



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus Patent- och registerstyrelsen



F1000098829B

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 98829
C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 25 08 1997

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6
C 12N 15/12, C 07K 14/755

(21) Patentihakemus - Patentansökning 870261

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 21.01.87

(24) Alkupäivä - Löpdag 21.01.87

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 28.07.87

(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 15.05.97

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet
27.01.86 US 822989 P

(71) Hakija - Sökande

1. Chiron Corporation, 4560 Horton Street, Emeryville, CA, USA, (US)
2. Nordisk Gentofte, Niels Steensensvej 1, 2820 Gentofte, Danmark, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Burke, Rae Lyn, 1447 Willard Street, San Francisco, CA 94117, USA, (US)
2. Rasmussen, Mirella Ezban, Abildgaardsgade 24, 2100 Koebenhavn, Danmark, (DK)

(74) Asiamies - Ombud: Ruska & Co Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä rekombinoitujen proteiinikompleksin valmistamiseksi, jolla on humaanitekijä VIII:C-aktiivisuutta
Förfarande för framställning av rekombinerat proteinkomplex med humanfaktor VIII:C aktivitet

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 150735 (C 12N 15/00), EP A 182372 (C 07K 15/00), EP A 120694 (C 12N 15/00),
EP A 197901 (C 07K 15/12), EP B 160457 (C 12N 15/00), WO A 85/01961 (C 12Q 1/68),
Thromb. Haemostasis 54 (1985) p. 54 abstrakti S321, Nature 312 (1984) 330-337 (Wood et al.),
Nature 312 (1984) 337-342 (Vehar et al.), J.Biol. Chem. 261 (27) (1986) 12574-8 (Burke et al.)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Koostumukset, joilla on tekijä VIII:C-aktiivisuus ja jotka ovat immunologisesti ristireagoivia tekijä VIII:C:n kanssa, on valmistettu ekspressoimalla geenit, jotka koodaavat tekijä VIII:C-geenin N-päätettä ja C-päätettä, jolloin kullakin näistä sekvensseistä on toisistaan riippumaton signaalisekvenssi. N- ja C-päätteen rakennegeenit voivat olla samat tai erilaiset DNA-rakenteet, jolloin kullakin on toisistaan riippumattomat transkription ja translaation säätelysignaalit. Rakenne tai rakenteet vie-dään imettäväisen soluun, jolloin tuotetaan aktiivinen proteiinikompleksi, jolla on tekijä VIII:C-aktiivisuus.

Sammansättningar , som har en faktor VIII:C-aktivitet och som är immunologiskt korsreagerande med faktorn VIII:C, har framställts genom expressering av gener, som kodar faktorn VIII:C-genens N-terminal och C-terminal, varvid envar av dessa sekvenser är en av varandra oberoende signalsekvens. N- och C-terminalernas strukturgener kan vara likadana eller olika DNA-strukturer, varvid envar har av varandra oberoende transkriptions- och translationsreglersignaler. Strukturen eller strukturerna införes i en däggdjurscell, varvid produceras ett aktivt proteinkomplex med faktor VIII:C-aktivitet.

Menetelmä rekombinoidun proteiini-kompleksin valmistamiseksi, jolla on humaanitekijä VIII:C-aktiivisuutta

5 Keksinnön kohteena on menetelmä rekombinantti-proteiini-kompleksin valmistamiseksi, jolla on ihmisen veren hyytymisen tekijä VIII:C:n aktiivisuus, mutta josta puuttuu kokonaan tai osaksi tekijä VIII:C:n B-osa.

Hemofilia A on X-kromosomiin sidottu periytyvä sairaus, joka vaivaa 1-2 miestä 10 000:ta kohti. Puutos todetaan verenvuotosairautena, joka johtuu hyytymän muodostumisen puuttumisesta tekijä VIII:C:n puuttumisen aikaansaamana. Tekijä VIII:C on eristetty historiallisesti verestä konsentroidussa muodossa hemofilian terapeuttista käsittelyä varten. Kuitenkin hepatitin ja nyt AIDS:n leviämisen aiheuttama huoli on herättänyt aktiivisuuden vaihtoehtoisten tekijä VIII:C-lähteiden tuottamiseksi. On erittäin kiinnostavaa kyetä tarjoamaan tekijä VIII:C-aktiivisuutta omaavia koostumuksia ilman virussairauksien leviämisestä aiheutuvia huolia, jotka liittyvät natiiviin tekijä VIII:C:hen.

10 Tekijä VIII:C on hyvin suuri glykoproteiini (natiivi M_r 330-360 kilodaltonia (kD), jota on plasmassa erittäin matalia konsentraatioita. Proteiini on hyvin herkkä hajoiselle trombiinin, plasmiinin, proteaasi C:n ja muiden seriiniproteaasien vaikutuksesta. Se on tavallisesti eristetty plasmasta tai plasmatuotteista sarjana läheisiä polypeptidejä vaihdellen välillä 160-40 kD valtaosan ollessa 25 92kD ja 80-77kD. Tämä monimutkainen rakenne on tehnyt aktiivisen tekijä VIII:C:n rakenneanalyysin hyvin vaikeaksi.

Rotblat et al., Biochemistry (1985) 24:4294-4300; Vehar et al., Nature (1984) 312:337-342; Toole et al., Nature 30 (1984) 312:342-347; and Truett et al., DNA (1985) 4:333-349 kuvaavat tekijä VIII:C:tä ja sitä lähellä olevia polypeptidejä. Orr et al., Molecular Genetics of Clotting Factors, s. 54, s321, kuvaa voimakkaasti glykosyloidun tekijä VIII:C:n alueen "välike"toimintaa. Toole et al., supra; 35 Wood et al., Nature (1984) 312:330-336; ja Truett et al., supra, kuvaa tekijä VIII:C:n sekventointia. Fulcher et al., Blood (1983) 61:807-811 selostaa, että maksimi tekijä

VIII:C:n aktiivisuuden huippu korreloi 90kD ja 70kD fragmenttien läsnäolon kanssa. Fulcher *et al.*, *J. Clin. Invest.* (1985) 76:117-124 ehdottaa, että perustuen vasta-aine-epitooppitietoihin tekijä VIII:C:stä, sekä 92kD ja 80kD polypeptidit ovat välttämättömiä tekijä VIII:C:n toiminnalle.

Vaikkakin täysipituista rekombinantti ihmisen tekijä VIII:C:tä on tuotettu, on vaikeata puhdistaa ja karakterisoida sitä ja se on pysymätön proteolyysistä johtuen. Käytäntö, jolla kyetään tuottamaan ja käyttämään onnistuneesti täysipituista molekyyliä kliinisesti, on siksi epävarmaa tällä hetkellä. Aiemmat yritykset yhdistää 92kD ja 80kD polypeptidit *in vitro* ei tuota aktiivista koostumusta. Esillä oleva keksintö tarjoaa keinon 92kD ja 80kD ketjujen aktiivisen kompleksin valmistamiseksi.

Keksinnön kuvaus

Eräs tämän keksinnön näkökohta on tarjota menetelmä rekombinantti proteiinikompleksin tuottamiseksi, jolla on ihmisen tekijä VIII:C aktiivisuus, mutta jolta puuttuu kokonaan tai osaksi B-osa ihmisen tekijä VIII:C:stä käsittäen koekspressoimisen *in trans* eukarioottisessa transformantti-isäntäsoluissa

(a) ensimmäinen geeni, joka koodaa signaalisekvenssiä ja polypeptidiä, jolla on pääasiassa sama aminohapposekvenssi kuin ihmisen tekijä VIII:C:n A-osalla ja käsittää mahdollisesti ihmisen tekijä VIII:C:n N-terminaalisen B-osan; ja

(b) toinen geeni, joka koodaa signaalisekvenssiä ja polypeptidiä, jolla on pääasiassa sama aminohapposekvenssi kuin ihmisen tekijä VIII:C:n osalla C; ja rekombinantti proteiinikompleksin erittämisen. Käytettynä tässä yhteydessä osa C käsittää Wood *et al.*:n supra kuvaaman A3:n.

Toinen keksinnön näkökohta on yllä kuvatulla menetelmällä valmistettu proteiinikompleksi.

Vielä eräs keksinnön näkökohta on tarjota farmaseuttinen koostumus, joka käsittää yllä kuvatun proteiinikompleksin, ja fysiologisesti hyväksyttävän kantajan.

Vielä eräs keksinnön näkökohta on tarjota menetelmä yksilöjen käsittelemiseksi, jotka tarvitsevat tekijä VIII:C aktiivisuutta, joka menetelmä käsittää riittävän määrän yllä kuvattua proteiinikompleksia antamisen yksilölle veren hyytymisaktiivisuuden lisäämiseksi yksilössä.

Vielä eräs keksinnön näkökohta on tarjota DNA-koostumus, joka käsittää ensimmäisen ja toisen ekspressiokasetin, sanotun ensimmäisen ekspressiokasetin käsittäessä geenin, joka koodaa signaalisekvenssiä ja peptidiä, joka käsittää pääasiassa samaa sekvenssiä kuin ihmisen tekijä VIII:C:n A-osa ja mahdollisesti ihmisen tekijä VIII:C:n B-osan N-terminaalisen osan isäntäsolussa toimivien transkriptiota ja translaatiota säätelevien signaalien alaisena, ja sanotun toisen ekspressiokasetin käsittäessä geenin, joka koodaa signaalisekvenssiä ja peptidiä, joka käsittää pääasiassa saman sekvenssin kuin ihmisen tekijä VIII:C:n C-osa eikä sisällä B-osaa sanotussa isäntäsolussa toimivien transkription ja translaation säätelysignaalien alaisena.

Toinen keksinnön näkökohta on tarjota isäntäimettäväisoluu, joka sisältää yllä kuvatun DNA-koostumuksen.

