmente wurden so-
30 dann unter Bildung eines für die Aminosäuren 1-110 kodieren-
den 338 bp-Fragments miteinander verknüpft. Dieses Fragment
und ein 1645 bp-Nar I - Bgl II-Fragment aus pPA25E10 wurden
sodann zwischen den Eco RI- und Bgl II-Stellen des Plasmids
pLeIFAt_{trp} 103 (53) unter Bildung des Expressionsplasmids
35 p_t-PA_{trp}12 verknüpft. Das geklonte t-PA-Gen wurde unter der
Kontrolle eines 300 bp-Fragments von E. coli-trp-Operon,
das den trp-Promotor, Operator und die Shine-Dalgarno-Se-
quenz des trp-Leitpeptids enthält, aber das Leitpeptid

1 ATG-Initiationskodon nicht enthält, transkribiert (52).

E. coli K12 Stamm W3110 (ATCC 27325) mit einem Gehalt am Plasmid pt-PATrp12 wurde gezüchtet. Extrakte wurden zur Be-
 5 stimmung der fibrinolytischen Aktivität hergestellt. Eine Methode zur Messung der Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Akti-
 vität war der Fibrinplattentest (87). Dabei wird die Menge an gebildetem Plasmin gemessen, indem man das Ausmass der Plasminverdauung von Fibrin in einer Agaroseplatte mit einem
 10 Gehalt an Plasminogen und Fibrin bestimmt. Plasmin ruft eine klare Lysiszone in der Fibrinplatte hervor. Aus der Fläche dieser Zone kann die Menge an in der Probe vorhandenem Ge-
 webe-Plasminogen-Aktivator ermittelt werden. Werden Extrakte von pt-PATrp12-Klonen auf die Gewebe-Plasminogen-Akti-
 15 vator-Aktivität unter Anwendung des Fibrinplattentests getestet, so ergibt sich eine klare Lysiszone. Diese fibrinolytische Aktivität wird durch anti t-PA- IgG, aber nicht durch Präimmun-IgG oder anti- Urokinase-IgG gehemmt. Keine Aktivität ergibt sich bei einem Extrakt, der aus Zellen her-
 20 gestellt ist, die zur Kontrolle das Leukocyteninterferon-plasmid pLeIFATrp103 enthalten. Unter Anwendung einer Eichkurve von gereinigtem t-PA lässt sich berechnen, dass etwa 20 units an extrahierter Aktivität pro 10^9 Zellen erhalten wurden (für gereinigtes t-PA: 90 000 Plough-units = 1 mg)
 25 (Fig. 10).

E.1.J Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse beruhte auf dem Edman-Abbau (83b). Die
 30 Probe wurde in das Probengefäss des Beckman 890B oder 890C-Sequenziergerät mit drehendem Probengefäss gegeben. Polybrene^R (Poly-N,N,N¹,N¹-tetramethyl-N-trimethylenhexamethylen-diammonium-diacetat) wurde als Träger im Gefäss verwendet.
 (63C). Das Sequenziergerät war mit einer Kühlfalle und mit
 35 einigen Programmveränderungen zur Verringerung von Hintergrundpeaks modifiziert. Als Reagentien wurden die Beckman-Reagentien für Sequenzierzwecke 0,1 m Quadrol-Puffer, Phenylisothiocyanat und Heptafluorbuttersäure verwendet.

1 Die gesammelten Edman-Zyklen wurden manuell zu 2-Anilino-
 5-thiazolinonderivaten umgesetzt. Das 1 Chlorbutan wurde
 unter Stickstoff getrocknet. Sodann wurde 1,0 n HCl in Was-
 ser zum 2-Anilino-5-thiazolinon gegeben und 10 Minuten auf
 5 70°C erwärmt, um eine Umwandlung in das 3-Phenyl-2-thio-
 hydantoin (PTH-Derivat) durchzuführen. Der PTH-Aminosäure-
 rest wurde sodann in 50 prozentigem Acetonitril in Wasser
 gelöst und in eine Hochdruck-Flüssigchromatographievorrich-
 tung mit Phasenumkehr injiziert. Die einzelnen PTH-Amino-
 10 säuren wurden durch Vergleich der Retentionszeiten eines
 Standardgemisches von PTH-Aminosäuren, die in die Konver-
 sionsflasche eingeführt und wie ein Zyklus des Sequenzier-
 geräts behandelt wurden, identifiziert.

15 E.1.K Tests zum Nachweis der Expression von Gewebe-Plasmino- gen-Aktivator

1. Direkter Test der Plasminbildung

a. Theorie

20 Ein empfindlicher Test für Gewebe-Plasminogen-Aktivator
 lässt sich durchführen, indem man die durch den Gewebe-Plas-
 minogen-Aktivator katalysierte Umwandlung von Plasminogen
 zu Plasmin ermittelt. Plasmin ist ein Enzym, für das chro-
 mogene Substrate zur Verfügung stehen. Diese Tests be-
 25 ruhen auf der proteolytischen Spaltung eines Tripeptids von
 einer chromophoren Gruppe. Die Spaltungsgeschwindigkeit ist
 direkt proportional zur Spezifität und zur Konzentration der
 zu untersuchenden Protease. Die Grundlage für diesen Test
 ist die Bestimmung der Menge an Plasmin, die nach Inkubation
 30 der den Gewebe-Plasminogen-Aktivator enthaltenden Lösung
 mit einer Plasminogenlösung entsteht. Je grösser die Aktiva-
 tormenge ist, desto grösser ist die Menge an gebildetem
 Plasmin. Plasmin wird auf Grund der Spaltung des chromogenen
 Substrats S2251 (Kabi Group, Inc., Greenwich, CT) gemessen.

35

b. Verfahren

Ein Aliquotanteil der Probe wird mit 0,10 ml 0,7 mg/ml Plas-
 minogen (in 0,05 m Tris-HCl, pH-Wert 7,4 mit einem Gehalt

1 an 0,012 m NaCl) vermischt. Das Volumen wird auf 0,15 ml ein-
 gestellt. Das Gemisch wird 10 Minuten bei 37°C inkubiert und
 mit 0,35 ml S2251 (1,0 millimolare Lösung im vorgenannten
 Puffer) versetzt. Die Umsetzung wird 30 Minuten bei 37°C
 5 fortgesetzt. Zur Beendigung der Reaktion werden 25 µl Eis-
 essig zugesetzt. Die Proben werden zentrifugiert. Die Ab-
 sorption bei 405 nm wird gemessen. Die quantitative Bestim-
 mung der Aktivität erfolgt mittels eines Vergleichs mit ei-
 ner Urokinase-Eichlösung. Die Testbedingungen zum Nachweis
 10 des Gewebe-Plasminogen-Aktivators der vollen Länge werden
 durch Zugabe von 0,2 mg Fibrinogen zur Lösung modifiziert.
 Fibrinogen bewirkt eine Stimulierung der Aktivität des Ge-
 webe-Plasminogen-Aktivators, wodurch sich eine etwas erhöh-
 te Aktivität ergibt. Die Aktivität wird in Plough-units fest-
 15 gehalten, wobei 90 000 Plough-units der Aktivität von 1 mg
 gereinigtem Gewebe-Plasminogen-Aktivator entsprechen.

2. Indirekter Test der Plasminbildung

a. Theorie

20 Es wurde ein empfindlicher Test auf die Aktivität an Gewebe-
 Plasminogen-Aktivator entwickelt (87). Der Test beruht auf der Bestim-
 mung der Plasminbildung durch Messung des Grads der Verdaue-
 ung von Fibrin durch Plasmin in einer Agarplatte mit einem
 Gehalt an Fibrin und Plasminogen. Plasmin bildet eine klare
 25 Lysiszone in der Fibrinplatte. Die Fläche dieser Lysiszone
 korreliert mit der Menge an Gewebe-Plasminogen-Aktivator in
 der Probe.

b. Verfahren

30 Gemäss dem Verfahren von Granelli-Piperno und Reich (87)
 werden die Platten 3,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Ly-
 siszonen werden gemessen. Eine quantitative Bestimmung er-
 gibt sich durch Vergleich mit einer Urokinase-Eichlösung.

35 E.1.L Nachweis der Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Aktivität

1. Bakteriellles Wachstum und Probenvorbereitung

Eine Kolonie von E. coli mit einem Gehalt an dem Plasmid

- 1 ($p\Delta RIPA^\circ$) wurde in ein Teströhrchen mit einem Gehalt an
 5 ml LB-Wachstumsmedium mit einem Gehalt an 20 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin überimpft. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C gezüchtet. Eine Aliquotmenge dieser Kultur wurde 1:100 in
 5 300 ml M-9-Medium mit einem Gehalt an 20 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin verdünnt. Die Zellen wurden 4 Stunden bei 37°C in einem Schüttelkolben gezüchtet, wobei sich eine Absorption bei 550 nm von 0,419 ergab. Die tryptophananaloge Indolacrylsäure wurde in einer Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt.
 10 Die Zellen wurden 90 Minuten inkubiert, wobei sich eine Absorption bei 550 nm von 0,628 ergab. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in 0,8 ml 0,01 m Tris vom pH-Wert 8,0 mit einem Gehalt an 0,01 m EDTA resuspendiert. Die erhaltene Suspension wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur
 15 rasch gerührt. Die Probe wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Aktivität an Gewebe-Plasminogen-Aktivator getestet.

Bezüglich der Expression von pt-PAt_{trp12} wird auf die ausführliche Erläuterung zu Fig. 10 verwiesen.

2. Aktivitätsnachweis

Die Tabellen I und II zeigen die Ergebnisse der Aktivierung von Plasminogen durch entsprechende E. coli-Extrakte. Es
 25 bildet sich eine Aktivität, die von der Anwesenheit von Plasminogen abhängig ist (Tabelle I). Diese Aktivität wird nicht durch Präimmunserum von Kaninchen beeinflusst, wird aber durch Antiserum, das gegen aus gereinigten Melanomzellen abgeleiteten Gewebe-Plasminogen-Aktivator hergestellt wurde
 30 (88), deutlich gehemmt (Tabellen I und II). Dies zeigt, dass E. coli-Extrakte eine Plasminogen aktivierende Aktivität erzeugen, die durch Antikörper gegen den Gewebe-Plasminogen-Aktivator gehemmt wird.

