(19) DANMARK (11) **DK 174754 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷.: **C 12 N 15/12** **C 07 K 14/71** **C 07 K 16/22** **C 12 N 15/63** **G 01 N 33/536**
G 01 N 33/543

(21) Patentansøgning nr: **PA 2000 01612**

(22) Indleveringsdag: **2000-10-27**

(24) Løbedag: **1988-07-22**

(41) Alm. tilgængelig: **2000-10-27**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2003-10-20**

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

(73) Patenthaver: **Monsanto Company, 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, USA**
Washington University, Washington University Box 8013, 724 S. Euclid Avenue, St. Louis, Missouri 63110, USA

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

(74) Fuldmægtig: **Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**

(54) Benævnelse: **Humane vævsfaktorinhibitor (TFI), antistof med bindingsspecificitet herfor, fremgangsmåde til anvendelse af en TFI-peptid-kolonne til at oprense et antistof og fremgangsmåder til detektion af TFI eller et polypeptid omfattende....**

(56) Fremdragne publikationer:
PNAS,USA,bind 84(april1987),side 1886-90
International Patent Classification, 4.udg.,bind 7, side 39

(57) Sammendrag:
Baseret på tilvejebringelsen af den fuldstændige kodesekvens for en cDNA-klon, der i det væsentlige repræsenterer vævsfaktorinhibitor (TFI) af fuld størrelse angives humane vævsfaktorinhibitor-proteiner, DNA som koder herfor, ekspressionsvektorer omfattende sådan DNA, værtsceller transficeret eller transformeret dermed, en fremgangsmåde til fremstilling af proteinerne, antistoffer rettet mod proteinerne og fremgangsmåder til anvendelse af antistofferne til at oprene et TFI-polypeptid fra et biologisk fluidum og til detektering af et TFI-polypeptid i et biologisk fluidum.

Human vævsfaktorinhibitor (TFI), antistoffer med bindingsspecificitet herfor, fremgangsmåde til anvendelse af en TFI-peptid-kolonne til at oprense et antistof og fremgangsmåder til detektion af TFI eller et polypeptid omfattende et eller flere Kunitz-domæner af TFI i et biologisk fluidum

Den foreliggende opfindelse angår en human koagulationsinhibitor betegnet vævsfaktorinhibitor (TFI) og alternativt som lipoproteinassocieret koagulationsinhibitor (LACI) samt antistoffer med bindingsspecificitet herfor. Endvidere angår opfindelsen en fremgangsmåde til anvendelse af en TFI-peptid-kolonne til at oprense et antistof over for TFI og fremgangsmåder til detektion af TFI eller et polypeptid omfattende et eller flere Kunitz-domæner af TFI i et biologisk fluidum.

OPFINDELSENS BAGGRUND

Koagulationsprocessen, der forekommer i pattedyrblod, omfatter to adskilte systemer – de såkaldte interne og eksterne systemer. Sidstnævnte system aktiveres, når blodet udsættes for vævsthromboplastin (faktor III), i det efterfølgende betegnet vævsfaktor (TF). Vævsfaktor er et lipoprotein, der forekommer i plasmamembranen af en hel række celletyper, idet hjernen og lungerne specielt er rige herpå. Ved at komme i kontakt med TF danner plasmafaktor VII eller dens aktiverede form, faktor VII_a, et calciumafhængigt kompleks med TF, der herefter proteolytisk aktiverer faktor X til faktor X_a, og faktor IX til faktor IX_a.

Tidlige undersøgelser over reguleringen af TF-initieret koagulering viste, at inkubation af TF (i urensede vævsthromboplastin-præparater) med serum hæmmede dens aktivitet *in vitro* og forhindrede dens dødelige virkning, når den blev infunderet i mus. Yderligere undersøgelser af Hjort, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **9**, Suppl. 27, 76-97 (1957) bekræftede og videreudviklede tidligere arbejde inden for dette område og førte til den konklusion, at en hæmmende del i serum genkender faktor VII-TF-komplekset. I overensstemmelse

med denne hypotese er de kendsgerninger, at hæmningen af TF, der forekommer i plasma, kræver tilstedeværelsen af Ca^{2+} (der også er nødvendig for bindingen af faktor VII/VII_a til TF), og at hæmningen kan forhindres og/eller vendes om ved chelatering af divalente kationer med EDTA. Nye undersøgelser har vist, at ikke alene faktor VII_a, men også katalytisk aktiv faktor X_a og en yderligere faktor er nødvendig for opnåelsen af TF-inhibition i plasma eller serum. Se Broze og Miletich, *Blood* **69**, 150-155 (1987) og Sanders et al., *Ibid.* **66**, 204-212 (1985). Denne yderligere faktor, heri defineret som vævsfaktorinhibitor (TFI) og alternativt som lipoproteinassocieret koagulationshæmmer (LACI) forefindes i bariumabsorberet plasma og synes at være associeret med lipoproteiner, da TFI-funktionel aktivitet udskilles med lipoproteinfraktionen, der flyder ovenpå, når serum centrifugeres ved en massefylde på 1,21 g/cm^3. Ifølge Broze og Miletic, *supra*, og *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1886-1890 (1987) udskiller HepG2-celler (en human hepatomacellelinie) en hæmmende del med samme egenskaber som den TFI, der forefindes i plasma.

I EP offentliggørelsesskrift nr. 300 988 beskrives en renset vævsfaktorinhibitor (TFI), der udskilles af HepG2-celler. Den viste sig at forefindes i to former, en TFI_1, der vandrer ved cirka 37000-40000 dalton, og en TFI_2, der vandrer ved 25000-26000 dalton, bestemt ved natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgel-elektroforese (SDS-PAGE). En delvis N-terminal aminosyresekvens for TFI blev kortlagt som:

1 15
X-X-Glu-Glu-Asp-Glu-Glu-His-Thr-Ile-Ile-Thr-Asp-Thr-Glu-

16 27
Leu-Pro-Pro-Leu-Lys-Leu-Met-His-Ser-Phe-(Phe)-Ala,

hvor X-X ikke var blevet bestemt. Indholdet af denne ansøgning betragtes som inkorporeret i denne beskrivelse ved reference.

KORT BESKRIVELSE AF OPFINDELSEN

Opfindelsen bygger på tilvejebringelsen af den fuldstændige kodesekvens for en cDNA-klon, der i det væsentlige repræsenterer vævsfaktorinhibitor (TFI) af fuld størrelse.