Lyhyt kuvaus piirustuksista

Kuva 1A esittää proteolyyttisen hajoamisen sijaintikohdat, jonka hajoamisen vaikutuksesta syntyvät 92kD ja 80kD ketjut.

Kuvat 1B-E osoittavat valikoituja restriktiokarttoja plasmideille pSV7d, pSVF8-92, pSVF8-80 ja pSVF8-200, fragmenttien lähde tai toiminta ja nukleotidien numerot alkavat pisteestä, joka on merkitty 0:lla. Valikoidut restriktiokohdat ovat: B, BamHI; Bc, BclI; Bg, BglII; E, EcoRI; H, HindIII; Hp, HpaI; K, KpnI; N, NdeI; Nr, NruI; P, PstI; PvuI, PvuI; PvuII, PvuII; S, SalI; Sc, SacI; Sm, SmaI; St, StuI; X, XbaI. Kohtia, jotka on merkitty sulkuihin, käytettiin vektorirakenteissa, mutta niitä ei regeneroitu.

Erityisten sovellutusmuotojen kuvaus

On esitetty uusia proteiinikoostumuksia ja menetelmiä

niiden valmistamiseksi, joilla koostumuksilla on tekijä VIII:C aktiivisuutta. Koostumukset käsittävät kaksi ketjua, toisella ketjulla on pääasiassa sama aminohapposekvenssi kuin tekijä VIII:C:n N-terminaaliosalla (A-osa) ja toisella ketjulla pääasiassa sama aminohapposekvenssi kuin tekijä VIII:C proteiinin C-terminaaliosalla (C-osa). Nämä kaksi ketjua ovat noin 92kD A-osalle (paitsi ulottuessaan B-osaan) ja 80kD C-osalle, ja niitä kutsutaan joskus "raskaaksi" ketjuksi ja vastaavasti "kevyeksi" ketjuksi. On esitetty nukleinihapporakenteita, jotka käsittävät yksittäisiä ekspressiokasetteja, joilla on transkription ja translaation säätelyalueet, jotka ovat toiminnallisia imettäväisen soluissa, ja jotka säätelevät rakennegeenien transkriptiota ja translaatiota, jolloin kullakin rakennegeenillä on kypsä peptidiketju koodaava sekvenssi yhdistettynä N-terminaalistaan signaalisekvenssiin. Ekspressiokasetit viedään imettäväisisäntään, jolloin tuotetaan proteiinikompleksi, jolla on tekijä VIII:C aktiivisuus. (Viitattaessa tekijä VIII:C:n sekvensseihin ja osiin, viitattut sekvenssit ja osat löydetään sivulta 333 yllä esitettyssä Wood *et al.*:n artikkelissa.)

N-terminaalinen polypeptidi ulottuu aminohaposta 10, tavallisesti aminohaposta 1, ainakin aminohappoon noin 620, tavallisesti vähintään aminohappoon noin 675, vielä tavallisemmin vähintään aminohappoon noin 740. Polypeptidi käsittää ainakin noin 85 % A-osasta (Wood *et al.*, supra), vielä tavallisemmin vähintään noin 90 % ja voi valinnaisesti käsittää osan B-osan N-terminaalista, tyypillisesti jättäen alle aminohapon noin 1405. Erityisen kiinnostava on N-terminaalinen ketju, jolla on koko sekvenssi trombolyyttiin katkaisukohtaan Arg₇₄₀-Ser₇₄₁.

Kevyellä ketjulla voi olla pääasiassa sama aminohapposekvenssi kuin tekijä VIII:C polypeptidin C-terminaaliosalla, tavallisesti vähintään noin 80 %, vielä tavallisemmin vähintään noin 90 % tekijä VIII:C 80kD ketjusta, alkaen erityisesti aminohapolla 1570, tavallisesti aminohapolla 1600, erityisesti aminohapolla 1625, vielä erityisemmin aminoha-

5 polla 1640, edullisesti aminohapossa noin 1649, ± 10 aminohapolla, vielä erityisemmin ± 1 aminohapolla, ja jatkuen ainakin aminohappoon noin 2300, tavallisesti 2310, ± 10 aminohappoon, edullisesti 2325, ± 5 aminohappoon, vielä edullisemmin pääteaminohappoon (2332). Tavallisesti kevyt ketju voi sisältää ainakin noin 85 % vielä tavallisemmin ainakin 95 % C1-C2 -osista, tavoiteltavasti A3-C1-C2 -osista.

10 Tavallisesti ei enempää kuin 10, vielä tavallisemmin ei enempää kuin 5 numero-%, edullisesti ei enempää kuin noin 1 numero-% ketjussa olevista aminohapoista eroaa luonnollisesti tekijä VIII:C A- ja C-osissa läsnä olevista aminohapoista. Erityisesti, ei enempää kuin noin 5 %, vielä tavallisemmin ei enempää kuin noin 1 % on ei-konservatiivisia substituutioita. Konservatiiviset substituutiot käsittävät: G,A; V,I,L; D,E; K,R; N,Q; F,W,Y, jossa puolipisteiden välillä olevat kirjaimet ovat konservatiivisia substituutioita. (Kirjaimet ovat yhden kirjaimen koodeja aminohapoille.) Milloin yksi aminohappo yhdessä ryhmittymässä on korvautunut toisella aminohapolla toisesta ryhmittymästä tai aminohapolla, jota ei ole esitetty yllä (C,M,H,P), niin sellaista muutosta pidetään konservatiivisena.

15 DNA-rakenteita käytetään viitattujen polypeptidien ekspressoimiseen. Kullakin rakenteista on 5'-3' -transkriptiosuunnassa transkription aloitus- ja translaation aloitusalue, rakennegeeniä koodaava alue, joka käsittää peptidin signaalisekvenssiä koodaavan sekvenssin, joka sisältää prosessointisignaalin, ja tekijä VIII:C:n raskaita ja kevyitä ketjuja koodaavan sekvenssin, jota seuraa translaation ja transkription lopetusalue.

30 Aloitusalue voi käsittää joukon erilaisia sekvenssejä, jotka liittyvät transkription ja translaation aloitukseen. Nämä sekvenssit sisältävät lisääjäsekvenssejä, RNA-polymeraasin sitomiskohdan, capping-kohdan, ribosomien sitomisen ja translaation aloituskohdat, ja sen kaltaisia. Transkription aloitusalue voi olla luonnollinen tai villintyyppin alue, joka on liittynyt tekijä VIII:C:hen tai voi olla vaihtoehtoinen alue, joka huolehtii suuresta transkriptio-

tehokkuudesta. Alue voidaan saada viruksista, joilla on imettäväisen isäntäalueet tai isäntäsolun geenit tai eri imettäväisisännän geenit, jotka sopivat yhteen isäntäsolun kanssa. Lukuisia transkription aloitusalueita on eristetty ja niiden on osoitettu olevan toimivia imettäväisisännissä. Nämä alueet käsittävät SV-40 varhaispromoottorin ja myöhäispromoottorin alueet, adenoviruksen päämyöhäispromoottorialueen, β -aktiinin promoottorialueen, sytomegaloviruksen 72kD varhaisproteiinipromoottorialueen, metallotioneiini-promoottorin, ja sen kaltaiset.

Terminaatioalue voi sisältää polyadenylaation signaali-sekvenssin, transkription päätössekvenssin ja sen kaltaisia. Terminaatioalue voidaan saada tekijä VIII:C:n luonnollisen tai villintyyppin alueen 3'-alueesta, tai se voi olla peräisin samasta rakennegeenistä tai eri rakennegeenistä, josta 5'-aloitusalue saatiin. 3'-alue ei ole yhtä olennainen transkriptiotason kannalta kuin aloitusalue niin, että sen valinnassa on pikemminkin kysymys mukavuudesta kuin spesifisestä valinnasta.

Rakennegeenit voivat koostua signaali-sekvenssistä, joka koodaa N-terminaalista aminohapposekvenssiä ja joka ohjaa polypeptidin endoplasmisen retikulumin aukolle prosessointia ja kypsymistä varten. Signaali-sekvenssiin sisältyy myös prosessointisignaali, jonka endopeptidaasi tunnistaa, jolloin endopeptidaasi hajottaa peptidisidoksen, poistaen signaali-sekvenssin, jolloin syntyy kypsä polypeptidi. Signaali-sekvenssi voi olla luonnossa esiintyvä signaali-sekvenssi, erityisesti N-terminaalilla peptidillä tai se voi olla mikä tahansa signaali-sekvenssi, joka on toiminnallinen peptidien kanssa saaden aikaan polypeptidien prosessoinnin ja kypsymisen.

Erilaisia signaali-sekvenssejä on raportoitu kirjallisuudessa ja ne käsittävät sellaiset signaali-sekvenssit kuten kudospasminogeeniaktivaattorin, immunoglobuliinin ras-kaat ja kevyet ketjut, virusmembraaniglykoproteiinit kuten Herpes Simplex virusglykoproteiinit gB ja gD ja sen kaltaiset.

Tarvittaessa voidaan kypsää proteiinia ja signaalisekvenssiä koodaavat sekvenssit yhdistää niin, että ne ovat lukemiskehyksessä. Milloin on käytettävissä sopivia restriktiokohtia, kohesiiviset tai tylpät päät voidaan yhdistää sopivasti. Kuitenkin suurimmaksi osaksi voidaan käyttää adaptoreja silloin, kun koodaavan sekvenssin osat reagoivat synteettisessä adaptorissa niin, että typistetty rakennegeeni ja/tai typistetty signaalisekvenssi voidaan yhdistää adaptorin kautta, jotta ne olisivat oikeassa lukemiskehyksessä. Signaalisekvenssi ja rakennegeeni voivat olla osaksi restriktiokartoitettuja niin, että restriktiokohdat voidaan identifioida, erityisesti ainutlaatuiset restriktickohdat, joita voidaan käyttää yhdistämään kaksi sekvenssiä toisiinsa oikeassa lukemiskehyksessä sopivien adaptorien avulla. Vaihtoehtoisesti voidaan ainutlaatuiset restriktiokohdat siirtää signaalisekvenssin tunnistuskohtaan in vitro mutageneesillä.