35 Fig. 7 zeigt das Ergebnis eines Fibrinplattentests auf fibrinolytische Aktivität. Eine Standardmenge an Urokinase wurde in die Mittelreihe in Konzentrationen (von links nach rechts) von 0,24, 0,14, 0,10, 0,05 und 0,02 Plough-units ge-

1 geben. Die untere Reihe enthält Proben von natürlichem Gewe-
 be-Plasminogen-Aktivator mit der gleichen Enzymmenge in je-
 der Vertiefung. Die Vertiefungen enthalten (von links nach
 rechts) Gewebe-Plasminogen-Aktivator, anti-Plasminogen-Akt-
 5 vator plus Präimmunserum und Gewebe-Plasminogen-Aktivator
 plus Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Antikörper. Die Vertiefun-
 gen in der oberen Reihe enthalten jeweils 8 µl der rekombi-
 nanten Gewebe-Plasminogen-Aktivator-E. coli-Extrakte. Die
 erste Vertiefung enthält das Extrakt allein, in der zweiten
 10 Vertiefung ist Präimmunserum zugesetzt und in der dritten
 Vertiefung sind Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Antikörper zu-
 gesetzt. Es ist offensichtlich, dass das Präimmunserum na-
 türlichen oder rekombinanten Gewebe-Plasminogen-Aktivator
 nicht beeinflusst und dass Gewebe-Plasminogen-Aktivator-
 15 Antikörper die Aktivität von natürlichen und von E. co-
 li-Extrakten hemmen. Bezogen auf die Urokinase-Standards
 enthalten die Extrakte geringfügig weniger als 2,5 Plough-
 units pro ml. Dies braucht den Vergleich mit dem in Tabelle
 I erhaltenen Wert von 1,3 Plough-units pro ml nicht scheuen.
 20
 In den Tabellen I und II sind die Ergebnisse der in E.1.K.
 1.b. durchgeführten Tests zusammengestellt.

Tabelle I

25 Plasminogenaktivierung durch E. coli-Extrakte von Kulturen
mit einem Gehalt an p Δ R1PA

Probe	<u>A⁴⁰⁵</u>	<u>prozentuale</u> <u>Aktivität</u>	<u>berechnete</u> <u>Plough-Units/ml</u>
30 Extrakt (ohne Plasminogen)	0,043	(0)	
Extrakt	0,451	(100)	1,3
Extrakt plus Prä- immunserum	0,477	106	---
35 Extrakt plus anti t-PA-Antikörper	0,079	9	---

¹ Prozentuale Aktivität, berechnet durch Subtraktion des Leerwerts

1 (0,043) von den erhaltenen Werten und Division durch den vom Extrakt erhaltenen Wert.

Tabelle II

5 Plasminogenaktivierung durch E. coli-Extrakte von Kulturen
von pt-PATrp12

<u>Probe</u>	<u>A₄₀₅</u>	<u>prozentuale Aktivität</u>
10 Extrakt	0,657	(100)
Extrakt plus Präimmun-serum	0,665	101
Extrakt plus anti t-PA-Antikörper	0,059	9

15 Fig. 10 gibt die Ergebnisse eines Fibrinplattentests wieder, der mit Extrakten aus 10 Liter Fermentationskulturen von E. coli mit einem Gehalt an Gewebe-Plasminogen-Aktivator exprimierendem Plasmid durchgeführt wurde. Die fibrinolytische Aktivität des Gewebe-Plasminogen-Aktivators mit einem
 20 Gehalt an dem Extrakt ist in Fig. 10 durch die Vertiefung A wiedergegeben. Diese fibrinolytische Aktivität wird durch anti-t-PA-IgG (Vertiefung C), aber nicht durch Präimmun-IgG (Vertiefung B) oder durch anti-Urokinase-IgG (Vertiefung D) gehemmt. Keine Aktivität ergibt sich bei einem Extrakt, der
 25 aus Zellen hergestellt ist, die als Kontrolle das Leukocyteninterferonplasmid pLeIFATrp103 enthalten (Vertiefung H).

E.2 Herstellung von t-PA unter Verwendung von DHFR-Protein
mit geringer Bindungsaffinität für MTX

30

E.2.A Vektoraufbau

Die Humangewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA) kodierende Sequenz wird in ein Expressionsplasmid mit einem Gehalt an
 35 mutanter DHFR mit geringer Bindungsaktivität für MTX (beschrieben in der US-Anmeldung 459 151 vom 19. Januar 1983) gemäss folgendem Verfahren (vgl. Fig. 11) eingesetzt:

1 Drei Fragmente von überlappenden t-PA-Plasmiden, nämlich
 pPA25E10, pPA17 und p Δ RIPA^o (vgl. oben) wurden folgender-
 massen hergestellt: Plasmid pPA17 wurde mit Dde I verdaut,
 unter Verwendung von Klenow DNA-Polymerase I gefüllt und mit
 5 PstI geschnitten. Das auf diese Weise gebildete Fragment mit
 etwa 200 bp mit einem Gehalt an der 5'-terminalen t-PA-Se-
 quenz wurde isoliert. Das zweite t-PA-Fragment wurde durch
 Verdauen von p Δ RIPA^o mit PstI und NarI und Isolieren des
 Fragments mit etwa 310 bp erhalten. Das dritte t-PA-Fragment wurde
 10 durch Verdauen von pPA25E10 mit NarI und BglII und Isolieren
 des etwa 1645 bp aufweisenden Fragments, das zusätzlich zu
 einem Grossteil des t-PA-kodierenden Bereichs einige 3'-
 nicht-translatierte Sequenzen enthält, erhalten.

15 Das Plasmid pE342, das HBV-Oberflächenantigen exprimiert
 (auch bezeichnet als pHBs348-E)) ist in der US-Patentanmel-
 dung 326 980 vom 03. Dezember 1981 beschrieben. Kurz zusam-
 mengefasst, wurde die Startstelle des Simian-Virus SV 40
 durch Verdauen von SV 40-DNA mit HindIII und Umwandeln der
 20 HindIII-Enden zu Eco RI-Enden durch Zugabe eines Konverters
 (AGCTGAATTC) isoliert. Diese DNA wurde mit PvuII geschnitten
 und mit RI-Linkern versetzt. Durch anschliessende Verdauung
 mit Eco RI wurde das 348 bp-Fragment, das die Startstelle
 umspannt, durch Elektrophorese an Polyacrylamidgel und Elek-
 25 troelution isoliert und in pBR322 geklont. Das Expressions-
 plasmid pHBs348-E wurde durch Klonen des 1986 bp-Fragments,
 das durch Eco RI- und BglII-Verdauung von HBV (Animal Virus
 Genetics, (Ch.5) Acad. Press, N.Y., 1980) (das das HBsAg
 kodierende Gen umspannt) erhalten worden ist, in das Plas-
 30 mid pML (Lusky et al., Nature, Bd. 293 (1981), S. 79) an
 den Eco RI- und BamHI-Stellen aufgebaut. (pML ist ein Deri-
 vat von pBR322, das eine Deletion unter Weglassen von Se-
 quenzen, die eine Hemmung der Plasmidreplikation in Affen-
 zellen bewirken, aufweist). Das erhaltene Plasmid (pRI-Bgl)
 35 wurde dann mit Eco RI linearisiert, und das 348 bp-Fragment,
 das den SV 40-Startbereich repräsentiert, wurde in die Eco
 RI-Stelle von pRI-Bgl eingeführt. Das Startstellenfragment
 kann in beliebiger Orientierung eingesetzt werden. Da dieses

1 Fragment sowohl die frühen als auch die späten SV 40-Promotoren zusätzlich zur Replikationsstartstelle kodiert, konnten HBV-Gene unter der Kontrolle beider Promotoren je nach dieser Orientierung (pHBS348-E repräsentiert HBs, das unter
5 der Kontrolle des frühen Promotors exprimiert ist) exprimiert werden. pE342 ist durch teilweise Verdauung mit Eco RI, Füllen der Spaltungsstelle unter Verwendung von Klenow-DNA-Polymerase I und Rückligation des Plasmids modifiziert, wodurch die Eco RI-Stelle, die der SV 40-Ursprungsstelle
10 in pE342 vorausgeht, entfernt wird. Das erhaltene Plasmid, als pE342 Δ RI bezeichnet, wird mit Eco RI verdaut, unter Verwendung von Klenow-DNA-Polymerase I gefüllt und mit Bam HI geschnitten. Nach Elektrophorese an Acrylamidgel wird das
15 Fragment mit etwa 3500 bp auf die vorstehend erläuterte Weise der Elektroelution unterworfen, mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Äthanol gefällt.

Der auf diese Weise hergestellte p342E-3500 bp-Vektor und die vorstehend beschriebenen t-PA-Fragmente mit etwa 2160
20 bp werden unter Anwendung von üblichen Techniken miteinander ligiert. Ein Plasmid mit einem Gehalt an den drei t-PA kodierenden Fragmenten in richtiger Orientierung wurde isoliert, charakterisiert und als pE342-t-PA bezeichnet. Dieses Plasmid wurde mit Sac II verdaut und mit bakterieller alkalischer Phosphatase (BRL) behandelt. Zur Erzeugung der
25 DHFR-Sequenz (zusammen mit Kontrollsequenzen für dessen Expression) wurde ein Fragment mit etwa 1700 bp durch SacII-Verdauung von pEHER erzeugt. (pEHER ist ein Plasmid, das mutante DHFR exprimiert; vgl. US-Patentanmeldung 459 151
30 a.a.O.). Dieses Fragment wurde in das pE342-t-PA-Plasmid unter Bildung von pEdPAER400, einem Plasmid, das analog zu pEHER ist, mit der Ausnahme, dass der HBsAg kodierende Bereich durch die cDNA-Sequenzen aus t-PA ersetzt ist, ligiert.

35 E.2.B Expression und Amplifikation der t-PA-Sequenz

pETPAER400 (pETPER) wurde gemäss dem Verfahren von Graham und Van der Eb (vgl. oben) sowohl in dhfr⁻ CHO-DUX B11-Zel-

1 len als auch in DHFR⁺ CHO-K1 (ATCC CCL61) transfiziert.

Transformierte dhfr⁻-Zellen wurden durch Züchtung in einem Medium mit einem Mangel an Glycin, Hypoxanthin und Thymidin ausgewählt. Transformierte DHFR⁺-Zellen wurden durch Züchtung in ≥ 100 nanomolar MTX ausgewählt. Kolonien, die im entsprechenden Selektionmedium entstanden, wurden unter Verwendung von Klonierungsringen isoliert und im gleichen Medium auf mehrere Generationen vermehrt.

