FI000120355B



(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 120355 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **30.09.2009**

(51) Kv.lk. - Int.kl.

C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/14 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **943563**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag **29.07.1994**

(24) Alkupäivä - Löpdag **28.01.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **29.07.1994**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/FR1993/000085**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

31.01.1992 FR 9201064 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 • Novozymes Biopharma UK Limited, Castle Court 59, Castle Boulevard, Nottingham NG7 1FD, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 • Fleer, Reinhard, 47, avenue Beausejour, 91440 Bures-sur-Yvette, RANSKA, (FR)
2 • Fournier, Alain, 28, avenue Roger-Salengro, 92000 Chatenay-Malabry, RANSKA, (FR)
3 • Guitton, Jean-Dominique, 74, rue Dunois, 75013 Paris, RANSKA, (FR)
4 • Jung, Gerard, 12, rue des Grands-Jardins, Leuville-sur-Orge, 91310 Montlhéry, RANSKA, (FR)
5 • Yeh, Patrice, 11 bis, rue Lacepede, 75005 Paris, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud

Kolster Oy Ab, Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä biologisesti aktiivisten polypeptidien ja niitä sisältävien farmaseuttisten koostumusten valmistamiseksi sekä niitä koodaavia nukleotidisekvenssejä, ilmentämiskasetteja, plasmideja ja soluja

Förfarande för framställning av biologiskt aktiva polypeptider och farmaceutiska kompositioner innehållande dessa samt nukleotidsekvenser, expressionskassetter, plasmider och celler som kodar nämnda polypeptider

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI 104255 B, FI 105277 B, JP 3201987 A, WO 89/02922 A

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Esillä oleva keksintö koskee uusia biologisesti aktiivisia polypeptidejä, niiden valmistusta ja niitä sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia.

Föreliggande uppfinning avser nya biologiskt aktiva polypeptider, framställningen av dem och farmaceutiska kompositioner, vilka innehåller dem.

Menetelmä biologisesti aktiivisten polypeptidien ja niitä sisältävien farmaseuttisten koostumusten valmistamiseksi sekä niitä koodaavia nukleotidisekvenssejä, ilmentämiskasetteja, plasmideja ja soluja

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää uusien biologisesti aktiivisten polypeptidien ja niitä sisältävien farmaseuttisien koostumusten valmistamiseksi. Keksintö koskee edelleen niitä koodittavia nukleotidisekvenssjä, ilmentämiskasetteja, itsenäisesti replikoitavia plasmideja ja rekombinanttisoluja.

Tarkemmin ottaen esillä oleva keksintö koskee menetelmää yhdistelmä-DNA-polypeptidien valmistamiseksi, jotka koostuvat oleellisesti luonnollisesta tai keinotekoisesta polypeptidistä saadusta aktiivisesta osasta, jolla on terapeuttista aktiivisuutta ja joka on kytketty albumiiniin tai albumiinivarianttiin. Huomattakoon, että niiden polypeptidien terapeuttinen aktiivisuus voi olla joko suoraa (sairauksien hoito) tai epäsuoraa (ja esimerkiksi käyttökelpoista sairauksien estossa, rokotteiden luomisessa, lääketieteellisissä kuvannustekniikoissa jne.).

Huomattakoon, että seuraavassa albumiinivarianteilla tarkoitetaan mitä tahansa proteiinia, jonka puoliintumisaika plasmassa on korkea ja joka on saatu modifioimalla (mutaatio, deleetio ja/tai additio) geenimanipulatiivisin tekniikoin ihmisen seerumialbumiinin tiettyä isomorfia koodittavaa geeniä, sekä mitä tahansa makromolekyyliä, jonka puoliintumisaika plasmassa on korkea ja joka on saatu modifioimalla in vitro tällaisten geenien koodittamaa proteiinia. Koska albumiini on hyvin polymorfinen, lukuisia luonnollisia variantteja on identifioitu ja luetteloitu [Weitkamp, L.R., et al., Ann. Hum. Genet. 37 (1973) 219].

Esillä olevan keksinnön päämäärä on valmistaa keinotekoisia biologisesti aktiivisia proteiineja, jotka ovat käyttökelpoisia farmasian alalla. Itse asiassa lukuisia polypeptidejä, joilla on yksi tai useampi mahdollinen tera-

peuttinen aktiivisuus, ei voida käyttää farmaseuttisesti. Tähän voi olla erilaisia syitä, kuten etenkin niiden huono stabiilisuus in vivo, niiden kompleksinen tai hauras rakenne, vaikeus tuottaa niitä teollisesti hyväksyttävässä mittakaavassa jne. Samoin tietyt polypeptidit eivät anna odotettuja tuloksia in vivo johtuen antoon, pakkaukseen, farmakokinetiikkaan jne. liittyvistä ongelmista.

Esillä oleva keksintö mahdollistaa korjauksen näihin huonoihin puoliin. Itse asiassa esillä oleva keksintö antaa käyttöön uusia molekyylejä, jotka tekevät mahdolliseksi näiden polypeptidien biologisten ominaisuuksien optimaalisen hyödyntämisen terapian alalla. Esillä oleva keksintö on tulosta etenkin sen osoittamisesta, että on mahdollista kytkeä geneettisesti mikä tahansa aktiivinen rakenne, joka on saatu biologisesti aktiivisesta polypeptidistä, toiseen, albumiinista koostuvaan proteiinirakenteeseen muuttamatta mainittuja biologisia ominaisuuksia. Se on tulosta samoin siitä, että hakija osoitti, että ihmisen seerumialbumiini tekee mahdolliseksi aktiivisen rakenteen tehokkaan presentaation sen vuorovaikutuskohdille, ja se takaa valmistettavan polypeptidin kohonneen stabiilisuuden plasmassa. Keksinnön mukaisesti valmistetut polypeptidit tekevät täten mahdolliseksi tietyn biologisen aktiivisuuden ylläpitämisen organismissa aiempaa pitemmän ajan. Se tekee täten mahdolliseksi annettujen annosten vähentämisen ja tietyissä tapauksissa terapeuttisen vaikutuksen tehosta misen, esimerkiksi vähentämällä runsaampaan antoon liittyviä sekundaarivaikutuksia. Kyseiset polypeptidit tekevät lisäksi mahdolliseksi biologisesti aktiivisista polypeptideistä saatujen rakenteiden muodostamisen ja käyttämisen, jotka ovat hyvin pieniä ja siten hyvin spesifisiä halutulle vaikutukselle. Huomattakoon, että terapeuttisesti kiinnostavat peptidit, joilla on biologista aktiivisuutta, voivat samoin vastata ei-luonnollisia peptidisekvenssejä, jotka on eristetty esimerkiksi satunnaispeptidipankeista. Esitetyillä polypeptideillä on sitä paitsi erityisen edullinen jakauma

organismissa, mikä modifioi niiden farmakokineettisiä ominaisuuksia ja suosii niiden biologisen aktiivisuuden kehittymistä ja niiden käyttöä. Lisäksi ne tarjoavat edelleen sen edun, että ne ovat heikosti tai ei lainkaan immunogeenisiä organismille, jossa niitä käytetään. Lopuksi yhdistelmä-DNA-organismit pystyvät ilmentämään (ja edullisesti erittämään) mainittuja polypeptidejä tasoina, jotka mahdollistavat näiden teollisen hyödyntämisen.

Esillä olevan keksinnön yksi kohde koskee menetelmää sellaisen rekombinanttipolypeptidin valmistamiseksi, joka käsittää terapeuttista aktiivisuutta omaavasta polypeptidistä peräisin olevan aktiivisen osan, joka on geneettisesti kytketty albumiiniin tai albumiinivarianttiin, jolla variantilla on säilyneenä pitkä puoliintumisaika plasmassa, ja jolloin terapeuttista aktiivisuutta omaava polypeptidi on hormoni, interferoni, interleukiini, erytropoietiini, G-CSF tai insuliini. Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään.

Erityisessä suoritusmuodossa peptidit, joilla on terapeuttista aktiivisuutta, eivät ole ihmisalkuperää.

Tarkemmin ottaen keksinnön mukaisesti valmistetuissa molekyyleissä polypeptidi, jolla on terapeuttista aktiivisuutta, on ihmisalkuperää oleva polypeptidi tai molekyylivariantti. Esimerkiksi kyseessä voi olla kokonaisuudessaan tai osittain hormoni, interferoni, interleukiini, erytropoietiini, G-CSF tai insuliini.

Keksinnön mukaisesti valmistettavien polypeptidien aktiivinen osa voi koostua esimerkiksi kokonaisesta polypeptidistä, jolla on terapeuttista aktiivisuutta, tai tästä saadusta rakenteesta, tai edelleen ei-luonnollisesta polypeptidistä, joka on eristetty peptidipankista. Esillä olevan keksinnön tarkoituksessa johdannaisrakenteella tarkoitetaan mitä tahansa polypeptidiä, joka on saatu modifioimalla ja säilyttäen terapeuttinen aktiivisuus. Modifikaatiolla on tarkoitettava mitä tahansa luonteeltaan geneettistä

ja/tai kemiallista mutaatiota, substituutiota, deleetiota, additiota tai modifikaatiota. Tällaisia johdannaisia voidaan muodostaa eri päämäärin, kuten etenkin molekyylin affiniteetin sen kiinnittymiskohtiin lisäämiseksi, sen tuotantotasojen parantamiseksi, sen resistenssin proteaaseille lisäämiseksi, sen terapeuttisen tehokkuuden lisäämiseksi tai edelleen sen sekundaarivaikutusten vähentämiseksi tai uusien biologisten ominaisuuksien antamiseksi sille. Esimerkiksi keksinnön mukaisesti valmistetuilla kimeerisillä polypeptideillä on farmakokineettisiä ominaisuuksia ja biologista aktiivisuutta, jotka ovat käyttökelpoisia sairauksien estämiseksi tai hoitamiseksi.

Erityisen edullisia polypeptidejä ovat polypeptidit, joissa aktiivinen osa käsittää:

(a) peptidirakenteen kokonaisuudessaan, tai

(b) rakenteen, joka on saatu (a):sta rakennemodifikaatiolla (yhden tai useamman tähteen mutaatio, substituutio, additio ja/tai deleetio) ja jolla on terapeuttista aktiivisuutta.

Tyypin (b) rakenteista voidaan mainita erityisemmin molekyylit, joissa tiettyjä N- tai O-glykosylaatiokohtia on modifioitu tai tukahdutettu, molekyylit, joissa yksi tai useampi tähde on substituoitu, tai molekyylit, joissa kaikki kysteiinitähteet on substituoitu. Voidaan mainita samoin molekyylit, jotka on saatu (a):sta deletoimalla alueita, jotka eivät osallistu tai osallistuvat vain vähän vuorovaikutukseen kyseessä olevien sitoutumiskohtien kanssa, tai jotka osoittavat epätoivottavaa aktiivisuutta, ja molekyylit, jotka käsittävät suhteessa (a):han ylimääräisiä tähteitä, kuten esimerkiksi N-terminaalinen metioniini ja/tai erityssignaali ja/tai liitospeptidi.

Keksinnön mukaisesti valmistettavien molekyylien aktiivinen osa voi olla kytketty joko suoraan tai keinotekoisen peptidin välityksellä albumiiniin. Lisäksi se voi muodostaa molekyylin yhtä hyvin N-terminaalisen kuin C-terminaalisen pään. Edullisesti kyseisissä molekyyleissä ak-

tiivinen osa muodostaa kimeerin C-terminaalisen osan. Tulee samoin huomata, että biologisesti aktiivinen osa voi olla monikopiona kimeerin keskellä. Keksinnön mukaisesti valmistettavat molekyylit esitetään kaaviollisesti kuviossa 1.

Keksinnön kohde on menetelmä edellä kuvattujen kimeeristen molekyylien valmistamiseksi. Eukaryoottinen tai prokaryoottinen soluisäntä saadaan ilmentämään nukleotidisekvenssi, joka koodittaa haluttua polypeptidiä, minkä jälkeen tuotettu polypeptidi otetaan talteen.

Keksinnön kohteena ovat edelleen kyseisiä polypeptidejä koodittavat nukleotidisekvenssit, ilmentämiskasetit, itsenäisesti replikoituvat plasmidit ja eukaryoottiset tai prokaryoottiset rekombinanttisolut, joille on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 12, 14, 15 tai 16 esitetään.

Esillä olevan keksinnön piirissä käyttökelpoisista eukaryoottisista isännistä voidaan mainita eläinsolut, hiivat tai sienet. Erityisesti hiivojen kyseessä ollen voidaan mainita suvun Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Schwanniomyces tai Hansenula hiivat. Kun kyseessä ovat eläinsolut, voidaan mainita COS-, CHO-, C127- jne. solut. Sienistä, joita voidaan käyttää esillä olevassa keksinnössä, voidaan tarkemmin ottaen mainita Aspergillus ssp. tai Trichoderma ssp. Prokaryottisina isäntinä käytetään edullisesti bakteereita kuten Escherichia coli tai bakteereita, jotka kuuluvat sukuihin Corynebacterium, Bacillus tai Streptomyces.

Esillä olevan keksinnön piirissä käyttökelpoiset nukleotidisekvenssit voidaan valmistaa eri tavoin. Yleensä ne saadaan kokoamalla lukualueelle sekvenssit, jotka koodittavat polypeptidin kutakin funktionaalista osaa. Nämä voidaan eristää alan ammattilaiselle tutuilla tekniikoilla, ja esimerkiksi suoraan lähtien solulähetti-RNA:sta (mRNA), tai uudelleenkloonaamalla lähtien komplementaarinen DNA- (cDNA-) pankista, tai edelleen kyseessä voivat olla täysin synteettiset nukleotidisekvenssit. Huomattakoon lisäksi, että nukleotidisekvenssejä voidaan samoin lopuksi modifioi-

da esimerkiksi geenimanipulatiivisin tekniikoin mainittujen sekvenssien johdannaisten tai varianttien saamiseksi.

Edullisemmin keksinnön mukaisessa menetelmässä nukleotidisekvenssi on osa ilmentämiskasetista, joka käsittää transkription aloitusalueen (promoottorialueen), joka mahdollistaa isäntäsoluissa sen kontrolliin sijoitetun ja esitettyjä polypeptidejä koodittavan nukleotidisekvenssin ilmentämisen. Tämä alue voi olla peräisin sellaisten geenien promoottorialueilta, jotka ilmentyvät voimakkaasti käytetyssä isäntäsolussa ilmentymisen ollessa konstitutiivista tai säädeltävää. Kun kyseessä ovat hiivat, kyseessä voivat olla fosfoglyseraattikinaasigeenin (PGK), glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasigeenin (GPD), laktaasigeenin (LAC4), enolaasigeenien (ENO), alkoholidehydrogenaasigeenien (ADH) jne. promoottorit. Kun kyseessä ovat bakteerit, kyseessä voi olla bakteriofagi lambdan oikean tai vasemman geenin promoottori (P_L, P_R), tai edelleen tryptofaani- tai laktoosioperonien geenien promoottorit (P_{trp} ja vastaavasti P_{lac}). Lisäksi tätä kontrollialuetta voidaan modifioida esimerkiksi mutagenisoimalla in vitro, liittämällä mukaan ylimääräisiä kontrolliyksiköitä tai synteettisiä sekvenssejä, tai alkuperäisten kontrolliyksiköiden deleetioilla tai substituutioilla. Ilmentämiskasetti voi samoin käsittää transkription lopetusalueen, joka on funktionaalinen aiotussa isännässä ja sijoitettu välittömästi alavirtaan keksinnön mukaista polypeptidiä koodittavasta nukleotidisekvenssistä.

Edullisessa suoritusmuodossa tässä esitetyt polypeptidit ovat tulosta nukleotidisekvenssin ilmentämisestä eukaryoottisessa tai prokaryoottisessa isännässä ja mainitun sekvenssin ilmentämistuotteen erittymisestä kasvualustaan. Itse asiassa on erityisen edullista kyetä saamaan yhdistelmä-DNA-teknistä tietä molekyylejä suoraan kasvualustaan. Tässä tapauksessa kyseistä polypeptidiä koodittavaa nukleotidisekvenssiä edeltää "johto"-sekvenssi (tai signaalisekvenssi), joka ohjaa syntyvän polypeptidin käytetyn isännän eritysreiteille. Tämä "johto"-sekvenssi voi olla biolo-

gisesti aktiivisen polypeptidin luonnollinen signaalisekvenssi siinä tapauksessa, että tämä on luonnollisesti erittyvä proteiini, tai stabiloivan rakenteen signaalisekvenssi, mutta kyseessä voi samoin olla mikä tahansa muu funktionaalinen "johto"-sekvenssi, tai keinotekoinen "johto"-sekvenssi. Jonkin tai jonkin toisen näistä sekvensseistä valintaa ohjaa etenkin käytetty isäntä. Esimerkkejä funktionaalisista signaalisekvensseistä ovat sukupuoliferomonien tai hiivojen "killer"-toksiinien geenien signaalisekvenssit.

Ilmentämiskasetin lisäksi yksi tai useampi merkki, joka mahdollistaa yhdistelmä-DNA-isännän valikoinnin, voidaan lisätä, esimerkiksi hiivan S. cerevisiae URA3-geeni, tai geenejä, jotka tuottavat resistenssin antibiooteille kuten genetisiinille (G418) tai mille tahansa muulle myrkylliselle yhdisteelle kuten tietyille metalli-ioneille.

Ilmentämiskasetin ja valikointimerkin muodostama yhdistelmä voidaan viedä suoraan aiottuihin isäntäsoluihin, tai insertoida edeltäpäin funktionaaliseen itsenäisesti replikoituvaan vektoriin. Ensimmäisessä tapauksessa sekvenssejä, jotka ovat homologisia isäntäsolujen genomissa esiintyviin alueisiin nähden, lisätään edullisesti tähän yhdistelmään; jolloin mainitut sekvenssit sijoitetaan ilmentämiskasetin ja valikointigeenin molemmin puolin, jotta lisättäisiin yhdistelmän integraatiotiheyttä isännän genomiin tähdättäessä sekvenssien integraatioon homologisen DNA-yhdistymisen välityksellä. Siinä tapauksessa, että ilmentämiskasetti insertoidaan replikoituvaan systeemiin, edullinen replikaatiosysteemi suvun Kluyveromyces hiivoille saadaan plasmidista pKD1, joka eristetään alunperin K. drosophilarumista; edullinen replikaatiosysteemi suvun Saccharomyces hiivoille saadaan S. cerevisiaen plasmidista 2µ. Lisäksi tämä ilmentämisplasmidi voi sisältää kokonaisuudessaan tai osittain mainitut replikaatiosysteemit, tai siinä on voitu yhdistää yksiköitä, jotka on saatu yhtä hyvin plasmidista pKD1 kuin plasmidista 2µ.