Translaation aloitus- ja lopetussignaalit voivat normaalisti olla osa rakennegeeniä, ylläpitäen sopivan aloituskodonin translaation alussa ja yhden tai useampia stopkodoneja translaation päätöksessä. Nämä kodonit voivat tavallisesti olla läsnä käytettävissä sekvensseissä, erityisesti aloituskodonit antavissa signaalisekvensseissä. Stopkodonit voidaan lisätä yhtä sopivasti osana terminaatioaluetta tai ne voidaan lisätä koodaavaan alueeseen antamaan sopiva 3'-pää yhdistämistä varten transkription terminaatioalueeseen, jotta saataisiin täydellinen terminaatioalue.

Ekspressiokasetin eri alueet (transkription ja translaation aloitusalueen nukleinihapposekvenssi, rakennegeenin nukleinihapposekvenssi, joka koodaa yhtä polypeptideistä ja aloitusalueen transkription ja translaation säätelyn alaisena, ja transkription ja translaation terminaatioalue, joka säätelee mRNA:n prosessointia ja translaation terminaatiota), jotka identifioivat erityisiä nuklotidisekvenssejä, voidaan yhdistää käyttäen tavanomaisia menetelmiä. Saadut sekvenssit sisältävät tavallisesti, tai ne voidaan modifioida sisältämään restriktiokohtia, jotka voi-

daan sitten liittää uudelleen yhteen, silloin kun on läsnä komplementaarisia ulkonemia tai kohesiivisiä päitä. Modifiikaatiota saattaa esiintyä usein ei-koodaavilla alueilla linkkereiden tuomisen mukana aikaan saataessa haluttuja kohesiivisiä päitä. Päät yhdistetään tavallisesti ennen viemistä isäntäsoluun, vaikka isäntäsolun voidaan antaa suorittoa tarvittava yhdistäminen.

Ekspressiokasetit voidaan liittää laajaan määrään muita sekvenssejä erityisiä tarkoituksia varten. Milloin tarvitaan amplifikaatiota, ekspressiokasetit voidaan liittää in tandem geeniin, joka amplifioidaan indusoimalla sopivalla ärsykkeellä. Sellaiset geenit kuten metallotioneiinigenit, esim. ihmisen metallotioneiinigeni, dihydrofolaattireduktaasi ja hiiren nisäkasvainvirus LTR, voidaan liittää peptidikasetteihin, joilla on omat transkription ja translaation säätelysekvenssit. Käyttämällä raskasmetalli-ioneja, esim. kuparia tai kadmiumia, metotreksaattia tai glukokortikoideja, amplifioivan geenin ja kiinnostuksen kohteena olevan geenin (ekspressiokasetti) amplifikaatio voidaan saada aikaan isäntäsolussa. Rakennegeneilla tulee olla sopivat sekvenssit ekspressiota varten kuten kuvattiin ekspressiokasetille.

Ekspressiokasetit voidaan liittää vektoriin, joka sisältää isäntäsolussa toimivan replikaatiosysteemin, joka replikaatiosysteemi voi turvata pysyvän episomaalisen säilymisen tai ekspressiokasetin integroitumisen isännän genomiin. Vektori voi sisältää myös selektiomarkkerin DNA-rakenteen sisältävien isäntäsolujen ja vektorin selektoimiseksi niistä isäntäsoluista, joista puuttuu DNA-rakenne ja vektori.

Suuri joukko replikaatiosysteemeitä on käytettävissä, tavallisesti peräisin imettäväisäntäsoluista, jotka infektoivat viruksia. Esimerkkireplikaatiosysteemit käsittävät Simian virus 40:stä, adenoviruksesta, härän papillomaviruksesta, polyomaviruksesta, Epstein-Barr -viruksesta ja sen kaltaisista peräisin olevat replikaatiosysteemit.

Markkerit voivat sisältää vastustuskyvyn biosidille,

erityisesti antibiootin, tai auktotrofian komplementaation antamaan prototroofinen isäntä. Markkereina kiinnostavat erityisesti geenit käsittävät kanamysiiniresistenssigeenin (NPTII), kloramfenikoliresistenssigeeni (CAT), penisilliinaasi ja sen kaltaiset.

5 Tavallisesti voi vektori olla ympyrän muotoinen ja sillä voi olla yksi tai useampia restriktiokohtia, jotka sallivat ekspressiokasetin viemisen osittain tai valmiina kokonaisuutena vektoriin. Vektori voi myös usein sisältää
10 bakteriaalisen replikaatio- ja selektiosysteemin, joka mahdollistaa kloonauksen kunkin manipulaatiovaiheen jälkeen. Tällä tavoin voidaan suhteellisen suuria määriä rakenteita valmistaa, eristää, puhdistaa, kontrolloida sen näkemiseksi, onko sopiva liittyminen tapahtunut, kussakin vaiheessa
15 ja käyttää sitten seuraavassa vaiheessa.

Erilaisia imettäväisisäntäsoluja, joissa säätelysekvenssit ja replikaatiosysteemit ovat toimintakykyisiä, voidaan käyttää. Sellaiset solut käsittävät COS-solut, Kiinalaisen hamsterin munasolut (CHO), hiiren munuaissolut,
20 hamsterin munuaissolut, HeLa-solut tai sen kaltaiset.

Haluttujen polypeptidien ekspressiokasetit voidaan liittää yhteen yhtenä nukleinihappoketjuna tai ne voivat olla läsnä eri nukleinihappomolekyyleissä. Ekspressiokasetit voivat sopivasti olla osia eri vektoreista tai samasta vektorista. Tämä on ensisijaisesti mukavuusasia, vaikka
25 joissakin tilanteissa voi tietyillä vektoreilla olla toinen tai toinen konstruktiotapa toivottava.

Tapa, jolla ekspressiokasetit viedään isäntäsoluun, voi olla tavanomainen. Sopivasti voidaan transformointiin
30 käyttää kalsiumfosfaatilla saostettua DNA:ta tai DNA:ta DEAE-dekstraanin läsnäollessa. Viruksien kyseessä ollessa voidaan käyttää transfektiota tai transduktiota. Se erityinen tapa, jolla isäntäsolu transformoidaan, ei ole kriittinen tässä keksinnössä, riippuen pääasiassa siitä,
35 onko ekspressiokasetit liitetty replikaatiosysteemiin, ja replikaatiosysteemistä ja liittyneistä geeneistä.

Transformoituja soluja voidaan sitten kasvattaa sopi-

vassa ravintoväliaineessa. Tuote saadaan kahden ketjun kompleksina niin, että väliaine tai solulysaatti voidaan eristää ja tekijä VIII:C:n aktiivinen kompleksi uuttaa ja puhdistaa. Uuttamista ja puhdistamista varten on olemassa
5 erilaisia keinoja kuten affiniteettikromatografia, ionin- vaihtokromatografia, hydrofobinen kromatografia, elektroforeesi, liuotin-liuotin uutto, selektiivinen saostaminen ja sen kaltaiset. Erityinen tapa, jolla tuote on eristetty, ei ole kriittinen tämän keksinnön kannalta ja se voidaan valita minimoimaan denaturaatio tai inaktivaatio ja
10 maksimoimaan erittäin puhtaan aktiivisen tuotteen eristämisen.

On aikaan saatu koostumuksia, joissa koostumuksella on Coatestissä ainakin aktiivisuus 0.02U/ml, tavallisesti ainakin noin 0.2, vielä tavallisemmin ainakin noin 0.5U/ml. Tuote voidaan puhdistaa affiniteettikromatografialla käyttäen vasta-aineita, erityisesti monoklonaalisia vasta-aineita, jotka kohdistuvat tekijä VIII:C aktiivisuuden C-päänteen alayksikköön, elektroforeesia, uuttamista,
20 HPLC:aa, jne.

Esillä olevan keksinnön menetelmä saa aikaan raskaiden ja kevyiden ketjujen tuottamisen, joilla on tekijä VIII:C aktiivisuus. Tuotanto havaitaan tasapainotetulla väliaineella, kuten on kuvattu kokeellisessa osassa, jolla väliaineella on tekijä VIII:C aktiivisuus vähintään noin 50, tavallisesti vähintään noin 70mU/ml, vielä tavallisemmin vähintään noin 200mU/ml Coatest-kokeessa.

Keksinnön mukaisesti tuotetuilla komplekseilla, joilla on tekijä VIII:C aktiivisuus, on erilaisia käyttöjä immunogeeneina vasta-aineiden tuottamista varten, Willebrand-tekijän eristämistä varten affiniteettikromatografian avulla, tekijä VIII:C:n diagnostisissa kokeissa ja hemofiliaa potyvien, veren hyytymissairauksista kärsivien käsittelyssä. Esillä olevat proteiinikompleksit voidaan antaa fysiologisesti hyväksyttävässä kantajassa, kuten vedessä, suolaliuoksessa, fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa ja sitraattipuskuroidussa suolaliuoksessa konsentraatioissa vä-

lillä noin 10-200U/ml. Katso US-patentti no. 3631018; 3652530 ja 4069216 antotapojen ja määrien osalta. Muita tavanomaisia lisäaineita voidaan myös sisällyttää.

Seuraavat esimerkit esitetään keksinnön kuvaamiseksi,
5 mutta ei sen rajoittamiseksi.

Kokeellinen osa

Esimerkki 1

10

A. Ekspressioplasmidien valmistus

A.1 pSV7d: Imettäväisen solu ekspressiovektori

Ekspressiokasetit valmistettiin käyttäen imettäväisso-
15 luekspressiovektoria pSV7d (2423bp).