10 Zur Amplifikation wurden die Zellen aus den Kolonien in Medien mit einem Gehalt an 5×10^4 , 10^5 , $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 und 10^6 nanomolar MTX aufgeteilt und mehrmals passagiert. Die Zellen wurden in sehr niedrigen Zelldichten (10^2 - 10^3 Zellen/Platte) in 10 cm-Schalen ausgestrichen. Die erhaltenen Kolonien wurden isoliert.

E.2.C Testmethoden

Die Expression von t-PA in den transfizierten, amplifizierten Kolonien kann zweckmässigerweise nach ähnlichen Verfahren bestimmt werden, wie sie vorstehend unter D.1.K.1.b angegeben sind.

Die Koamplifikation von DHFR- und t-PA-Sequenzen wird durch Isolierung von DNA aus konfluenten Monolayers von amplifizierten Kolonien folgendermassen bestimmt: Konfluente Monolayers in 150 mm Platten werden mit 50 ml steriler PBS gewaschen und durch Zugabe von 5 ml 0,1 Prozent SDS, 0,4 m CaCl₂, 0,1 m EDTA, pH-Wert 8 lysiert. Nach 5 bis 10 Minuten wird das Gemisch entfernt, mit Phenol und Chloroform extrahiert und mit Äthanol gefällt. Die DNA wird in 1 ml (pro 150 mm-Platte) 10 millimolar Tris-HCl, pH-Wert 8,1 millimolar EDTA (TE) resuspendiert. 0,1 mg/ml RNase werden zugesetzt und die Lösung wird 30 Minuten bei 37°C inkubiert. So- dann wird 0,1 Prozent SDS und 0,5 mg/ml Pronase (Sigma) zugegeben. Nach 3- bis 16-stündiger Inkubation bei 37°C wird die Lösung wieder mit Phenol und Chloroform extrahiert und mit Äthanol gefällt. Das DNA-Pellet wird in 0,5 ml Wasser

1 resuspendiert und mit Restriktionsenzymen verdaut. Etwa 5
 bis 10 µg der verdauten DNA werden der Elektrophorese in
 einem Agarosegel (1 Prozent Agarose in Tris-Acetat-Puffer
 (40 millimolar Tris, 1 millimolar EDTA, mit Essigsäure auf
 5 den pH-Wert 8,2 eingestellt)) unterworfen; vgl. Crouse et
 al., J. Biol. Chem., Bd. 257 (1982), S. 7887. Nachdem Brom-
 phenolblau-Farbstoff im Gel 2/3 der Strecke nach unten ge-
 wandert ist, wird das Gel entfernt und mit Ethidiumbromid
 gefärbt. Nach Sichtbarmachen der DNA mit UV-Licht wird die
 10 DNA gemäss dem Verfahren von Southern, J. Mol. Biol., Bd. 98
 (1975), S. 503, auf Nitrocellulosefilter übertragen. Die
 Filter werden sodann mit einem der Nick-Translation unter-
 worfenen Tracer, der aus dem 1700 bp-SacII-Fragment von
 pEHER (hergestellt und hybridisiert auf die vorstehend be-
 15 schriebene Weise) oder aus dem etwa 1970 bp umfassenden
 BglIII-Fragment von pETPER hergestellt worden ist, unterzo-
 gen.

20 E.3 Herstellung von t-PA in Konjunktion mit Wildtyp-DHFR-Protein

E.3.A Vektoraufbau

Auf analoge Weise wie beim Aufbau von pETPER wird ein Plas-
 25 mid mit einem Gehalt an der DNA-Sequenz, die Wildtyp-DHFR
 kodiert, nämlich pETPFR, aufgebaut. Der Aufbau erfolgt ge-
 mäss Beispiel C.1.A mit der Ausnahme, dass an Stelle des
 Plasmids pEHER als Quelle für die DHFR-Protein-Gensequenz
 das Plasmid pE342.HBV.E400.D22 (vgl. Genentech-Anmeldung
 30 mit dem internen Aktenzeichen 100/92) verwendet wurde. Das
 Plasmid pE342.HBV.E400.D22 ist das gleiche wie pEHER, mit
 Ausnahme eines Unterschieds bezüglich eines einzigen Basen-
 paars zwischen Wildtyp- und Mutanten-DHFR. Somit ist das
 erhaltene Plasmid pETPFR in jeder Weise zu pETPER analog,
 35 mit der Ausnahme, dass die für Wildtyp-DHFR kodierende DNA-
 Sequenz durch die Sequenz der Mutante ersetzt ist.

1 E.3.B Expression der t-PA-Sequenz

pETPFR wurde zur Transfektion von CHO-Zellen mit DHFR-Mangel (Urlaub und Chasin, a.a.O.) unter Verwendung des Calcium-phosphat-Fällungsverfahrens gemäss Graham und Van der Eb verwendet. 21 Kolonien, die auf dem selektiven Medium (-HGT) entstanden, wurden durch Nachweis der Plasminbildung bestimmt. Dieser Nachweis erfolgte auf Grund der Verdauung von Fibrin in einer Agarplatte mit einem Gehalt an Fibrin und Plasminogen gemäss Granelli-Piperno et al., J. Exp. Med., Bd. 148 (1978), S. 223.

Vier der besten positiven Klone wurden dann quantitativ auf Plasminbildung pro Zelle gemäss dem in D.2.C erläuterten Verfahren getestet.

Auf Grund dieser quantitativen Bestimmung wurde festgestellt, dass die vier untersuchten Klone bei der Bestimmung von units/Zelle/Tag die gleiche oder eine vergleichbare Sekretion von t-PA in das Medium aufwiesen. Subklone wurden hergestellt, indem Inocula aus zwei der Klone in getrennte Platten mit einem Gehalt an -HGT-Medium übertragen wurden. Zwei der erhaltenen Subklone, 18B und 1, wurden für die weitere Analyse herangezogen.

25

E.3.C Amplifikation und Grad der t-PA-Bildung

Die vorerwähnten Subklone wurden in einer Menge von 2×10^5 Zellen pro 100 mm-Platten in 50 nanomolar MTX ausgestrichen, um die Amplifikation zu fördern. Die überlebenden Zellen ergaben bei der vorstehend beschriebenen Bestimmung in sämtlichen Fällen im Vergleich zur unverstärkten Menge an Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Aktivität die 10-fache Aktivität. Zwei dieser Klone wurden für die weitere Untersuchung ausgewählt und als 1-15 und 18B-9 bezeichnet.

Der Subklon 1-15 wurde weiter durch Überimpfen von 2×10^5 Zellen in 100 mm-Platten mit einem Gehalt an 500 nanomolar

1 MTX verstärkt. Die Bestimmung der auf diese Weise amplifi-
 zierten Zellen ergab einen weiteren Anstieg (etwa um das
 3-fache) in Bezug auf die t-PA-Bildung. Bei quantitativer
 Bestimmung gemäss dem Verfahren von C.1.C ergaben sich Men-
 5 gen im Bereich von 7×10^{-4} units/Zelle/Tag. Ein Teil dieser
 amplifizierten Zellen wurde sodann übertragen und in Gegen-
 wart von 10 000 nanomolar MTX erhalten. Subklone von 1-15
 und 18B-9 wurden, nachdem sie etwa 1 bis 2 Monate unter den
 in Tabelle 1' angegebenen Bedingungen gehalten worden waren,
 10 weiter getestet.

Tabelle 1'

	<u>Zelllinie</u>	<u>Wachstumsbedingungen</u>	<u>ng t-PA/Zelle/Tag*</u>
15	1-15 ₅₀₀	500 nanomolar MTX	$28,5 \times 10^{-3}$
	1-15 ₅₀₀	500 nanomolar MTX	$26,0 \times 10^{-3}$
	1-15 ₅₀₀	(-HGT-Medium, kein MTX)	$8,3 \times 10^{-3}$
	1-15 ₅₀₀	(-HGT-Medium, kein MTX)	$18,0 \times 10^{-3}$
20	1-15 _{10 000}	10 mikromolar MTX	$29,3 \times 10^{-3}$
	1-15 _{10 000}	10 mikromolar MTX	$49,0 \times 10^{-3}$
	18B-9	50 nanomolar MTX	$14,3 \times 10^{-3}$
	18B-9	50 nanomolar MTX	$14,4 \times 10^{-3}$
25	18B-9	(-HGT-Medium, kein MTX)	$14,3 \times 10^{-3}$
	18B-9	(-HGT-Medium, kein MTX)	$14,4 \times 10^{-3}$
	1	(-HGT-Medium, kein MTX)	$1,0 \times 10^{-3}$
	1	(-HGT-Medium, kein MTX)	$0,7 \times 10^{-3}$

30 * t-PA im Kulturmedium wurde quantitativ durch einen Radio-
 immunoassay folgendermassen bestimmt: Gereinigter t-PA und
 gereinigter, jodierter Tracer-t-PA, die aus Melanomzellen
 abgeleitet waren, wurden Serienverdünnungen auf Konzentra-
 tionen von 12,5 bis 400 ng/ml in einem Puffer mit einem Ge-
 halt an phosphatgepufferter Kochsalzlösung, pH-Wert 7,3,
 0,5 Prozent Rinderserumalbumin, 0,01 Prozent Tween 80 und
 35 0,02 Prozent Na₂S₂O₃ unterzogen. Entsprechende Verdünnungen
 der zu untersuchenden Mediumproben wurden zu radioaktiv
 markierten Tracerproteinen gegeben. Man liess die Antigene
 über Nacht bei Raumtemperatur in Gegenwart einer 1:10 000-
 Verdünnung der IgG-Fraktion von Kaninchen-anti-t-PA-Anti-

1 serum inkubieren. Der Antikörper-Antigen-Komplex wurde durch
 zweistündige Absorption bei Raumtemperatur an Ziegen-anti-
 Kaninchen-IgG-Immunokügelchen (Immunobeads, BioRad) präzipi-
 tiert. Die Kügelchen wurden durch Zugabe von Kochsalzlösung-
 Verdünnungsmittel geklärt und sodann 10 Minuten bei 2000 g
 bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Die
 5 Radioaktivität der Niederschläge wurde ermittelt. Die Kon-
 zentrationen wurden durch Vergleich mit Eichstandards fest-
 gelegt.