Lisäksi ilmentämisplasmidit voivat olla bakteeri-isännän kuten Escherichia coli ja valitun soluisännän välisiä sukkulavektoreita. Tässä tapauksessa tarvitaan replikaatioalkukohta ja valikointimerkki, jotka ovat funktionaalisia bakteeri-isännässä. On samoin mahdollista sijoittaa bakteerisekvenssien ympärille restriktiokohdat, jotka ovat yksittäiset ilmentämisvektorissa: tämä mahdollistaa näiden sekvenssien tukahduttamisen leikkaamalla ja uudelleenligatoimalla in vitro typistetty vektori ennen soluisäntien transformointia, mikä voi johtaa kopioiden lukumäärän lisäykseen ja ilmentämisplasmidien lisääntyneeseen stabiilisuuteen mainituissa isännissä. Esimerkiksi tällaiset restriktiokohdat voivat vastata sekvenssejä kuten 5'-GGCCNNNNNGGCC-3' (SfiI) tai 5'-GCGGCCGC-3' (NotI) sikäli, että nämä kohdat ovat äärimmäisen harvinaisia ja yleensä puuttuvat ilmentämisvektorista.

Sitten kun tällaiset vektorit tai ilmentämiskasetti on rakennettu, nämä viedään hankittuihin isäntäsoluihin kirjallisuudessa kuvattujen klassisten tekniikoiden mukaan. Tässä suhteessa mitä tahansa menetelmää, jolla on mahdollista viedä vieras-DNA:ta soluun, voidaan käyttää. Kyseessä voi olla etenkin transformaatio, elektroporaatio, konjugointi, tai mikä tahansa muu alan ammattilaiselle tuttu tekniikka. Esimerkkinä hiivatyypin isännille käytettyjä eri Kluyveromyces-kantoja on transformoitu käsittelemällä kokonaisia soluja litiumasetaatin ja polyetyleeniglykolin läsnä ollessa tekniikan mukaan, jota kuvaavat Ito et al. [J. Bacteriol. 153 (1983) 163]. Samoin on käytetty Durrensin et al. [Curr. Genet. 18 (1990) 7] kuvaamaa transformointitekniikkaa, jossa käytetään etyleeniglykolia ja dimetyylisulfoksidia. On samoin mahdollista transformoida hiivoja elektroporaatiolla menetelmän mukaan, jota kuvaavat Karube et al. [FEBS Lett. 182 (1985) 90]. Vaihtoehtoista menettelyjärjestelyä kuvataan samoin yksityiskohtaisesti seuraavissa esimerkeissä.

Transformoitujen solujen valikoinnin jälkeen mainittuja polypeptidejä ilmentävät solut siirrostetaan ja voidaan suorittaa mainittujen polypeptidien talteenotto joko solukasvun aikana "jatkuvatoimisten" menetelmien kohdalla tai kasvatuksen jälkeen "erä"- ("batch"-) viljelmille. Esillä olevan keksinnön kohteena olevat polypeptidit puhdistetaan sitten viljelmäsupernatantista silmällä pitäen niiden karakterisointia molekulaarisesti, farmakokineettisesti ja biologisesti.

Keksinnön mukaisesti polypeptidien edullinen ilmentämissysteemi käsittää suvun Kluyveromyces hiivojen käytön isäntänäsoluina, jotka transformoidaan tietyillä vektoreilla, jotka on saatu alunperin K. marxianus var. drosophilarumista eristetystä kromosomin ulkoisesta replikonista pKD1. Nämä hiivat, ja etenkin K. lactis ja K. fragilis, kykenevät yleensä replikoimaan mainitut vektorit stabiilisti ja niiden lisäetuna on sisältyminen G.R.A.S.- (Generally Recognized As Safe) organismien luetteloon. Edulliset hiivat ovat ensisijaisesti suvun Kluyveromyces teollisia kantoja, jotka kykenevät replikoimaan stabiilisti mainitut plasmidista pKD1 saadut plasmidit, joihin on insertoitu valikointimerkki sekä ilmentämiskasetti, joka mahdollistaa keksinnön mukaisten polypeptidien erityksen korkeina tasoina.

Esillä oleva keksintö koskee samoin nukleotidisekvenssejä, jotka koodittavat edellä kuvattuja kimeerisiä polypeptidejä, sekä tällaisia sekvenssejä käsittäviä eukaryoottisia tai prokaryoottisia yhdistelmä-DNA-soluja.

Keksinnön mukaisesti valmistettuja polypeptidejä voidaan käyttää lääkkeinä. Tarkemmin ottaen keksinnön kohteena on menetelmä farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi, joka käsittää yhden tai useamman edellä kuvatun kaltaisen polypeptidin. Menetelmälle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 19 esitetään.

Esillä olevaa keksintöä kuvataan täydellisemmin seuraavien esimerkkien avulla, jotka on katsottava havainnollistaviksi eikä rajoittaviksi.

Luettelo kuvioista

Seuraavissa kuvioissa esiintyvien plasmidien esityksiä ei ole piirretty mittakaavassa ja ainoastaan ne restriktiokohdat, joilla on merkitystä suoritettujen kloonausten ymmärtämiselle, on esitetty.

Kuvio 1: Kaaviollinen esitys kimeerityypeistä SAH-peptidi (A), peptidi-SAH (B) tai peptidi-SAH-peptidi (C). Käytety lyhenteet: M/LP, translaation käynnistävä metioniinitähde, jota mahdollisesti seuraa erityssignaalisekvenssi; SAH, kypsä albumiini tai sen jokin molekyylivariantti; PEP, luonnollista tai keinotekoista alkuperää oleva peptidi, jolla on tietty terapeuttinen ominaisuus. Sekvenssi PEP voi esiintyä useaan kertaan tyypin A, B tai C mokekyyleissä. Musta nuoli osoittaa kypsän proteiinin N-terminaalisen pään.

Sekvenssi tunnusnro 1: Esimerkkejä nukleotidisekvensseistä HindIII-restriktiofragmentille, joka koodittaa tyypin prepro-SAH-peptidi kimeeristä proteiinia. Mustat nuolet osoittavat SAH:n "pre"- ja "pro"-alueiden päättymisen. MstII-restriktiokohta on alleviivattu ja kodoni, joka spesifioi translaation päättymisen, on merkitty lihavalla.

Kuvio 3: Plasmidin pYG105 restriktiokartta ja yleinen strategia esillä olevan keksinnön mukaisten kimeeristen proteiinien ilmentämisplasmidien rakentamiseksi. Käytetyt lyhenteet: P, transkriptiopromoottori; T, transkription päättäjä; IR, käänteisiä toistuvia plasmidi pKD1 -sekvenssejä; LP, erityksen signaalisekvenssi; Ap^r ja Km^r merkitsevät vastaavasti ampisilliini- ja G418-resistenssigeenejä (E. coli ja vastaavasti hiivat).

Kuvio 4: Esimerkkejä von Willebrandin tekijästä saatujen MstI-HindIII-restriktiofragmenttien nukleotidisekvensseistä. Esitetään MstI-HindIII-fragmenttien rakenne plasmidista pYG1248 (paneeli A), pYG1214 (paneeli B),

pYG1206 [paneeli C, tässä nimenomaisessa kimeerissä vWF:n tähde Leu694 on samalla SAH:n viimeinen tähde (Leu585)] ja pYG1223 (paneeli D); aminohappojen numerointi vastaa kypsän vWF:n numerointia Titanin et al. mukaan [Biochemistry 25 (1986) 3171 - 3184]. Restriktiokohdat MstII ja HindIII on alleviivattu ja translaation lopetuskodoni on lihavoitu. Sekvenssi tunnusnro 2: plasmidin pYG1248 MstII- HindIII-restriktiofragmentin nukleotidisekvenssi. Aminohappojen numerointi (oikeanpuoleinen sarake) vastaa kypsää kimeeristä proteiinia SAH-vWF470→713 (829 tähdettä). Kypsän vWF:n tähteet Thr470, Leu494, Asp498, Pro502, Tyr508, Leu694, Pro704 ja Pro708 on alleviivattu.

Kuvio 5: Materiaalin karakterisointi, joka erittyy kasvatettaessa 4 päivän ajan (erlenmeyereissä) kantaa CBS 293.91, joka on transformoitu plasmideilla pYG1248 (kimeerityypin SAH-vWF Thr470→Val713 ilmentämisplasmidi) ja pKan707 (verrokkiplasmidi). Tässä kokeessa paneelien A, B ja C tulokset on saatu migraatiosta samassa geelissä (8,5-%:inen SDS-PAGE) ja sitten erillisellä käsittelyllä.

A, värjääminen Coomassie-sinisellä; molekyylipainostandardi (vyöhyke 2); supernatantti, joka vastaa 50 µl viljelmää, joka on transformoitu plasmidilla pKan707 YPL-kasvualustassa (vyöhyke 1) tai YG1248:lla YPD-kasvualustassa (vyöhyke 3) tai YPL:ssä (vyöhyke 4).

B, materiaalin immunologinen karakterisointi, joka on erittynyt, kun on käytetty hiiren ihmis-vWF:n vastaisia vasta-aineita; sama selitys kuin A:ssa lukuun ottamatta, että käytettiin biotinyloituja molekyylipainostandardeja.

C, materiaalin immunologinen karakterisointi, joka on erittynyt, kun on käytetty kaniinin ihmisalbumiinin vastaisia vasta-aineita: supernatantti, joka vastaa 50 µl viljelmää, joka on transformoitu plasmidilla pKan707 YPL-kasvualustassa (vyöhyke 1) tai pYG1248 YPD-kasvualustassa (vyöhyke 2) tai YPL:ssä (vyöhyke 3).

Kuvio 6: Plasmidilla pYG1206 transformoidun kannan CBS 293.91 erittämän keksinnön mukaisen kimeerin (SAH-vWF Leu694→Pro708) erityksen kinetiikka.

A, Coomassie-sinivärjäys; molekyylipainostandardi (vyöhyke 1); supernatantti, joka vastaa 2,5 µl "eräsyöttö"-viljelmää YPD-kasvualustassa 24 tunnin (vyöhyke 2), 40 tunnin (vyöhyke 3) tai 46 tunnin (vyöhyke 4) kasvatuksen jälkeen.

B, materiaalin immunologinen karakterisointi, joka on erittynyt, kun on käytetty hiiren ihmis-vWF:n vastaisia vasta-aineita: sama selitys kuin A:ssa lukuun ottamatta, että käytettiin biotinyloituja molekyylipainostandardeja.

Kuvio 7: Materiaalin karakterisointi, jonka on erittänyt K. lactis, joka on transformoitu plasmideilla pKan707 (verrokkiplasmidi, vyöhyke 2), pYG1206 (vyöhyke 3), pYG1214 (vyöhyke 4) ja pYG1223 (vyöhyke 5); molekyylipainostandardi (vyöhyke 1). Käytetyt näytteet vastaavat 50 µl supernatanttia stationaarisesta viljelmästä kasvatuksen YPD-kasvualustassa jälkeen, jota on seurannut migraatio 8,5-%:isessa akryyliamidigeelissä ja värjääminen Coomassie-sinisellä.

Sekvenssi tunnusnro 3: Plasmidin pYG1341 restriktiofragmentin MstII-HindIII nukleotidisekvenssi (SAH-UK1→135). Plasmidin pYG1340 MstII-HindIII-restriktiofragmentissa esiintyvän EGF:n kaltaisen alueen (UK1→46) raja on merkitty. Aminohappojen numerointi vastaa kypsää kimeeristä proteiinia SAH-UK1→135 (720 tähdettä).

Kuvio 9: Kimeerien SAH-UK1-46 ja SAH-UK1-135 eritys kannalla CBS 293.91, joka on vastaavasti transformoitu plasmideilla pYG1343 (SAH-UK1-46) ja pYG1345 (SAH-UK1-135), 4 päivän kasvatuksen jälkeen (kasvualusta YPL + G418). Näytteiden (jotka vastaavat 50 µl viljelmää) migraatio suoritetaan 8,5-%:isessa SDS-PAGE-geelissä ja ne värjätään Coomassie-sinisellä: supernatantti kloonista, joka on transformoitu plasmidilla pKan707 (vyöhyke 1), pYG1343 (vyöhyke

3) tai pYG1345 (vyöhyke 4); molekyylipainostandardi (vyöhyke 2).

Sekvenssi tunnusnro 4: Plasmidin pYG1259 restriktiofragmentin MstII-HindIII nukleotidisekvenssi (SAH-G.CSF). G-CSF osan (174 tähdettä) raja on merkitty. Restriktiokohdat ApaI ja SstI on alleviivattu. Aminohappojen numerointi vastaa kypsää kimeeristä proteiinia SAH-G.CSF (759 tähdettä).

Sekvenssi tunnusnro 5: Plasmidin pYG1301 HindIII-restriktiofragmentin nukleotidisekvenssi (kimeeri G.CSF-Gly_4-SAH). Mustat nuolet osoittavat SAH:n "pre"- ja "pro"-alueiden päättymisen. Restriktiokohdat ApaI, SstI (SacI) ja MstII on alleviivattu. Alueita G.CSF (174 tähdettä) ja SAH (585 tähdettä) erottaa synteettinen liittäjä GGGG. Aminohappojen numerointi vastaa kypsää kimeeristä proteiinia G.CSF-Gly_4-SAH (763 tähdettä). Nukleotidisekvenssi, joka on translaation lopetuskodonin ja HindIII-kohdan välissä, on peräisin SAH:n komplementaarisesta DNA:sta (cDNA) julkaisussa EP-361 991 kuvatun mukaan.

Kuvio 12: Materiaalin karakterisointi, jonka on erittänyt 4 päivän kasvatuksessa (erlenmeyereissä) kanta CBS 293.91, joka on transformoitu plasmidilla pYG1266 (tyypin SAH-G.CSF kimeerin ilmentämisplasmidi) ja pKan707 (verrokkiplasmidi). Tässä kokeessa paneelien A, B ja C tulokset saatiin suorittamalla migraatio samassa geelissä (8,5-%:inen SDS-PAGE) ja käsittelemällä sitten erikseen.

A, värjääminen Coomassie-sinisellä; molekyylipainostandardi (vyöhyke 2); supernatantti, joka vastaa 100 µl viljelmää, joka on transformoitu plasmideilla pKan707 YPL-kasvualustassa (vyöhyke 1) tai pYG1266 YPD-kasvualustassa (vyöhyke 3) tai YPL:ssä (vyöhyke 4).

B, materiaalin immunologinen karakterisointi, joka on erittynyt, kun on käytetty ihmis-G-CSF:n vastaisia primaarisia vasta-aineita: sama selitys kuin A:ssa.

C, materaalin immunologinen karakterisointi, joka on erittynyt, kun on käytetty ihmisalbumiinin vastaisia primaarisia vasta-aineita: sama selitys kuin A:ssa.

Kuvio 13: Materiaalin karakterisointi, jonka on erittänyt 4 päivän kasvatuksessa (erlenmeyereissä YPD-kasvualustassa) kanta CBS 293.91, joka on transformoitu plasmidilla pYG1267 (kimeeri SAH-G.CSF), pYG1303 (kimeeri G.CSF-Gly_4-SAH) ja pYG1352 (kimeeri SAH-Gly_4-G.CSF), migraation 8,5-%:isessa SDS-PAGE-geelissä jälkeen.

A, värjääminen Coomassie-sinisellä; supernatantti vastaa 100 µl viljelmää, joka on transformoitu plasmidilla pYG1303 (vyöhyke 1), pYG1267 (vyöhyke 2) tai pYG1352 (vyöhyke 3); molekyylipainostandardi (vyöhyke 4).

B, materiaalin immunologinen karakterisointi, joka on erittynyt, kun on käytetty ihmis-G-CSF:n vastaisia primaarisia vasta-aineita: sama selitys kuin A:ssa.

Sekvenssi tunnusnro 6: Plasmidin pYG1382 MstII-HindIII-restriktiofragmentin nukleotidisekvenssi (SAH-Fv'). Fv'-fragmentin alueita VH (124 tähdettä) ja VL (107 tähdettä) erottaa synteettinen liittäjä $(GGGGS)_{x3}$. Aminohappojen numerointi vastaa kypsää kimeeristä SAH-Fv'-proteiinia (831 tähdettä).

Kuvio 15: Kimeerin SAH-Fv' eritys kannalla CBS 293.91, joka on transformoitu plasmidilla pYG1383 (LAC4), 4 päivän kasvatuksessa erlenmeyereissä 28 °C:ssa YPD-kasvualustassa (vyöhyke 2) tai YPL-kasvualustassa (vyöhyke 3); molekyylipainostandardi (vyöhyke 1). Näytteiden, jotka vastaavat 200 µl viljelmää (saostus etanolilla), migraatio suoritetaan SDS-PAGE-geelissä (8,5-%:inen).

A, värjääminen Coomassie-sinisellä.

B, materiaalin immunologinen karakterisointi, joka on erittynyt, kun on käytetty SAH-vastaisia primaarisia vasta-aineita.

Kuvio 16: Formaldehydillä kiinnitettyjen ihmisen verihiutaleiden agglutinaation antagonistiaktiivisuuden in vitro määritys: IC_{50} hybrideille SAH-vWF694-708 [SAH-

vWF470-713 C471G C474G] ja [SAH-vWF470-704 C471G, C474G] suhteessa malliin RG12986. Verihiutaleiden agglutinaation annosriippuvaisen inhibition määritys suoritettiin menetelmän mukaan, jota kuvaavat C. Prior et al. [Bio/Technology 10 (1992) 66] käyttäen agregometriä, joka rekisteröi optisen transmission vaihtelut sekoitettaessa 37 °C:ssa, kun läsnä on ihmis-vWF:ää, botrosetiiniä (8,2 mg/ml) ja testattavaa yhdistettä erilaisina liuoksina. Sitten määritetään yhdisteen se pitoisuus, joka kykenee inhiboimaan puolet verrokkiagglutinaatiosta (yhdisteen puuttuessa) (IC_{50}).

Kuvio 17: Aktiivisuus hiirisolulinjan NFS60 solulisääntymisen in vitro suhteen. Ordinaattana esitetään radioaktiivisuus (^3H-tymidiini), joka on tullut inkorporoiduksi solutumiin 6 tunnin inkuboinnin jälkeen; abskissana esitetään käytetyn yhdisteen määrä mooleina (valinnaiset yksiköt).

Kuvio 18: Aktiivisuus granulopoieesiin rotassa in vivo. Ordinaattana esitetään neutrofiilien lukumäärä (keskiarvo 7 eläimestä) ajan funktiona. Testatut yhdisteet ovat SAH-G.CSF-kimeeri (pYG1266, 4 tai 40 mg/rotta/päivä), verrokki-G-CSF (10 mg/rotta/päivä), yhdistelmä-DNA-SAH, joka on puhdistettu Kluyveromyces lactis-supernatantista (SAH, 30 mg/rotta/päivä, vrt. EP-361 991), tai fysiologisesta seerumista.