Først blev humane placentale og fetal lever-λgtII-cDNA-biblioteker screenet med et polyklonalt kaninantiserum frembragt over for en renset TFI. Immunologisk positive kloner blev yderligere screenet for ^{125}I-faktor X_a-bindende virkning. Der blev opnået syv kloner, der var immunologisk og funktionelt aktive. Den længste klon, placenta-afledt λP9, var 1,4 kilobaser (kb) lang, mens de andre seks havde en længde på 1,0 kb. Delvis DNA-sekvensering viste, at 1,0 kb klonerne havde sekvenser identiske med en del af den længere 1,4 kb klon. Nucleotidsekvensanalyse viste, at λP9 bestod af en 1432 basepar (pb) cDNA-insertion, der omfatter en 5'-ikke-kodende region på 133 bp, en åben læseramme på 912 bp, en stopkodon og en 3'-ikke-kodende region på 384 bp.

cDNA-sekvensen koder for et 31 950 dalton protein på 276 aminosyrer, som omfatter 18 cysteinrester og 7 methioninrester. Den translaterede aminosyresekvens viser, at et signalpeptid på cirka 28 aminosyrer kommer forud for det modne TFI-protein. Det skal bemærkes, at det "modne" TFI er defineret til at omfatte både TFI og methionyl-TFI på grund af den translationelle ATG-kodon i den heri beskrevne λP9-klon.

Der er tre potentielle N-forbundne glycosyleringssteder i TFI-proteinet med sekvensen Asn-X-Ser/Thr, hvori X kan være en vilkårlig af de almindelige 20 aminosyrer. Disse steder er ved aminosyrepositionerne Asn 145, Asn 195 og Asn 256, når den første methioninrest efter den 5'-ikke-kodende region betegnes aminosyreposition +1.

Den translaterede aminosyresekvens af TFI viser adskillige skelnelige domæner, herunder en højt negativt ladet N-terminal, en højt positivt ladet car-

boxy-terminal og en mellemliggende del bestående af tre homologe domæner med sekvenser typiske for enzyminhibitorer af Kunitz-type. Baseret på en homologiundersøgelse synes TFI at være et medlem af den basale proteaseinhibitorgen-superfamilie.

Den oprindelige kilde for proteinmaterialet til frembringelse af cDNA-klon λP9 var humant placentavæv. Dette væv kan fås i udstrakt grad efter fødsel ved almindelige kirurgiske metoder. λgtII (lac5 nin5 c1857 S100) anvendt heri er en velkendt og almindeligt tilgængelig lambda-phag-ekspressionsvektor. Dens konstruktion og restriktionsendonucleasekort er beskrevet af Young og Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1194-1198 (1983).

Northern blot analyse viste, at følgende leverafledte cellelinier: Chang-levercelle, HepG2 hepatoma og SK-HEP-1 hepatoma alle indeholdt to hoveddarter af mRNA (1,4 og 4,4 kb), der hybridiserede med TFI-cDNA'en.

Kloningen af cDNA for TFI og udviklingen af hele dens proteinsekvens og strukturelle domæner som omhandlet heri muliggør detaljerede strukturfunktionelle analyser og tilvejebringer et grundlag for at studere dens biosyntetiske reguleringer. Opfindelsen er således vigtig for lægevidenskaben ved undersøgelsen af koagulationen med hensyn til midler, der er i stand til at hæmme faktor X_a og faktor VII_a/TF-enzymkompleks.

Den foreliggende opfindelse angår specielt human vævsfaktorinhibitor (TFI) med den i Fig. 3 på tegningerne viste proteinaminosyresekvens.

Desuden angår opfindelsen et isoleret og renset antistof der har en bindingsspecificitet for vævsfaktorinhibitor (TFI) med en aminosyresekvens som vist i Fig. 3.

Endvidere angår opfindelsen en fremgangsmåde til anvendelse af en TFI-peptid-kolonne til at oprense et antistof over for den i Fig. 3 på tegningerne viste proteinaminosyresekvens.

Opfindelsen angår yderlige fremgangsmåder til detektion af et første polypeptid i et biologisk fluidum, hvor det nævnte første polypeptid er valgt blandt TFI og et polypeptid omfattende et eller flere Kunitz-domæner af TFI,

hvor én fremgangsmåde ifølge opfindelsen omfatter følgende trin:

(a) man bringer det nævnte fluidum i kontakt med et andet polypeptid, der har en bindingsspecificitet for det nævnte første polypeptid, og

(b) man prøver for tilstedeværelsen af det nævnte andet polypeptid for at bestemme niveauet af det nævnte første polypeptid;

og en anden fremgangsmåde ifølge opfindelsen omfatter følgende trin:

(a) man bringer det nævnte fluidum i kontakt med et antistof, der har en bindingsspecificitet for det nævnte første polypeptid, og et andet polypeptid, der er i stand til at binde det nævnte antistof, og

(b) man prøver for tilstedeværelsen af det nævnte andet polypeptid for at bestemme niveauet af det nævnte første polypeptid.

DETALJERET BESKRIVELSE AF OPFINDELSEN

Opfindelsen beskrives nu nærmere med henvisning til tegningen, på hvilken

Fig. 1 viser screeningen af λgtII-kloner med ^{125}I-faktor X_a. Klonede phaglysater (0,1 ml) blev pletvis anbragt på et nitrocellulosepapir ved sugning under anvendelse af et dot blot apparat. Nitrocellulosepapiret blev herefter probeundersøgt med ^{125}I-faktor X_a og autoradiograferet som beskrevet nærmere. Kloner, der forekommer som mørke pletter, er positive kloner, der binder ^{125}I-faktor X_a. Kontrol λgtII (nedre højre hjørne) og andre kloner binder ikke ^{125}I-faktor X_a.

Fig. 2 viser et partielt restriktionskort og sekvenseringsstrategi for λP9-insertionerne. Skalaen forneden angiver nucleotidpositionen. Den tykke stang repræsenterer den kodende region. De tynde stænger repræsenterer 5'- og 3'-ikke-kodende regioner. Restriktionsendonuclease-stederne blev be-

kræftet ved nedbrydning. Pilene viser de overlappende M13-kloner, der blev anvendt til at sekvensere cDNA'en.

Fig. 3 viser nucleotid-sekvensen og den translaterede aminosyresekvens af den humane TFI-cDNA. Nucleotider er nummereret på den venstre side og aminosyrer på den højre side. De understregede sekvenser er uafhængigt blevet bekræftet ved aminosyresekvensanalyse af det rensede TFI-protein og to V_8-protease + trypsin-nedbrudte peptider. Aminosyre + 1 blev tildelt den første methioninrest efter en stopkodon i den 5'-ikke-kodende region. Potentielle N-forbundne glycosyleringssteder er markeret med stjerner.