Es handelte sich um folgende Zelllinien: Zelllinie "1" ist
 10 ein nicht-amplifizierter Klon aus dem ursprünglichen Satz
 von vier Klonen. "1-15₅₀₀" ist ein amplifizierter Subklon
 der Zelllinie "1", die zunächst in 50 nanomolar MTX unter
 Bildung von 1-15 amplifiziert und sodann zur weiteren Ampli-
 fikation in 500 nanomolar MTX übertragen worden ist.
 15 1-15_{10 000} ist ein Subklon von 1-15₅₀₀, der weiter in Gegen-
 wart von 10 000 nanomolar MTX amplifiziert worden ist. Die
 Zelllinie 18B-9 ist ein Subklon von einem der ursprünglichen
 vier nachgewiesenen Klone, der mit 50 nanomolar MTX ampli-
 fiziert worden ist.

20 Sämtliche amplifizierten Zellen zeigen eine erhöhte t-PA-
 Bildung im Vergleich zur nicht-amplifizierten Zellkultur.
 Auch die nicht-amplifizierte Kultur bildet t-PA-Mengen von
 mehr als 0,5 pg/Zelle/Tag. Durch Amplifikation nähert man
 25 sich der Menge von 50 pg/Zelle/Tag.

F. Arzneimittel

Die Verbindungen der Erfindung können nach an sich bekannten
 30 Verfahren zu Arzneimitteln formuliert werden, wobei das er-
 findungsgemäße Humangewebe-Plasminogen-Aktivator-Produkt
 mit einem pharmakologisch verträglichen Träger vermischt
 wird. Entsprechende Träger und deren Herstellung, unter Ein-
 schluss von anderen Humanproteinen, wie Humanserumalbumin,
 35 sind zum Beispiel in Remington's Pharmaceutical Sciences,
 E. W. Martin, erläutert. Diese Arzneimittel enthalten eine
 wirksame Menge des erfindungsgemässen Proteins zusammen mit
 einer entsprechenden Trägerstoffmenge, so dass pharmakolo-

1 gisch verträgliche Arzneimittel, die sich zur wirksamen Verabreichung an einen Wirt eignen, gebildet werden.

Beispielsweise kann der erfindungsgemässe Humangewebe-Plasminogen-Aktivator parenteral an Patienten, die an kardiovaskulären Krankheiten oder Zuständen leiden, verabreicht werden. Die Dosierung bei Patienten mit Pulmonarembolie kann entsprechend der gegenwärtigen Praxis bei klinischen Untersuchungen von anderen kardiovaskulären, thrombolytischen Mitteln erfolgen, zum Beispiel durch eine intravenöse Anfangsdosis von etwa 440 IU/kg Körpergewicht, gefolgt von einer 12-stündigen, kontinuierlichen, intravenösen Infusion von etwa 440 IU/kg/Stunde.

15 Ein Beispiel für eine entsprechende Dosierungsform für im wesentlichen homogenen Humangewebe-Plasminogen-Aktivator zur parenteralen Verabreichung sind Fläschchen mit einem Gehalt an 25 000 IU Gewebe-Plasminogen-Aktivator-Aktivität, 25 mg Mannit und 45 mg NaCl, die für die intravenöse Verabreichung mit 5 ml sterilem Wasser für Injektionszwecke rekonstituiert und mit einem entsprechendem Volumen an 0,9 prozentiger Natriumchloridlösung oder 5 prozentiger Dextro-
20 selösung für Injektionszwecke vermischt werden können.

25 G. Ausführliche Beschreibung von rekombinanter human t-PA

Die Struktur des gemäss den Beispielen hergestellten human t-PA wurde näher untersucht, und zwar sowohl durch Aufklärung der Genkodierungssequenz und durch biochemische Proteinuntersuchungstechniken. Gegenwärtig nimmt man die in
30 Fig. 12 dargestellte Proteinstruktur an.

Durch Collen et al. (88) wurde auch nachgewiesen, dass zweikettiger human t-PA durch proteolytische Spaltung des
35 kettigen Moleküls in zwei durch Disulfidbindung verbundene Polypeptide erfolgt. Die gegenwärtigen Befunde erlauben den Schluss, dass die schwere Kette (Molekulargewicht 30 882) sich vom NH₂-terminalen Teil ableitet und die leichte Kette

1 (Molekulargewicht 28 126) den COOH-terminalen Bereich um-
fasst. Die N-terminale Sequenzierung des zweikettigen Mole-
küls legt den Schluss nahe, dass die zweikettige Form durch
Spaltung einer einzigen Arginyl-Isoleucin-Bindung entsteht
5 (Fig. 12, Pfeil).

Die primäre Struktur eines Teils des Bereichs der schweren
Kette von human t-PA (Fig. 12) zeigt ein hohes Ausmass an
Sequenzhomologie mit den "kringle"-Bereichen von Plasmino-
10 gen (89) und Prothrombin (40, 41). Der "kringle"-Bereich
bezieht sich auf eine charakteristische, dreifache Disulfid-
struktur im "pro"-Fragment von Prothrombin, was zunächst von
Magnusson et al. (91, 92) näher beschrieben wurde. In der
Primärsequenz von t-PA sind zwei sogenannte "kringle"-Berei-
15 che von jeweils 82 Aminosäuren erkennbar, die ein hohes Aus-
mass an Homologie mit den 5 "kringle"-Bereichen von Plasmi-
nogen zeigen. Die restlichen N-terminalen 91 Aminosäuren
zeigen wenig Homologie mit dem üblichen "kringle"-Bereich.
Es lässt sich jedoch vermuten, dass dieser Bereich ebenfalls
20 eine Struktur mit einem Gehalt an mehrfachen Disulfidbin-
dungen annehmen kann, da dort 11 weitere Cysteinreste vor-
handen sind.

Das katalytische Zentrum der leichten Kette von human t-PA,
25 der sogenannte Serinproteasebereich ist wie bei anderen Se-
rinenzymen vermutlich aus den Resten Histidin₃₂₂, Aspara-
ginsäure₃₇₁ und Serin₄₇₈ gebildet. Ferner zeigen diese
Reste umgebenden Aminosäuresequenzen eine starke Homologie
zu entsprechenden Teilen anderer Serinproteasen, wie Tryp-
30 sin, Prothrombin und Plasminogen.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von Humangewebe-Plasminogen-Aktivator (HPA, gekennzeichnet dadurch, daß eine Expression von DNA, die HPA kodiert, in einer rekombinanten Wirtszelle durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man
 - a) einen replizierbaren Expressionsvektor herstellt, der zur Expression der HPA kodierenden DNA-Sequenz in einer geeigneten Wirtszelle in der Lage ist,
 - b) eine Wirtszellenkultur zur Bildung einer rekombinanten Wirtszelle transformiert,
 - c) die rekombinanten Wirtszellen unter Bedingungen züchtet, die eine Expression der HPA kodierenden DNA-Sequenz zur Bildung von HPA erlauben, und
 - d) HPA gewinnt.
3. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß man die Wirtszellenkultur mit dem Plasmid oder pt-PATrp 12 transformiert.
4. Verfahren nach Punkt 2 oder 3, gekennzeichnet dadurch, daß man eine Mikroorganismenkultur oder Zellkultur verwendet.
5. Verfahren nach Punkt 4, gekennzeichnet dadurch, daß man einen E. coli-Stamm verwendet.
6. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß ein HPA hergestellt wird, der nicht von assoziierter nativer Glycosylierung begleitet ist.
7. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß ein HPA hergestellt wird, der eine Polypeptidsequenz enthält, die sich vom N-Ende der üblicherweise ersten Aminosäure des HPA erstreckt.

Hierzu 14 Seiten Zeichnungen

Literaturverzeichnis

1. US-A-3355361.
2. US-A-3926727.
3. US-A-4029767.
4. US-A-4258030.
5. US-A-4271150.
6. EP-A-0037687.
7. Rijken, D.C., "Plasminogen Activator from Human Tissue",
Krips Repro Meppel, 1980.
8. US-A-3555000.
9. US-A-3998947.
10. US-A-4245051.
11. EP-A-0023860.
12. US-A-4083961.
13. US-A-4177262.
14. US-A-3082612.
15. Wallen, P., Proc. Seroonc Symp. 9, 91 (1977).
16. Thorsen, S., et al., Thrombos. Diathes. haemorrh. 28,
65 (1972).

17. Collen, Thrombos. Haemostas. 43, 77 (1980).

18. Wiman et al., Nature 272, 549 (1978).

5 19. EP-A-0041766.

20. Weimar, W., et al., The Lancet Vol. II, No. 8254, p. 1018 (1981).

10 21. GB-A-2007676A.

22. Wetzel, American Scientist 68, 664 (1980).

23. Microbiology, 2d Ed., Harper and Row Publications, Inc.,
15 Hagerstown, Maryland (1973), esp. pp. 1122 et seq.

24. Scientific American 245, 106 (1981).

25. GB-A-2055382A.

20 26. DE-A-2644432.

27. Chang et al., Nature 275, 617 (1978).

25 28. Itakura et al., Science 198, 1056 (1977).

29. Goeddel et al., Nucleic Acids Research 8, 4057 (1980).

30. EP-A-0036776.

31. Siebenlist et al., Cell 20, 269 (1980).

32. Stinchcomb et al., Nature 282, 39 (1979).

35 33. Kingsman et al., Gene 7, 141 (1979).

34. Tschumper et al., Gene 10, 157 (1980).
35. Mortimer et al., Microbiological Reviews 44, 519 (198).
- 5 36. Miozzari et al., Journal of Bacteriology 134, 48 (1978).
37. Jones, Genetics 85, 23 (1977).
- 10 38. Hitzeman, et al., J. Biol. Chem. 255, 12073 (1980).
39. Hess et al., J. Adv. Enzyme Regul. 7, 149 (1968).
40. Holland et al., Biochemistry 17, 4900 (1978).
- 15 41. Bostian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 4504 (1980).
42. The Molecular Biology of Yeast (Aug 11-18, 1981), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 20 43. Chambon, Ann. Rev. Biochemistry, 44, 613 (1975).
44. Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson eds, (1973).
- 25 45. Gluzman, Cell 23, 175 (1981).
46. Bolivar et al., Gene 2, 95 (1977).
47. Lusky et al., Nature 293, 79 (1981).
- 30 48. Gluzman et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 44, 293 (1980).
49. Fiers et al., Nature 273, 113 (1978).
- 35 50. Reddy et al., Science 200, 494 (1978).