Esimerkkejä

Yleisiä kloonaustekniikoita

Menetelmät, joita tavanomaisesti käytetään molekyylibiologiassa, kuten plasmidi-DNA:n preparatiiviset uutot, plasmidi-DNA:n sentrifugointi käyttäen seesiumkloridigradienttia, elektroforeesi akryyliamidiagaroosigeeleissä, DNA-fragmenttien puhdistaminen elektroeluutiolla, proteiinien uuttaminen fenolilla tai fenoli-kloroformilla, DNA:n saostaminen suolaympäristössä etanolilla tai isopropanolilla, Escherichia colin transformointi jne., ovat alan ammattilaiselle tuttuja ja niitä kuvataan runsaasti kirjallisuudessa [Maniatis, T., et al., "Molecular Cloning: A Labora-

tory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel, F.M., et al. (toim.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Restriktioentsyymit saatiin tahoilta New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) tai Amersham, ja niitä käytetään toimittajan suositusten mukaan.

Tyypin pBR322, pUC plasmidit ja sarjan M13 fagit ovat kaupallista alkuperää (Bethesda Research Laboratories).

Ligatointeja varten DNA-fragmentit erotetaan koon mukaan elektroforeesilla akryyliamidiagaroosigeeleissä, ne uutetaan fenolilla tai seoksella fenoli/kloroformi, ne saostetaan etanolilla ja niitä inkuboidaan sitten fagin T4 DNA-ligaasin (Biolabs) läsnä ollessa toimittajan suosituksia noudattaen.

Esiintyöntyvien 5'-päiden täyttäminen suoritetaan E. colin DNA-polymeraasi-I:n Klenow-fragmentilla (Biolabs) toimittajan spesifikaatioita noudattaen. Esiintyöntyvien 3'-päiden tuhoaminen suoritetaan fagin T4 DNA-polymeraasin (Biolabs) läsnä ollessa, jota käytetään valmistajan suositusten mukaan. Esiintyöntyvien 5'-päiden tuhoaminen suoritetaan hallitulla käsittelyllä S1-nukleaasilla.

Kohdennettu mutagenisointi in vitro käyttäen synteettisiä oligodeoksinukleotidejä suoritetaan menetelmän mukaan, jonka ovat kehittäneet Taylor et al. [Nucl. Acids Res. 13 (1985) 8749 - 8764], käyttäen Amershamin markkinoimaa pakkausta.

DNA-fragmenttien entsymaattinen monistaminen PCR:ksi kutsutulla tekniikalla [Polymerase-catalyzed Chain Reaction, Saiki, R.K., et al., Science 230 (1985) 1350 - 1354; Mullis, K.B., ja Faloona, F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335 - 350] suoritetaan käyttäen DNA Thermal Cycler -lämpökierrätyslaitetta (Perkin Elmer Cetus) valmistajan spesifikaatioita noudattaen.

Nukleotidisekvenssien vahvistaminen suoritetaan menetelmällä, jonka ovat kehittäneet Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463 - 5467] käyttäen Amershamin markkinoimaa pakkausta.

K. lactiksen transformoinnit esillä olevan keksinnön mukaisten proteiinien ilmentämisplasmideilla suoritetaan millä tahansa alan ammattilaiselle tutulla tekniikalla, josta esitetään jäljempänä esimerkki.

Ellei toisin ole mainittu, käytetty bakteerikanta on E. coli MC1060 (lacIPOZYA, X74, galU, galK, $strA^r$) tai E. coli TG1 (lac, proA,B, supE, thi, hsdD5/FtraD36, $proA^+B^+$, $lacI^q$, lacZ, M15).

Käytetyt hiivakannat kuuluvat kuroutuviin hiivoihin ja tarkemmin ottaen suvun Kluyveromyces hiivoihin. Kantoja K. lactis MW98-8C (a, uraA, arg, lys, K^+, pKD1°) ja K. lactis CBS 293.91 käytettiin erityisesti; näyte kannasta MW98-8C on talletettu 16. syyskuuta 1988 talletuslaitokseen Centraalbureau voor Schimmelkulturen (CBS) Baarnissa (Hollanti), jossa se on rekisteröity numerolla CBS 579.88.

Bakteerikanta (E. coli), joka on transformoitu plasmidilla pET-8c52K, on talletettu 17. huhtikuuta 1990 talletuslaitokseen the American Type Culture Collection, jossa sen hakunumero on ATCC 68306.

Hiivakantoja, jotka on transformoitu esillä olevan keksinnön mukaisia proteiineja koodittavilla ilmentämisplasmideilla, kasvatetaan erlenmeyereissä tai 2 litran pilottifermentoreissa (Setric, Ranska) 28 °C:ssa runsaasti ravinteita sisältävässä kasvualustassa (YPD: 1 % hiivauutetta, 2 % Bactopeptone-valmistetta, 2 % glukoosia; tai YPL: 1 % hiivauutetta, 2 % Bactopeptone-valmistetta, 2 % laktoosia) jatkuvasti sekoittaen.

Esimerkki 1

Kytkeminen SAH:n C-päähän

Plasmidia pYG404 kuvataan julkaisussa EP-361 991. Tämä plasmidi käsittää HindIII-restriktiofragmentin, joka koodittaa prepro-SAH:n geenin, jota edeltävät 21 nukleoti-

dia, jotka esiintyvät luonnollisesti välittömästi ylävirtaan S. cerevisiaen PGK-geenin translaation käynnistäjästä ATG. Tämän restriktiofragmentin nukleotidisekvenssi sisältyy sekvenssiin tunnusnro 2. MstII-kohta, joka sijaitsee koodaussekvenssissä 3 tähteen päässä kodonista, joka spesifioi translaation lopetuksen, on erityisen käyttökelpoinen sellaisen biologisesti aktiivisen peptidin kloonauskohtana, joka halutaan kytkeä translaatioalueelle SAH:n C-päähän. Erityisessä suoritusmuodossa on hyödyllistä käyttää peptidejä, joiden sekvenssin koodittaa MstII-HindIII-restriktiofragmentti tyyppiä: 5'-CCTTAGGCTTA $[3xN]_p$ TAAGCTT-3', biologisesti aktiivista peptidiä (p tähdettä) koodittava sekvenssi on $[3xN]_p$. Ligatoimalla tämä fragmentti HindIII-MstII-restriktiofragmenttiin, joka vastaa SAH:ta koodittavaa geeniä kokonaisuudessaan lukuun ottamatta viimeisiä 3 C-terminaalista aminohappoa (tähteet leusiini-glysiini-leusiini), muodostetaan HindIII-restriktiofragmentti, joka käsittää hybridigeenin, joka koodittaa tyypin SAH-peptidi kimeeristä proteiinia (kuvio 1, paneeli A), jota välittömästi edeltää SAH:n "prepro"-kuljetusalue. Toisessa suoritusmuodossa biologisesti aktiivinen peptidi voi esiintyä useamman kuin yhden kerran kimeerissä.

Esimerkki 2

Kytkeminen SAH:n N-päähän

Erityisessä suoritusmuodossa kohdennetun mutageenisoinnin ja PCR-vahvistamisen yhdistetyillä tekniikoilla on mahdollista rakentaa hybridigeenejä, jotka koodittavat kimeeristä proteiinia tuloksena siitä, että translationaalisesti on kytketty signaalipeptidi (ja esimerkiksi SAH:n prepro-alue), sekvenssi, johon sisältyy biologisesti aktiivinen peptidi, ja SAH:n kypsä muoto tai jokin sen molekyylivariantti. HindIII-restriktiokohdat rajoittavat edullisesti näitä hybridigeenejä 5'-päässä translaation käynnistäjään ATG ja 3'-päässä translaation lopetuskodoniin, ja hybridigeenit koodittavat tyypin peptidi-SAH kimeerisiä proteiineja (kuvio 1, paneeli B). Edelleen erityisemmässä suo-

ritusmuodossa biologisesti aktiivinen peptidi voi esiintyä kimeerissä useampaan kuin yhteen kertaan.

Esimerkki 3

Kytkeminen SAH:n N- ja C-päähän

Kohdennetun mutagenisoinnin ja PCR-monistamisen yhdistetyillä tekniikoilla, joita kuvattiin esimerkeissä 1 ja 2, on mahdollista rakentaa hybridigeenejä, jotka koodittavat kimeeristä proteiinia, joka on tulos siitä, että on kytketty translationaalisesti SAH:n kypsä muoto, tai sen jokin molekyylivariantti, ja biologisesti aktiivinen peptidi kytkettynä SAH:n N- ja C-päähän. HindIII-restriktiokohdat rajoittavat edullisesti näitä hybridigeenejä 5'-päässä translaation käynnistäjään ATG ja 3'-päässä translaation lopetuskodoniin, ja hybridigeenit koodittavat tyypin peptidi-SAH-peptidi kimeerisiä proteiineja (kuvio 1, paneeli C), joita edeltää välittömästi SAH:n "prepro"-kuljetusalue. Edelleen erityisemmässä suoritusmuodossa biologisesti aktiivinen peptidi voi esiintyä kimeerissä useamman kuin yhden kerran.

Esimerkki 4

Plasmidien ilmentäminen

Edeltävien esimerkkien kimeeriset proteiinit voidaan ilmentää hiivoissa funktionaalisista promoottoreista, jotka ovat säädeltäviä tai konstitutiivisia, kuten esimerkiksi ne, jotka esiintyvät plasmideissa pYG105 (Kluyveromyces lactiksen LAC4-promoottori), pYG106 (Saccharomyces cerevisiaen PGK-promoottori), pYG536 (S. cerevisiaen PHO5-promoottori), tai hybridipromoottorit kuten ne, joita kuvataan julkaisussa EP-361 991. Plasmidit pYG105 ja pYG106 ovat tässä erityisen käyttökelpoisia, koska ne mahdollistavat geenien ilmentämisen, joita koodittavat HindIII-restriktiofragmentit, kuten ne, joita kuvattiin edeltävissä esimerkeissä, ja jotka on kloonattu HindIII-kohtaan tuottavassa suunnassa (määritellään suunnaksi, joka sijoittaa albumiinin "prepro"-alueen transkriptiopromoottorin viereen), K. lactiksessa funktionaalisista promoottoreista, jotka

ovat säädeltäviä (pYG105) tai konstitutiivisia (pYG106). Plasmidi pYG105 vastaa plasmidia pKan707 (jota kuvataan julkaisussa EP-361 991), jossa ainoa HindIII-restriktiokohta, joka sijaitsee genetisiini-(G418-) resistenssigeenissä, on tuhottu kohdennetulla mutagenisoinnilla säilyttäen samalla kuitenkin proteiini muuttumattomana (oligodeoksinukleotidi 5'-GAAATGCATAAGCTCTTGCCATTCTCACCG-3'). SalI-SacI-fragmentti, joka koodittaa mutagenisoidun plasmidin URA3-geeniä, korvattiin sitten SalI-SacI-restriktiofragmentilla, joka käsittää ilmentämiskasetin, joka koostuu K. lactiksen LAC4-promoottorista (SalI-HindIII-fragmentin muodossa) ja S. cerevisiaen PGK-geenin päättäjästä (HindIII-SacI-fragmentin muodossa). Plasmidi pYG105 on mitoosissa hyvin stabiili Kluyveromyces-hiivoissa ja restriktiokartta esitetään kuviossa 3. Plasmidit pYG105 ja pYG106 poikkeavat toisistaan ainoastaan SalI-HindIII-fragmentin koodittaman transkriptiopromoottorin luonteen osalta.

Esimerkki 5

Hiivojen transformointi

Sukuun Kluyveromyces kuuluvien hiivojen, ja erityisesti K. lactis -kantojen MW98-8C ja CBS 293.91, transformointi suoritetaan esimerkiksi tekniikalla, jonka mukaan kokonaisia soluja käsitellään litiumasetaatilla [Ito, H., et al., J. Bacteriol. 153 (1983) 163 - 168] seuraavasti adaptoiden. Solujen kasvatus tapahtuu 28 °C:ssa 50 ml:ssa YPD-kasvualustaa sekoittaen ja optiseen tiheyteen 600 nm:ssä ($O.D._{600}$), joka on 0,6 - 0,8; solut otetaan talteen sentrifugoimalla alhaisella nopeudella, ne pestään steriilillä TE-liuoksella (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA), uudelleensuspendoidaan 3 - 4 ml:aan litiumasetaattiliuosta (0,1 M TE:ssä) siten, että solutiheydeksi tulee noin 2 x 10^8 solua/ml, minkä jälkeen inkuboidaan 30 °C:ssa 1 tunnin ajan kohtuullisesti sekoittaen. 0,1 ml:n eriä saadusta transformoitumiskelpoisten solujen suspensiosta inkuboidaan 30 °C:ssa 1 tunnin ajan DNA:n läsnä ollessa ja loppupitoisuudessa 35 % polyetyleeniglykolia (PEG_{4000}, Sigma). 5 minuu-

tin lämpöshokin 42 °C:ssa jälkeen solut pestään 2 kertaan, ne uudelleensuspendoidaan 0,2 ml:aan steriiliä vettä ja inkuboidaan 16 tunnin ajan 28 °C:ssa 2 ml:ssa YPD-kasvualustaa, jotta saadaan G418-resistenssigeenin fenotyyppi-ilmentyminen ilmennettynä promoottorin P_{kl} kontrollissa (vrt. EP-361 991); sitten 200 µl solususpensiota levitetään selektiivisille YPD-maljoille (G418, 200 µg/ ml). Maljoja inkuboidaan 28 °C:ssa ja transformantteja ilmaantuu 2 - 3 päivän solukasvun jälkeen.

Esimerkki 6

Kimeerien erittyminen

Valikoinnin G418:lla täydennetyllä, runsaasti ravinteita sisältävällä kasvualustalla jälkeen testataan yhdistelmä-DNA-kloonien kykyä erittää kimeeristen proteiinien kypsää muotoa. Muutamia klooneja, jotka vastaavat kantaa CBS 293.91 tai MW98-8C, joka on transformoitu SAH:n ja biologisesti aktiivisen osan välisten kimeerien ilmentämisplasmideilla, inkuboidaan YPD- tai YPL-kasvualustassa 28 °C:ssa. Solusupernatantit otetaan talteen sentrifugoimalla solujen saavutettua kasvun stationaarivaiheen, niitä mahdollisesti konsentroidaan 10 x saostamalla 30 minuutin ajan -20 °C:ssa 60 %:n loppupitoisuudessa etanolia, minkä jälkeen niitä testataan elektroforeesin 8,5-%:isessa SDS-PAGE-geelissä jälkeen joko suoraan värjäämällä geeli Coomassie-sinisellä tai blot-immuunisiirron jälkeen käyttäen biologisesti aktiivista osaa vastaan kohdistuvia primaarisia vasta-aineita tai kaniinin SAH-vastaista polyklonaalista seerumia. Immunologisissa toteamiskokeissa nitroselluloosasuodatinta inkuboidaan ensin spesifisten primaaristen vasta-aineiden läsnä ollessa, minkä jälkeen se pestään useaan kertaan, sitä inkuboidaan vuohen primaarivasta-aineiden vastaisella vasta-aineella, minkä jälkeen inkuboidaan avidiiniperoksidaasikompleksin läsnä ollessa käyttäen Vectastainin markkinoimaa "ABC-pakkausta" (Biosys S.A., Compiegne, Ranska). Immunologinen reaktio osoitetaan sitten lisäämällä diamino-3,3'-bentsidiinitetraklorydraattia (Prolabo)

hapetetun veden läsnä ollessa valmistajan suosituksia noudattaen.

Esimerkki 7

von Willebrandin tekijästä saadut kimeerit

E.7.1. vWF:n kiinnittymistä verihiutaleisiin vastustavat fragmentit

E.7.1.1. vWF:n tähteet Thr470-Val713

Plasmidi pET-8c52K käsittää vWF:n cDNA-fragmentin, joka koodittaa ihmisen vWF:n tähteitä 445 - 733 ja johon siten sisältyy useita määreitä, jotka ovat keskeisiä vWF:n ja verihiutaleiden väliselle vuorovaikutukselle yhtäältä ja toisaalta pohjamembraanin ja endoteelin alapuolisen kudoksen tiettyjen elementtien vuorovaikutukselle, ja etenkin peptidit G10 ja D5, jotka vastustavat vWF:n ja GP1b:n välistä vuorovaikutusta [Mori, H., et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901 - 17904]. Tämä peptidisekvenssi on identtinen vastaavaan sekvenssiin nähden, jota kuvaavat Titani et al. [Biochemistry 25 (1986) 3171 - 3184]. Näiden geneettisten määreiden monistaminen voidaan suorittaa lähtien plasmidista pET-8c52K, esimerkiksi PCR-monistamistekniikalla käyttäen alukkeena oligodeoksinukleotidejä, jotka koodittavat viereisiä tähteitä, jotka sijaitsevat monistettavan sekvenssin molemmin puolin. Sitten monistetut fragmentit kloonataan tyypin M13 vektoreihin niiden rakenteen vahvistamiseksi sekventoimalla käyttäen joko yleisalukkeita, jotka sijaitsevat monikloonauskohdan molemmin puolin, tai oligodeoksinukleotidejä, jotka ovat spesifisiä vWF-geenin monistetulle alueelle tunnettaessa useiden vWF-isomorfien sekvenssi [Sadler, J.E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985) 6394 - 6398; Verweij, C.L., et al., EMBO J. 5 (1986) 1839 - 1847; Shelton-Inloes, B.B., et. al., Biochemistry 25 (1986) 3164 - 3171; Bonthron, D., et al., Nucl. Acids Res. 17 (1986) 7125 - 7127]. Täten monistamalla PCR:llä plasmidia pET-8c52K oligodeoksinukleotideillä 5'-CCCGGGATCCCTTAGGCTTAACCTGTGAAGCCTGC-3' (Sq1969, MstII-kohta on alleviivattu) ja

5'-CCCGGGATCCAAGCTTAGACTTGTGCCATGTCG-3' (Sq2029, HindIII-kohta on alleviivattu) saadaan MstII-HindIII-restriktiofragmentti, joka sisältää tähteet Thr470 - Val713 vWF:stä (sekvenssi tunnusnro 2). Ligatoimalla tämä fragmentti HindIII-MstII-restriktiofragmenttiin, joka vastaa SAH:ta koodittavaa geeniä kokonaisuudessaan lukuun ottamatta kolmea viimeistä C-terminaalista aminohappoa (vrt. sekvenssi tunnusnro 1) muodostetaan HindIII-restriktiofragmentti, joka käsittää hybridigeenin, joka koodittaa tyypin SAH-peptidi kimeeristä proteiinia (kuvio 1, paneeli A), jota välittömästi edeltää SAH:n "prepro"-kuljetusalue. Tämä restriktiofragmentti kloonataan tuottavassa suunnassa plasmidin pYG105 HindIII-kohtaan, jolloin muodostuu ilmentämisplasmidi pYG1248 (SAH-vWF470-713).