Fig. 4 er en grafisk afbildning, der viser ladningsfordelingen af aminosyresekvensen i TFI. Ladninger er beregnet fra den første rest til de i-ende rester og vist ved den i-ende rest. Således er værdien i den i-ende position opsummeringen af alle ladninger fra den første rest til den i-ende rest, og forskellen i ladningerne mellem den i-ende og den j-te rest (j>i) er nettoladningen af fragmentet fra den i-ende til den j-te rest.

Fig. 5 er en grafisk afbildning, der viser hydrofobicitetsprofilen af TFI. Hydrofobicitetsprofilen blev analyseret ved hjælp af et computerprogram, hvor hydrofobicitetsindekset af aminosyreresterne er defineret som den dybde, hvortil en aminosyrerest er begravet inden i et protein (fra røntgen-krystallografiske data) [Kidera et al., *J. Protein Chem.* **4**, 23-55 (1985)]. Hydrofobicitetsprofilen langs sekvensen blev udglattet under anvendelse af programmet ICSSCU i IMSL Library [*IMSL Library Reference Manual*, 9. udgave, Institute for Mathematical and Statistical Subroutine Library, Houston, Texas (1982)].

Fig. 6 viser en linieopstilling af de basale proteaseinhibitordomæner af TFI med andre basale proteaseinhibitorer. Alle sekvenserne bortset fra TFI blev opnået fra National Biomedical Research Foundation Protein Sequence Database (Georgetown University, Washington, D.C., U.S.A., frigivet 13. juni 1987). 1. Bovin basal proteaseinhibitor-precursor; 2. Bovint colostrum-trypsininhibitor; 3. Bovint serum-basal proteaseinhibitor; 4. Spiselig snegl-isoinhibitor K; 5. Rødehavsskildpadde-basal proteaseinhibitor (kun aminosyrerne 1-79 angivet); 6. Vestlig sandhugorm gift-basal proteaseinhibitor I; 7.

Ringhalsgift-basal proteaseinhibitor II; 8. Cape cobra gift-basal proteaseinhibitor II; 9. Russell's hugorm gift-basal proteaseinhibitor II; 10. Sandhugorm gift-basal proteaseinhibitor III; 11. Østlig grøn mamba gift-basal proteaseinhibitor I homolog; 12. Sort mamba gift-basal proteaseinhibitor B; 13. Sort mamba gift-basal proteaseinhibitor E; 14. Sort mamba gift-basal proteaseinhibitor I; 15. Sort mamba gift-basal proteaseinhibitor K; 16. β-1-Bungarotoxin B kæde (mindre); 17. β-1-Bungarotoxin B kæde (større); 18. β-2-Bungarotoxin B kæde; 19. Heste-inter-α-trypsininhibitor [aminosyrerne 1-57(1); 58-123(2)]; 20. Svine-inter-α-trypsininhibitor [aminosyrerne 1-57(1); 58-123(2)]; 21. Bovin inter-α-trypsininhibitor [aminosyrerne 1-57(1); 58-123(2)]; 22. Human α-1-mikroglobulin/inter-α-trypsininhibitor-precursor [aminosyrerne 227-283(1); 284-352(2)]; 23. TFI [aminosyrerne 47-117(1); 118-188(2); 210-280(3)]. Mellemrum blev inkluderet i 16, 17, 18 for at opnå bedste overensstemmelse. Der er anvendt standard et-bogstavs-koder for aminosyrer.

Fig. 7 viser Northern blot analysen af RNA'er fra 3 lever-afledte cellelinier. 10 µg poly(A)$^+$ RNA blev anvendt pr. bane. Bane 1: Chang-levercelle; bane 2: SK-HEP-1 hepatomacelle; bane 3: HepG2 hepatomacelle.

I denne beskrivelse med krav er anvendt biokemisk standardnomenclatur, hvor nucleotidbaserne er betegnet som adenin (A); thymin (T); guanin (G); og cytosin (C). Tilsvarende nucleotider er for eksempel deoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP). Som det er almindeligt af nemhedsgrunde ved den strukturelle afbildning af en DNA-nucleotidsekvens, er kun én streng vist, hvori A på én streng indebærer T på dens komplementære streng, og G indebærer C. Aminosyrer er vist enten ved tre bogstavs- eller et-bogstavsforkortelser på følgende måde:

Forkortet betegnelse		Aminosyre
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsyre
E	Glu	Glutaminsyre
F	Phe	Phenylalanin

G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Almindeligt tilgængelige restriktionsendonucleaser beskrevet heri har følgende sekvenser og (angivet ved pile) spaltningsmønstre:

EcoR1	↓ GAATTC GTTAAG ↑
Ssp1	↓ AATAAT TTATAA ↑
Cla1	↓ ATCGAT TAGCTA ↑
Alu1	↓ AGCT TCGA ↑
Stu1	↓ AGGCCT TCCGGA ↑

For at belyse specifikke foretrukne udførelsesformer af opfindelsen nærmere er angivet følgende eksempler på præparativt laboratoriearbejde.

EKSEMPEL 1

Materialer

Human placenta- og fetal lever-cDNA-biblioteker blev opnået fra Clonetech. Protoblot-immunoscreenings-udstyr blev indkøbt fra Promega Biotech. Restriktionsenzymer var fra New England Biolabs. Kalvetarm-alkalisk phosphatase, T4 DNA-ligase, DNA-polymerase I (Klenow), exonuclease III og S1-nuclease var fra Boehringer Mannheim. dNTP var fra P.L. Biochemicals. 5'-[α-^{35}S]-thio-dATP (600 Ci/mml) var fra Amersham. Sekvenseringsudstyr (sequenase) var fra United States Biochemicals. Chang-leverceller (ATCC CCL 13) og HepG2 hepatomaceller (ATCC HB 8065) blev opnået fra the American Type Culture Collection. SK-HEP-1 hepatoma-celler stammede oprindeligt fra en lever-adenocarcinoma fra G. Trempe fra Sloan-Kettering Institute for Cancer Research i 1971 og er nu udbredt og let tilgængelig.

^{125}I-faktor X_a blev fremstillet ved radiomærkning under anvendelse af Iodogen. Den specifikke aktivitet var 2000 dpm/ng. Mere end 97% af radioaktiviteten kunne udfældes med 10% trichloreddikesyre (TCA). Det ioderede protein bibeholdt >80% af deres katalytiske aktivitet over for Spectrozyme X_a (American Diagnostica Product).