51. Crea et al., Nucleic Acids Research 8, 2331 (1980).
52. Goeddel et al., Nature 287, 411 (1980).
- 5 53. Gray et al., Nature 295, 503 (1982).
54. Oppermann et al., Virology 108, 47 (1981).
- 10 55. Ward et al., J. Virol. 9, 61 (1972).
56. Aviv et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 1408 (1972).
57. Lehrach et al., Biochemistry 16, 4743 (1977).
- 15 58. Lynch et al., Virology 98, 251 (1979).
59. Lodish, Am. Rev. of Biochem. 45, 40 (1976).
- 20 60. Pelham et al., Eur. J. Biochem. 43, 247 (1976).
61. Blobel, et al., J. Cell Biology 67, 852 (1975).
62. Shields et al., J. Biol. Chemistry 253, 3753 (1978).
- 25 63. Laemmli, Nature 227, 680 (1970).
64. Bonner et al., Eur. J. Biochem. 46, 83 (1974).
65. Goeddel et al., Nature 281, 544 (1979).
- 30 66. Wickens et al., J. Biol. Chem. 253, 2483 (1978).
67. Chang et al., Nature 275, 617 (1978).
- 35 68. Bolivar et al., Gene 2, 95 (1977).

69. Grunstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3961 (1975).
70. Hanahan et al., Gene 10, 63 (1980).
- 5 71. Birnboim et al., Nucleic Acids Res. 7, 1513 (1979).
72. Smith, Methods Enzymol. 65, 499 (1980).
73. Messing et al., Nucleic Acids Res. 9, 309 (1981).
- 10 74. Maxam et al., Methods in Enzymol. 65, 499 (1980).
75. Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5765 (1978).
- 15 76. Lawn et al., Cell 15, 1157 (1978).
77. Southern, J. Mol. Biol. 98, 503 (1975).
78. Benton et al., Science 196, 180 (1977).
- 20 79. McGrath and Levinson, Nature 295, 423 (1982).
80. Blin et al., Nucleic Acid Res. 3, 2303 (1976).
- 25 81. Lawn et al., Science 212, 1159 (1981).
82. Fritsch et al., Cell 19, 959 (1980).
83. Taylor et al., Biochem. Biophys. Acta 442, 324 (1976).
- 30 83b. Edman et. al., European J. Biochem. 1, 80 (1967).
84. Denhardt, Biochem. Biophys. Res. Comm. 23, 641 (1966).
- 35 85. Wahl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 3683 (1979).

86. Davis et al., Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1980).
- 5 87. Granelli-Piperno et al., J. Exp. Med. 148, 223.
88. Rijken et al., J. Biol. Chem. 256, 7035 (1981).
89. Sottrup-Jensen et al., Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol. 3, Raven Press, N.Y. p. 191 (1978)
- 10 90. Sottrup-Jensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 2577 (1975).
91. Magnussen et al., Proteolysis and Physiological Regulation, Ribbons et al., Eds., Academic Press, New York, p. 203 (1976).
- 15 92. Magnussen et al., Proteases and Biological Control, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., p. 123 (1975).
93. Miller, Experiments in Molecular Genetics, p. 431-3, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York (1972).
- 20 94. Reich, E., Proteases and Biological Control, (Ibid) p. 333-341.
95. Matsuo, O., et al., Throm. Haemostasis 45 225 (1981).
- 25 96. Koringe, C., et al., Throm. Haemostasis 46 561, 662 (1981).
97. Hoylaerts, M., et al., J. Biol. Chem. 257 2912 (1982).
- 30 98. Koringe, C., et al., Thromb. Haemostasis 46 685 (1981).
- 35

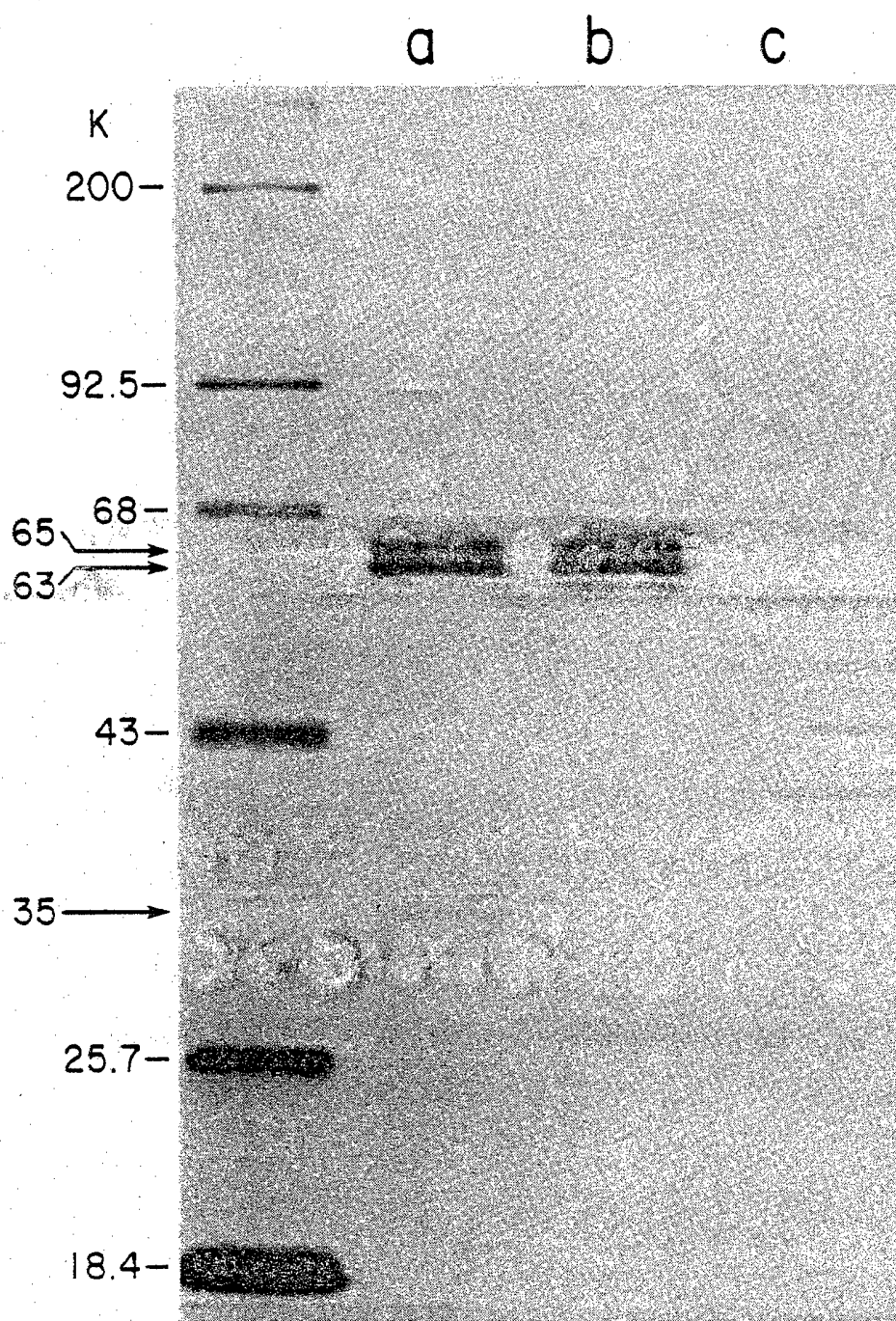
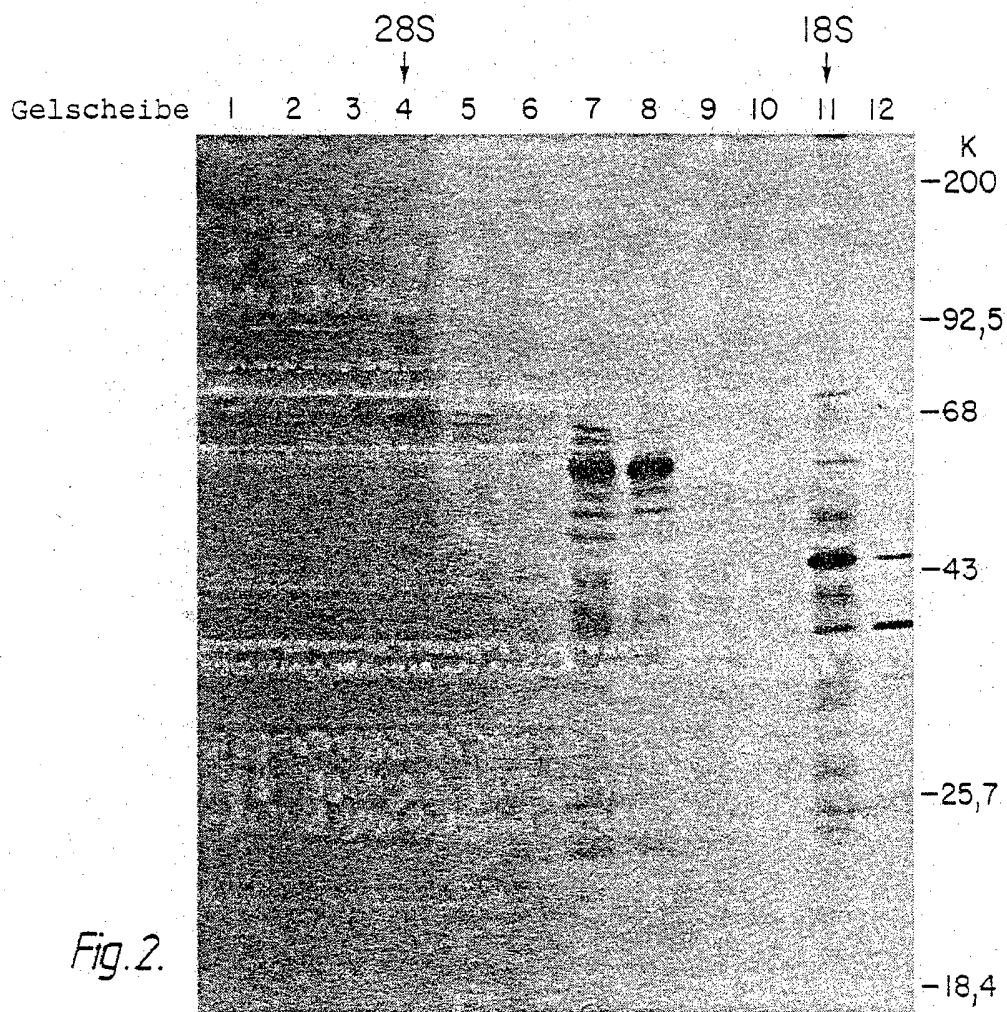


Fig.1.