Plasmidivektori pSV7d (katso Truett et al., supra)
suunniteltiin seuraavasti: 400bp BamHI/HindIII -fragmentti,
joka sisältää SV40 replikaation alkukohdan ja varhaispro-
moottorin saatiin pSVgtI:stä (Gruss, P., ja Khoury, G.,
20 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78:133-137) ja puhdistet-
tiin. 240bp:n SV40 BclI/BamH -fragmentti, joka sisältää
SV40 polyA lisäyskohdan saatiin pSV2/DHFR (Subramani et al.,
Molec. and Cell Biol. (1981) 1:854-864) ja puhdistettiin.
Fragmentit liitettiin seuraavien linkkereiden avulla:

25

Stop-kodonit

1 2 3

5'-AGCTAGATCTCCCGGGTCTAGATAAGTAAT-3'

TCTAGAGGGCCCAGATCTATTCATTACTAG

HindIII BglIII SmaI XbaI BclI ulkonema.

30

Tämä linkkeri sisältää viisi restriktiokohtaa, kuten myös
stop-kodonit kaikissa kolmessa lukemiskehyksessä. Syntyvä
670bp fragmentti, joka sisältää SV40 replikaation aloitus-
kohdan, SV40 varhaispromoottorin, polylinkkerin stop-kodo-
35 nein ja SV40 polyadenylaatiokohdan, kloonattiin pML:n
BamHI-kohtaan, pBR322 johdannainen, jossa on 1.5kb:n dele-
tio (Lusky and Botchan, Cell (1984) 36:391) antamaan pSV6.

EcoRI ja EcoRV -kohdat pSV6:n pML-sekvensseissä eliminoitiin hajottamalla EcoRI:llä ja EcoRV:llä, käsiteltiin Bal31-nukleaasilla noin 200 emäsparin poistamiseksi kummassakin päässä ja yhdistettiin lopulta antamaan pSV7a.

5 Bal31 käsittely eliminoi myös yhden BamHI restriktiokohdan, joka reunustaa SV-aluetta, noin 200 emäsparin päässä EcoRI kohdasta. Toisen SV40-aluetta reunustavan BamHI-kohdan eliminoimiseksi pSV7a hajotettiin NruI:llä, joka katkaisee pML-sekvenssin ylävirtaan replikaation aloituskohdasta.

10 Tämä saatettiin uudelleen ympyränmuotoon blunt end -yhdistämällä antamaan pSV7b:n.

pSV7c ja pSV7d edustavat peräkkäisiä polylinkkerikorvauksia. pSV7b hajotettiin ensin StuI:llä ja XbaI:llä. Seuraavat linkkerit liitettiin sitten vektoriin antamaan

15 pSV7c:

BglIII EcoRI SmaI KpnI XbaI
 5'-AGATCTCGAATTCCCCGGGGGTACCT
 TCTAGAGCTTAAGGGGCCCCCATGGAGATC

20 Sen jälkeen pSV7c hajotettiin BglIII:lla ja XbaI:llä ja liitettiin sitten yhteen seuraavan linkkerin avulla antamaan pSV7d:

BglIII EcoRI SmaI XbaI BamHI SalI
 5'-GATCTCGAATTCCCCGGGTCTAGAGGATCCGTCGAC
 25 AGCTTAAGGGGCCAGATCTCCTAGGCACGTGGATC

A.2 pSVF8-92: Ekspressioplasmidi 92kD ketjua varten

Alkaen BamHI-kohdasta polylinkkerissä pSV7d, pSVF8-92

30 koostuu 49 emäsparin synteettisestä linkkeri-adaptorimolekyylistä BamHI:stä SacI:een, joka koodaa nukleotidejä -30:stä +14:ään tekijä VIII:C-proteiinissa (numerointi translaation aloituskohdan ensimmäisestä A:sta; sekvenssi on osoitettu alapuolella A.4:ssä) 2267 emäsparin SacI:stä

35 HindIII-fragmenttiin pSVF8-200:n sisältämässä tekijä VIII:C DNA:ssa, kuten on kuvattu alapuolella (nukleotidiin +2281 asti), ja pSV7d HindIII:sta BamHI:een.

A.3 pSVF8-80: Ekspressioplasmidi 80kD ketjua varten

Lähtien SalI-kohdasta pSV7d polylinkkerissä pSVF8-80 koostuu kudosplasminogeeniaktivaattori cDNA:n 201bp fragmentista nukleotideistä välillä -98 ja +103 (suhteessa aloituskodoneihin) päättyen BglII-kohtaan (tPA-sekvenssit annettu viitteessä Degan, S.J.F., et al., J. Biol. Chem. (1986) 261:6972-6985), 29 emäsparin synteettisestä BglII linkkeri-adaptorista BclI, jota koodaavat nukleotidit välillä +5002 ja +5031 tekijässä VIII:C, joka on liitetty tekijä VIII:C:n 2464 emäsparin BclI-fragmenttiin, joka ulottuu tekijä VIII:C cDNA:n nukleotidiin 5028 in vitro mutageneesilla muodostuneesta BclI-kohdasta (Zoller and Smith, Methods in Enzymology (1983) 100:468), 3'-translatoitumattoman alueen BclI-kohtaan nukleotidiin 7492, ja 400 emäsparin fragmentista tPA:n 3'-translatoitumattomalla sekvenssillä, joka ulottuu BglII-kohdasta synteettiseen PstI-kohtaan, joka on syntynyt cDNA-kloonauksessa, mitä seuraa vektorin M13mp9:stä peräisin oleva polylinkkeri (Vieira and Messing, Gene (1982) 19:259) ja sitten pSV7d:stä.

A.4 pSVF8-200: Ekspressioplasmidi täysipituista tekijä VIII:C cDNA:ta varten

Plasmidi pSVF8-200 (kuvattu viitteessä Truett et al.), joka sisältää koko tekijä VIII:C cDNA:ta koodaavan ja 3'-translatoitumattoman sekvenssin, 5'-translatoitumattomien sekvenssien ollessa samat kuin on kuvattu yllä pSVF8-92:lle, valmistettiin seuraavalla tavalla.

Plasmidi pSV7d hajotettiin BamHI:llä SV40-varhaispromoottorista alavirtaan sijaitsevan polylinkkerialueen leikkaamiseksi. Seuraava 49bp BamHI-SacI linkkeriadaptori, joka koodaa 5'-translatoitumattoman alueen viimeistä 30 emäsparia ja ihmisen tekijä VIII:C:tä koodaavan sekvenssin 15 ensimmäistä emäsparia, syntetisoitiin kemiallisesti ja liitettiin pSV7d:hen :

-35 -30 -25 -20 -15 -10 -5 met gln ile glu

5' GATCC TCTCC AGTTG AACAT TTGTA GCAAT AAGTC ATG CAA ATA GAG CT 3'
 3' BamHI G AGAGG TCAAC TTGTA AACAT CGTTA TTCAG TAC GTT TAT CSacI 5'

5 Tämä yhteen liitetty plasmidi hajotettiin sitten SacI:llä ylimääräisten linkkereiden poistamiseksi ja SalI:llä saamaan aikaan SalI-ulkoneman.

Fragmentti 1, 2.9kb SacI-fragmentti, joka on peräisin ihmisen tekijä VIII:C:n 5'-koodaavan alueen sisältävästä
 10 pF8-102:sta, ja fragmentti 2, 6.5kb SacI-SalI-fragmentti, joka on peräisin tekijän 3'-koodaavan alueen sisältävästä pF8-6.5:stä, ja linkkeriadapterin sisältävä pSV7d modifioitu vektori liitettiin yhteen (katso Truett *et al.*, *supra*). Tätä ligaatioseosta käytettiin sitten transformoimaan
 15 E. coli HB101, ja pesäkkeet valittiin ampicilliiniresistenssin perusteella.

Kolmesataa transformanttia seulottiin pesäkesuodatushybridisaation avulla käyttäen BamHI-SacI 5'-adaptorin tai 2.9kb SacI-fragmenttia koettimina. Molemmilla koettimilla
 20 positiiviset pesäkkeet analysoitiin restriktiokartoituksen perusteella. Saatiin plasmidi pSV8-200, joka sisältää täydellisen koodausalueen ihmisen tekijä VIII:C-geenille ja 5'-translatoitumattoman alueen sopivasti liitettynä transkription suuntaan SV40-varhaispromoottoriin.

25

B. COS7-solujen transfektio ja viljely

Plasmidit, joita kuvattiin yllä, transfektoitiin COS7-soluihin (Guzman, Cell (1981) 23:175) käyttäen kalsiumfosfaattikerasaostusmenetelmää (van der Eb ja Graham, Meth. Enzymology (65:826-39) yhdistettynä klorokinonidifosfaatti-käsittelyyn (Luthman ja Magnusson, Nucl. Acids Res. (1983) 11:1295-1308) käyttäen 50 µg plasmidi-DNA:ta 5 x 10⁵
 30 solua kohti 14 tunnin ajan. Solut voidaan transfektoida myös DEAE-dekstraanimenetelmällä, jota ovat kuvanneet Sompayrac ja Danna P.N.A.S. (1981) 78:7575-7578.
 35

COS7-soluja kasvatettiin Dulbecco'n modifioidussa Eagle-väliaineessa, jota oli täydennetty 10 % vasikan si-

kiöseerumilla, 100U/ml penisilliinillä, 100 µg/ml streptomysiinillä, 292 µg/ml glutamiinilla ja 110 µg/ml natriumpyruvaatilla. Näytteet saatiin koottaessa 48 tuntia seerumia sisältävää väliainetta 88 tuntia transfektion jälkeen.