E.7.1.2. Molekyylivariantteja

Toisessa suoritusmuodossa vWF:n sitoutumiskohta on peptidi, joka sisältää tähteet Thr470 - Asp498 kypsästä vWF:stä. Tämä sekvenssi sisältää peptidin G10 (Cys474-Pro488), jota kuvaavat Mori et al. [J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901 - 17904] ja kykenee vastustamaan ihmis-vWF:n vuorovaikutusta ihmisen verihiutaleiden GP1b:hen. Peptidiä G10 vastaava sekvenssi sisällytetään ensiksi MstII-HindIII-restriktiofragmenttiin (kuvio 4, paneeli B), esimerkiksi monistamalla PCR:llä plasmidia pET-8c52K käyttäen oligodeoksinukleotidejä Sq1969 ja 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAGTCCTCCACATACAG-3' (Sq1970, HindIII-kohta on alleviivattu), jolloin muodostuu MstII-HindIII-restriktiofragmentti, joka sisältää peptidin G10, ja jonka sekvenssi on:

5'-CCTTAGGCTTAACCTGTGAAGCC**TGCCAGGAGCCGGGAGGCCTGGTGGTGCCTCCC ACAGATGCC-CCG**GTGAGCCCCACCACTCTGTATGTGGAGGACTAAGCTT-3' (peptidiä G10 koodittava sekvenssi on lihavoitu). Ligatoimalla tämä fragmentti HindIII-MstII-restriktiofragmenttiin, joka vastaa SAH:ta koodittavaa geeniä kokonaisuudessaan lukuun ottamatta kolmea viimeistä C-terminaalista aminohappoa (vrt. sekvenssi tunnusnro 1), saadaan HindIII-restriktio-

fragmentti, joka käsittää hybridigeenin, joka koodittaa tyypin SAH-peptidi kimeeristä proteiinia (kuvio 1, paneeli A), jota välittömästi edelää SAH:n "prepro"-kuljetusalue. Tämä restriktiofragmentti kloonataan tuottavassa suunnassa plasmidin pYG105 HindIII-kohtaan, jolloin muodostuu ilmentämisplasmidi pYG1214.

Toisessa suoritusmuodossa vWF:n sitoutumiskohta GP1b:hen luodaan suoraan käyttämällä synteettisiä oligodeoksinukleotidejä, ja esimerkiksi oligodeoksinukleotidejä 5'-TTAGGCCTCTGTGACCTTGCCCCTGAAGCCCCTCCTCCTACTCTGCCCCCCTAAGCTTA-3' ja 5'-GATCTAAGCTTAGGGGGGCAGAGTAGGAGGAGGGGCTTCAGGGGCAAGGTCACAGAGGCC-3'. Nämä oligodeoksinukleotidit muodostavat ilmaantuessaan MstII-BglII-restriktiofragmentin, joka sisältää MstII-HindIII-fragmentin (kuvio 4, paneeli C), joka vastaa peptidiä D5, jonka määrittelevät vWF:n tähteet Leu694 - Pro708. Ligatoimalla MstII-HindIII-fragmentti HindIII-MstII-restriktiofragmenttiin, joka vastaa SAH:ta koodittavaa geeniä kokonaisuudessaan lukuun ottamatta kolmea viimeistä C-terminaalista aminohappoa (vrt. sekvenssi tunnusnro 1), muodostetaan HindIII-restriktiofragmentti, joka käsittää hybridigeenin, joka koodittaa tyypin SAH-peptidi kimeeristä proteiinia (kuvio 1, paneeli A), jota välittömästi edeltää SAH:n "prepro"-kuljetusalue. Tämä restriktiofragmentti kloonataan tuottavassa suunnassa plasmidin pYG105 HindIII-kohtaan, jolloin muodostuu ilmentämisplasmidi pYG1206.

Plasmidin pET-8c52K hyödyllisiä variantteja deletoidaan kohdennetulla mutageneesillä peptidien G10 ja D5 välillä, esimerkiksi kiinnittymiskohdat kollageeniin, ja/tai hepariiniin, ja/tai botrosetiiniin, ja/tai sulfatideihin ja/tai ristosetiiniin. Esimerkki on plasmidi pMMB9, jota on deletoitu kohdennetulla mutageneesillä tähteiden Cys509 ja Ile662 väliltä. Monistamalla PCR:llä tätä plasmidia käyttäen oligodeoksinukleotidejä Sq1969 ja Sq2029 muodostetaan MstII-HindIII-restriktiofragmentti (kuvio 4, paneeli D), joka sisältää tähteet Thr470 - Tyr508 ja Arg663 - Val713 ja

erityisesti vWF:n peptidit G10 ja D5 ja deletoituna erityisesti kollageenikiinnittymiskohdastaan, joka sijaitsee tähteiden Glu542 ja Met622 välissä [Roth, G.J., et al., Biochemistry 25 (1986) 8357 - 8361]. Ligatoimalla tämä fragmentti HindIII-MstII-restriktiofragmenttin, joka vastaa SAH:ta koodittavaa geeniä kokonaisuudessaan lukuun ottamatta kolmea viimeistä C-terminaalista aminohappoa (vrt. sekvenssi tunnusnro 1), muodostetaan HindIII-restriktiofragmentti, joka käsittää hybridigeenin, joka koodittaa tyypin SAH-peptidi kimeeristä proteiinia (kuvio 1, paneeli A), jota välittömästi edeltää SAH:n "prepro"-kuljetusalue. Tämä restriktiofragmentti kloonataan tuottavassa suunnassa plasmidin pYG105 HindIII-kohtaan, jolloin muodostuu ilmentämisplasmidi pYG1223.

Toisissa suoritusmuodoissa käyttämällä kohdennetun mutagenisoinnin ja PCR-monistamisen yhdistettyjä tekniikoita voidaan muodostaa toivomusten mukaan kuvion 4 paneelin A mukaisen MstII-HindIII-restriktiofragmentin variantteja, joista on deletoitu yksi tai useampi kiinnittymiskohta sulfatideihin ja/tai botrosetiiniin ja/tai hepariiniin ja/tai kollageeniin ja/tai jotka on substituoitu millä tahansa tähteellä, joka osallistuu vWF:ään liittyvien IIB-tyypin patologioiden esiintuloon.

Plasmidin pET-8c52K muissa hyödyllisissä variantteissa mutaatioita suoritetaan esimerkiksi kohdennetusti mutagenisoimalla ihmis-vWF:n asemissa 471, 474, 509 ja 695 esiintyvien kysteiinien kokonaisuudessaan tai osittain korvaamiseksi tai poistamiseksi. Nimenomaisia esimerkkejä ovat plasmidit p5E ja p7E, joissa kysteiinit, jotka esiintyvät asemissa 471 ja 474 yhtäältä ja asemissa 471, 474, 509 ja 695 toisaalta on vastaavasti korvattu glysiinitähteillä. Monistamalla PCR:llä näitä plasmideja käyttäen oligodeoksinukleotidejä Sq2149 (5'-CCCGGGATCCCTTAGGCTTAACCGGTGAAGCCGGC-3', MstII-kohta on alleviivattu) ja Sq2029 voidaan muodostaa MstII-HindIII-restriktiofragmentteja, jotka sisältävät luonnollisesta

vWF:stä tähteet Thr470 - Val713 paitsi, että vähintään kysteiinitähteet asemissa 471 ja 474 on mutatoitu glysiinitähteiksi. Ligatoimalla nämä fragmentit HindIII-MstII-restriktiofragmenttiin, joka vastaa SAH:ta koodittavaa geeniä kokonaisuudessaan lukuun ottamatta kolmea viimeistä C-terminaalista aminohappoa (vrt. sekvenssi tunnusnro 1), muodostetaan HindIII-restriktiofragmentti, joka käsittää hybridigeenin, joka koodittaa tyypin SAH-peptidi kimeeristä proteiinia (kuvio 1, paneeli A), jota välittömästi edeltää SAH:n "prepro"-kuljetusalue. Nämä restriktiofragmentit kloonataan tuottavassa suunnassa plasmidin pYG105 HindIII-kohtaan, jolloin muodostuvat ilmentämisplasmidit pYG1283 (kimeeri SAH-vWF470-713, C471G, C474G) ja pYG1279 (kimeeri SAH-vWF470-713, C471G, C474G, C509G, C695G).

Toiset erityisen käyttökelpoiset mutaatiot koskevat vähintään yhtä tähdettä, joka liittyy vWF:ään liittyviin tyypin IIB patologioihin (vWF:n luonnollisen affiniteetin GPIb:lle lisääntyminen), kuten tähteet Arg543, Arg545, Trp550, Val551, Val553, Pro574 tai Arg578 esimerkiksi. Geneettiset DNA-yhdistämistekniikat in vitro mahdollistavat samoin mielen mukaan yhden tai useamman ylimääräisen tähteen lisäämisen vWF:n sekvenssiin ja esimerkiksi ylimääräisen metioniin asemien Asp539 ja Glu542 väliin.

E.7.2. Fragmentit, jotka vastustavat vWF:n sitoutumista endoteelin alaisiin kudoksiin

Erityisessä suoritusmuodossa vWF:n sitoutumiskohdat endoteelin alaisiin kudososiin, ja esimerkiksi kollageeniin, muodostetaan plasmidin pET-8c52K PCR-monistuksella esimerkiksi käyttäen oligodeoksinukleotidejä Sq2258 (5'-GGATCCTTAGGGCTGTGCAGCAGGCTACTGGACCTGGTC-3', MstII-kohta on alleviivattu) ja Sq2259 (5'-GAATTCAAGCTTAACAGAGGTAGCTAACGATCTCGTCCC-3', HindIII-kohta on alleviivattu), jolloin muodostuu MstII-HindIII-restriktiofragmentti, joka koodittaa luonnollisen vWF:n tähteitä Cys509 - Cys695. Deletoimalla tai modifioimalla syntyy myös molekyylivariantteja, jotka käsittävät minkä

tahansa toivottavan yhdistelmän vWF:n kiinnittymiskohtien sulfatideihin välillä, ja/tai botrosetiiniin ja/ tai hepariiniin ja/tai kollageeniin ja/tai mihin tahansa tähteeseen, joka on vastuussa vWF:n affinitetiin GP1b:lle modifikaatiosta (vWF:ään liittyvät tyypin II patologiat). Toisessa suoritusmuodossa alue, joka kykenee kiinnittymään kollageeniin, voi samoin olla peräisin vWF-fragmentista, joka sijaitsee tähteiden 911 ja 1 114 välillä ja jota kuvaavat Pareti et al. [J. Biol. Chem. 262 (1987) 13835 - 13841]. Ligatoimalla nämä fragmentit HindIII-MstII-restriktiofragmenttiin, joka vastaa SAH:ta koodittavaa geeniä kokonaisuudessaan lukuun ottamatta kolmea viimeistä C-terminaalista aminohappoa (vrt. sekvenssi tunnusnro 1), muodostetaan HindIII-restriktiofragmentteja, jotka käsittävät hybridigeenin, joka koodittaa tyypin SAH-peptidi kimeeristä proteiinia (kuvio 1, paneeli A), jota välittömästi edeltää SAH:n "prepro"-kuljetusalue. Nämä restriktiofragmentit kloonataan tuottavassa suunnassa plasmidin pYG105 HindIII-kohtaan, jolloin muodostuvat vastaavat ilmentämisplasmidit ja esimerkiksi plasmidi pYG1277 (SAH-vWF509-695).

E.7.3. SAH:n ja vWF:n välisten kimeerien puhdistus ja molekyylitason karakterisointi

Kimeerejä, jotka esiintyvät viljelmäsupernatanteissa, jotka vastaavat CBS 293.91 -kantaa, joka ontransformoitu esimerkiksi esimerkkien E.7.1. ja E.7.2. mukaisilla ilmentämisplasmideilla, karakterisoidaan ensivaiheessa SAH-osalle ja vWF-osalle spesifisten vasta-aineiden avulla. Kuvioiden 5 - 7 tulokset osoittavat, että hiiva K. lactis kykenee erittämään SAH:n ja vWF-fragmentin välisiä kimeerisiä proteiineja, ja että nämä kimeerit ovat immunologisesti reaktiivisia. Tiettyjen näistä kimeereistä puhdistaminen voi samoin olla toivottavaa. Siten viljelmä sentrifugoidaan (10 000 x g, 30 min), supernatantti käytetään 0,22 mm:n suodattimen (Millipore) läpi ja konsentroidaan sitten ultrasuodattamalla (Amicon) käyttäen membraania, jonka erotuskynnys on 30 kDa. Sitten saatua konsentraattia dialysoidaan

vastaan Tris-HCl-liuosta (50 mM, pH 8) ja puhdistetaan sitten kolonnissa. Esimerkiksi konsentraattia, joka vastaa plasmidilla pYG1206 transformoidun kannan CBS 293.91 viljelmäsupernatanttia, puhdistetaan affiniteettikromatografisesti Bleu-Trisacryl-valmisteella (IBF). Voidaan samoin käyttää puhdistusta ioninvaihtokromatografisesti. Esimerkiksi kimeerin SAH-vWF470-713 kyseessä ollen ultrasuodatuksesta saatua konsentraattia dialysoidaan vastaan Tris-HCl-liuosta (50 mM, pH 8), minkä jälkeen se panostetaan 20 ml:n fraktioina kationinvaihtokolonniin (5 ml, S Fast Flow, Pharmacia), jota on tasapainoitettu samalla puskurilla. Sitten kolonni pestään useaan kertaan Tris-HCl-liuoksella (50 mM, pH 8), minkä jälkeen kimeerinen proteiini eluoidaan kolonnista käyttäen NaCl-gradienttia (0 - 1 M). Sitten kimeeristä proteiinia sisältävät fraktiot yhdistetään ja niitä dialysoidaan vastaan 50 mM Tris-HCl-liuosta (pH 8), minkä jälkeen ne panostetaan toistamiseen S Fast Flow -kolonniin. Kolonnista eluoinnin jälkeen proteiinia sisältävät fraktiot yhdistetään, niitä dialysoidaan vettä vastaan ja ne kylmäkuivataan ennen karakterisointia: esimerkiksi sekventoimalla (Applied Biosystem) hiivan CBS 293.91 erittämä proteiini [SAH-vWF470-704 C471G, C474G] saadaan SAH:lle odotuksia vastaava N-pään sekvenssi (Asp-Ala-His...), mikä osoittaa kimeerin oikeanlaisen kypsymisen välittömästi C-terminaalisesti SAH:n "pro"-alueen tähteiden Arg-Arg dubletista (sekvenssi tunnusnro 1). SAH:n ja vWF:n välisten kimeeristen proteiinien oleellisesti monomeerisen luonteen vahvistaa samoin niiden eluutioprofiili TSK 3000 -kolonnissa [Toyo Soda Company, tasapainoitettu kakodylaattiliuoksella (pH 7), joka sisältää pitoisuuden 0,2 M Na_2SO_4]: esimerkiksi kimeeri [SAH-vWF470-704 C471G, C474G] käyttäytyy näissä olosuhteissa kuten proteiini, jonka näennäinen molekyylipaino on 95 kDa, osoittaen monomeerisen luonteensa.

Esimerkki 8

Urokinaasista saatuja kimeerejä

E.8.1. Rakentamiset

Fragmentti, joka vastaa urokinaasin aminoterminaalista fragmenttia [ATF: EGF:n kaltainen alue + kringle-(runsaasti silmukoita sisältävä) alue], voidaan saada tiettyjen ihmiskarsinoomien solujen vastaavasta lähetti-RNA:sta, esimerkiksi käyttäen Pharmacian markkinoimaa RT-PCR-pakkausta. MstII-HindIII-restriktiofragmentti, joka sisältää ihmisurokinaasin ATF:n, esitetään sekvenssissä tunnusnro 3. Ligatoimalla plasmidin pYG404 HindIII-MstII-fragmentti tähän MstII-HindIII-fragmenttiin voidaan muodostaa plasmidin pYG1341 HindIII-fragmentti, joka koodittaa kimeeristä proteiinia, jossa SAH-molekyyli on geneettisesti kytketty ATF:ään (SAH-UK1→135). Samalla tavalla plasmidi pYG1340 sisältää HindIII-fragmentin, joka koodittaa kimeeriä, joka koostuu SAH:sta, jota välittömästi seuraavat ihmisen urokinaasin ensimmäiset 46 tähdettä (SAH-UK1→46, vrt. sekvenssi tunnusnro 3). Kloonaamalla tuottavassa suunnassa plasmidin pYG1340 HindIII-restriktiofragmentti (SAH-UK1→46) plasmidien pYG105 (LAC4) ja pYG106 (PGK) HindIII-kohtaan muodostetaan ilmentämisplasmidit pYG1343 ja vastaavasti pYG1342. Samalla tavalla kloonaamalla tuottavassa suunnassa plasmidin pYG1341 (SAH-UK1→135) HindIII-restriktiofragmentti plasmidien pYG105 (LAC4) ja pYG106 (PGK) HindIII-kohtaan muodostetaan ilmentämisplasmidit pYG1345 ja vastaavasti pYG1344.

E.8.2. Hybridien eritys

Valikoinnin G418:lla täydennetyllä ja runsaasti ravinteita sisältävällä kasvualustalla jälkeen testataan yhdistelmä-DNA-kloonien kykyä erittää kimeeristen proteiinien SAH-UK kypsää muotoa. Muutamia klooneja, jotka vastaavat esimerkin E.9.1. mukaisilla ilmentämisplasmideilla transformoitua K. lactis -kantaa CBS 293.91, inkuboidaan 28 °C:ssa täydellisessä selektiivisessä nestemäisessä kasvualustassa. Solusupernatantteja testataan sitten elektro-

foreesin 8,5-%:isessa akryyliamidigeelissä jälkeen joko suoraan värjäämällä geeli Coomassie-sinisellä tai blot-immuunisiirron jälkeen käyttäen primaarisina vasta-aineina kaniinin polyklonaalista seerumia, joka kohdistuu ihmisen albumiinia tai ihmisen urokinaasia vastaan. Kuvion 9 tulokset osoittavat, että hiiva Kluyveromyces erittää erityisen hyvin hybridiproteiineja SAH-UK1→46 ja SAH-UK1→135.

E.8.3. SAH:n ja urokinaasin välisten kimeerien puhdistaminen

Esimerkin E.8.1. mukaisilla ilmentämisplasmideilla transformoidun kannan CBS 293.91 viljelmä sentrifugoidaan, minkä jälkeen viljelmäsupernatantti käytetään 0,22 mm:n suodattimen (Millipore) läpi ja konsentroidaan sitten ultrasuodattamalla (Amicon) käyttäen membraania, jonka erotuskynnys on 30 kDa. Saatu konsentraatti säädetään sitten 50 millimolaariseksi (50 mM) Tris-HCl:n suhteen lähtien 1 M Tris-HCl-varastoliuoksesta (pH 7), minkä jälkeen se panostetaan 20 ml:n fraktioina anioninvaihtokolonniin (3 ml, D-Zephyr, Sepracor), jota on tasapainoitettu samalla puskurilla. Kimeerinen proteiini (SAH-UK1→46 tai SAH-UK1→135) eluoidaan sitten kolonnista NaCl-gradienttia (0 -1 M) käyttäen. Sitten kimeeristä proteiinia sisältävät fraktiot yhdistetään ja niitä dialysoidaan vastaan 50 mM Tris-HCl-liuosta (pH 6) ja ne panostetaan toistamiseen D-Zephyr-kolonniin, jota on tasapainoitettu samalla puskurilla. Kolonnin eluoinnin jälkeen proteiinia sisältävät fraktiot yhdistetään, niitä dialysoidaan vettä vastaan ja ne kylmäkuivataan, minkä jälkeen karakterisoidaan niiden biologista aktiivisuutta ja etenkin niiden kykyä syrjäyttää urokinaasi solureseptoriltaan.