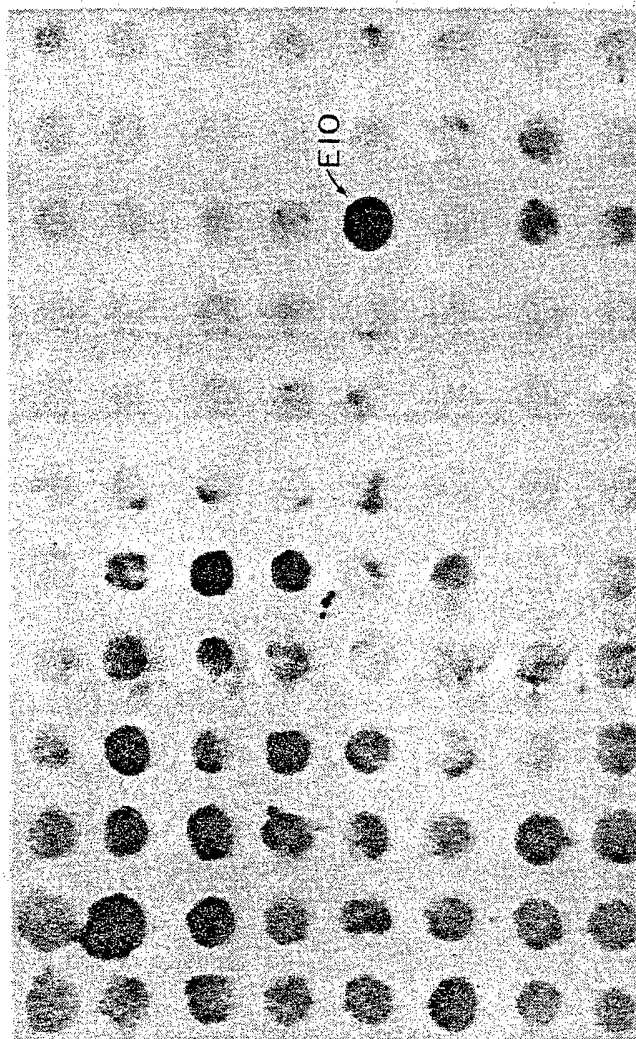
KOLONIEHYBRIDISIERUNG

RNA Gelscheibe 7 cDNA-Klone

Fig. 3.

gegen

^{32}P -TC(A)₆CA(A)₆TA($\frac{C}{T}$)TCCCA-Tracer



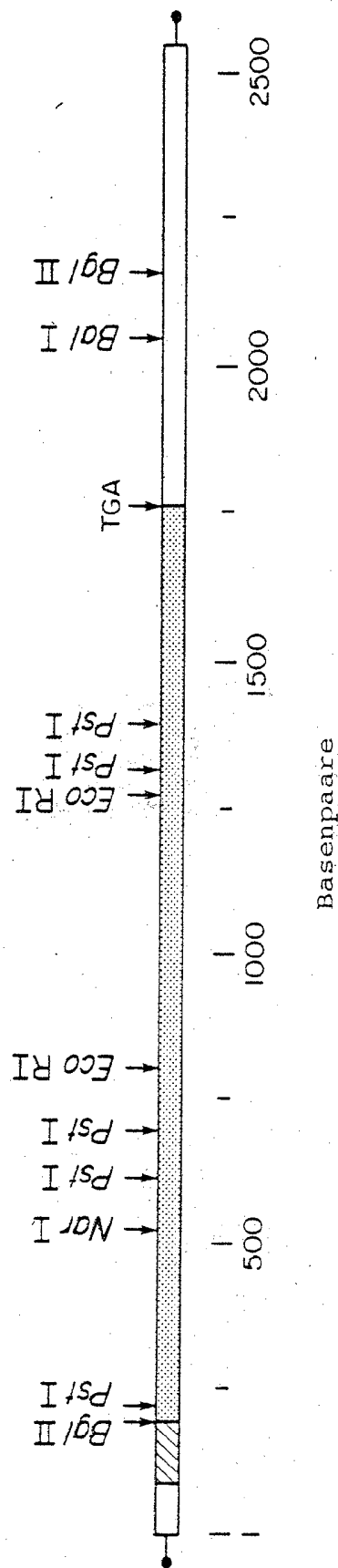


Fig. 4.

190
 ASN GLY SER ALA TYR ARG GLY THR HIS SER LEU THR GLU SER GLY
 AAT GGG TCA GCC TAC CGT GGC ACG CAC AGC CTC ACC GAG TCG GGT

200
 ALA SER CYS LEU PRO TRP ASN SER MET ILE LEU ILE GLY LYS VAL
 GCC TCC TGC CTC CCG TGG AAT TCC ATG ATC CTG ATA GGC AAG GTT

210
 TYR THR ALA GLN ASN PRO SER ALA GLN ALA LEU GLY LEU GLY LYS
 TAC ACA GCA CAG AAC CCC AGT GCC CAG GCA CTG GGC CTG GGC AAA

220
 HIS ASN TYR CYS ARG ASN PRO ASP GLY ASP ALA LYS PRO TRP CYS
 CAT AAT TAC TGC CGG AAT CCT GAT GGG GAT GCC AAG CCC TGG TGC

230
 HIS VAL LEU LYS ASN ARG LEU THR TRP GLU TYR CYS ASP VAL
 CAC GTG CTG AAG AAC CGC AGG CTG ACG TGG GAG TAC TGT GAT GTG

240
 PRO SER CYS SER THR CYS GLY LEU ARG GLN TYR SER GLN PRO GLN
 CCC TCC TGC TCC ACC TGC GGC CTG AGA CAG TAC AGC CAG CCT CAG

250
 PHE ARG ILE LYS GLY GLY LEU PHE ALA ASP ILE ALA SER HIS PRO
 TTT CGC ATC AAA GGA GGG CTC TTC GCC GAC ATC GCC TCC CAC CCC

260
 TRP GLN ALA ALA ILE PHE ALA LYS HIS ARG ARG SER PRO GLY GLU
 TGG CAG GCT GCC ATC TTT GCC AAG CAC AGG AGG TCG CCC GGA GAG

270
 ARG PHE LEU CYS GLY GLY ILE LEU ILE SER SER CYS TRP ILE LEU
 CGG TTC CTG TGC GGG GGC ATA CTC ATC AGC TCC TGC TGG ATT CTC

280
 SER ALA ALA HIS CYS PHE GLN GLU ARG PHE PRO PRO HIS HIS LEU
 TCT GCC GCC CAC TGC TTC CAG GAG AGG TTT CCG CCC CAC CAC CTG

290
 THR VAL ILE LEU GLY ARG THR TYR ARG VAL VAL PRO GLY GLU GLU
 ACG GTG ATC TTG GGC AGA ACA TAC CGG GTG GTC CCT GGC GAG GAG

300
 GLU GLN LYS PHE GLU VAL GLU LYS TYR ILE VAL HIS LYS GLU PHE
 GAG CAG AAA TTT GAA GTC GAA AAA TAC ATT GTC CAT AAG GAA TTC

310
 ASP ASP ASP THR TYR ASP ASN ASP ILE ALA LEU LEU GLN LEU LYS
 GAT GAT GAC ACT TAC GAC AAT GAC ATT GCG CTG CTG CAG CTG AAA

320
 SER ASP SER SER ARG CYS ALA GLN GLU SER SER VAL VAL ARG THR
 TCG GAT TCG TCC CGC TGT GCC CAG GAG AGC AGC GTG GTC CGC ACT

330
 VAL CYS LEU PRO PRO ALA ASP LEU GLN LEU PRO ASP TRP THR GLU
 GTG TGC CTT CCC CCG GCG GAC CTG CAG CTG CCG GAC TGG ACG GAG

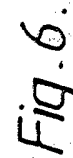
340
 CYS GLU LEU SER GLY TYR GLY LYS HIS GLU ALA LEU SER PRO PHE
 TGT GAG CTC TCC GGC TAC GGC AAG CAT GAG GCC TTG TCT CCT TTC

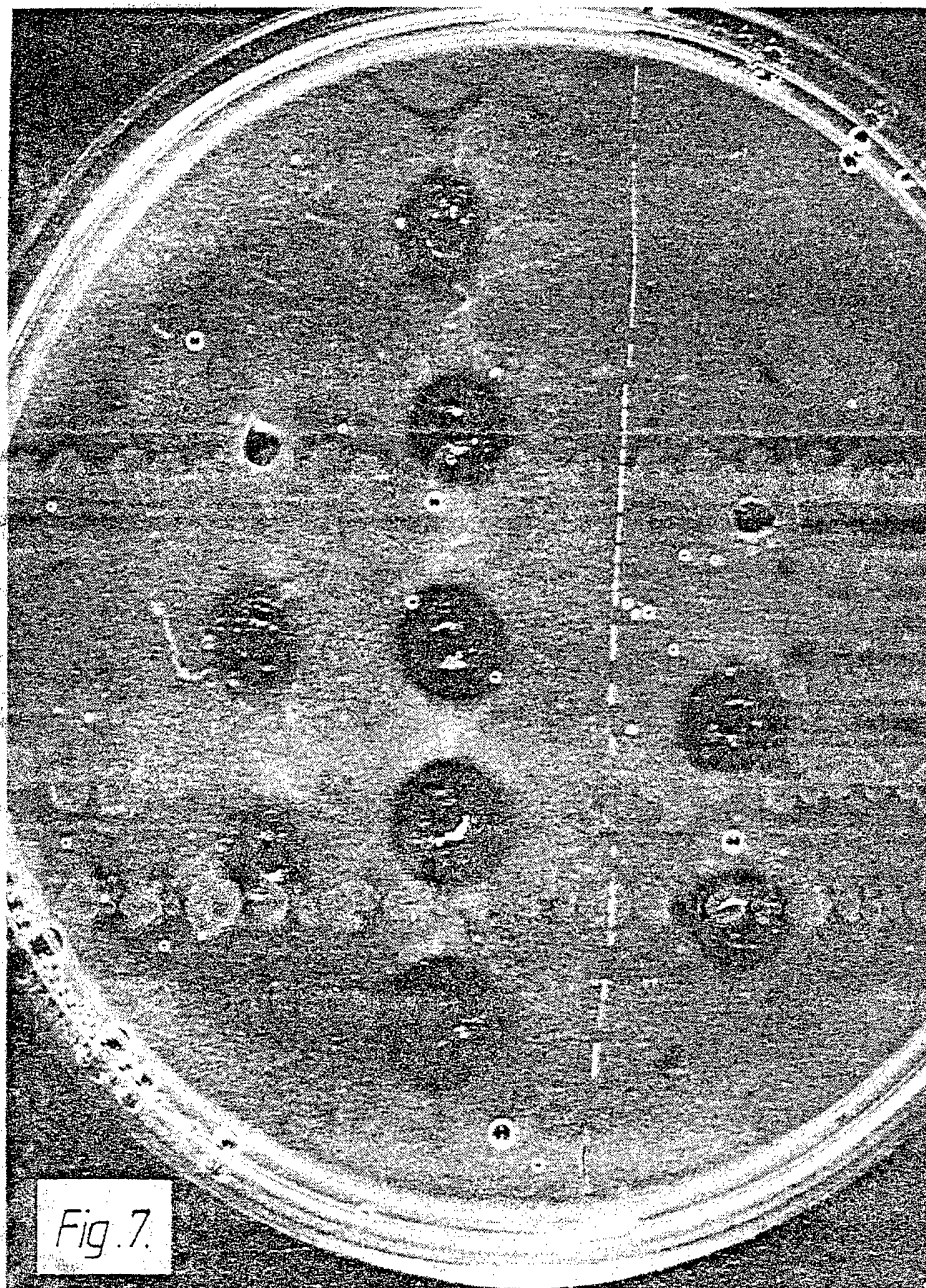
350
 410
 420

Fig. 5B.