5

C. Kokeet

Väliaine poistettiin tietyin välein transfektion jälkeen soluista ja tasaeriä säilytettiin -70°C:ssa. Näytteitä testattiin niiden kyvyn suhteen vähentää tekijä VIII:C:tä vailla olevaan plasmaan pitkäaikaista osittaista trombo-
10 plastiiniaikaa standardikoagulaatiokokeessa (Hardisty et al., Thrombosis et Diathesis Haemologica (1962) 72:215). Vielä spesifisempää Coatest-koetta (Rosen et al. in Thromb. and Haemostasis (1985) 54:818-823), joka määrittää aktivoituneen tekijä X (Xa):n syntymistä ulkoapäin tuodun tekijä VIII:C:n konsentraation lineaarisena funktiona, käytettiin koaguloitumiskokeen tulosten tarkistamiseen. Immunologisesti reaktiivisen tekijä VIII:C proteiinin konsentraatio väliaineessa määritettiin radioimmunokoetta (RIA) käyttäen,
15 joka on kehitetty havaitsemaan 92kD polypeptidi, ja entsyymisidottua immunoabsorbenttikoetta (ELISA) käyttäen, joka on spesifinen 80kD polypeptidille (Nordfang et al., Thromb. and Haemostasis (1985) 53:346).

Kuten on osoitettu taulukossa 1 92kD polypeptidin tai
25 80kD polypeptidin ekspressio ei yksin tuottanut havaittavaa aktiivisuutta vaikkakin kutakin yksittäistä proteiinia oli läsnä suuret määrät tasapainotetussa väliaineessa. Kun soluja kotransfektoitiin pSVF8-92 ja pSVF8-80 plasmidilla, väliaine sisälsi noin 20mU/ml koaguloitumisaktiivisuutta.
30 Koaguloitumisaktiivisuuden sama suhteellinen taso erittyi täydellistä tekijä VIII:C proteiinia koodaavalla plasmidilla pSVF8-200 transfektoiduilla soluilla.

Kun pSVF8-92 ja pSVF8-80 yksittäisistä transfektanteista saadut tasapainotetut väliaineet sekoitettiin yhteen
35 (käyttäen useita erilaisia olosuhteita kuten on esitetty taulukossa 1), yhtään aktiivisuutta ei mitattu.

Tulokset osoittavat, että tekijä VIII:C:n amino- ja karboksiterminaalisten osien kompleksi säilyttää sisäisen koaguloitumisaktiivisuuden ja että sisäinen β -osa ei ole olennainen aktiivisuuden eikä aktiivisen kompleksin järjestytyksen erillisistä ketjuista kannalta.

TAULUKKO 1: Rekombinantti-tekijä VIII:C aktiivisuuskoe tasapainotussa COS-solu väliaineessa

10	ELISA ^d	Koaguloitu- minen	Aktii- sivuus ^a	Coatest ^b - aktiivi- suus	RIA ^c - koe
	Plasmidi U/ml	Koaguloitu- misaika (sek)	mU/ml ^e	mU/ml	92kD U/ml 80kD
15	pSVF8-92 <.0002	95.7	< .9	< .1	0.15
	pSVF8-80 1.36	97.2	< .9	< .1	<.01
	pSVF8-92+pSVF8-80 1.13	56.1	22.5	20.4	0.05
20	pSVF8-200 0.28	47.7	70.0	43.2	0.12
	ei mikään <.0002	94.6	< .9	< .1	<.01
25	pSVF8-92 } sekoitet- -- tu in pSVF8-80 } <u>vitro</u> ^f	95.7	< .9	< .1	--

a 75 μ l tasaerät väliainetta, joka oli tasapainotettu yllä olevilla plasmideilla transfektoitujen COS-solujen kasvulla tai transfektoitu sokeakoe analysoitiin niiden kyvyn suhteen vähentää tekijä VIII:C:tä vailla olevan plasman pidennettyä osittaista trombo-
30 plastiiniaikaa yksivaiheisessa kokeessa. Lyhyesti, 75 μ l Plateliniä (yleisdiagnostinen aine) inkuboitii 3 min 37°C:ssa, mitä seurasi 75 μ l:n tekijä VIII:C:tä vailla olevan plasman plus 75 μ l:n testinäytettä lisääminen 5 min lisäinkuboisajan kuluessa 37°C:ssa. 75 μ l esilämmitettyä 0.025 M CaCl₂ lisättiin ja hyytymisaika mitattiin Becton-Dickinson fibrometrillä. Standardina käytettiin normaalia ihmisen seerumia, joka oli laimennettu COS-solujen väliaineella.

(jatkuu)

- 5 b Coatest-koe (Kabi) mittaa aktivoituneen tekijä X (Xa):n muodostumista tekijä VIII:C:n konsentraation lineaarisena funktiona. Tekijä Xa:n konsentraatio määritettiin kromogeenin para-nitroaniliinin proteolyyttisen hajoamisen Xa:n synteettisestä peptidisubstraatis- ta perusteella. Normaalia ihmisen plasmaa, joka oli laimennettu 50 mM Tris-HD:llä pH 7.3, 0.2 % BSA käytettiin standardina.
- 10 c RIA-koetta varten päällystettiin puhdistetulla koiran tekijä VIII:C-inhibiittori IgG:llä 96-kaivoinen polystyreenimikrotiiterilevy konsentraatiossa 3.5 µg/ml 0.1M natriumkarbonaattipuskurissa, pH 9.8, inkuboiden yli yön 37°C:ssa. Levyt pestiin 3 kertaa 0.1M NaCl, 0.05 % Tween 20:llä, mitä seurasi inkubointi testiväli- ainenäytteen ja jodinoidun VIII:C 92-kDa proteiinin seoksella, molempien ollessa laimennettuja seoksella, joka sisälsi 0.05M imidatsolia, 0.1M NaCl, 1 % härän seerumialbumiinia, 0.05 % Tween 20, pH 7.3. VIII:C 92-kDa proteiini eristettiin plasmasta ja se oli enemmän kuin 50 % homogeeninen määritettynä natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesilla ja hopeavärjäyk- sellä. 16 tunnin inkubointiajan huoneenlämmössä kuluttua levyt pestiin ja ¹²⁵I:n määrä yksittäisissä kaivoissa määritettiin γ- laskimella. Keskimääräisesti puhdistettua kaupallista tekijä VIII:C valmistetta (tekijä VIII, NORDISK), jolla on spesifinen aktiivisuus 0.5 yksikköä koaguloitumisaktiivisuutta mg:aa kohti, käytettiin standardina. Tämä standardi kalibroitiin Maailman Terveysjärjestön Kolmatta Kansainvälistä tekijä VIII:C standardia vastaan. Me määrittelimme keskimääräisesti puhdistetun standardimme sisältävän 92 kDa RIA-aktiivisuutta/tekijä VIII:C koaguloitumisaktiivisuutta suhteessa 1.
- 15 d ELISA-koetta varten päällystettiin puhdistettu tekijä VIII:C-inhibiittori IgG 96-kaivoinen polyvinyylikloridimikrotiiterilevylle konsentraatiossa 4.5 µg/ml 0.1M natriumkarbonaatissa pH 9.8, inkuboiden yli yön 37°C:ssa. Kaivot pestiin, kuten yllä ja peroksi- daasi-konjugoidut ihmisen inhibiittori IgG F(ab)₂-fragmentit, jotka oli laimennettu seoksella, joka sisälsi 0.1M imidatsolia, 0.15M NaCl 1 % BSA, 0.05 % Tween 20, pH 7.3, lisättiin lopulliseen inkubointiin, joka kesti 16 h huoneen lämpötilassa. Väri kehitettiin o-fenyleenidiamiiniliuoksen avulla. Normaali ihmisen seerumia käytettiin standardina.
- 20 e Yhden mU-aktiivisuuden arvioidaan vastaavan suunnilleen 100pg tekijä VIII:C proteiinia (Fay et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79:7200).
- 25 f Testattiin erilaisia sekoitusolosuhteita, jotka käsittivät eripituisia aikoja aina 2 tuntiin kestävästä esi-inkuboinnista 37°C:ssa, 20°C:ssa tai 4°C:ssa 10mM CaCl₂ läsnäollessa tai poissaollessa. Tässä taulukossa raportoitu arvo edustaa saatuja tuloksia.
- 30
- 35

TAULUKKO 2: Koaguloitumisen inhibitiokoe

		Koe I:	
5	Plasmidi	IgG ^a	Koaguloitumisaika (sekunteja)
	pSVF-80 + pSVF8-92	N	51.9
		I	74.5
		B	54.4
10	pSVF8-200	N	46.4
		I	69.4
		B	46.8

15 Koetta I varten inkuboitiin 160 µl COS-solujen tasapainotettua väliainetta 20 µl:n kanssa 100-kertaisesti laimennettua ihmisen tekijä VIII:C inhibiittori-seerumia (Bethesda-tiitteri 1500 yksikköä) tai samalla lailla laimennettua kerättyä normaalia ihmisen seerumia tai puskuria yksin (50 mM inidatsoli, 0.1M Nacl, 100 µl/ml BSA pH 7.3) kahden tunnin ajan 37°C:ssa. Nämä näytteet tutkittiin sitten jäljellä olevan koaguloitumisaktiivisuuden suhteen, kuten esitettiin taulukon 1 selityksessä.

		Koe II:	
20	Plasmidi	IgG ^a	Koaguloitumisaika (sekunteja)
	pSVF8-92 + pSVF8-80	I	72.9
25		B	48.0
	pSVF8-200	I	60.9
		B	44.9

30 Koetta II varten inkuboitiin 100 µl tasapainotettua väliainetta 2 tunnin ajan 37°C:ssa joko 10 µl:n kanssa liuosta, joka sisälsi 1 µg/µl anti-tekijä VIII:C monoklonaalista Hybriteck vasta-ainetta (Bethesda-tiitteri 14000 yksikköä) tai puskuria ja tutkittiin sitten kuten yllä.