Esimerkki 9

G-CSF-johdannaiskimeerejä

E.9.1. Rakentamiset

E.9.1.1. Kytkeminen C-terminaalisesti SAH:hon

Ihmis-G-CSF:n kypsän muodon sisältävä MstII-HindIII-restriktiofragmentti muodostetaan esimerkiksi seu-

raavalla strategialla: ensin hankitaan KpnI-HindIII-restriktiofragmentti entsymaattisella PCR-monistamistekniikalla käyttäen oligodeoksinukleotidejä Sq2291 (5'-CAAGGATCCAAGCTTCAGGGCTGCGCAAGGTGGCGTAG-3', HindIII-kohta on alleviivattu) ja Sq2292 (5'-CGGGGTACCTTAGGCTTAACCCCCCTGGGCCCTGCCAGC-3', KpnI-kohta on allevivattu) alukkeena ja matriisina plasmidia BBG13. Plasmidi BBG13 käsittää kypsän ihmis-G-CSF:n B-muotoa (174 aminohappoa) koodittavan geenin ja se saadaan taholta British Bio-technology Limited, Oxford, Englanti. Entsymaattisen monistamisen noin 550 nukleotidin tuotetta pilkotaan sitten restriktioentsyymeillä KpnI ja HindIII ja kloonataan samoilla entsyymeillä leikattuun vektoriin pUC19, jolloin muodostuu yhdistelmä-DNA-plasmidi pYG1255. Tämä plasmidi on lähde MstI-HindIII-restriktiofragmentille, joka mahdollistaa G-CSF:n fuusioinnin välittömästi alavirtaan SAH:sta (kimeeri SAH-G.CSF) ja jonka nukleotidisekvenssi esitetään sekvenssinä tunnusnro 4.

Voi samoin olla toivottavaa insertoida peptidiliittäjä SAH- ja G-CSF-osien väliin, esimerkiksi jotta mahdollistettaisiin translaatioosan parempi funktionaalinen presentaatio. MstI-HindIII-restriktiofragmentti muodostetaan esimerkiksi substituoimalla plasmidin pYG1255 MstII-ApaI-fragmentti oligodeoksinukleotideillä Sq2742 (5'-TTAGGCTTAGGTGGTGGCGGTACCCCCCTGGGCC-3', kodonit, jotka koodittavat tämän erityisen liittäjän glysiinitähteitä, on alleviivattu) ja Sq2741 (5'-CAGGGGGGTACCGCCACCACCTAAGCC-3'), jotka muodostavat ilmaantuessaan MstII-ApaI-fragmentin. Näin muodostettu plasmidi käsittää siten MstII-HindIII-restriktiofragmentin, jonka sekvenssi on identtinen sekvenssin tunnusnro 4 sekvenssiin nähden MstII-ApaI-fragmenttia lukuun ottamatta.

Ligatoimalla plasmidin pYG404 HindIII-MstII-fragmentti plasmidin pYG1255 MstII-HindIII-fragmenttiin on mahdollista muodostaa plasmidin pYG1259 HindIII-fragmentti, joka koodittaa kimeeristä proteiinia, jossa kypsän G-CSF:n

B-muoto on sijoitettu geneettisesti kytkemällä lukualueelle C-terminaalisesti SAH-molekyyliin (SAH-G.CSF).

HindIII-restriktiofragmentti, joka on identtinen lukuun ottamatta MstII-ApaI-fragmenttia, voidaan samoin helposti muodostaa, jolloin se koodittaa kimeeristä proteiinia, jossa kypsän G-CSF:n B-muoto on sijoitettu geneettisesti kytkemällä lukualueelle C-terminaalisesti SAH-molekyyliin ja erityiseen peptidiliittäjään. Tämä liittäjä koostuu esimerkiksi 4 glysiinitähteestä plasmidin pYG1336 HindIII-fragmentissa (kimeeri SAH-Gly_4-G.CSF).

Plasmidin pYG1259 HindIII-restriktiofragmentti kloonataan tuottavassa suunnassa ilmentämisplasmidin pYG105 HindIII-restriktiokohtaan, jolloin muodostuu ilmentämisplasmidi pYG1266 (SAH-G.CSF). Toisessa esimerkissä kloonaamalla plasmidin pYG1259 HindIII-restriktiofragmentti tuottavassa suunnassa plasmidin pYG106 HindIII-kohtaan muodostetaan plasmidi pYG1267. Plasmidit pYG1266 ja pYG1267 ovat keskenään isogeenisiä lukuun ottamatta SalI-HindIII-restriktiofragmenttia, joka koodittaa K. lactiksen LAC4-promoottoria (plasmidi pYG1266) tai S. cerevisiaen PGK-promoottoria (plasmidi pYG1267).

Toisessa esimerkissä kloonaamalla tuottavassa suunnassa plasmidin pYG1336 HindIII-restriktiofragmentti (kimeeri SAH-Gly_4-G.CSF) plasmidien pYG105 (LAC4) ja pYG106 (PGK) HindIII-kohtaan muodostetaan ilmentämisplasmidit pYG1351 ja vastaavasti pYG1352.

E.9.1.2. Kytkeminen N-terminaalisesti SAH:hon

Erityisessä suoritusmuodossa käyttämällä kohdennetun mutagenisoinnin ja PCR-monistamisen yhdistettyjä tekniikoita on mahdollista rakentaa hybridigeenejä, jotka koodittavat kimeeristä proteiinia, joka on tulos translationaalisesta kytkennästä signaalipeptidin (ja esimerkiksi SAH:n prepro-alueen), sekvenssin, johon sisältyy geeni, jolla on G-CSF-aktiivisuutta, ja SAH:n kypsän muodon tai sen jonkin molekyylivariantin (vrt. kimeeri paneelissa B, kuvio 1) välillä. Näitä hybridigeenejä rajoittavat edullisesti

5'-suunnassa translaation käynnistäjään ATG ja 3'-suunnassa translaation lopetuskodoniin HindIII-restriktiokohdat. Esimerkiksi käyttämällä oligodeoksinukleotidiä Sq2369 [5'-GTTCTACGCCACCTTGCGCAGCCCGGTGGAGGCGGTGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGG-3', alleviivatut tähteet (valinnaisia) vastaavat tässä nimenomaisessa kimeerissä 4 glysiinitähteestä koostuvaa peptidiliittäjää] on mahdollista kohdennetusti mutagenisoimalla sijoittaa lukualueelle ihmisen G-CSF:n kypsä muoto plasmidista BBG13 välittömästi ylävirtaan SAH:n kypsästä muodosta, jolloin muodostuu välituoteplasmidi A. Samalla tavalla käyttämällä oligodeoksinukleotidiä Sq2338 [5'-CAGGGAGCTGGCAGGGCCCAGGGGGGTTCGACGAAACACACCCCTGGAATAAGCCGAGCT-3' (ei-koodittava säie), nukleotidit, jotka ovat komplementaarisia nukleotideihin nähden, jotka koodittavat ihmisen G-CSF:n kypsän muodon ensimmäisiä N-terminaalisia tähteitä, on alleviivattu] on mahdollista kohdennetusti mutagenisoimalla kytkeä lukualueelle SAH:n prepro-alue välittömästi ylävirtaan ihmisen G-CSF:n kypsästä muodosta, jolloin muodostuu välituoteplasmidi B. Sitten muodostetaan HindIII-fragmentti, joka koodittaa tyypin peptidi-SAH (vrt. kuvio 1, paneeli B) kimeeristä proteiinia, liittämällä plasmidin B HindIII-SstI-fragmentti (SAH:n prepro-liitosalue + kypsän G-CSF:n N-terminaalinen fragmentti) plasmidin A SstI-HindIII-fragmenttiin [liitos kypsä G-CSF-$(glysiini)_{x4}$-kypsä SAH]. Plasmidi pYG1301 sisältää tämän erityisen HindIII-restriktiofragmentin, joka koodittaa kimeeriä G.CSF-Gly_4-SAH fuusioituna välittömästi alavirtaan SAH:n prepro-alueesta (sekvenssi tunnusnro 5). Kloonaamalla tämä HindIII-restriktiofragmentti tuottavassa suunnassa plasmidien pYG105 (LAC4) ja pYG106 (PGK) HindIII-kohtaan muodostetaan ilmentämisplasmidit pYG1302 ja vastaavasti pYG1303.

E.9.2. Hybridien eritys

Valikoinnin G418:lla täydennetyllä runsaasti ravinteita sisältävällä kasvualustalla jälkeen testataan yhdistelmä-DNA-kloonien kykyä erittää SAH:n ja G-CSF:n välisten kimeeristen proteiinien kypsää muotoa. Muutamia klooneja,

jotka vastaavat K. lactis -kantaa CBS 293.91, joka on transformoitu plasmideilla pYG1266 tai pYG1267 (SAH-G.CSF), pYG1302 tai pYG1303 (G.CSF-Gly_4-SAH) tai edelleen pYG1351 tai pYG1352 (SAH-Gly_4-G.CSF), inkuboidaan 28 °C:ssa selektiivisessä täydellisessä nestemäisessä kasvualustassa. Elektroforeesin 8,5-%:isessa akryyliamidigeelissä jälkeen testataan sitten solusupernatantteja joko suoraan värjäämällä geeli Coomassie-sinisellä tai blot-immuunisiirron jälkeen käyttäen primaarisina vasta-aineina ihmisen G-CSF:n vastaisia kaniinin polyklonaalisia vasta-aineita tai ihmisalbumiinin vastaista kaniinin polyklonaalista seerumia. Kuvion 12 tulokset osoittavat, että hybridiproteiinin SAH-G.CSF tunnistavat sekä ihmisalbumiinin että ihmis-G-CSF:n vastaiset vasta-aineet (paneelit C ja vastaavasti B). Kuvion 13 tulokset osoittavat, että Kluyveromyces-hiiva erittää erityisen hyvin kimeeriä SAH-Gly_4-G.CSF (vyöhyke 3), mikä johtuu mahdollisesti siitä, että peptidiliittäjän läsnäolo SAH-osan ja G-CSF-osan välillä suosii enemmän näiden 2 osan toisistaan riippumatonta uudelleenlaskostumista kimeerin kuljetuksessa eritysreitille. Lisäksi Kluyveromyces-hiiva erittää samoin N-terminaalista fuusiota (G.CSF-Gly_4-SAH) (kuvio 13, vyöhyke 1).

E.9.3. SAH:n ja G-CSF:n välisten kimeerien puhdistus ja molekyylitason karakterisointi

Kannan CBS 293.91 viljelmä, joka on transformoitu esimerkin E.9.1. mukaisilla ilmentämisplasmideilla, sentrifugoidaan, minkä jälkeen viljelmäsupernatantti käytetään 0,22 mm:n suodattimen (Millipore) läpi ja konsentroidaan sitten ultrasuodattamalla (Amicon) käyttäen membraania, jonka erotuskynnys on 30 kDa. Saatu konsentraatti säädetään sitten 50 millimolaariseksi (50 mM) Tris-HCl:n suhteen lähtien 1 M Tris-HCl-varastoliuoksesta (pH 6), minkä jälkeen se panostetaan 20 ml:n fraktioina ioninvaihtokolonniin (5 ml, Q Fast Flow, Pharmacia), jota on tasapainoitettu samalla puskurilla. Kimeerinen proteiini eluoidaan sitten kolonnista NaCl-gradienttia (0 - 1 M) käyttäen. Sitten kimeeris-

tä proteiinia sisältävät fraktiot yhdistetään ja niitä dialysoidaan vastaan 50 mM Tris-HCl-liuosta (pH 6) ja ne panostetaan toistamiseen Q Fast Flow -kolonniin (1 ml), jota on tasapainoitettu samalla puskurilla. Kolonnin eluoinnin jälkeen proteiinia sisältävät fraktiot yhdistetään, niitä dialysoidaan vettä vastaan ja ne kylmäkuivataan, minkä jälkeen niitä karakterisoidaan: esimerkiksi sekventoimalla (Applied Biosystem) hiivan CBS 293.91 erittämä SAH-G.CSF-proteiini saadaan SAH:lle odotuksia vastaava N-terminaalinen sekvenssi (Asp-Ala-His...), mikä osoittaa kimeerin oikeanlaisen kypsymisen välittömästi C-terminaalisesti SAH:n "pro"-alueen tähteiden Arg-Arg dubletista (sekvenssi tunnusnro 1).

Esimerkki 10

Immunoglobuliinista saatuja kimeerejä

E.10.1. rakentamiset

Geenimanipulatiivisin tekniikoin voidaan rakentaa Fv'-fragmentti, joka koodittaa immunoglobuliinin (Ig) raskaiden ja kevyiden ketjujen vaihtuvia fragmentteja, joita liittää toisiinsa peptidiliittäjä [Bird et al., Science 242 (1988) 423; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85 (1988) 5879]. Kaaviollisesti tietyn Ig:n raskaiden ja kevyiden ketjujen vaihtuvat alueet (noin 120 tähdettä) kloonataan lähtien vastaavan hybridooman lähetti-RNA:sta esimerkiksi käyttäen Pharmacian markkinoimaa RT-PCR-pakkausta (Mouse ScFv Module). Toisessa vaiheessa vaihtuvat alueet kytketään geneettisesti geenimanipulatiivisin tekniikoin synteettisen liitospeptidin ja esimerkiksi liittäjän $(GGGGS)_{x3}$ välityksellä. MstII-HindIII-restriktiofragmentti, joka sisältää hiirihydridooman erittämän immunoglobuliinin Fv'-fragmentin, esitetään sekvenssinä tunnusnro 6. Ligatoimalla plasmidin pYG404 HindIII-MstII-fragmentti tähän MstII-HindIII-fragmenttiin voidaan muodostaa plasmidin pYG1382 HindIII-fragmentti, joka koodittaa kimeeristä proteiinia, jossa SAH-molekyyli on geneettisesti kytketty sekvenssin tunnusnro 6 mukaiseen Fv'-fragmenttiin (kimeeri SAH-Fv'). Kloonaa-

malla tuottavassa suunnassa plasmidin pYG1382 HindIII-restriktiofragmentti plasmidien pYG105 (LAC4) ja pYG106 (PGK) HindIII-kohtaan muodostetaan ilmentämisplasmidit pYG1383 ja vastaavasti pYG1384.

E.10.2. Hybridien eritys

Valikoinnin G418:lla täydennetyllä runsaasti ravinteita sisältävällä kasvualustalla jälkeen testataan yhdistelmä-DNA-kloonien kykyä erittää kimeerisen proteiinin SAH-Fv' kypsää muotoa. Muutamia klooneja, jotka vastaavat K. lactis -kantaa CBS 293.91, joka on transformoitu plasmideilla pYG1383 tai pYG1384 (SAH-Fv'), inkuboidaan 28 °C:ssa selektiivisessä täydellisessä nestemäisessä kasvualustassa. Solusupernatantteja testataan sitten elektroforeesin 8,5-%:isessa akryyliamidigeelissä jälkeen joko suoraan värjäämällä geeli Coomassie-sinisellä tai blot-immuunisiirron jälkeen käyttäen primaarisina vasta-aineina ihmisalbumiinin vastaista kaniinin polyklonaalista seerumia, tai suoraan inkuboimalla biotinyloiduilla vasta-aineilla, jotka kohdistuvat vastaan hiiriperäisiä immunoglobuliineja. Kuvion 15 mukaiset tulokset osoittavat, että hybridiproteiinin SAH-Fv' tunnistavat sekä ihmisalbumiinin vastaiset vasta-aineet (paneeli C), ja se reagoi biotinyloitujen vuohivasta-aineiden kanssa, jotka ovat immunologisesti reaktiivisia vastaan hiiren immunoglobuliineja (paneeli B).