430
 TYR SER GLU ARG LEU LYS GLU ALA HIS VAL ARG LEU TYR PRO SER
 TAT TCG GAG CGG CTG AAG GAG GCT CAT GTC AGA CTG TAC CCA TCC
 440 450
 SER ARG CYS THR SER GLN HIS LEU LEU ASN ARG THR VAL THR ASP
 AGC CGC TGC ACA TCA CAA CAT TTA CTT AAC AGA ACA GTC ACC GAC
 460
 ASN MET LEU CYS ALA GLY ASP THR ARG SER GLY GLY PRO GLN ALA
 AAC ATG CTG TGT GCT GGA GAC ACT CGG AGC GGC GGG CCC CAG GCA
 470 480
 ASN LEU HIS ASP ALA CYS GLN GLY ASP SER GLY GLY PRO LEU VAL
 AAC TTG CAC GAC GCC TGC CAG GGC GAT TCG GGA GGC CCC CTG GTG
 490
 CYS LEU ASN ASP GLY ARG MET THR LEU VAL GLY ILE ILE SER TRP
 TGT CTG AAC GAT GGC CGC ATG ACT TTG GTG GGC ATC ATC AGC TGG
 500 510
 GLY LEU GLY CYS GLY GLN LYS ASP VAL PRO GLY VAL TYR THR LYS
 GGC CTG GGC TGT GGA CAG AAG GAT GTC CCG GGT GTG TAC ACA AAG
 520 527
 VAL THR ASN TYR LEU ASP TRP ILE ARG ASP ASN MET ARG PRO OP
 GTT ACC AAC TAC CTA GAC TGG ATT CGT GAC AAC ATG CGA CCG TGA
 CCAGGAACACCCGACTCCTCAAAAGCAAATGAGATCCCGCCTCTTCTTCTTCAGAAGACA
 CTGCAAAGGCGCAGTGCTTCTCTACAGACTTCTCCAGACCCACCACACCGCAGAAGCGGG
 ACGAGACCCCTACAGGGAGAGGGGAAGAGTGCATTTTCCAGATACTTCCCATTTTGGAAGT
 TTTCAGGACTTGGTCTGATTTCAAGATACTCTGTGAGATGGGAAGACATGAATGCACACT
 AGCCTCTCCAGGAATGCCTCCTCCCTGGGCAGAAAGTGGCCATGCCACCCTGTTTTGCTA
 AAGCCCAACCTCCTGACCTGTACCGTGAGCAGCTTTGGAACAGGACCACAAAAATGAA
 AGCATGTCTCAATAGTAAAAGAAACAAGAGATCTTTAGGAAAGACGGATTGCATTAGAA
 ATAGACAGTATATTTATAGTACAAGGGCCAGCAGGGCTCAAAGTTGGGGCAGGCTGGC
 TGGCCCGTCATGTTCTCAAAAGCGCCCTTGACGTCAAGTCTCCTTCCCTTTCCCACT
 CCCTGGCTCTCAGAAGGTATTCCTTTTGAGTACAGTGTGTAAAGTGAAATCCTTTTTCT
 TTATAAATTTAGAGTAGCATGAGAGAATTGTATCATTTGAACAACCTAGGCTTCAGCATA
 TTTATAGCGATCCATCGTTAGTTTTTACTTTCCGTTGCCACAACCCTGTTTTATACCGTA
 CTTAATAAATTCGGATATATTTTTTACAGTTTTTTTCAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 5C.





-4.MAI 1933*087532

% Lösungsmittel B

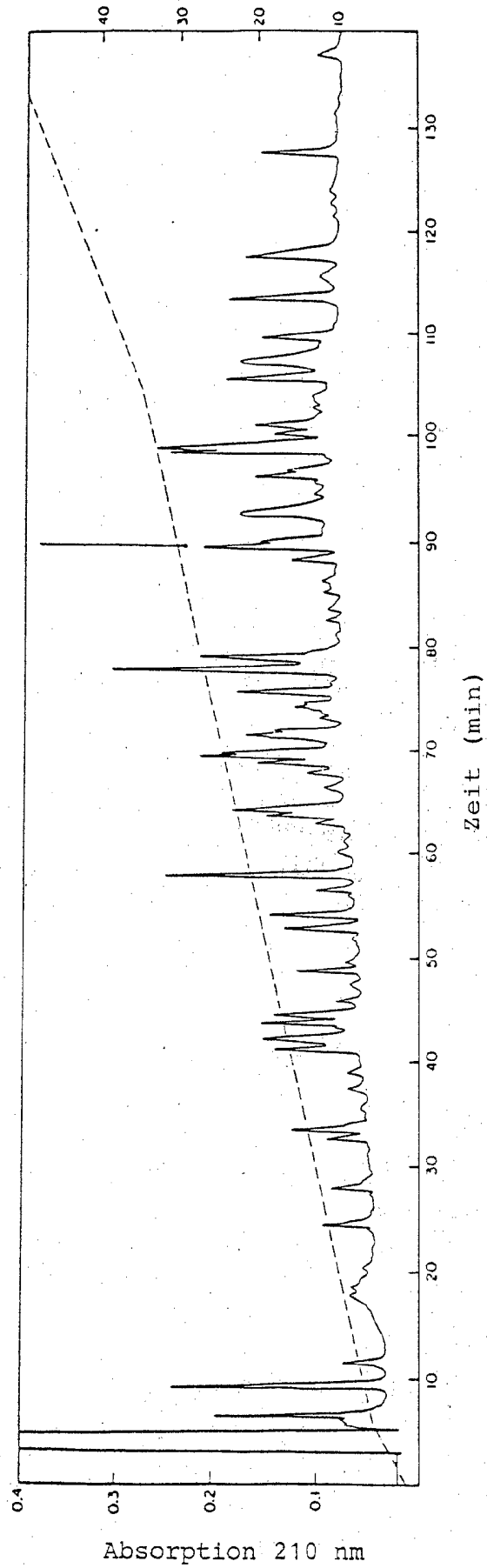


Fig. 8

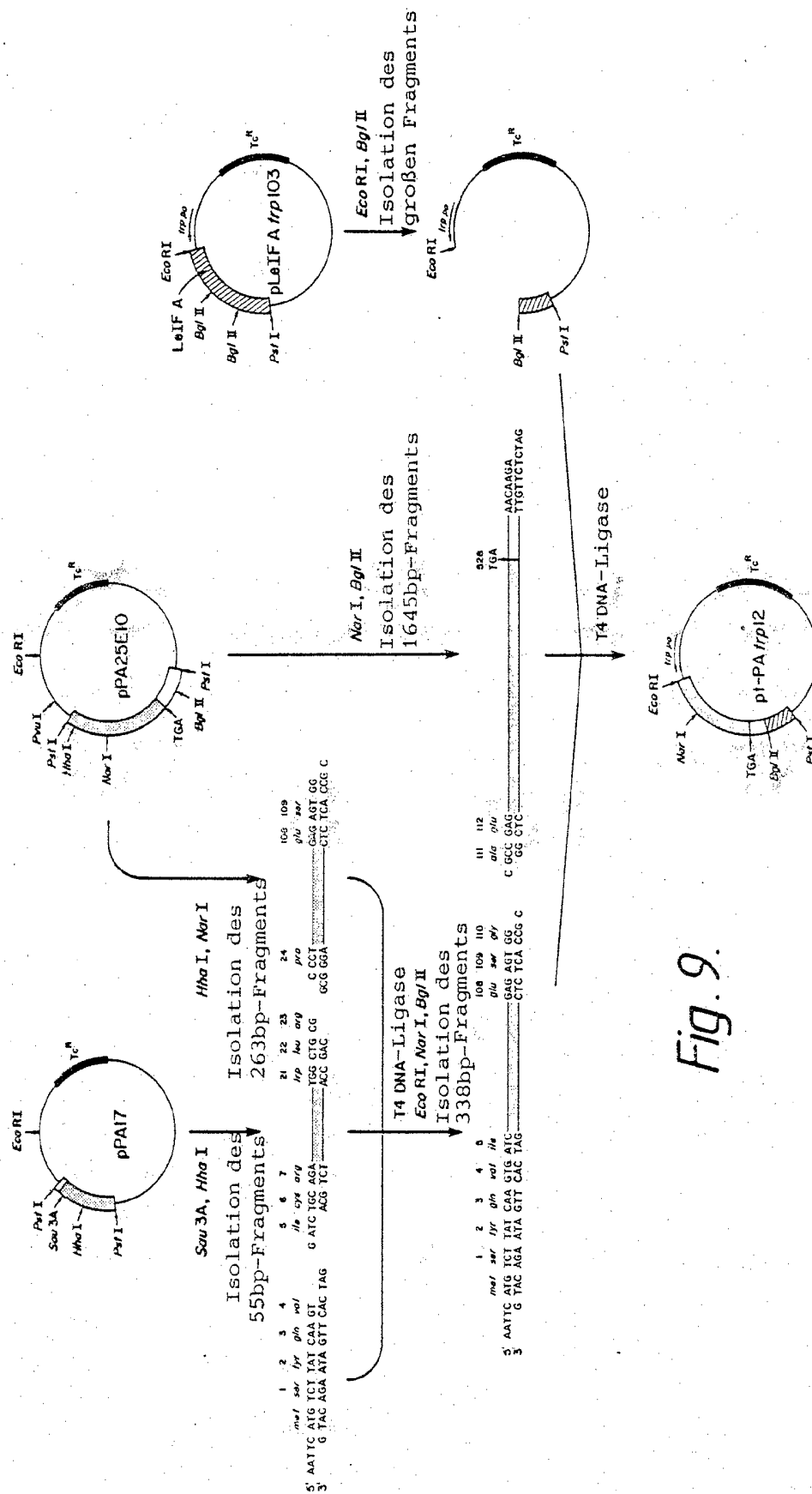


Fig. 9.