En anti-TFI-Ig-"Sepharose® 4B"-søjle blev fremstillet på følgende måde: Et peptid (betegnet TFI-peptid) indeholdende en sekvens svarende til aminosyresekvensen 3-25 af det modne TFI blev syntetiseret under anvendelse af Biosystems fastfase-peptidsyntese-system. TFI-peptidet (5 mg) konjugeredes til 10 mg Keyhole albueskæl-hæmocyanin ved hjælp af glutaraldehyd. To hvide kaniner af New Zealand race immuniseredes ved intradermal injektion af et homogenat indeholdende 1 ml Freund's complete adjuvant og 1 ml konjugat (200 µg TFI-peptid). En måned senere fik kaninerne atter injektion med et homogenat indeholdende 1 ml Freund's incomplete adjuvant og 1 ml konjugat (100 µg konjugat). Antiserum blev opsamlet hver uge i tre måneder, og yderligere injektioner blev udført en gang om måneden. For at isolere speci-

fikke antistoffer over for TFI-peptidet blev antiserum kromatograferet på en TFI-peptid-"Sepharose 4B"-søjle. Søjlen blev vasket med 10 rumfang PBS (0,4 M NaCl-0,1 M benzamidin-1% "Triton® X-100"), og samme opløsning uden "Triton X-100". Antistoffet blev elueret med 0,1 M glycin/HCl, pH 2,2, og derpå straks neutraliseret ved tilsætning af 1/10 rumfang Tris-OH og dialyseret over for saltvandsopløsning. Det isolerede antistof blev koblet til cyanbromid-aktiveret "Sepharose 4B" efter fabrikantens (Pharmacia) anvisninger og anvendt til at isolere TFI fra celledyrkningssubstratet.

Chang-leverceller blev dyrket ved metoden, der tidligere er beskrevet af Broze og Miletich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1886-1890 (1987). Det konditionerede substrat blev kromatograferet på anti-TFI-Ig-"Sepharose 4B"-søjlen. Søjlen blev vasket med 10 rumfang PBS-1% "Triton X-100" og PBS. Den bundne TFI elueredes med 0,1 M glycin-HCl, pH 2,2. Immunoaffinitetsisoleret TFI blev renset yderligere ved præparativ natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgel-elektroforese (Savants apparat). Aminosyreanalyse af slutproduktet viste den samme amino-endestillede sekvens som den TFI, der var isoleret fra HepG2-celler som beskrevet i den sideløbende danske patentansøgning PA 1988 04135. Det isolerede Chang-levercelle-TFI anvendtes herefter til at immunisere kaniner ved den ovenfor beskrevne immuniseringsforskrift. Det opnåede antiserum havde en titer på cirka 100 µg/ml ved dobbelt immunodiffusions-prøvningen. Dette antiserum anvendtes ved immuno-screeningen af λgtII cDNA-biblioteker.

Metoder

Isolering af cDNA-kloner

Metoder til at afsøge placenta- og fetal lever-cDNA-biblioteker med antistof, plaque-rensning og fremstilling af λ-phag-lysat og DNA var som beskrevet af Wun og Kretzmer, *FEBS Lett.* **1**, 11-16 (1987). Antiserumet blev præadsorberet med BNN97 λgtII-lysat og fortyndet 1/500 til screening af biblioteket.

Screening for faktor X_a-bindende aktivitet

Rekombinante proteiner induceret med isopropyl-β-thio-galactosid fra immunopositive λ-phag isolater eller fra kontrol λgtll blev screenet for faktor X_a-bindende aktivitet. λ-phag-lysaterne (0,1 ml) blev filtreret gennem et nitrocellulosepapir under anvendelse af et dot-blot-apparat (Bio Rad). Herefter blev nitrocellulosepapiret neddykket og omrørt i phosphatpufret saltvand indeholdende 5 mg/ml bovint serumalbumin og 2,5 mg/ml bovint gammaglobulin ved stuetemperatur i 1 time. Opløsningen blev erstattet med ^{125}I-faktor X_a (1,0 x 10^6 cmp/ml) opløst i den samme opløsning tilsat 0,1 mg/ml heparin, og omrøringen fortsattes i yderligere 1 time. Herefter blev nitrocellulosepapiret vasket med phosphatpufret saltvand indeholdende 0,05% "Tween® 20". Vaskepufferen udskiftedes hvert femte minut, fire gange. Herefter blev nitrocellulosepapiret lufttørret og præpareret til autoradiografi under anvendelse af "Kodak XR5"-film. Filmen blev fremkaldt efter en uges eksponering.

Fremstilling af poly(A)$^+$ RNA og Northern blotting

Totale RNA'er blev præpareret fra dyrket Chang-levercelle, HepG2 hepatomacelle og SK-HEP-1 hepatomacelle under anvendelse af natriumperchloratekstraktionsmetoden beskrevet af Lizardi og Engelberg, *Anal. Biochem.* **98**, 116-122 (1979). Poly(A)$^+$ RNA-præparater blev isoleret ved batchvis adsorption på oligo(dT)-cellulose (P-L Biochemical, type 77F) under anvendelse af den af fabrikanten anbefalede procedure. Til Northern blot analyse blev 10 μg af hver poly(A)$^+$ RNA behandlet med glyoxal [Thomas, *Methods Enzymol.* **100**, 255-266 (1983)] og underkastet agarosegelelektroforese i en puffer indeholdende 10 mM natriumphosphat, pH 7,0. Bethesda Research Laboratory's RNA-stige blev anvendt som molekylvægtmarkør. RNA'erne blev duppet over på et nitrocellulosepapir, som derpå blev opvarmet i 2 timer ved 80 °C. Insertions-DNA'en fra λP9-klonen blev radiomærket med ^{32}P ved haktranslation og anvendtes som probe [Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Model*, Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982)]. Afdupningen blev hybridiseret med 5 x 10^6 cpm af proben i 5 ml af en opløsning indeholdende 50% formamid, 5X SSC, 50 mM natriumphosphat, pH 7,0, 250 μg/ml denatureret laksesperm-DNA og 1X Denhardt's opløsning ved 42 °C i 16 timer. Filteret blev vasket i 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 2X SSC

ved stuetemperatur 3 gange, hver gang i 5 minutter, og i 0,1% SDS, 0,2 X SSC ved 50 °C to gange, hver gang i 5 minutter. Nitrocellulosepapiret blev lufttørret og derefter autoradiograferet i 3 dage ved –70 °C under anvendelse af Kodak XAR-5-film og intensiveringsskærm.