Esimerkki 11

Kimeerien biologinen aktiivisuus

E.11.1. Biologinen aktiivisuus in vitro

E.11.1.1. SAH:n ja vWF:n väliset kimeerit

Tuotteiden antagonistiaktiivisuus määritetään mittaamalla paraformaldehydillä kiinnitettyjen ihmisverihiutaleiden agglutinaation annosriippuvainen inhibitio menetelmän mukaan, jota kuvaavat Prior et al. [Bio/Technology 10 (1992) 66]. Mittaukset suoritetaan agregametrillä (PAP-4, Bio Data, Horsham, PA, USA), joka rekisteröi optisen transmission vaihtelut ajan funktiona sekoitettaessa 37 °C:ssa vWF:n, botrosetiimin (8,2 mg/ml) ja testattavan tuotteen

läsnä ollessa vaihtelevina laimennoksina (pitoisuuksina). Kutakin mittausta varten 400 ml (8×10^7 verihiutaletta) suspensiota ihmisverihiutaleista, jotka on stabiloitu paraformaldehydillä [0,5 %, sitten uudelleensuspendointi liuokseen NaCl (137 mM); $MgCl_2$ (1 mM); NaH_2PO_4 (0,36 mM); $NaHCO_3$ (10 mM); KCl (2,7 mM); glukoosi (5,6 mM); SAH (3,5 mg/ml); Hepes-puskuri (10 mM, pH 7,35)], esi-inkuboidaan 37 °C:ssa agregametrin sylinterikyvetissä (8,75 x 50 mm, Wellcome Distriwell, 159 rue Nationale, Pariisi) 4 minuutin ajan, minkä jälkeen niihin lisätään 30 ml testattavan tuotteen liuosta eri laimennoksina kantajassa, jonka koostumus on apyrogeeninen [mannitoli (50 g/litra); sitruunahappo (192 mg/litra); L-lysiinimonohydrokloridi (182,6 mg/litra); NaCl (88 mg/litra); pH säädetään 3,5:ksi lisäämällä NaOH-liuosta (1 M)], tai yksinomaan koostumuskantajaa (verrokkikoe). Sitten saatua suspensiota inkuboidaan 1 minuutin ajan 37 °C:ssa ja lisätään 12,5 ml ihmis-vWF:ää [American Bioproducts, Parsippany, NJ, USA; 11 %:n von Willebrand-aktiivisuus mitattuna PAP-4:n (Platelet Aggregation Profiler^R) käytön suositusten mukaan käyttämällä formaldehydillä kiinnitettyjä verihiutaleita (2×10^5 verihiutaletta/ml) ihmisplasmasta, joka sisältää 0 - 100 % vWF:ää ja ristosetiinia (10 mg/ml, vrt. ss. 36 - 45: vW Program^{TM}], ja inkuboidaan 1 minuutin ajan 37 °C:ssa, minkä jälkeen lisätään 12,5 ml botrosetiiniliuosta [joka on puhdistettu Bothrops jararacan (Sigma) kylmäkuivatusta myrkystä menettelyn mukaan, jota kuvaavat Sugimoto et al., Biochemistry 266 (1991) 18712]. Transmission luennan rekisteröinti ajan funktiona suoritetaan sitten 2 minuutissa sekoittaen kyvettiin sijoitetun magnetoidun sekoittajan avulla (Wellcome Distriwell) sekoittaen magneettisesti 1 100 kierrosta/min agregametrillä. Optisen transmission keskimääräinen vaihtelu ($n^3 5$ kullekin laimennokselle) ajan funktiona on siten mitta verihiutaleiden agglutinaatiolle, joka johtuu vWF:n ja botrosetiinin läsnäolosta vaihtelevien pitoisuuksien testattavaa tuotetta puuttuessa tai läsnä ollessa. Tällai-

sista rekisteröinneistä määritetään sitten verihiutaleiden agglutinaation inhibitio-%, joka johtuu tuotteen kustakin pitoisuudesta, ja piirretään suora, joka antaa inhibitio-%:n tuotteen laimennoksen käänteisarvon funktiona log-log-asteikolla. IC_{50} (tai tuotteen pitoisuus, joka aikaansaa agglutinaation 50-%:isen inhibition) määritetään sitten tästä suorasta. Kuvion 16 taulukossa verrataan esillä olevan keksinnön mukaisten joidenkin SAH-vWF-kimeerien IC_{50}-arvoja, ja se osoittaa, että jotkut niistä ovat parempia verihiutaleiden agglutinaation antagonisteja kuin tuote RG12986, jota kuvaavat Prior et al. [Bio/Technology 10 (1992) 66], ja joka sisältyi kokeisiin verrokkina. Identtisillä testeillä ihmisen verihiutaleiden agglutinaation inhibitiosta sian plasman vWF:n (Sigma) läsnä ollessa on mahdollista lisäksi osoittaa, että tietyt esillä olevan keksinnön mukaiset hybridit, ja etenkin tietyt tyypin IIB variantit, ovat erittäin hyviä verihiutaleiden agglutinaation antagonisteja botrosetiinityypin kofaktoreiden puuttuessa. Näiden erityisten kimeerien botrosetiinista riippumaton antagonismi voidaan samoin osoittaa menettelyn mukaan, jota alunperin kuvasivat Ware et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991) 2946] monoklonaalisen vasta-aineen ^{125}I-LJ-IB1 (10 mg/ml), joka on vWF:n kiinnittymisen verihiutale-GPIb:hen kilpaileva inhibiittori [Handa, M., et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 12579], syrjäytymisestä 30 minuutin inkuboinnin 22 °C:ssa jälkeen tuoreiden verihiutaleiden läsnä ollessa (10^8 verihiutaletta/ml).

E.11.1.2. SAH:n ja G-CSF:n väliset kimeerit

Testataan puhdistettujen kimeerien kykyä sallia in vitro IL3:sta riippuvaisen hiirisolulinjan NFS60 lisääntyminen mittaamalla tritioidun tymidiinin inkorporaatio oleellisesti menettelyn mukaan, jota kuvaavat Tsuchiya et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. 83 (1986) 7633]. Kullekin kimeerille mittaukset suoritetaan 3 - 6 kertaan kolmipistetestillä (tuotteen 3 laimennosta) vyöhykkeellä, jossa aktiivisen tuotteen määrän ja merkityn tymidiinin (Amersham)

inkorporaation välinen suhde on lineaarinen. Kussakin mikrotitraatioplakissa verrokkituotteen aktiivisuus, joka muodostuu nisäkässoluissa ilmennnetystä yhdistelmä-DNA-ihmis-G-CSF:stä, on samoin systemaattisesti inkorporoitu. Kuvion 17 tulokset osoittavat, että kimeeri SAH-G.CSF (pYG1266), jonka on erittänyt hiiva Kluyveromyces ja joka on puhdistettu esimerkin E.9.3. mukaan, kykenee in vitro transduktoimaan solulinjan NFS60 solulisääntymissignaalin. Tässä erityistapauksessa kimeerin spesifinen aktiivisuus (tuiketta/min/molaarisuus) on noin 7 kertaa heikompi kuin verrokki-G-CSF:n (ei kytketty).

E.11.2. Biologinen aktiivisuus in vivo

SAH/G-CSF-kimeerien stimuloivaa aktiivisuutta granulopoieesiin in vivo testataan ihonalaisen ruiskutuksen rottaan (Sprague-Dawley/CD, 250 - 300 g, 8 - 9 viikkoa) jälkeen ja verrataan nisäkässoluista ilmennetyn verrokki-G-CSF:n stimulaatioaktiivisuuteen. Kutakin tuotetta, joka testataan 7 eläimellä, ruiskutetaan ihonalaisesti selänolan alueelle 100 ml 7 perättäisenä päivänä (J1- J7). 500 ml verta otetaan päivinä J-6, J2 (ennen 2. ruisketta), J5 (ennen 5. ruisketta) ja J8, ja suoritetaan verilaskenta. Tässä testissä SAH-G.CSF-kimeerin (pYG1266) spesifinen aktiivisuus (neutropoieesiyksikköä/ruiskutettua moolia) on identtinen verrokki-G-CSF:n spesifiseen aktiivisuuteen (kuvio 18). Koska tällä nimenomaisella kimeerillä on in vitro spesifinen aktivisuus, joka on 7 kertaa heikompi kuin verrokki-G-CSF:n (kuvio 17), on siten osoitettu, että G-CSF:n geneettinen kytkeminen SAH:hon modifioi suotuisasti sen farmakokineettisiä ominaisuuksia.

Sekvenssiluettelo:

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:
(A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
(B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
(C) VILLE: ANTONY
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 92165

(ii) TITRE DE L' INVENTION: NOUVEAUX POLYPEPTIDES BIOLOGIQUEMENT ACTIFS, LEUR PREPARATION ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LES CONTENANT.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 6

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:
(A) TYPE DE SUPPORT: Tape
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 1859 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 26..1855
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Chimere de type SAH-Peptide"

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: misc_feature
(B) EMPLACEMENT: 1842..1848
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /standard_name= "Site Mst II"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```
AAGCTTTACA ACAAATATAA AAACA ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT      52
                            Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu
                              1               5

CTT TTT CTC TTT AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA GAT     100
Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp
 10                  15                  20                  25

GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA     148
```

```
Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu
                30                  35                  40

AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT CAG CAG      196
Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln
            45                  50                  55

TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT      244
Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
        60                  65                  70

GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA      292
Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser
    75                  80                  85

CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT CGT      340
Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg
 90                  95                 100                 105

GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG      388
Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu
                110                 115                 120

AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC CTC CCC      436
Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro
            125                 130                 135

CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC      484
Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
        140                 145                 150

AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA      532
Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
    155                 160                 165

CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT      580
His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
170                 175                 180                 185

AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC      628
Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
                190                 195                 200

CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT TCG TCT      676
Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser
            205                 210                 215

GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA      724
Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg
        220                 225                 230

GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA      772
Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys
    235                 240                 245

GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC      820
Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val
250                 255                 260                 265

CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG      868
His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg
                270                 275                 280
```

```
GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT TCG ATC TCC AGT      916
Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
            285                 290                 295

AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC      964
Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
        300                 305                 310

ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA     1012
Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
    315                 320                 325

GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG     1060
Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
330                 335                 340                 345

GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG     1108
Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
                350                 355                 360

CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG ACA TAT     1156
His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
            365                 370                 375

GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC     1204
Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
        380                 385                 390

TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG     1252
Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln
    395                 400                 405

AAT TTA ATC AAA CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG TAC     1300
Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr
410                 415                 420                 425

AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA     1348
Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln
                430                 435                 440

GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG     1396
Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val
            445                 450                 455

GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA     1444
Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala
        460                 465                 470

GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG     1492
Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu
    475                 480                 485

AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA TCC TTG     1540
Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu
490                 495                 500                 505

GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC     1588
Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr
                510                 515                 520

GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA     1636
```

```
Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile
            525                 530                 535

TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT     1684
Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
        540                 545                 550

GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA     1732
Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
    555                 560                 565

GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT     1780
Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
570                 575                 580                 585

GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT     1828
Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
                590                 595                 600

GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA (NNN)p     TAAGCTT                  1859
Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu PEPTIDE
            605                 610
```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 750 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 3..746
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Fragment C-ter de la chimere SAH-vWF470"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```
CC TTA GGC TTA ACC TGT GAA GCC TGC CAG GAG CCG GGA GGC CTG GTG       47
  Leu Gly Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val
    1               5                  10                  15

GTG CCT CCC ACA GAT GCC CCG GTG AGC CCC ACC ACT CTG TAT GTG GAG      95
Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu
                20                  25                  30

GAC ATC TCG GAA CCG CCG TTG CAC GAT TTC TAC TGC AGC AGG CTA CTG     143
Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu
            35                  40                  45

GAC CTG GTC TTC CTG CTG GAT GGC TCC TCC AGG CTG TCC GAG GCT GAG     191
```

```
Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu
          50                  55                  60

TTT GAA GTG CTG AAG GCC TTT GTG GTG GAC ATG ATG GAG CGG CTG CGC      239
Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg
     65                  70                  75

ATC TCC CAG AAG TGG GTC CGC GTG GCC GTG GTG GAG TAC CAC GAC GGC      287
Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp Gly
 80                  85                  90                  95

TCC CAC GCC TAC ATC GGG CTC AAG GAC CGG AAG CGA CCG TCA GAG CTG      335
Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu
                100                 105                 110

CGG CGC ATT GCC AGC CAG GTG AAG TAT GCG GGC AGC CAG GTG GCC TCC      383
Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser
            115                 120                 125

ACC AGC GAG GTC TTG AAA TAC ACA CTG TTC CAA ATC TTC AGC AAG ATC      431
Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile
        130                 135                 140

GAC CGC CCT GAA GCC TCC CGC ATC GCC CTG CTC CTG ATG GCC AGC CAG      479
Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln
    145                 150                 155

GAG CCC CAA CGG ATG TCC CGG AAC TTT GTC CGC TAC GTC CAG GGC CTG      527
Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu
160                 165                 170                 175

AAG AAG AAG AAG GTC ATT GTG ATC CCG GTG GGC ATT GGG CCC CAT GCC      575
Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His Ala
                180                 185                 190

AAC CTC AAG CAG ATC CGC CTC ATC GAG AAG CAG GCC CCT GAG AAC AAG      623
Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys
            195                 200                 205

GCC TTC GTG CTG AGC AGT GTG GAT GAG CTG GAG CAG CAA AGG GAC GAG      671
Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu
        210                 215                 220

ATC GTT AGC TAC CTC TGT GAC CTT GCC CCT GAA GCC CCT CCT CCT ACT      719
Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr
    225                 230                 235

CTG CCC CCC GAC ATG GCA CAA GTC TAAGCTT                             750
Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val
240                 245
```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 423 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) *HYPOTHETIQUE: OUI*

(iii) ANTI-SENS: OUI

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 3..419
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Fragment C-ter de la chimere SAH-UK1-135"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

```
CC TTA GGC TTA AGC AAT GAA CTT CAT CAA GTT CCA TCG AAC TGT GAC        47
   Leu Gly Leu Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp
    1               5                  10                  15

TGT CTA AAT GGA GGA ACA TGT GTG TCC AAC AAG TAC TTC TCC AAC ATT       95
Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile
                20                  25                  30

CAC TGG TGC AAC TGC CCA AAG AAA TTC GGA GGG CAG CAC TGT GAA ATA      143
His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile
            35                  40                  45

GAT AAG TCA AAA ACC TGC TAT GAG GGG AAT GGT CAC TTT TAC CGA GGA      191
Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly
        50                  55                  60

AAG GCC AGC ACT GAC ACC ATG GGC CGG CCC TGC CTG CCC TGG AAC TCT      239
Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser
    65                  70                  75

GCC ACT GTC CTT CAG CAA ACG TAC CAT GCC CAC AGA TCT GAT GCT CTT      287
Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu
80                  85                  90                  95

CAG CTG GGC CTG GGG AAA CAT AAT TAC TGC AGG AAC CCA GAC AAC CGG      335
Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg
                100                 105                 110

AGG CGA CCC TGG TGC TAT GTG CAG GTG GGC CTA AAG CCG CTT GTC CAA      383
Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln
            115                 120                 125

GAG TGC ATG GTG CAT GAC TGC GCA GAT GGA AAA TAAGCTT                  423
Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Lys
        130                 135
```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) *CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:*
(A) LONGUEUR: 541 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) *HYPOTHETIQUE: NON*

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 3..536
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Fragment C-ter de la chimere SAH-G.CSF"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

```
CC TTA GGC TTA ACC CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC        47
   Leu Gly Leu Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser
    1               5                  10                  15

TTC CTG CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC        95
Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly
                20                  25                  30

GCA GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC       143
Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro
            35                  40                  45

GAG GAG CTG GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC       191
Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro
        50                  55                  60

CTG AGC TCC TGC CCC AGC CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC       239
Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser
    65                  70                  75

CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG CAG GCC CTG       287
Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu
80                  85                  90                  95

GAA GGG ATA TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG       335
Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu
                100                 105                 110

GAC GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG       383
Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu
            115                 120                 125

GGA ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC       431
Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe
        130                 135                 140

GCC TCT GCT TTC CAG CGC CGG GCA GGA GGG GTC CTG GTT GCT AGC CAT       479
Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His
    145                 150                 155

CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCG       527
Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala
160                 165                 170                 175

CAG CCC TGAAGCTT                                                     543
Gln Pro
```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 2455 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 26..2389
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Chimere G.CSF-Gly4-SAH en aval region prepro de SAH"

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: misc_recomb
(B) EMPLACEMENT: 620..631
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /standard_name= "Linker PolyGly"

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: misc_feature
(B) EMPLACEMENT: 106..111
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /standard_name= "Site Apa I"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

```
AAGCTTTACA ACAAATATAA AAACA ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT      52
                            Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu
                              1               5

CTT TTT CTC TTT AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA ACC     100
Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Thr
 10                  15                  20                  25

CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC TTC CTG CTC AAG TGC     148
Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys
                 30                  35                  40

TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA GCG CTC CAG GAG     196
Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu
             45                  50                  55

AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG GTG CTG     244
Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu
         60                  65                  70

CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC TCC TGC CCC     292
Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro
     75                  80                  85
```

```
AGC CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC      340
Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly
 90                  95                 100                 105

CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG CAG GCC CTG GAA GGG ATA TCC CCC      388
Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro
                110                 115                 120

GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT      436
Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe
        125                 130                 135

GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC      484
Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala
    140                 145                 150

CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG      532
Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln
155                 160                 165

CGC CGG GCA GGA GGG GTC CTG GTT GCT AGC CAT CTG CAG AGC TTC CTG      580
Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu
170                 175                 180                 185

GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCG CAG CCC GGT GGA GGC      628
Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro Gly Gly Gly
                190                 195                 200

GGT GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA      676
Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly
            205                 210                 215

GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT      724
Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu
        220                 225                 230

CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT      772
Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr
235                 240                 245

GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC      820
Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp
250                 255                 260                 265

AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT      868
Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr
                270                 275                 280

CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA      916
Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu
            285                 290                 295

CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC      964
Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn
        300                 305                 310

CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT     1012
Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe
315                 320                 325

CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC     1060
His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala
```

```
330                 335                 340                 345

AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA  1108
Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys
                350                 355                 360

AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT  1156
Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala
            365                 370                 375

GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT  1204
Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala
        380                 385                 390

TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA  1252
Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly
    395                 400                 405

GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT  1300
Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe
410                 415                 420                 425

CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC  1348
Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr
                430                 435                 440

AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT  1396
Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp
            445                 450                 455

GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT TCG ATC  1444
Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile
        460                 465                 470

TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC  1492
Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser
    475                 480                 485

CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT  1540
His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro
490                 495                 500                 505

TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT  1588
Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr
                510                 515                 520

GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA  1636
Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala
            525                 530                 535

AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG  1684
Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys
        540                 545                 550

ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT  1732
Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His
    555                 560                 565

GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG  1780
Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu
570                 575                 580                 585
```

```
CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA      1828
Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly
                590                 595                 600

GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA      1876
Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val
            605                 610                 615

CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA      1924
Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly
        620                 625                 630

AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC      1972
Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro
    635                 640                 645

TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG      2020
Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu
650                 655                 660                 665

CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA      2068
His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu
                670                 675                 680

TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA      2116
Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu
            685                 690                 695

ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA      2164
Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala
        700                 705                 710

GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT      2212
Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr
    715                 720                 725

GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA      2260
Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln
730                 735                 740                 745

CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC      2308
Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys
                750                 755                 760

AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT      2356
Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu
            765                 770                 775

GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAACATCACA TTTAAAAGCA        2406
Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
        780                 785

TCTCAGCCTA CCATGAGAAT AAGAGAAAGA AAATGAAGAT CAAAAGCTT               2455
```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 756 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 3..752
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Fragment C-ter de la chimere SAH-Fv'"

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: misc_recomb
(B) EMPLACEMENT: 384..428
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /standard_name= "Linker synthetique"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

```
CC TTA GGC TTA CAG GTG CAG CTC GAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG        47
   Leu Gly Leu Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val
     1               5                  10                  15

AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC GCA        95
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala
                20                  25                  30

TTC AGT AGG TCT TGG ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAG GGT       143
Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly
            35                  40                  45

CTT GAG TGG ATT GGA CGG ATT TAT CCT GGA GAT GGA GAT ACC AAA TAC       191
Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr
        50                  55                  60

AAT GGG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCG GAC AGA TCA TCC       239
Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser
    65                  70                  75

AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GTG GGC TCT GCG       287
Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Gly Ser Ala
80                  85                  90                  95

GTC TAT TTC TGT GCA AAA GAG AAC AAT AGG TTC GAC GAG AGG GGT TAC       335
Val Tyr Phe Cys Ala Lys Glu Asn Asn Arg Phe Asp Glu Arg Gly Tyr
                100                 105                 110

TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA       383
Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
            115                 120                 125

GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT AAC       431
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn
        130                 135                 140

ATT CAG TTG ACC CAG TCT CCA AAT TCC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC       479
Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asn Ser Met Ser Thr Ser Val Gly Asp
```

```
    145                 150                 155

AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG GCC AGT CAG GAT GTG GAT ACT TCT GTA      527
Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Val
160                 165                 170                 175

GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGG CAA TCT CCT AAA CTA CTG ATT TAC      575
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
                180                 185                 190

TGG GCA TCC ACC CGG CAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT      623
Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
            195                 200                 205

GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATT AGC AAT GTG CAG TCT GAA      671
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu
        210                 215                 220

GAC TCG GCA GAT TAT TTC TGT CAG CAA TAT AGC AGC TAT CCG TGG ACG      719
Asp Ser Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
    225                 230                 235

TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA TAAGCTT                     759
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
240                 245                 250
```

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä sellaisen rekombinanttipolypeptidin valmistamiseksi, joka käsittää terapeuttista aktiivisuutta omaavasta polypeptidistä peräisin olevan aktiivisen osan, joka on geneettisesti kytketty albumiiniin tai albumiinivarianttiin, jolla variantilla on säilyneenä pitkä puoliintumisaika plasmassa, ja jolloin terapeuttista aktiivisuutta omaava polypeptidi on hormoni, interferoni, interleukiini, erytropoietiini, G-CSF tai insuliini, tunnettu siitä, että viljellään eukaryoottista tai prokaryoottista rekombinanttisolua, johon on lisätty mainittua polypeptidiä koodaava sekvenssi, ilmentämisolosuhteissa, ja otetaan talteen ilmennetty polypeptidi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että terapeuttista aktiivisuutta omaava polypeptidi on ihmisalkuperää oleva polypeptidi.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että polypeptidin aktiivinen osa käsittää rakenteen, joka on

(a) kokonainen peptidirakenne, tai

(b) (a):n fragmentti tai rakenne, joka on saatu (a):sta rakenteellisesti modifioimalla (yhden tai useamman ryhmän mutaatio, substituutio, additio ja/tai deleetio) terapeuttinen aktiivisuus säilyttäen.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että albumiini tai albumiinivariantti käsittää rakenteen, joka on:

(a) kypsä albumiini,

(b) albumiini, tai

(c) rakenne, joka on saatu (a):sta tai (b):stä rakenteellisesti modifioimalla (yhden tai useamman ryhmän mutaatio, substituutio, additio ja/tai deleetio) säilyttäen pitkä puoliintumisaika plasmassa.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että polypeptidi käsittää N-terminaalisen metioniinin.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että polypeptidi käsittää liittäjäpeptidin.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että polypeptidi käsittää erityssignaalin.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että erityssignaali on biologisesti aktiivisen polypeptidin luonnollinen erityssignaali.

9. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että polypeptidin aktiivinen osa on kytketty albumiinin N-terminaaliin.

10. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että polypeptidin aktiivinen osa on kytketty albumiinin C-terminaaliin.

11. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 10 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että aktiivinen osa esiintyy polypeptidissä useaan kertaan.

12. Nukleotidisekvenssi, joka koodittaa jossakin patenttivaatimuksessa 1 - 11 määritettyä polypeptidiä.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen nukleotidisekvenssi, tunnettu siitä, että se käsittää sekvenssin, joka koodittaa "johto"-sekvenssin, joka mahdollistaa ilmenetyn polypeptidin erityksen.

14. Ilmentämiskasetti, joka käsittää patenttivaatimuksen 12 tai 13 mukaisen nukleotidisekvenssin transkription aloitusalueen ja mahdollisesti transkription lopetusalueen säätelyn alla.

15. Itsenäisesti replikoituva plasmidi, joka käsittää patenttivaatimuksen 14 mukaisen ilmentämiskasetin.

16. Eukaryoottinen tai prokaryoottinen rekombinanttisolu, johon on insertoitu patenttivaatimuksen 12 tai 13 mukainen nukleotidisekvenssi tai patenttivaatimuksen 14 mu-

kainen ilmentämiskasetti tai patenttivaatimuksen 15 mukainen plasmidi.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen rekombinanttisolu, tunnettu siitä, että se on hiiva-, eläin-, sieni- tai bakteerisolu.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen rekombinanttisolu, tunnettu siitä, että se on suvun Saccharomyces tai Kluyveromyces hiiva.

19. Menetelmä yhden tai useamman rekombinanttipolypeptidin sisältävän farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi, joka rekombinanttipolypeptidi käsittää terapeuttista aktiivisuutta omaavasta polypeptidistä peräisin olevan aktiivisen osan, joka on geneettisesti kytketty albumiiniin tai albumiinivarianttiin, jolla variantilla on säilyneenä pitkä puoliintumisaika plasmassa, ja jolloin terapeuttista aktiivisuutta omaava polypeptidi on hormoni, interferoni, interleukiini, erytropoietiini, G-CSF tai insuliini, tunnettu siitä, että viljellään eukaryoottista tai prokaryoottista rekombinanttisolua, johon on lisätty mainittua polypeptidiä koodaava nukleotidisekvenssi, ilmentämisolosuhteissa, otetaan talteen ilmennetty polypeptidi, ja lisätään yhtä tai useampaa framaseuttisesti hyväksyttävää apuainetta.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en rekombinant polypeptid som innehåller en aktiv del som härstammar från en polypeptid som har terapeutisk aktivitet, och som är genetiskt kopplad till albumin eller en variant av albumin, vilken variant har bibehållen lång halveringstid i plasma, varvid polypeptiden som har terapeutisk aktivitet är ett hormon, interferon, interleukin, erytropoietin, G-CSF eller insulin, kännetecknat av att man odlar en rekombinant eukaryotisk eller prokaryotisk cell i vilken man infört en nukleotidsekvens som kodar nämnda polypeptid under expressionsbetingelser, och tar tillvara den expresserade polypeptiden.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att polypeptiden som har terapeutisk aktivitet är en polypeptid av mänskligt ursprung.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, kännetecknat av att den aktiva delen har en struktur som är:

(a) en hel peptidstruktur, eller

(b) ett fragment av (a) eller en struktur som erhållits ur (a) genom strukturell modifiering (mutation, substitution, addition och/eller deletion av en eller flera grupper) med bibehållen terapeutisk aktivitet.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3, kännetecknat av att albuminet eller albuminvarianten har en struktur som är:

(a) moget albumin,

(b) albumin eller

(c) en struktur som erhållits ur (a) eller (b) genom strukturell modifiering (mutation, substitution, addition och/eller deletion av en eller flere grupper) med bibehållen lång halveringstid i plasma.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4, kännetecknat av att polypeptiden innehåller N-terminalt metionin.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 5, kännetecknat av att polypeptiden innehåller en linkerpeptid.

7. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 6, kännetecknat av att polypeptiden innehåller en utsöndringssignal.

8. Förfarande enligt patentkrav 7, kännetecknat av att utsöndringssignalen är den naturliga utsöndringssignalen för den biologiskt aktiva polypeptiden.

9. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 8, kännetecknat av att polypeptidens aktiva del är kopplad till albuminets N-terminal.

10. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 8, kännetecknat av att polypeptidens aktiva del är kopplad till albuminets C-terminal.

11. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 10, kännetecknat av att den aktiva delen föreligger flera gånger i polypeptiden.

12. Nukleotidsekvens som kodar för en polypeptid som definierats i något av patentkraven 1 - 11.

13. Nukleotidsekvens enligt patentkrav 12, kännetecknad av att den omfattar en sekvens som kodar en "ledar"-sekvens som möjliggör utsöndring av den expresserade polypeptiden.

14. Expressionskassett, som omfattar en nukleotidsekvens enligt något av patentkraven 12 eller 13 under kontroll av ett transkriptionsinitieringsområde och eventuellt ett transkriptionsavslutningsområde.

15. Självreplikerande plasmid om innehåller en expressionskassett enligt patentkrav 14.

16. Rekombinant eukaryotisk eller prokaryotisk cell i vilken införts en nukleotidsekvens enligt patentkrav 12

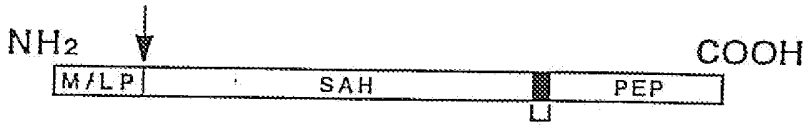
eller 13 eller en expressionskassett enligt patentkrav 14 eller en plasmid enligt patentkrav 15.

17. Rekombinant cell enligt patentkrav 16, kännetecknad av att den är en jäst-, djur-, svamp- eller bakteriecell.

18. Rekombinant cell enligt patentkrav 17, kännetecknad av att den är jäst från släktet Saccharomyces eller Kluyveromyces.

19. Förfarande för framställning av en farmaceutisk komposition som innehåller en eller flere rekombinanta polypeptider som innehåller en aktiv del som härstammar från en polypeptid som har terapeutisk aktivitet, genetiskt kopplad till albumin eller en variant av albumin, vilken variant har bibehållen lång halveringstid i plasma, varvid polypeptiden som har terapeutisk aktivitet är ett hormon, interferon, interleukin, erytropoietin, G-CSF eller insulin, kännetecknat av att man odlar en rekombinant eukaryotisk eller prokaryotisk cell i vilken man infört en nukleotidsekvens som kodar nämnda polypeptid under expressionsbetingelser, och tar tillvara den expresserade polypeptiden, och tillsätter en eller flere farmaceutiskt acceptabla excipienter.

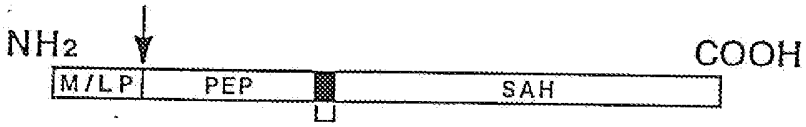
Fig. 1A



peptidiliittäjä

(mahdollinen)

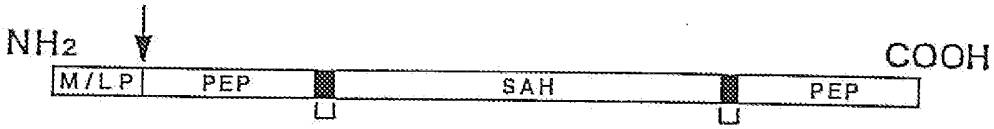
Fig. 1B



peptidiliittäjä

(mahdollinen)

Fig. 1C



peptidiliittäjä

(mahdollinen)

Fig. 1

Sekvenssi tunnusnro 1

```
AAGCT TTACAACAAA TATAAAAACA ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT
                            Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe   -12

AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT
Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His     9

CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG
Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln    29

TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT
Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe    49

GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT
Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu    69

TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC
Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp    89

TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC
Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn   109

CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC
Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp   129

AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT
Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe   149

TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC
Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys   169

CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG
Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly   189

AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA
Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg   209

GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA
Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala   229

GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT
Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp   249
```

Fig. 2(a)

```
CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT
Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp    269

TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC
Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys    289

ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT
Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe    309

GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG
Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met    329

TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG CTG AGA CTT
Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu    349

GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC
Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys    369

TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA
Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys    389

CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT
Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val    409

CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC
Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn    429

CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA
Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala    449

GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA
Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val    469

AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA
Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser    489

GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC
Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe    509

CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT
His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu    529

GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT
Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp    549

GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC
Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala    569

                                                    MstII
GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA (NNN)p TAA GCTT
Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  (X)p  ***
                                                                 peptidi
```

Fig. 2(b)

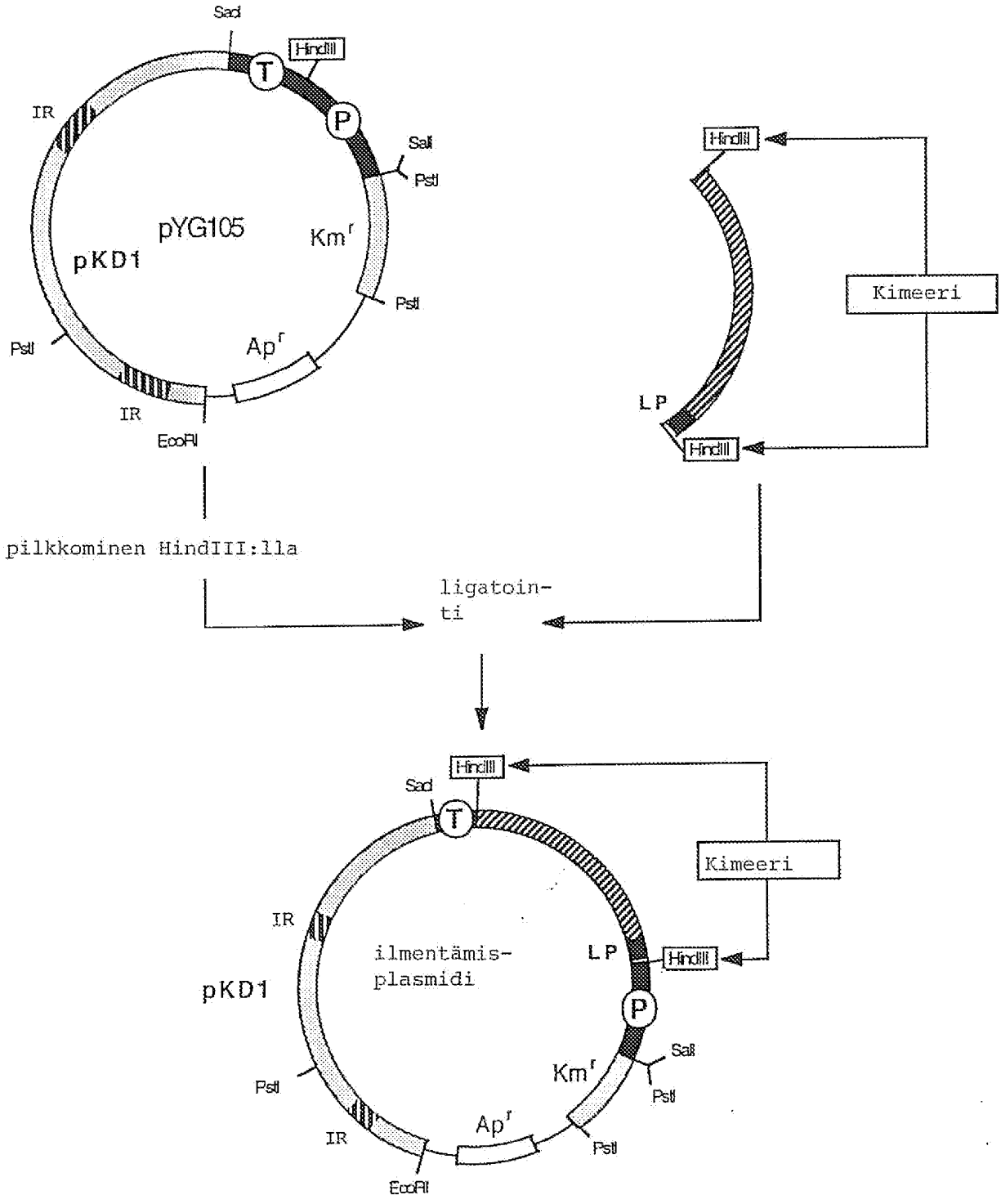

SacI
HindIII
T
P
IR
SalI
PstI
pYG105
pKD1
Km r
PstI
Ap r
PstI
IR
EcoRI
HindIII
Kimeeri
LP
HindIII
pilkkominen HindIII:lla
ligatoin-
ti
HindIII
SacI
T
Kimeeri
IR
ilmentämis-
plasmidi
LP
HindIII
pKD1
P
SalI
Km r
PstI
PstI
Ap r
IR
PstI
EcoRI

Fig. 3

Fig. 4A

CC TTA GGC TTA (NNN)244 TAA GCTT
Leu Gly Leu (Thr470->Val713) ***

Fig. 4B

CC TTA GGC TTA (NNN)29 TAA GCTT
Leu Gly Leu (Thr470->Asp498) ***

Fig. 4C

CC TTA GGC CTC (NNN)14 TAA GCTT
Leu Gly Leu (Cys695->Pro708) ***
<------- D5 ------->

Fig. 4D

CC TTA GGC TTA (NNN)90 TAA GCTT
Leu Gly Leu (Thr470->Tyr508,Arg663->Val713) ***

Fig. 4 (A - D)

Sekvenssi tunnusnro 2

```
CC TTA GGC TTA ACC TGT GAA GCC TGC CAG GAG CCG GGA GGC CTG GTG GTG CCT CCC ACA
   Leu Gly Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr   601
      SAH<----I--->vWF470->713

GAT GCC CCG GTG AGC CCC ACC ACT CTG TAT GTG GAG GAC ATC TCG GAA CCG CCG TTG CAC
Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His   621

GAT TTC TAC TGC AGC AGG CTA CTG GAC CTG GTC TTC CTG CTG GAT GGC TCC TCC AGG CTG
Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu   641

TCC GAG GCT GAG TTT GAA GTG CTG AAG GCC TTT GTG GTG GAC ATG ATG GAG CGG CTG CGC
Ser Glu Ala Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg   661

ATC TCC CAG AAG TGG GTC CGC GTG GCC GTG GTG GAG TAC CAC GAC GGC TCC CAC GCC TAC
Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr   681

ATC GGG CTC AAG GAC CGG AAG CGA CCG TCA GAG CTG CGG CGC ATT GCC AGC CAG GTG AAG
Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys   701

TAT GCG GGC AGC CAG GTG GCC TCC ACC AGC GAG GTC TTG AAA TAC ACA CTG TTC CAA ATC
Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile   721

TTC AGC AAG ATC GAC CGC CCT GAA GCC TCC CGC ATC GCC CTG CTC CTG ATG GCC AGC CAG
Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln   741

GAG CCC CAA CGG ATG TCC CGG AAC TTT GTC CGC TAC GTC CAG GGC CTG AAG AAG AAG AAG
Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys   761

GTC ATT GTG ATC CCG GTG GGC ATT GGG CCC CAT GCC AAC CTC AAG CAG ATC CGC CTC ATC
Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile   781

GAG AAG CAG GCC CCT GAG AAC AAG GCC TTC GTG CTG AGC AGT GTG GAT GAG CTG GAG CAG
Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln   801

CAA AGG GAC GAG ATC GTT AGC TAC CTC TGT GAC CTT GCC CCT GAA GCC CCT CCT CCT ACT
Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr   821

CTG CCC CCC GAC ATG GCA CAA GTC TAA GCTT
Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val ***                                               829
```