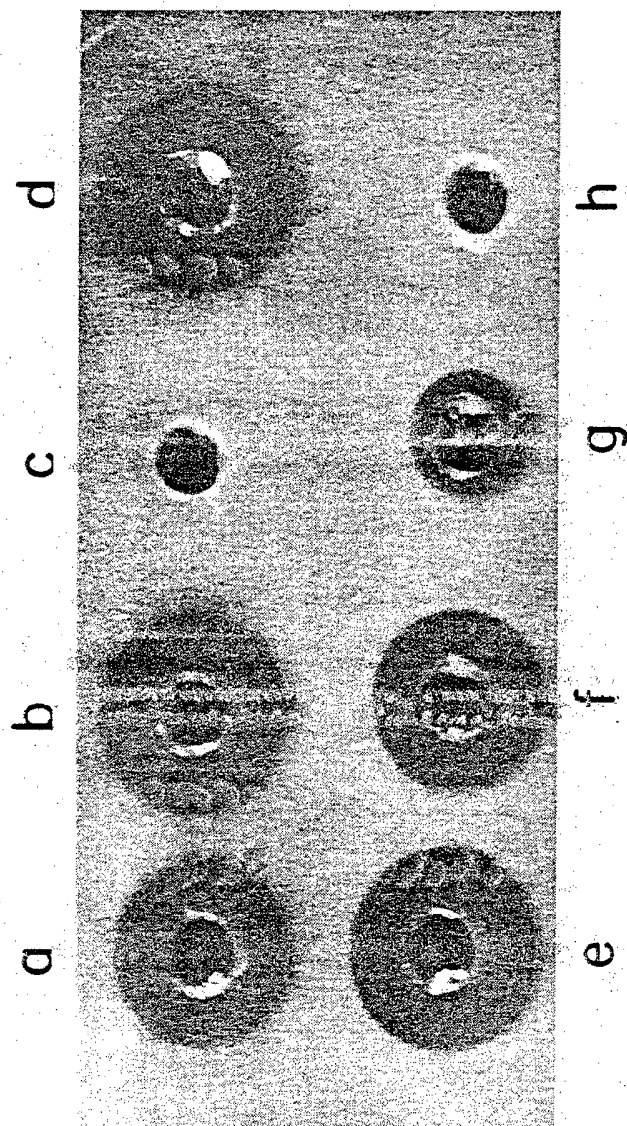
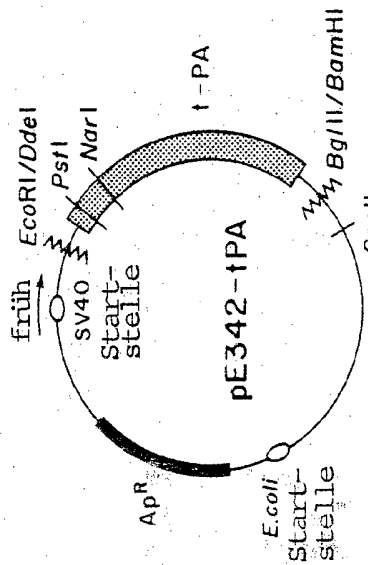
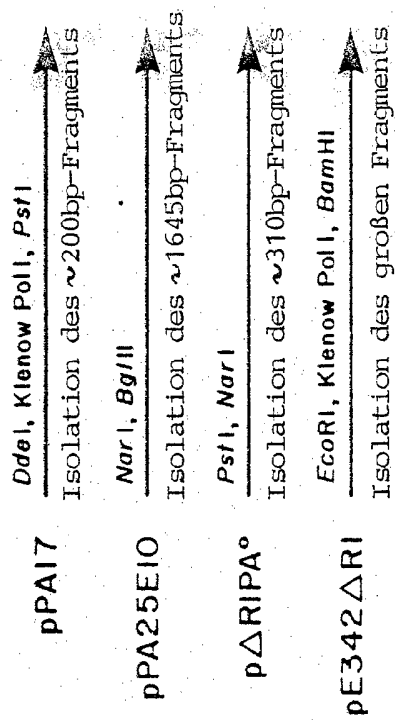
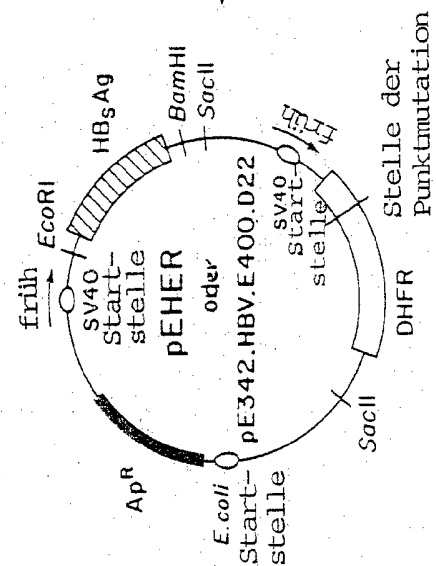


Fig. 10.

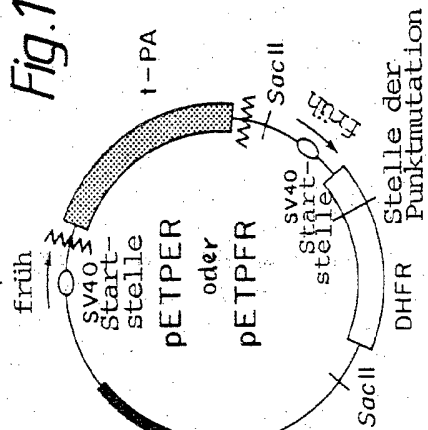


SacII
Bakterielle
alkalische
Phosphatase



SacII
Isolation des
~1700 bp-Fragments

Fig.11.



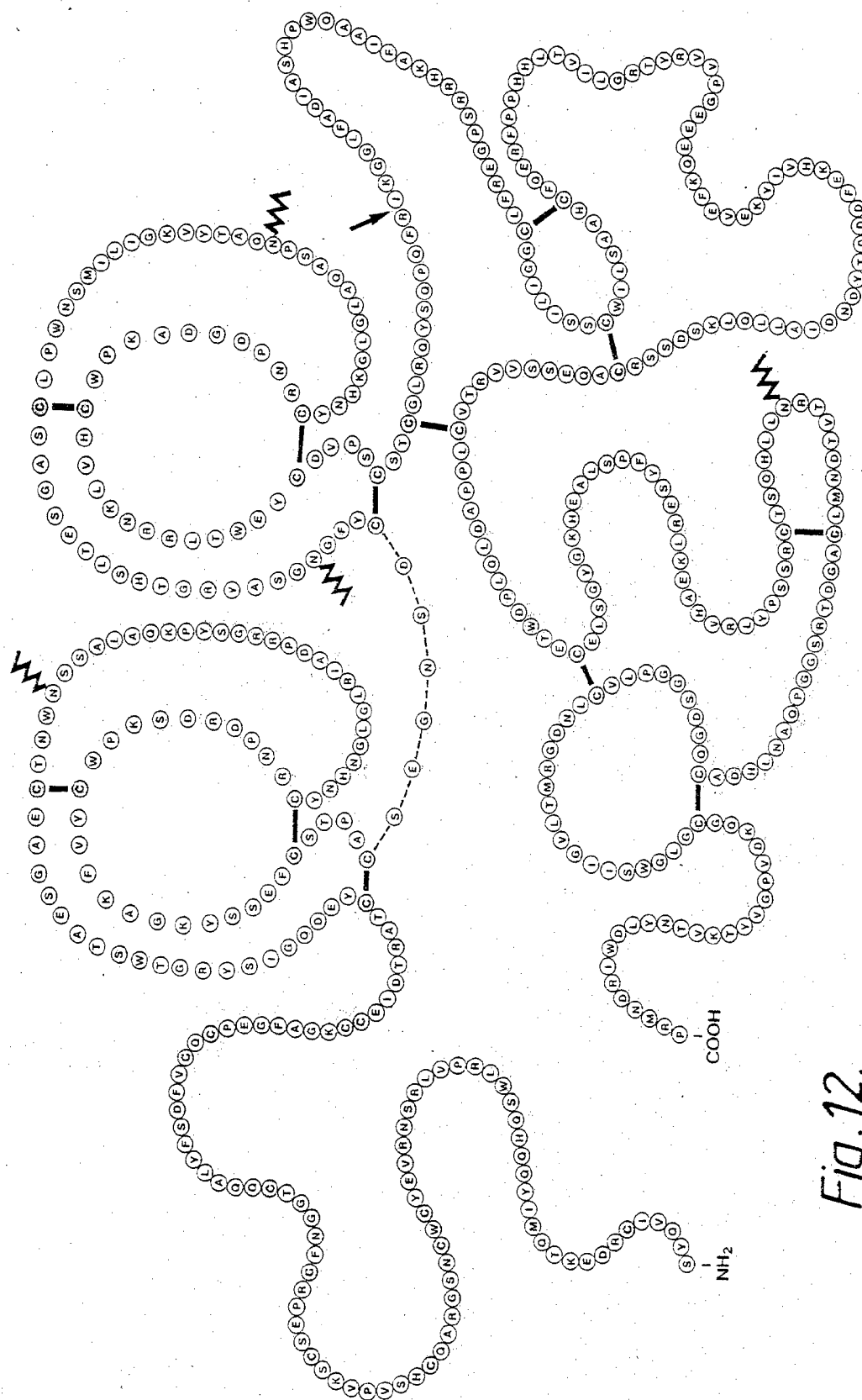


Fig. 12.