



(12) PATENTANSØGNING

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: C 07 K 14/475 C 12 N 15/12

(21) Patentansøgning nr: PA 2002 00302

(22) Indleveringsdag: 2002-02-27

(24) Løbedag: 1988-07-22

(41) Alm. tilgængelig: 2002-02-27

(30) Prioritet: 1987-11-23 US 123.753

(71) Ansøger: Monsanto Company, 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63166, USA
Washington University, Washington University Box 8013, 724 S. Euclid Avenue, St. Louis, Missouri 63110, USA

(72) Opfinder: George John Broze, Jr., 15 West Point Lane, St. Louis, Missouri 63131, USA
Kuniko Kusano Kretzmer, 33 Persimmon Lane, Eureka, Missouri 63025, USA
Tze-Chein Wun, 613 Huntley Heights, St. Louis, Missouri 63021, USA

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang Zacco A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark

(54) Benævnelse: Rekombinante polypeptider omfattende aminosyresekvensen af moden vævsfaktorinhibitor (TFI), polypeptidfragmenter deraf, ekspressionsvektorer der koder for disse, værtsceller transformeret dermed, og fremgangsmåde til fremstilling af et vævsfaktorinhibitor-polypeptid

(57) Sammendrag:

Baseret på tilvejebringelsen af den fuldstændige kodesekvens for en cDNA-klon, der i det væsentlige repræsenterer vævsfaktorinhibitor (TFI) af fuld størrelse angives humane vævsfaktorinhibitor-proteiner, DNA som koder herfor, ekspressionsvektorer omfattende sådan DNA, værtsceller transficeret eller transformeret dermed, og en fremgangsmåde til fremstilling af proteinerne.

PATENTKRAV

1. Rekombinant polypeptid omfattende aminosyresekvensen af moden vævsfaktorinhibitor (TFI) som vist i Fig. 3.
2. Polypeptid ifølge krav 1 hvori den modne vævsfaktorinhibitor består af aminosyrerne 29-304 som vist i Fig. 3.
3. Polypeptid ifølge krav 1, som yderligere omfatter en forlænget aminosyresekvens umiddelbart forud for den modne vævsfaktorinhibitor.
4. Polypeptid bestående af moden vævsfaktorinhibitor (aminosyrerne 29-304) med en umiddelbart forudgående N-terminal methioninrest, alaninrest eller methionin-alanin-dipeptid.
5. Renset og isoleret polypeptid omfattende en aminosyresekvens valgt blandt sekvenserne:
 - (a) Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile
Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Ala Cys Glu Gly Asn Gln Asn
Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys;
 - (b) Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr
Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys
Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn
Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys;
 - (c) Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala
Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly Lys
Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu
Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys;
 - (d) Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala
Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr
Gly Ala Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn
Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu;

- (e) Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu
 Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe
 Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr
 Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu
 5 Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly
 Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly; og
- (f) Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp
 Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr
 Asn Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser
 10 Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln
 Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile Gln Arg
 Ile Ser Lys Gly Gly Leu.
6. Renset og isoleret polypeptid med en aminosyresekvens valgt
 blandt sekvenserne:
- 15 (a) Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile
 Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
 Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Ala Cys Glu Gly Asn Gln Asn
 Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys;
- (b) Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr
 20 Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys
 Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn
 Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys; og
- (c) Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala
 Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly Lys
 25 Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu
 Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys.
7. Rekombinant polypeptid med aminosyresekvensen:
- Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr
 Glu Leu Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala
 30 Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys
 Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 Phe Ile Tyr Gly Ala Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe
 Glu Ser Ley Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp

Asn Ala Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu
 Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile
 Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln
 Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu
 5 Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys
 Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp
 Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn Ala Val Asn Asn Ser Leu
 Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe
 His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly
 10 Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser
 Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys
 Gly Gly Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys
 Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser
 Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys Lys
 15 Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe Val Lys
 Asn Met.

8. Renset og isoleret polypeptid med aminosyresekvensen:

Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr
 Glu Leu Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala
 20 Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys
 Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 Phe Ile Tyr Gly Ala Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe
 Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 Asn Ala Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Glu Glu
 25 Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile
 Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln
 Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu
 Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys
 Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp
 30 Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn Ala Val Asn Asn Ser Leu
 Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe
 His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly
 Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser
 Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys
 35 Gly Gly Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys

Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser
 Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys Lys
 Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe Val Lys
 Asn Met.

5 9. Ekspressionsvektor omfattende en rensset og isoleret DNA, som koder for moden vævsfaktorinhibitor (TFI), som vist i Fig. 3.

10. Ekspressionsvektor omfattende en rensset og isoleret DNA, som koder for et polypeptid valgt blandt:

- (a) Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile
 10 Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
 Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Ala Cys Glu Gly Asn Gln Asn
 Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys;
- (b) Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr
 Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys
 15 Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn
 Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys;
- (c) Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala
 Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly Lys
 Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu
 20 Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys;
- (d) Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala
 Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe
 Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr
 Gly Ala Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 25 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn
 Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu;
- (e) Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu
 Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe
 Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr
 30 Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu
 Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly
 Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly; og

(f) Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp
 Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr
 Asn Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser
 Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln
 5 Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile Gln Arg
 Ile Ser Lys Gly Gly Leu.

11. Ekspressionsvektor omfattende en rensset og isoleret DNA, som koder for et polypeptid med sekvensen:

Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr
 10 Glu Leu Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala
 Phe Lys Ala Asp Asp Lys Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys
 Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 Phe Ile Tyr Gly Ala Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe
 Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 15 Asn ALa Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu
 Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile
 Cys Arg Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe
 Tyr Asn Asn Glu Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr
 Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu
 20 Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly
 Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn Ala Val
 Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser
 Leu Phe GLu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
 ALa Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe
 25 Tyr Tyr Asn Ser Val Ile GLy Lys Cys Arg Pro Phe Lys
 Tyr Ser GLy Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser
 Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile
 Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys Arg Lys
 Arg Lys Lys Gln ArG Val Lys Ile ALa Tyr Glu Glu Ile
 30 Phe Val Lys Asn Met.

12. Værtscelle transficeret eller transformeret med en ekspressionsvektor ifølge krav 9, 10 eller 11.

13. Fremgangsmåde til fremstilling af et vævsfaktorinhibitor-polypeptid, hvilken fremgangsmåde omfatter, at man:
- (a) dyrker en transficeret eller transformeret værtscelle ifølge krav 12 under egnede næringsbetingelser på en måde, som tillader ekspresion af
- 5 det nævnte polypeptid; og
- (b) isolerer det nævnte polypeptid.