35 ^a Normaali seerumi = N; inhibiittori seerumi = I; pusku-
ri = B.

Sen varmistamiseksi, että havaittu koaguloitumisaktiivisuus oli peräisin tekijä VIII:C:stä, määritettiin koaguloitumisen herkkyys inhibiitiolle tekijä VIII:C:lle spesifisen vasta-aineen avulla. Ennen koetta esi-inkuboitiin
 5 tasaeriä tasapainotettua väliainetta 2 tunnin ajan 37°C:ssa normaali-ihmisen seerumin tai hemofiiliaa sairastavien ihmisten seerumin laimennosten läsnäollessa, joille oli kehittynyt korkea tiitteri inhibiittori vasta-aineita tekijä VIII:C:lle. Kuten on osoitettu taulukossa 2 täydellisen
 10 molekyylin aktiivisuus samoin kuin 92kD-80kD kompleksin aktiivisuus oli alentunut nimenomaan inhibiittoriseerumilla. Sama tulos saatiin käyttäen kolmea erilaista inhibiittori monoklonaalista vasta-ainetta, jotka sitoutuvat 80kD lajeihin.

15 Kahden ketjun kompleksin olemassaolon toteen näyttämiseksi vielä selvemmin aktiiviset lajit puhdistettiin osittain COS-solujen väliaineesta viemällä läpi pylvään, joka sisälsi 80kD osalle kohdistettua monoklonaalista vasta-ainetta, kuten on osoitettu taulukossa 3. Suunnilleen 65 %
 20 käytetystä aktiivisuudesta saatiin talteen pylvällä ja 50 % tästä sidotusta materiaalista eluoitui aktiivisessa muodossa ja 5-kertaa suurempana konsentraationa kuin alkuperäinen väliaine. Aktiivinen kompleksi voidaan eristää näin affiniteettikromatografian avulla käyttäen vain 80kD
 25 lajeille spesifistä vasta-ainetta.

TAULUKKO 3: 92kD-80kD koaguloitumisaktiivisen kompleksin osittainen puhdistaminen

30	Fraktio	Coatest U/ml	80kD ELISA U/ml
	Väliaine	.0044	0.175
	Läpivirtaus	.0017	0.13
	Eluaatti	.0200	0.76

35

TAULUKKO 3: jatkuu

100 µg anti-80kD monoklonaalista vasta-ainetta (56 IgG) (Nordfang et al., *Thromb. Haemostasis* (1985) 53:346) liitettyä Sepharose CL4B:hen inkuboitiin yli yön 20°C:ssa 1.4 ml:n kanssa väliainetta, joka sisältää 6.2mU kokoaktiivisuuden (määritettyä Coatest-kokeella pSVF8-92 ja pSVF8-80 plasmideilla keratransfektoiduilla COS-soluilla). Inkuboinnin jälkeen liete vietiin pylvääseen ja läpivirtausfraktio koottiin. Pylväs pestiin 300 µl:lla puskuria A (50mM imidatsoli, .1M NaCl, 0.1 % natriuminsuliini, 0.2 % NaN₃, pH 7.3) ja eluoitiin sitten 300 µl:lla puskuria B (2.5M NaCl, 50 % etyleeniglykoli, 0.5M imidatsoli, 0.1M CaCl₂, 0.1 % natriuminsuliini, 0.2 % NaN₃, pH 7.3).

10

Tässä esitetyt tulokset osoittavat, että β-linkkeri-alueen, joka sisältää 918 aminohappoa tai noin 40 % koko ehjän proteiinin aminohapoista, ekspressoitumista ei tarvita tekijä VIII:C aktiivisuutta varten. Yksittäisten 92kD ja 80kD alueiden ko-ekspressoitumisen saa aikaan tekijä VIII:C-aktiivisuustason, joka on verrattavissa koko tekijä VIII:C:tä koodaavan alueen ekspressoitumisessa saatuun aktiivisuustasoon. Nämä proteiinit kerääntyvät in vivo muodostamaan aktiivisen kompleksin, joka on yhdistetty kaliumsillan avulla. Kokoonpano ei vaadi β-alueen läsnäoloa ja tapahtuu tehokkaasti kahdelle ketjulle, jotka ovat ekspressoituneet in trans.

15

20

On ilmeistä yllä olevien tulosten perusteella, että tekijä VIII:C-aktiivisuus voidaan saada aikaan tuottamalla suoraan N-terminaalinen fragmentti ja C-terminaalinen fragmentti, jotka ekspressoituvat toisistaan riippumatta, jolloin kullakin on oma signaalisekvenssinsä. Tekijä VIII:C voidaan saada näin tehokkaammin, koska suurta prekursoria ei tarvitse kloonata ja käyttää tekijä VIII:C-aktiivisuuden koodaavana sekvenssinä. Soluja, joilta voi puuttua kyky tuottaa sopivan kypsäasteen omaava tekijä VIII:C-proteiinia, voidaan käyttää näin tekijä VIII:C:n ekspressoimiseen.

25

30

35 Esimerkki 2

92kD proteiinin ekspresio COS-soluissa käyttäen pSVF8-92 rakennetta oli alhainen verrattuna tuotetun 80kD

proteiinin määrään. Rakennetta muunnettiin siksi yritet-
 täessä lisätä 92kD proteiinin tasoa. Seuraavan tyyppiset
 modifikaatiot tehtiin: Muutokset tekijä VIII:C geenin 5'
 ei-translatoidussa sekvenssissä; heterologisten 5' ei-
 5 translatoitujen ja leader-sekvenssien sisällyksessä; ja
 muutokset 3' ei-translatoiduissa sekvensseissä. Nämä ra-
 kenteet ovat yhteenvetona alla.

A. Ekspressioplasmidit

10

A.1. 5' ei-translatoidun alueen modifikaatiot

Plasmidi pSVF8-92B. Tämä plasmidi on pSVF8-92:n joh-
 dannainen, jossa pSVF8-92:n 30 emäsparin 5' ei-translatoi-
 tu sekvenssi on korvattu ihmisen tekijä VIII:C cDNA:n koko
 15 5' ei-translatoidulla alueella (nukleotidit 1-171; katso
 kuvaa 8 Truett et al., supra), jossa on deletio G-C hännäs-
 sä (in vitro paikka-spesifinen mutageneesi) ja kolmen emäk-
 sen muutokset, jotka on osoitettu alku ATG:n alapuolella
 (asemassa +172, kuva 8, Truett et al., supra) vahvistamaan
 20 Kozak'in edulliset sekvenssit tehokkaalle lähetti-trans-
 laatiolle eukarioottisoluisissa:

Tekijä VIII:C:	GTCATG CAA
Kozak konsensus:	ACCATG G

25 Tämä muutos muuttaa signaalipeptidin toisen aminohapon
 Glu:ksi Gln:sta.

Plasmidi pSVF8-92E. Tämä plasmidi on pSVF8-92B:n joh-
 dannainen, jossa pSV7d:stä peräisin oleva polylinkerin 5'-
 30 suuntaan tekijä VIII:C sekvensseistä poistetaan lukuunotta-
 matta SalI-kohtaa ja ATG-kodoni 5' translatoitumattomalla
 alueella (41 kohdassa Truett et al., supra) on vaihtunut
 ATT:ksi in vitro mutageneesilla.

35

A.2. Heterologisten 5' ei-translatoitujen alueiden ja leader-sekvenssien lisääminen

Plasmidit pSVF8-92G, H ja I. Nämä plasmidit ovat pSVF8-92B johdannaisia, joissa 5' ei-translatoitu alue kuten myös luonnollinen tekijä VIII:C signaalisekvenssi korvataan analogisella alueella ihmisen kudospasminogeeniaktivaattori (tPA) cDNA-geenistä. pSVF8-92G:ssä ensimmäiset 35 aminohappoa (signaalisekvenssi) tPA 5'-alueesta liitetään kypsään tekijä VIII:C 92kD:hen seriinin korvatussa 92kD proteiinin ensimmäisen aminohapon (alaniinin). pSVF8-92I:ssä tPA 5'-alueen ensimmäiset 23 aminohappoa liitetään kypsään tekijä VIII:C 92kD proteiiniin. tPA sekvenssit ovat samat kuin kuvattiin pSVF8-80:lle.

Plasmidi pSVF8-92J. Tämä plasmidi on pSVF8-92G:n johdannainen, jossa tPA 5'-alue on korvattu herpes simplex virus-1 (HSV-1) 75 emäsparin dG 5' ei-translatoituilla sekvensseillä ja HSV-1 gD signaalisekvenssin 75 emäsparilla. pSVF8-92J:stä puuttuu myös Ala → Ser substituutio (Watson, R.J., et al., Science (1982) 218:381-384).

A.3. 3' ei-translatoitujen alueen muutokset

Plasmidi pSVF8-92C. Tämä plasmidi on pSVF8-92B:n muunnos, jossa 92kD koodaava alue on liitetty suoraan ihmisen tekijä VIII:C cDNA:n translaation lopetuskodoniin ja luonnollisiin 3' ei-translatoituihin sekvensseihin. Tämä plasmidi on pSVF8-200:n johdannainen.

Plasmidi pSVF8-92L. Tämä plasmidi on pSVF8-92C:n johdannainen, jossa pSVF8-92C:n 3' ei-translatoitu alue on korvattu pSVF8-80:n 3' ei-translatoitulla alueella.