Fig. 4E

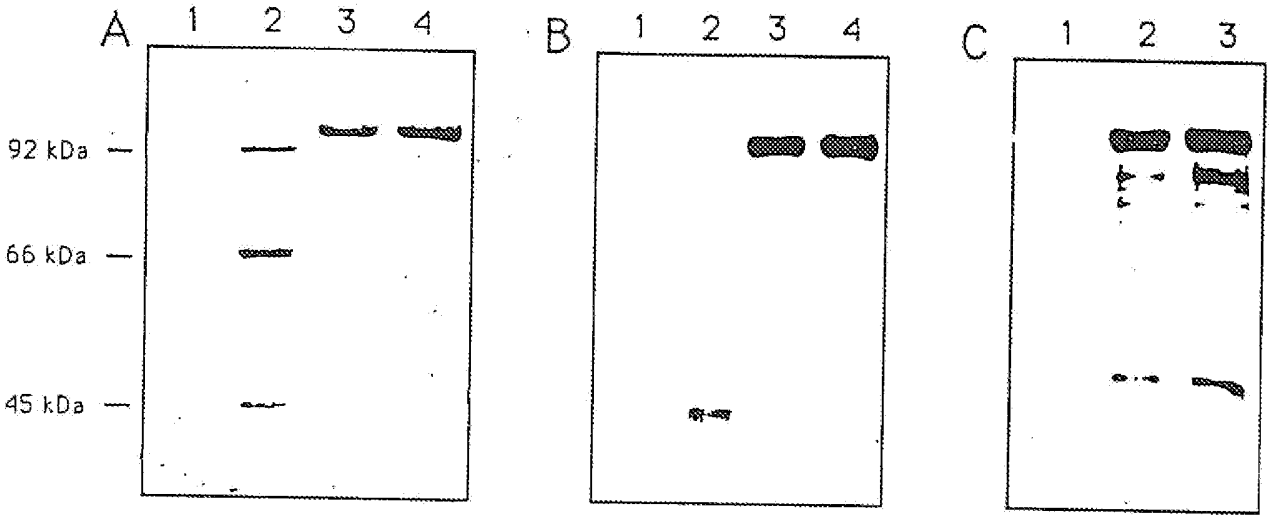


Fig. 5

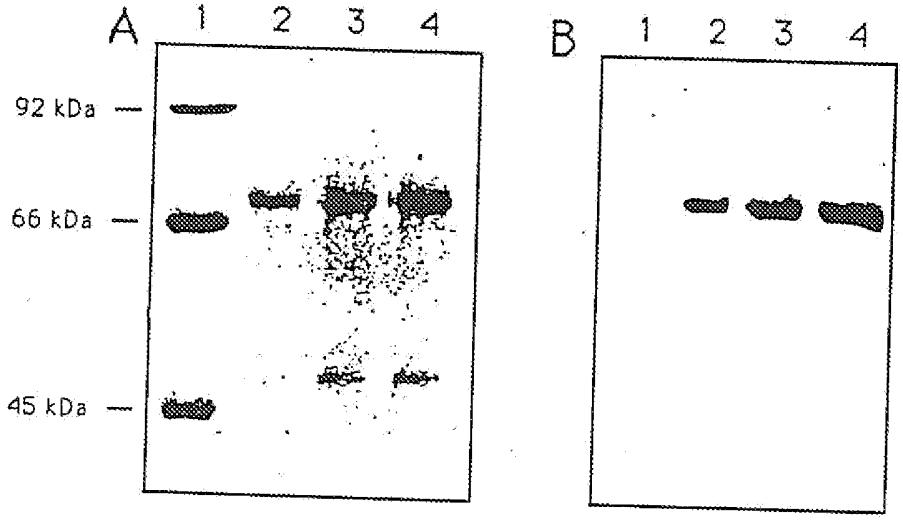


Fig. 6

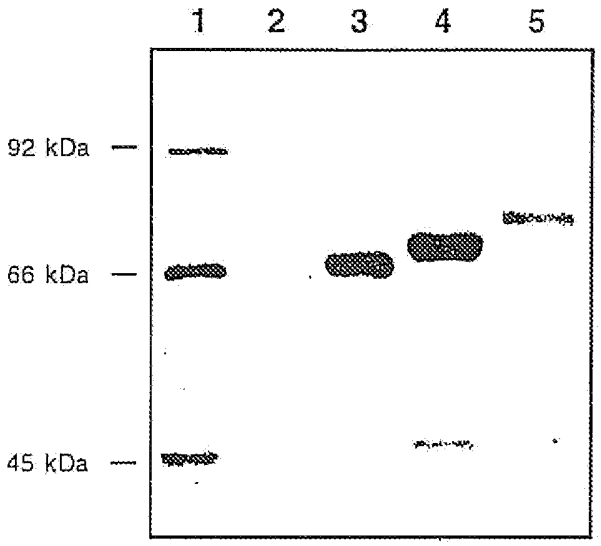


Fig. 7

Sekvenssi tunnusnro 3

```
CC TTA GGC TTA AGC AAT GAA CTT CAT CAA GTT CCA TCG AAC TGT GAC TGT CTA AAT GGA
   Leu Gly Leu Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp Cys Leu Asn Gly   601
     SAH<----I---->UK

GGA ACA TGT GTG TCC AAC AAG TAC TTC TCC AAC ATT CAC TGG TGC AAC TGC CCA AAG AAA
Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys   621

TTC GGA GGG CAG CAC TGT GAA ATA GAT AAG TCA AAA ACC TGC TAT GAG GGG AAT GGT CAC
Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His   641
                          EGF-LIKE<---I--->KRINGLE

TTT TAC CGA GGA AAG GCC AGC ACT GAC ACC ATG GGC CGG CCC TGC CTG CCC TGG AAC TCT
Phe Tyr Arg Gly Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser   661

GCC ACT GTC CTT CAG CAA ACG TAC CAT GCC CAC AGA TCT GAT GCT CTT CAG CTG GGC CTG
Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu Gln Leu Gly Leu   681

GGG AAA CAT AAT TAC TGC AGG AAC CCA GAC AAC CGG AGG CGA CCC TGG TGC TAT GTG CAG
Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln   701

GTG GGC CTA AAG CCG CTT GTC CAA GAG TGC ATG GTG CAT GAC TGC GCA GAT GGA AAA TAA
Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Lys ***   720

GCTT
```

Fig. 8

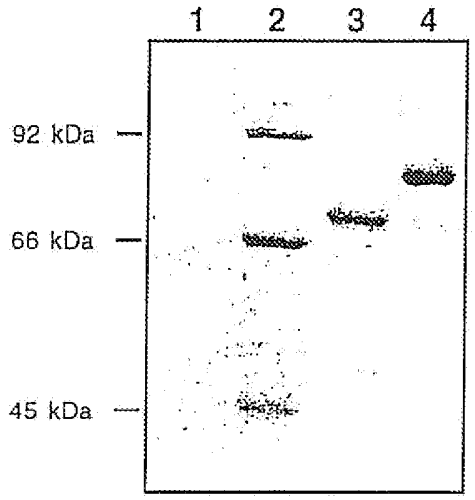


Fig. 9

Sekvenssi tunnusnro 4

```
                                ApaI
CC TTA GGC TTA ACC CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC TTC CTG CTC AAG
   Leu Gly Leu Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys    501
      SAH<---I--->G-CSF

TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT
Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys    621

GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC
Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile    641

                        SstI
CCC TGG GCT CCC CTG AGC TCC TGC CCC AGC CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC
Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser    661

CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG CAG GCC CTG GAA GGG ATA TCC
Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser    681

CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC
Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr    701

ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC
Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala    721

ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGC CGG GCA GGA GGG GTC CTG GTT GCT AGC CAT
Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His    741

CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCG CAG CCC TGA AGCTT
Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro ***        759
```

Fig. 10

Sekvenssi tunnusnro 5

```
AAGCT TTACAACAAA TATAAAAACA ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT
                            Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe   -12

                                                                ApaI
AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA ACC CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG
Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu     9
                                        I--->G-CSF

CCC CAG AGC TTC CTG CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA
Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala    29

GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG GTG CTG
Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu    49
                                                    SstI
CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC TCC TGC CCC AGC CAG GCC CTG
Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu    69

CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG
Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu    89

CAG GCC CTG GAA GGG ATA TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC
Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp   109

GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC
Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala   129

CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGC CGG GCA GGA
Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly   149

GGG GTC CTG GTT GCT AGC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA CGC
Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg   169

CAC CTT GCG CAG CCC GGT GGA GGC GGT GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT
His Leu Ala Gln Pro Gly Gly Gly Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe   189
        G-CSF<---I     linker     I--->SAH
AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT
Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu   209

CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA
Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys   229

ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA
Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly   249

GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT
Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys   269

GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC
Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn   289

CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA
Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu   309

GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC
Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala   329
```

Fig. 11(a)

```
CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT
Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala    349

GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT
Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala    369

TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC
Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe    389

AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT
Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val    409

TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT
Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu    429

GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT TCG ATC
Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile    449

TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATT GCC
Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala    469

GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA
Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu    489

AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG
Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu    509

TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG
Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys    529

ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC
Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala    549

AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAT
Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn    569

TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC
Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr    589

ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA
Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly    609

AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC
Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp    629

TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC
Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp    649

AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG
Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu    669

GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA
Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala    689

GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG
Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu    709

CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC
Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe    729

GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG
Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu    749
                                        MatII
GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA CATCACATTT
Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu ***                         763

AAAAGCATCT CAGCCTACCA TGAGAATAAG AGAAAGAAAA TGAAGATCAA AAGCTT
```

Fig. 11(b)

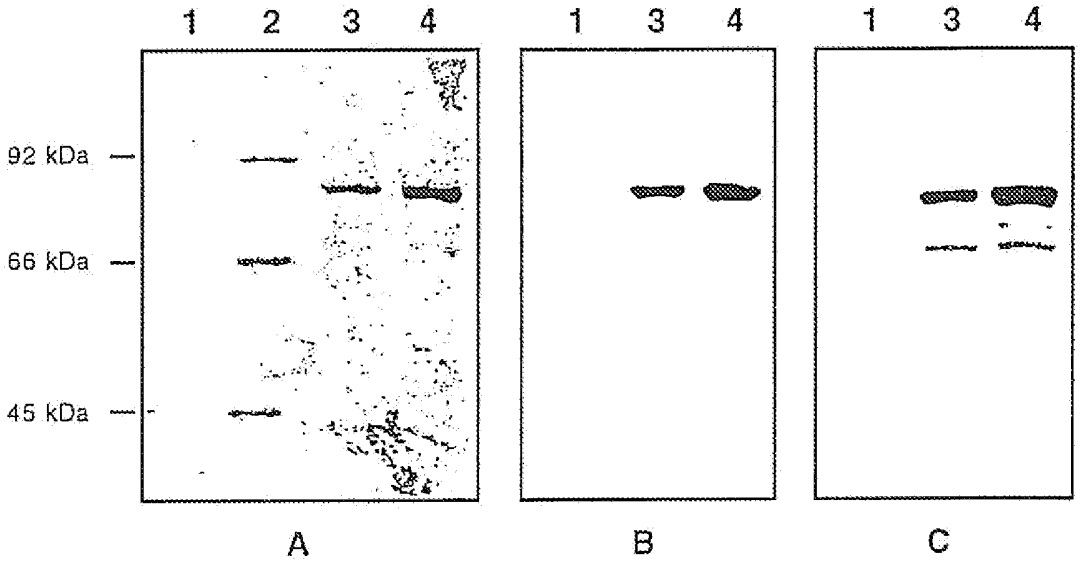


Fig. 12

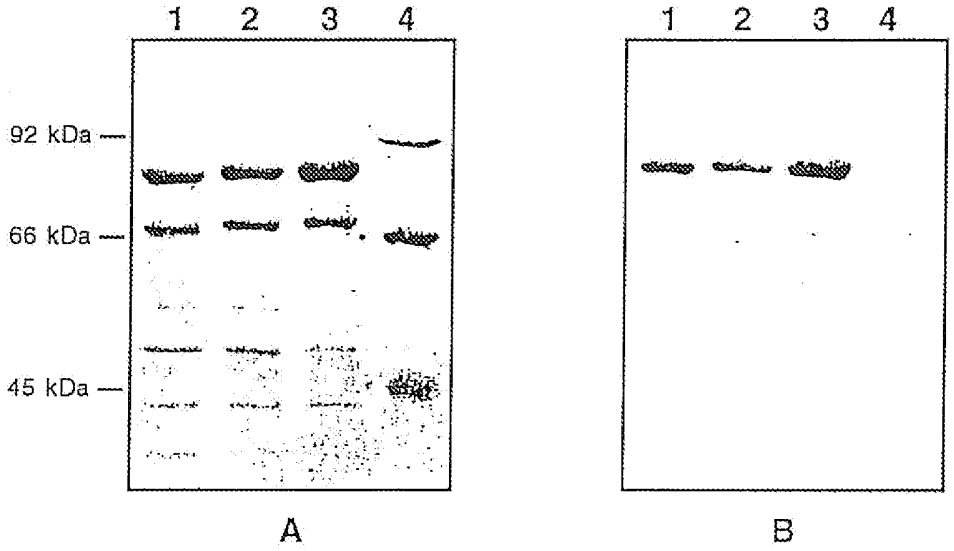


Fig. 13

Sekvenssi tunnusnro 6

```
CC TTA GGC TTA CAG GTG CAG CTC GAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC
   Leu Gly Leu Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala     601
      SAH<----I---->VH

TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC GCA TTC AGT AGG TCT TGG ATG AAC TGG
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn Trp     621

GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CGG ATT TAT CCT GGA GAT GGA
Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly     641

GAT ACC AAA TAC AAT GGG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCG GAC AGA TCA TCC
Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser     661

AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GTG GGC TCT GCG GTC TAT TTC TGT
Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Gly Ser Ala Val Tyr Phe Cys     681

GCA AAA GAG AAC AAT AGG TTC GAC GAG AGG GGT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA
Ala Lys Glu Asn Asn Arg Phe Asp Glu Arg Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln     701

GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly     721
                        VH<----I              linker synthetique

GGC GGA TCT AAC ATT CAG TTG ACC CAG TCT CCA AAT TCC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC
Gly Gly Ser Asn Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asn Ser Met Ser Thr Ser Val Gly Asp     741
           I--->VL

AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG GCC AGT CAG GAT GTG GAT ACT TCT GTA GCC TGG TAT CAA
Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Val Ala Trp Tyr Gln     761

CAG AAA CCA GGG CAA TCT CCT AAA CTA CTG ATT TAC TGG GCA TCC ACC CGG CAC ACT GGA
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly     781

GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATT AGC AAT
Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn     801

GTG CAG TCT GAA GAC TCG GCA GAT TAT TTC TGT CAG CAA TAT AGC AGC TAT CCG TGG ACG
Val Gln Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr     821

TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA TAA GCTT
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys ***                                         831
```

Fig. 14

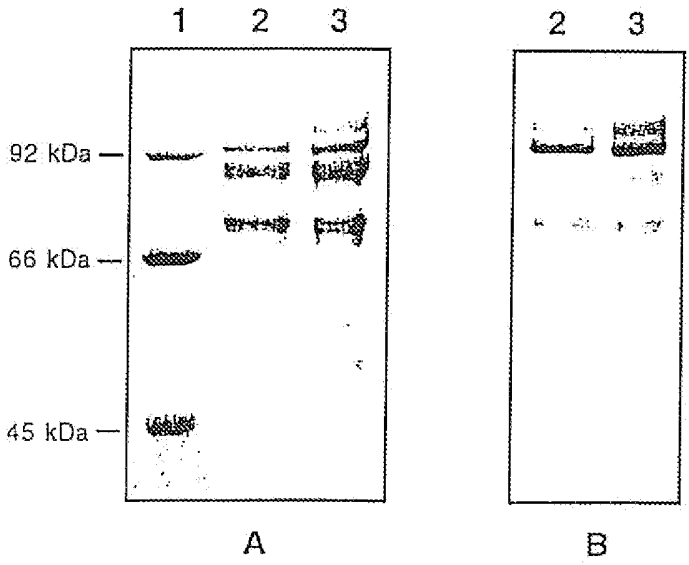


Fig. 15

Tuote	IC_{50} (nM)
RG12986	50
SAH-vWF$_{694-708}$	50000
SAH-vWF$^{470-713}_{C471,474->G}$	20
SAH-vWF$^{470-704}_{C471,474->G}$	<10

Fig. 16

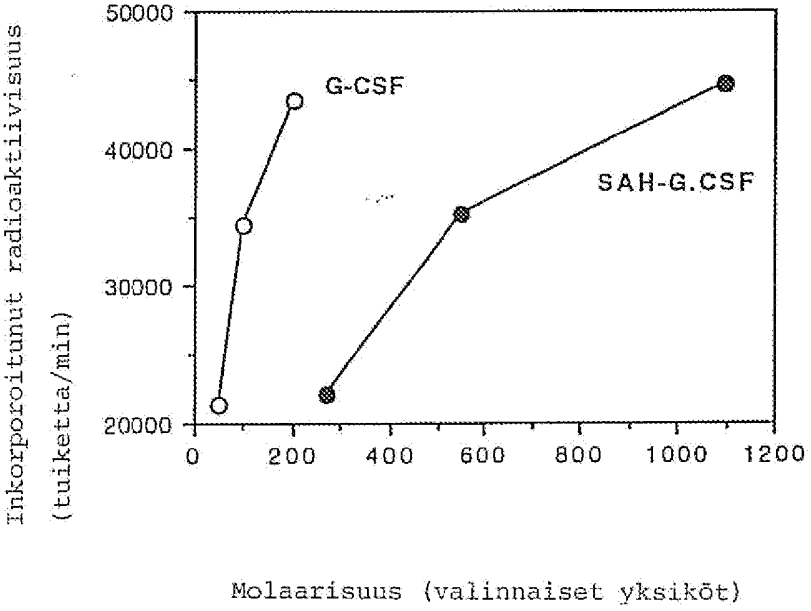

Inkorporoitunut radioaktiivisuus
(tuiketta/min)
50000
40000
30000
20000
0
200
400
600
800
1000
1200
G-CSF
SAH-G.CSF
Molaarisuus (valinnaiset yksiköt)

Fig. 17

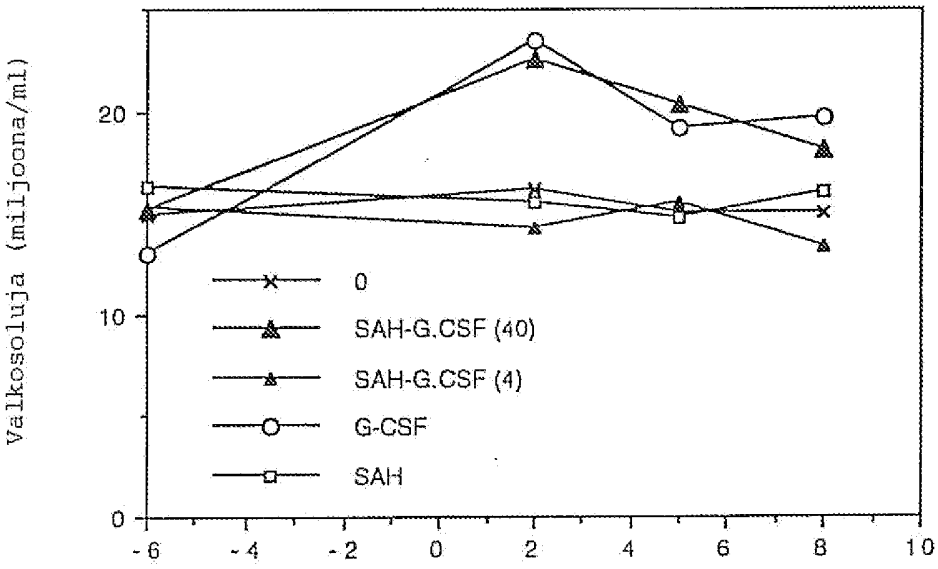

Valkosoluja (miljoona/ml)
20
10
0
-6
-4
-2
0
2
4
6
8
10
0
SAH-G.CSF (40)
SAH-G.CSF (4)
G-CSF
SAH
Päiviä

Fig. 18