Andre rekombinant-DNA-metoder

Fremstilling af klonet λgtII DNA, subkloning i pUC19-plasmid og M13mp18-vektor, frembringelse af deletion ved exonuclease III-nedbrydning og DNA-sekvensering ved dideoxymetoden [Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6776-6780 (1977)] blev gennemført som beskrevet af Wun og Kretzmer, ovenfor.

Programmet FASTP skrevet af Lipman og Pearson, *Science* **227**, 1435-1441 (1985) blev anvendt til at identificere homologe familier af proteiner fra National Biomedical Research Foundation Sequence Data Bank (frigivet 13. juni 1987) og til at stille sekvenserne på linie med den homologe familie.

RESULTATER

Screening af cDNA-biblioteker

En række cellelinier blev screenet for tilstedeværelsen af TFI i det konditionerede substrat, og det viste sig, at adskillige lever-afledte cellelinier, Chang-levercelle, HepG2 hepatoma og SK-HEP-1 hepatoma, secernerer TFI i kultur. Til at begynde med anvendtes et antiserum over for TFI til at screene et humant fetal-lever-λgtII cDNA-bibliotek (10^6 plaque-dannende enheder), og der blev opnået 15 immunologisk positive kloner. Herefter anvendtes samme metode til at screenee et placenta-λgtII cDNA-bibliotek. Ud af 10^6 plaque-dannende enheder opnåedes 10 immunologisk positive kloner. Disse kloner blev plaque-renset, og lysaterne af de rensede kloner prøvet for TFI-funktionel aktivitet. De isopropylthiogalactosid-inducerede phag-lysater blev absorberet på nitrocellulosepapiret og screenet for den ^{125}I-faktor X_a-bindende aktivitet. Fig. 1 viser, at visse af disse immunologisk positive kloner udviste evne til at binde ^{125}I-faktor X_a på nitrocellulosepapiret. I alt udviste tre ud af 15 immunologisk positive fetal-lever-kloner, og 4 ud af 10 immunologisk

positive placentakloner ^{125}I-faktor X_a-bindende aktivitet. Disse immunologisk og funktionelt positive kloner blev nedbrudt med EcoR1, og størrelsen af insertionerne blev bestemt ved gelelektroforese. Én klon fra det placentale bibliotek (λP9) havde en insertion på tilnærmelsesvis 1,4 kb, medens alle de andre kloner indeholdt insertioner på tilnærmelsesvis 1,0 kb. Delvis DNA-sekvensering har vist, at 1,0 kb-klonerne indeholder sekvenser, der er identiske med en del af den længere 1,4 kb placentale klon (λP9). λP9 blev derfor udvalgt til fuldstændig sekvensering.

Nucleotidsekvens og forudsagt proteinsekvens af TFI cDNA-isolat

λP9-klonen blev underkastet restriktionskortlægning, M13-subkloning og sekvensering således som angivet i fig. 2. Hele sekvensen blev bestemt på begge strenge ved hjælp af exonuclease III deletionsmetoden [Henikofff, *Gene* **28**, 351-359 (1984)] og viste sig at bestå af 1432 baser i længden. Sekvensen er angivet i fig. 3. Den indeholder en 5'-ikke-kodende region på 133 baser, en åben læseramme på 912 nucleotider, og en 3'-ikke-kodende region på 387 nucleotider. Den første ATG forekommer ved nucleotid 134 i sekvensen TAGATGA, der var tæt efterfulgt af en anden ATG ved nucleotid 146 i sekvensen ACAATGA. Disse er muligvis startsekvenserne, selv om de er forskellige fra den foreslåede consensussekvens for start af eukaryotisk ribosom, ACCATGG [Kozak, *Cell* **44**, 283-292 (1986)]. 28 aminosyrer går forud for en sekvens svarende til N-terminalen af det modne protein. Længden og sammensætningen af den hydrofobe del af disse 28 aminosyrer er typiske for signalsekvenser [Von Heijne, *Eur. J. Biochem.* **133**, 17-21 (1983); *J. Mol. Biol.* **184**, 99-105 (1985)]. En signalpeptidase spalter muligvis ved Ala_{28}-Asp_{29} til dannelse af et modent protein. Den forudsagte sekvens for moden TFI består af 276 aminosyrer, der indeholder 18 cysteinrester og 7 methioninrester. Den beregnede masse på 31 950 dalton baseret på den deducerede proteinsekvens for moden TFI er noget lavere end de 37-40 kDa bedømt ved natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgel-elektroforese af isoleret protein, og forskellen afspejler sandsynligvis glycosyleringsbidraget til mobiliteten af det naturlige protein. Den deducerede proteinsekvens svarende til det modne protein indeholder tre potentielle N-forbundne glycosyleringssteder med sekvensen Asn-X-Thr/Ser (aminosyrepositionerne 145, 195 og 256). Aminosyresekvensanalyse af renset hel TFI og to isolerede proteolytiske fragmenter

stemmer nøjagtigt overens med den fra cDNA-sekvensen decucerede proteinsekvens (fig. 3, understreget), hvilket indicerer, at den isolerede cDNA-klon koder for TFI. Den 3'-ikke-kodende region er A+T-rig (70% A+T). Hverken consensus-polyadenyleringssignalet, AATAAA [Proudfoot and Brownlee, *Nature* **252**, 359-362 (1981)], eller poly A-halen fandtes i denne klon, hvilket muligvis skyldes kunstigt opstået tab af en del af den 3'-terminale del under konstruktionen af biblioteket.

Ladningsfordeling, hydrofobicitet/hydrofilicitet og indre homologi

Den translaterede aminosyresekvens af TFI indeholder 27 lysinrester, 17 argininrester, 11 asparaginsyrerester og 25 glutaminsyrerester. Ladningsfordelingen langs proteinet er højst uensartet som angivet i fig. 4. Signalpeptidregionen indeholder to positivt ladede lysinrester med 26 neutrale rester. Den aminoterminale region af det modne protein indeholder en højt negativt ladet strækning. Seks af de første 7 rester er enten asparaginsyre eller glutaminsyre, der tæt følges af to mere negativt ladede aminosyrer neden herfor, inden en positivt ladet lysinrest dukker op. Centerdelen af molekylet er generelt negativt ladet. Ved carboxyterminalen er der en højt positivt ladet del. Aminosyrerne 265-293 af TFI indeholder 14 positivt ladede aminosyrerester, herunder en sekvens på 6 efter hinanden følgende arginin-lysin-rester.