B. Tulokset

Kukin osan A plasmideista transfektoitiin COS7-soluihin yhdessä pSVF8-80 kanssa, kuten kuvattiin esimerkissä 1 ja väliaine testattiin tekijä VIII:C-aktiivisuuden suhteen kuten esimerkissä 1.

pSVF8-8-92B, ensimmäinen testatuista, osoitti aktiivisuustasoja, jotka vaihtelivat välillä 2-8 kertaa paremmat kuin pSVF8-92. Jäljellä olevista plasmideista pSVF8-92E osoittautui parhaimmaksi, ollen 1.65 kertaa parempi kuin pSVF8-92B. pSVF8-92J ja I tuottivat myös pääasiassa korkeampia ekspressiotasoja kuin pSVF8-92 ollen lähellä pSVF8-92E:n tasoja. pSVF8-92G:n ekspressiotaso lähentelee pSVF8-92:n tasoa, kun taas pSVF8-92H:n oli pääosin pienempi kuin pSVF8-92:n. Sekä pSVF8-92C:n että pSVF8-92L:n ekspressiotasot näyttivät olevan samansuuruiset kuin pSVF8-92E:llä.

Esimerkki 3

Tämä esimerkki kuvaa polypeptidien tuottamista varten tarvittavien rakenteiden valmistusta, jotka sisältävät 92kD ketjun ja osan B-osasta. Nämä johdannaiset tehtiin yritettäessä kehittää raskas ketju, joka on stabiilimpi ja/tai yhdistyy tehokkaammin aktiiviseksi kompleksiksi kevyen ketjun kanssa. Johdannaiset valittiin jäljittelemään molekyylilajeja, joita on havaittu tekijä VIII:C:n plasmasta peräisin olevissa valmisteissa ja solulysaateissa ja rekombinantti täysipituista tekijä VIII:C:tä ekspressiivien solujen tasapainotetussa väliaineessa. Nämä voisivat mahdollisesti syntyä täysipituisten tekijä VIII:C:n trombiinin avulla tapahtuvalla pilkkomisella.

A. Ekspressioplasmidien valmistaminen

A.1 pSVF8-92S

Tämä plasmidi koodaa 982 aminohapon raskasta ketjua ja valmistettiin täysipituisestä cDNA plasmidista pSVF8-302 osittaisella pilkkomisella B-osaa koodaavan alueen ensimmäisessä SacI kohdassa. Oligonukleotidi adaptoria käytettiin translaation stop-kodonien asettamisessa ja koodaavan sekvenssin liittämässä ihmisen luonnollisen tekijä VIII:C 3' ei-translatoidun sekvenssin koodaavaan sekvenssiin, joka alkaa ensimmäisestä BalI-kohdasta. Tämä plas-

midi koodaa ihmisen natiivin tekijä VIII:C:n 978 ensimmäistä aminohappoa ja 4 substituoituja aminohappotähteitä karboksipäässä.

5 A.2 pSVF8-160

Tämä plasmidi saa aikaan 1323 aminohapon raskaan ketjun ja se valmistettiin täysipituudesta kloonista (nimetty pSVF8-303:ksi), joka on samanlainen kuin pSVF8-200, mutta jolla on pSVF8-92E:n 5' ei-translatoitu alue. pSVF8-303 pilkottiin EcoRV:n ja SmaI:n avulla ja tylpät päät liitettiin yhteen muodostamaan pSVF8-160. Tämä plasmidi koodaa tekijä VIII:C:n 1315 ensimmäistä aminohappoa. Kahdeksan nonsense aminohappoa lisätään karboksipäähän vektori pSV7d polylinkkerien yhteenliittymisen tuloksena.

15

A.3 pSVF8-170

Tämä plasmidi saa aikaan 1416 aminohapon raskaan ketjun ja se valmistettiin myös pSVF8-303:sta. pSVF8-303 pilkottiin osittain BglII:n avulla ja syntynyt 6811 emäsparin fragmentti eristettiin geelillä ja päät liitettiin yhteen muodostamaan pSVF8-170. Tämä plasmidi koodaa tekijä VIII:C:n 1405 ensimmäistä aminohappoa ja sillä on 11 nonsense aminohapon karboksyyliuloke, joka johtuu vektori pSVF7d polylinkkerin liittymisestä.

25

A.4 pSVF8-120

Tämä plasmidi saa aikaan 1107 aminohapon raskaan ketjun ja se valmistettiin pSVF8-303:sta. Plasmidi pSVF8-303 pilkottiin ApaI:n avulla ja kohesiiviset päät täytettiin T4-polymeraasilla. Syntynyt molekyyli pilkottiin edelleen SmaI:llä, DNA itse-liittyi ja lisääntyi E. coli HB101:ssä. Tämä plasmidi koodaa 1102 aminohappoa tekijä VIII:C:n aminopäästä ynnä 5 lisäaminohappoa karboksyylipäässä.

35 B. Tulokset

Kunkin osan A plasmideista transfektoitiin COS7-soluihin yhdessä pSVF8-80 kanssa, kuten kuvattiin esimerkissä 1

ja väliaine testattiin tekijä VIII:C:n aktiivisuuden suhteen kuten esimerkissä 1.

Jokainen näistä plasmideista osoitti pääosin alentuneita ekspressiotasoja verrattuna pSVF8-92E:n ekspressiotasoihin. RIA:n suhde Coatest-aktiivisuuteen on pSVF8-160:lla ja pSVF8-170:llä noin 1.8 verrattuna pSVF8-92E:n suhteeseen 7.2. Tämä tulos viittaa siihen, että näillä pitemmillä raskaan ketjun johdannaisilla on suurempi spesifinen aktiivisuus, mikä merkitsee sitä, että ne ovat liittyneet tehokkaammin aktiivisiksi alayksikkökomplekseiksi kuin 92kD molekyyli itse. Myös koaguloitumisaktiivisuuden suhde Coatest-aktiivisuuteen on alhaisempi pitemmillä ketjuilla ~ 1.7 verrattuna 2.3:een 92kD:lle ja 1.35:een täydelliselle molekyylille, viitaten siihen, että nämä pitemmät polypeptidit muodostavat komplekseja, jotka eivät ole yhtä aktivoituneita kuin 92kD + 80 kD kompleksi.

Esimerkki 4

Tämä esimerkki kuvaa stabiilien CHO-solulinjojen, jotka tuottavat tekijä VIII:C 92kD-80kD ketjukompleksia, valmistusta.

CHO-DUKX-B1 -solut (Urlaub ja Chasin, P.N.A.S. (1980) 77:4216-4220) kotransfektoitiin pSVF8-92C tai pSVF8-92E, pSVF8-80 ja pAd-DHFR plasmideilla käyttäen Graham'in ja Van der Eb'in kalsiumfosfaattisaostusmenetelmää (op. cit.) ja Wigler et al.:n julkaisussa Cell (1978) 14:725-731 ja Lewis et al.:n julkaisussa Somatic Cell Genetics (1980) 6:333-347 kuvaamia modifikaatioita. Tämä plasmidi pAd-DHFR, joka sisältää dhfr-geenin, rakennettiin liittämällä adenovirus-2 (Ad-MLP, karttayksiköt 16-17.3) myöhäis pääpromootori hiiren dhfr cDNA:han 5'-päässä. SV40:n pientä t-antigeenia koodaava DNA ja SV40-varhaisalue polyadenylaatiokohta saatiin pSV2-neo plasmidista (Southern ja Berg, J. Mol. Appl. Genet. (1982) 1:327-341) ja liitettiin dhfr cDNA:n 3'-päähän. Nämä kolme segmenttiä alikloonattiin plasmidiin pBR322 plasmidin pAd-DHFR saamiseksi. Plasmidien painosuhteet olivat vastaavasti 10:1:5 pSVF8-92C:n

kotransfektiossa ja 1:1:1 tai 10:10:1 pSVF8-92E:n kotransfektiossa. Yhdessä pSVF8-92C:n transfektioista, plasmidit pilkottiin PvuI:llä, joka pilkkoo ainutlaatuisesti pBR322:n beta-laktamaasigeenissä. Tässä tapauksessa liitettiin lineaarisia DNA-molekyylejä superkiertyneiden molekyylien sijasta. Syntyneiden DHFR-positiivisten kloonien väliaine seulottiin ELISA:n ja Coatestin avulla, kuten yllä kuvattiin. Positiivisten kloonien stabiilisuus arvioitiin toistetuilla läpikuluilla T-75 pulloissa ja väliaineen tutkimisilla. Alapuoella oleva taulukko 4 esittää lineaarisesta DNA:sta saatujen positiivisten stabiilien kloonien ekspressiotasoja.

Taulukko 4

15

	<u>Klooni</u>	<u>mU Coatest</u>
	pSVF8-92C	
	11-D6	43
20	11-D5	30
	pSVF8-92E	
	8-C1	18.2
	10-C2	70.0

25

pSVF8-92C ryhmän primääriset kloonit säilytettiin T-75 pulloissa. Klooni 11-D5 osoittautui olevan korkeimmin ekspressoiva klooni, tuottaen > 90 mU/ml Coatest-aktiivisuutta T-75 pulloviljelmissä. Kuuden viikon läpikulun jälkeen tämä klooni saatettiin valintaan 0.025 μ M, 0.05 μ M, 0.1 μ M ja 0.2 μ M metotreksaatissa. Kloonit ilmestyivät 0.025 μ M levyille, osoittaen, että DHFR-geenit olivat lisääntyneet metotreksaation matalilla tasoilla.

Ryhmän pSVF8-92E ryhmän linjat 8-C1 ja 10-C2 valikoitiin metotreksaatissa (0.025 μ M - 0.2 μ M) ja resistentit kloonit tutkittiin tekijä VIII:C-aktiivisuuden suhteen Coatestillä, RIA:lla ja ELISA:lla. Tutkittiin 22 meto-

35

treksaatti-resistenttiä 8-C1 kloonia, joista 10:n tiedot on esitetty taulukossa 5. Tekijä VIII:C:n lisääntymismäärä vaihtelee kloonien välillä, viitaten siihen, että jokin alayksikkögeneistä voi olla lisääntynyt DHFR-kasetin kera tai molemmat niistä tai ei yksikään. Huomatkaa kloonit 8C1-A2, 8C1-A2, 8C1-C2 ja 8C1-C5 esimerkkeinä näistä neljästä mahdollisuudesta. Samalla lailla arvioitiin 30 10-C2:n metotreksaatilla valikoitua johdannaista, jotka on myös esitetty taulukossa 5. Nämä sisältävät myös aktiivisuusspektrin. Huomatkaa kloonit 10C2-A2, 10C2-D2, 10C2-B5 ja 10C2-C6 esimerkkeinä neljästä erilaisesta keralisääntymisen mahdollisuudesta.