Den forudsagte hydrofilitets/hydrofobicitetsprofil af TFI-proteinet er angivet i fig. 5. Signalpeptidet indeholder en højt hydrofob region som forventet. Resten af molekylet synes snarere at være hydrofilt.

Den translaterede aminosyresekvens af TFI indeholder adskillige specielle domæner. Udover det højt negativt ladede N-terminale domæne og det højt negativt ladede C-terminale domæne består centerdelen af tre homologe domæner, der har de typiske sekvenser for inhibitorer af Kunitz-type (se nedenfor).

Homologi med andre proteiner

Ved at afsøge National Biomedical Research Foundation sekvensdatabasen blev det fundet, at det N-terminale domæne og C-terminale domæne af TFI

ikke udviser signifikant homologi med andre kendte proteiner. De tre interne homologe domæner er imidlertid hver for sig homologe med sekvenser af andre basale proteaseinhibitorer, herunder basal bovin pancreas-proteaseinhibitor (aprotinin), basale gift-proteaseinhibitorer og inter-α-trypsin-inhibitorer (fig. 6). Det er bemærkelsesværdigt, at disulfidbindingsstruktur er stærkt bevaret i alle disse tre inhibitorer. Baseret på disse homologier er det klart, at TFI hører til den basale proteaseinhibitor-gen-superfamilie.

Northern blotting

Poly(A)$^+$ RNA'er blev renset fra TFI-producerende lever-afledte cellelinier, Chang-levercelle, HepG2 hepatomaceller og SK-HEP-1 hepatomaceller. Poly(A)$^+$ RNA'erne blev opløst ved denaturerende agarosegelelektroforese, overduppet på et nitrocellulosepapir og probeundersøgt med ^{32}P-mærket TFI-cDNA (λP9). Som vist i fig. 7 blev der observeret to større hybridiseringsbånd, der svarer til mRNA'er på 1,4 kb og 4,4 kb, i alle tre afprøvede cellelinier. Adskillige andre cellelinier blev undersøgt, som ikke frembragte detekterbare mængder af TFI, og hvori der ikke blev fundet nogen hybridisering med proben (data ikke vist).

Forskellige andre eksempler vil efter læsning af denne beskrivelse være indlysende for fagmanden uden at gå uden for opfindelsens rammer. Sådanne yderligere eksempler skal også anses for inkluderet i opfindelsen som defineret ved de efterfølgende krav.

PATENTKRAV

1. Human vævsfaktorinhibitor (TFI) med den i Fig. 3 på tegningerne viste proteinaminosyresekvens.

2. Human vævsfaktorinhibitor ifølge krav 1 som er uglycosyleret.

3. Human vævsfaktorinhibitor ifølge krav 1 som er glycosyleret.

4. Isoleret og renset antistof der har en bindingsspecificitet for vævsfaktorinhibitor (TFI) med en aminosyresekvens som vist i Fig. 3.

5. Antistof ifølge krav 4 som er konjugeret til en immunoaffinitetsmatrix.

6. Antistof ifølge krav 5, hvor den nævnte immunoaffinitetsmatrix er "Sepharose® 4B".

7. Fremgangsmåde til anvendelse af en TFI-peptid-kolonne til at oprense et antistof over for den i Fig. 3 på tegningerne viste proteinaminosyresekvens.

8. Fremgangsmåde til detektion af et første polypeptid i et biologisk fluidum, hvor det nævnte første polypeptid er valgt blandt TFI og et polypeptid omfattende et eller flere Kunitz-domæner af TFI, hvilken fremgangsmåde omfatter følgende trin:

(a) man bringer det nævnte fluidum i kontakt med et andet polypeptid der har en bindingsspecificitet for det nævnte første polypeptid, og

(b) man prøver for tilstedeværelsen af det nævnte andet polypeptid for at bestemme niveauet af det nævnte første polypeptid.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, hvor det nævnte andet polypeptid er et antistof.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 8, hvor det nævnte andet polypeptid er factor Xa.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 9 eller 10, hvor det nævnte andet polypeptid er radiomærket.

12. Fremgangsmåde ifølge krav 10, hvor det nævnte andet polypeptid er ^{125}I-mærket factor Xa.

13. Fremgangsmåde til detektion af et første polypeptid i et biologisk fluidum, hvor det nævnte første polypeptid er valgt blandt TFI og et polypeptid omfattende et eller flere Kunitz-domæner af TFI, hvilken fremgangsmåde omfatter følgende trin:

(a) man bringer det nævnte fluidum i kontakt med et antistof der har en bindingsspecificitet for det nævnte første polypeptid, og et andet polypeptid der er i stand til at binde det nævnte antistof, og

(b) man prøver for tilstedeværelsen af det nævnte andet polypeptid for at bestemme niveauet af det nævnte første polypeptid.

14. Fremgangsmåde ifølge krav 13, hvor det nævnte andet polypeptid er et antistof.

15. Fremgangsmåde ifølge krav 13, hvor det nævnte andet polypeptid er radiomærket.

16. Fremgangsmåde ifølge krav 8 eller 13, hvor det nævnte biologiske fluidum er konditioneret cellekulturmedium.

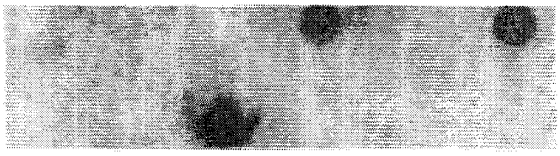


FIG. 1

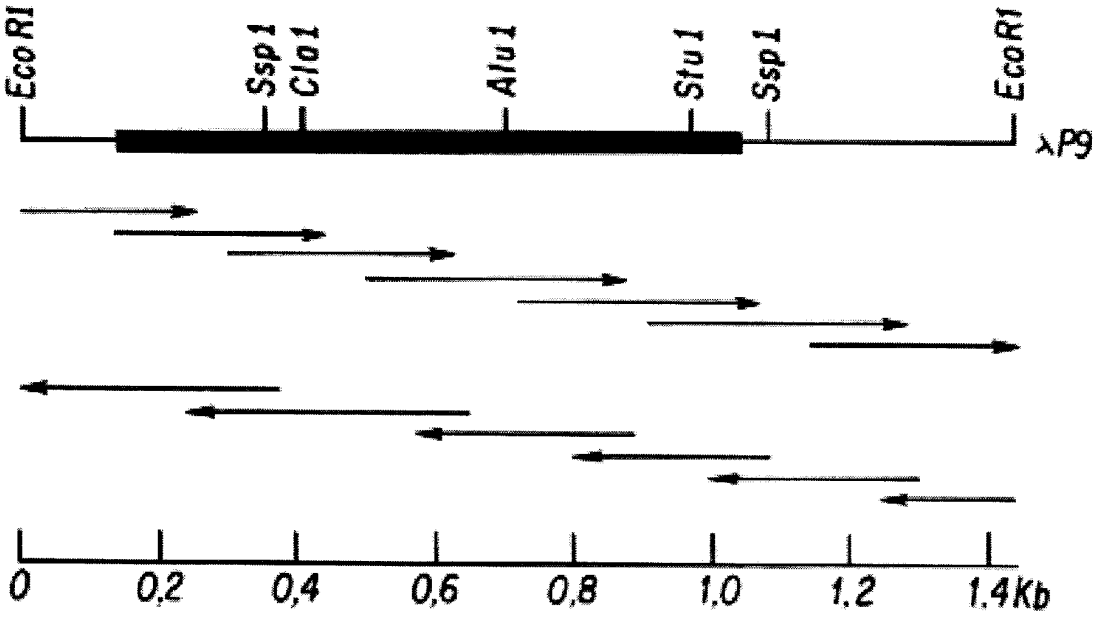

EcoRI
Ssp1
Clo1
Alu1
Stu1
Ssp1
EcoRI
λP9
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2
1,4Kb

FIG. 2



FIG. 3

DK 174754 B1

```
901   TTT ACT TCC AAA CAA GAA TGT CTG AGG GCA TGT AAA AAA GGT TTC ATC CAA AGA ATA TCA AAA GGA GGC CTA ATT AAA ACC AAA AGA AAA
      Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys Arg Lys   286

991   AGA AAG AAG CAG AGA GTG AAA ATA GCA TAT GAA GAA ATT TTT GTT AAA AAT ATG TGA ATT TGT TAT AGC AAT GTA ACA TTA ATT CTA CTA
      Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe Val Lys Asn Met End                                            304

1081  AAT ATT TTA TAT GAA ATG TTT CAC TAT GAT TTT CTA TTT TTC TTC TAA AAT CGT TTT AAT TAA TAT GTT CAT TAA ATT TTC TAT GCT TAT

1171  TGT ACT TGT TAT CAA CAC GTT TGT ATC AGA GTT GCT TTT CTA ATC TTG TTA AAT TGC TTA TTC TAG GTC TGT AAT TTA TTA ACT GGC TAC

1261  TGG GAA ATT ACT TAT TTT CTG GAT CTA TCT GTA TTT TCA TTT AAC TAC AAA TTA TCA TAC TAC CGG CTA CAT CAA ATC AGT CCT TTG ATT

1351  CCA TTT GGT GAC CAT CTG TTT GAG AAT ATG ATC ATG TAA ATG ATT ATC TCC TTT ATA GCC TGT AAC CAG ATT AAG CCC CCC
```

FIG. 3 (Fortsat)

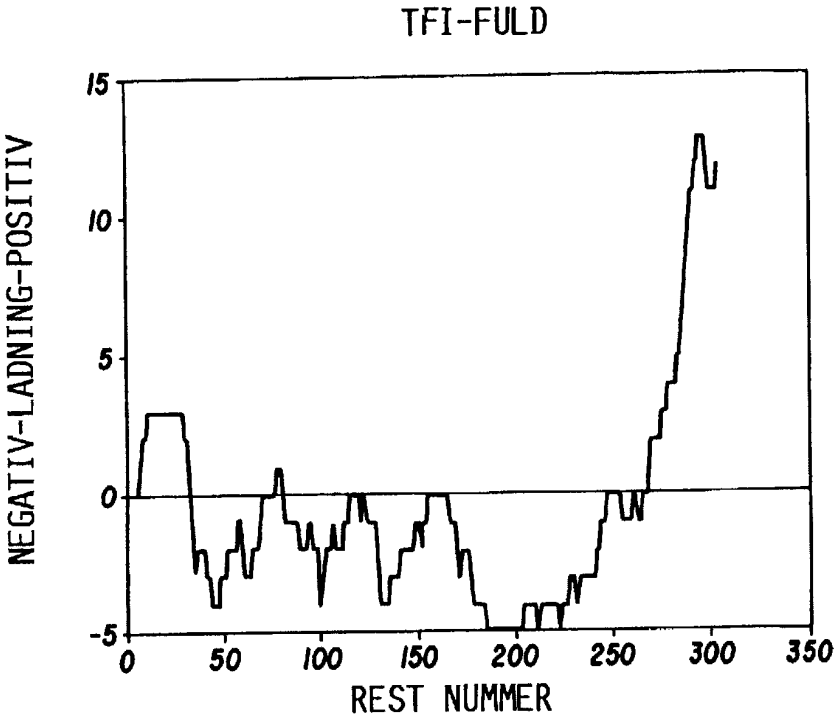

TFI-FULD
NEGATIV-LADNING-POSITIV
15
10
5
0
-5
0
50
100
150
200
250
300
350
REST NUMMER

FIG.4

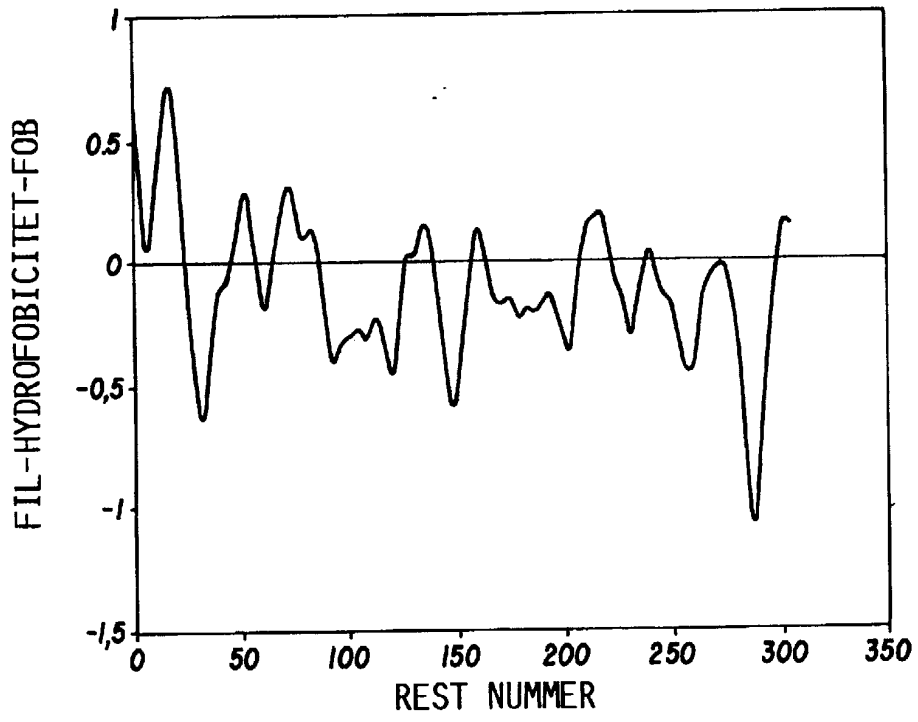

FIL-HYDROFOBICITET-FOB
1
0.5
0
-0,5
-1
-1,5
0
50
100
150
200
250
300
350
REST NUMMER

FIG.5

```
          1                                                  50
     1    PSLFNRDPPI PAAQRPDFCL EPPYTGPCKA RIIRYFYNAK AGLCQTFVYG GCRAKRNNFK SAEDCMRTCG GAIGPWGKTG GRAEGEGKG
     2               FQTPPDLCQ LPQARGPCKA ALLRYFYBST SNACEPFTYG GCQGNNBNFE TTEMCLRICE PPQQTDKS
     3                TERPDFCL EPPYTGPCKA AMIRYFYNAK AGFCETFVYG GCRAKSNNFK SAEDCMRTCG GA
     4                QGRPSFCN LPAETGPCKA SFRQYYYNSK SGGCQQFIYG GCRGNQNRFD TTQQCQGVCV
     5               QGDKRDICR LPPEQGPCKG RIPRYFYNPA SRMCESFIYG GCKGNKNNFK TKAECVRACR PPERPGVCPK TSGPGICLHG
     6                QDHPKFCY LPADPGRCKA HIPRFYYDSA SNKCNKFIYG GCPGNANNFK TWDECRQTCG ASA
     7                  RPDFCE LPAETGLCKA YIRSFHYNLA AQQCLQFIYG GCGGNANRFK TIDECRRTCV G
     8                  RPRFCE LPAETGLCKA RIRSFHYNRA AQQCLEFIYG GCGGNANRFK TIDECHRTCV G
     9                HDRPTFCN LAPESGRCRG HLRRIYYNLE SNKCKVFFYG GCGGNANNFE TRDECRETCG GK
    10                RDRPKFCY LPADPGRCLA YMPRFYYNPA SNKCEKFIYG GCRGNANNFK TWDECRHTCV ASGIQPR
    11                QPRRKLCI LHRNPGRCYD KIPAFYYNQK KKQCERFDWS GCGGNSNRFK TIEECRRTCI G
    12                  RPYACE LIVAAGPCMF FISAFYYSKG ANKCYPFTYS GCRGNANRFK TIEECRRTCV V
    13                LQHRTFCK LPAEPGPCKA SIPAFYYNWA AKKCQLFHYG GCKGNANRFS TIEKCRHACV G
    14                QPLRKLCI LHRNPGRCYQ KIPAFYYNQK KKQCZGFTWS GCGGNSNRFK TIEECRRTCI RK
    15                  AAKYCK LPLRIGPCKR KIPSFYYKWK AKQCLPFDYS GCGGNANRFK TIEECRRTCV G
    16                RQRHRDCD KPPDKGNC.G PVRAFYYDTR LKTCKAFQYR GCDGDHGNFK SDHLCRCECE LY
    17                RQRHRDCD KPPDKGNC.G PVRAFYYDTR LKTCKAFQYR GCDGDHGNFK TETLCRCECL VYP
    18                RKRHPDCD KPPDTKIC.Q TVRAFYYKPS AKRCVQFRYG GCDGDHGNFK SDHLCRCECE LYR
 19(1)                  KEDSCQ LDHAQGPCLG MISRYFYNGT SMACETFQYG GCLGNGNNFA SQKECLQTCR T
 19(2)                   VAACN LPIVQGPCRA FIRLWAFDAA QGKCVLFTYG GCRGNGNKFY SQKECKEYCG IPGDGDEELL R
 20(1)                  KEDSCQ LGYSQGPCLG MIKRYFYNGS SMACETFHYG GCMGNGNNFV SQKECLQTCR T
 20(2)                   VSACS LPIVQGPCRA FIRLWAFDAA QGKCVLFNYG GCQGNGNKFY SQKECKEYCG VPGEEDEELL R
 21(1)                  KADSCQ LDYSQGPCLG LFKRYFYNGT SMACETFLYG GCMGNLNNFL SQKECLQTCR T
 21(2)                   VEACN LPIVQGPCRA FIQLWAFDAV KGKCVRFSYG GCKGNGNKFY SQKECKEYCG IPGEADERLL R
 22(1)                  KEDSCQ LGYSAGPCMG MTSRYFYNGT SMACETFQYG GCMGNGNNFV TEKECLQTCR T
 22(2)                   VAACN LPIVRGPCRA FIQLWAFDAV KGKCVLFPYG GCQGNGNKFY SEKECREYCG VPGDGDEELL RFSN
 23(1)               LKLMHSFCA FKADDGPCKA IMKRFFFNIF TRQCEEFIYG GCEGNQNRFE SLEECKKMCT RDNANRIIKT TL
 23(2)               QQEKPDFCF LEEDPGICRG YITRYFYNNQ TKQCERFKYG GCLGNMNNFE TLEECKNICE DGPNGFQVDN YG
 23(3)               EFHGPSWCL TPADRGLCRA NENRFYYNSV IGKCRPFKYS GCGGNENNFT SKQECLRACK KGFIQRISKG GL
Consensus            .......C. .....G.C.. .......... ...C..F... GC......F. ....C...C.
```

FIG. 6

DK 174754 B1

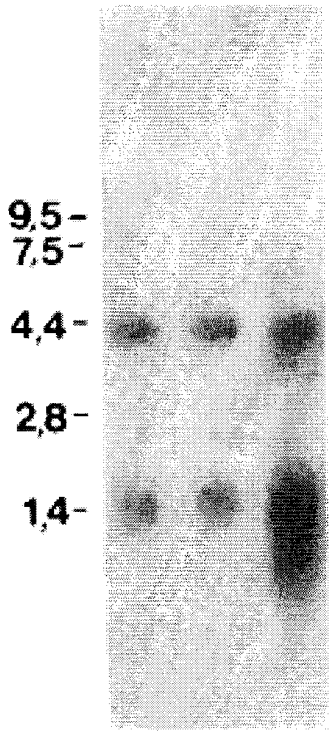


FIG. 7