Taulukko 5

	Klooni	Konsentraatio MTX μU	Coatesti $\mu\text{U/ml}$	ELISA $\mu\text{U/ml}$	RIA $\mu\text{U/ml}$
15	8-C1	0	18	1275	n.d.
	8C1-A1	0.1	<50	1750	80
	8C1-A2	0.1	60	1950	>1000
	8C1-A5	0.05	2	100	10
	8C1-B3	0.025	33	1950	1000
20	8C1-B4	0.025	50	3550	820
	8C1-B5	0.025	35	1950	>1000
	8C1-C2	0.025	130	13,100	>>1000
	8C1-C3	0.025	165	3900	>>>1000
	8C1-C5	0.025	30	1750	760
	10-C2	0	200	1400	700
	10C2-A1	0.05	61	1600	400
	10C2-A2	0.1	67	6700	700
25	10C2-A4	0.05	63	2250	1200
	10C2-A5	0.05	183	9450	2660
	10C2-A6	0.05	320	8600	7400
	10C2-B1	0.05	408	8100	4300
	10C2-B3	0.05	134	800	9800
	10C2-B4	0.05	394	18,000	7800
	10C2-B5	0.05	461	15,000	8400
30	10C2-B6	0.05	247	2200	9800
	10C2-C1	0.1	160	8100	7600
	10C2-C2	0.05	228	6000	5600
	10C2-C3	0.05	294	14,850	2650
	10C2-C5	0.05	294	12,400	5400
	10C2-C6	0.05	100	1350	520
	10C2-D2	0.05	496	1560	16,400
	10C2-D3	0.05	242	10,200	2260
35	10C2-D4	0.05	165	14,100	3500
	10C2-D5	0.05	316	7800	5200
	10C2-D6	0.05	141	1600	6400

Plasmidit pSVF8-92 ja pSVF8-80 talletettiin American Type Culture Collection'iin (ATCC) 24 tammikuuta 1986 ja niille annettiin ATCC-hyväksymisnumerot 40222 ja 40223. . Plasmidi pSVF8-200 talletettiin ATCC:hen 17. heinäkuuta 1985 ja sille annettiin hyväksymisnumero 40190.

Vaikka edellä olevaa keksintöä on kuvattu joissakin yksityiskohdissa esimerkin vuoksi tarkoituksena selventää sen ymmärtämistä, on ilmeistä, että tiettyjä muutoksia ja modifikaatioita voidaan tehdä vaatimusten suojapiirin puitteissa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä rekombinantti-proteiinikompleksin valmistamiseksi, jolla on ihmisen tekijä VIII:C-aktiivisuus, mutta jolta puuttuu ihmisen tekijä VIII:C:n B-osa kokonaan tai osaksi, **tunnettu** siitä, että koekspressoitetaan in trans eukariotillisessa transformantti-isäntäsolussa

(a) ensimmäinen plasmidi, joka sisältää geenin, joka koodaa signaalisekvenssiä ja polypeptidiä, jolla on sama aminohapposekvenssi kuin ihmisen tekijä VIII:C:n A-osalla tai aminohapposekvenssi, joka ei eroa siitä enempää kuin 10%, ja mahdollisesti sisältää vähemmän kuin täyspitkän ihmisen tekijä VIII:C:n B-osan sekvenssin, mutta plasmidi ei sisällä C-osaa, ja

(b) toinen plasmidi, joka sisältää geenin joka koodaa signaalisekvenssiä ja polypeptidiä, jolla on sama aminohapposekvenssi kuin ihmisen tekijä VIII:C:n C-osalla, tai aminohapposekvenssi, joka ei eroa siitä enempää kuin 10%, mutta plasmidi ei sisällä A- eikä B-osaa; ja eritetään rekombinantti-proteiinikompleksi.

2. Vaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että toisen geenin koodaaman polypeptidin aminohapposekvenssi on sama kuin ihmisen tekijä VIII:C:n aminohappojen 1649-2322 aminohapposekvenssi.

3. Vaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäisen geenin koodaaman polypeptidin aminohapposekvenssi on sama kuin ihmisen tekijä VIII:C:n aminohappojen 1-740 aminohapposekvenssi.

4. Vaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäisen geenin koodaaman polypeptidin aminohapposekvenssi on sama kuin ihmisen tekijä VIII:C:n aminohappojen 1-1102 aminohapposekvenssi.

5. Vaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäisen geenin koodaaman polypeptidin aminohapposekvenssi on sama kuin ihmisen tekijä VIII:C:n aminohappojen 1-1315 aminohapposekvenssi.

6. Vaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäisen geenin koodaaman polypeptidin aminohapposekvenssi on sama kuin ihmisen tekijä VIII:C:n aminohappojen 1-1405 aminohapposekvenssi.

7. Minkä tahansa vaatimuksista 1 - 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että eukarioottinen transformantti-isäntäsolu on imettäväisen solu.

5 8. Minkä tahansa vaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäinen geeni sisältää ihmisen tekijä VIII:C:n 5' ei-translatoidun DNA-sekvenssin, joka lisää ensimmäisen geenin koodaaman polypeptidin ekspressiota.

10 9. Minkä tahansa vaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäinen geeni sisältää ihmisen tekijä VIII:C:n 3' ei-translatoidun DNA-sekvenssin, joka lisää ensimmäisen geenin koodaaman polypeptidin ekspressiota.

15 10. DNA-koostumus käytettäväksi isäntäsolun transformoinnissa sanotun DNA-koostumuksen käsittäessä ensimmäisen ja toisen plasmidin, **tunnettu** siitä, että ensimmäinen plasmidi käsittää ensimmäisen ekspressiokasetin, joka käsittää ensimmäisen geenin, joka koodaa signaalisekvenssiä ja polypeptidiä, jolla on sama aminohapposekvenssi kuin ihmisen tekijä VIII:C:n A-osalla tai aminohapposekvenssi, joka ei eroa siitä enempää kuin 10 %, ja mahdollisesti sisältää vähemmän kuin
20 täyspitkän ihmisen tekijä VIII:C:n B-osan sekvenssin, mutta ei sisällä C-osan sekvenssiä, isäntäsolussa toimintakykyisten transkription ja translaation säätelysignaalisen alaisena; ja että lisäksi toinen plasmidi käsittää toisen ekspressiokasetin joka sisältää geenin, joka koodaa signaalisekvenssiä
25 ja polypeptidiä, jolla on sama aminohapposekvenssi kuin ihmisen tekijä VIII:C:n C-osalla tai aminohapposekvenssin, joka ei eroa siitä enempää kuin 10 %, eikä sisällä A eikä B-osaa, sanotussa isäntäsolussa toimintakykyisten transkription ja translaation säätelysignaalien alaisena.

30 11. Vaatimuksen 10 mukainen DNA-koostumus, **tunnettu** siitä, että sanottu ensimmäinen kasettigeeni koodaa polypeptidiä, joka käsittää ainakin 90 % ihmisen tekijä VIII:C:n aminohappojen 1-740 aminohapposekvenssistä ja sanottu toinen kasettigeeni koodaa polypeptidiä, joka käsittää ainakin 90 % ihmisen
35 tekijä VIII:C:n aminohappojen 1649-2332 aminohapposekvensseistä.

12. Isäntä-imettäväissolu, **tunnettu** siitä, että se on transformoitu vaatimuksen 10 tai 11 mukaisella DNA-koostumuksella.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av rekombinant-proteinkomplex, vilket har aktiviteten hos human faktor VIII:C, men som helt eller delvis saknar B-domänen hos human faktor VIII:C, **kännetecknad** därav, att i en eukaryotisk transformerad värdcell in trans ko-uttryckes:

(a) en första plasmid vilken innehåller en gen som kodar en signalsekvens och en polypeptid, vilken har samma aminosyresekvens som A-domänen i human faktor VIII:C eller en aminosyresekvens som inte skiljer sig mer än 10 % från denna, och möjligen innehåller mindre än hela längden hos sekvensen i B-domänen hos human faktor VIII:C, men vilken plasmid inte innehåller C-domänen, och

(b) en andra plasmid vilken innehåller en gen som kodar en signalsekvens och en polypeptid, vilken har samma aminosyresekvens som C-domänen i human faktor VIII:C eller en aminosyresekvens som inte skiljer sig mer än 10 % från denna, men vilken plasmid inte innehåller vare sig A- eller B-domänen, och rekombinant-proteinkomplexet utsöndras.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** därav, att aminosyresekvensen hos den polypeptid som kodas av den andra genen är densamma som aminosyresekvensen 1649-2322 hos human faktor VIII:C.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat** därav, att aminosyresekvensen hos den polypeptid som kodas av den första genen är densamma som aminosyresekvensen 1-740 hos human faktor VIII:C.

4. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat** därav, att aminosyresekvensen hos den polypeptid som kodas av den första genen är densamma som aminosyresekvensen 1-1102 hos human faktor VIII:C.

5. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat** därav, att aminosyresekvensen hos den polypeptid som kodas av den första genen är densamma som aminosyresekvensen 1-1315 hos human faktor VIII:C.

6. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat** därav, att aminosyresekvensen hos den polypeptid som kodas av den första genen är densamma som aminosyresekvensen 1-1405 hos human faktor VIII:C.

7. Förfarande enligt något av patentkrav 1-6, **kännetecknat** därav, att den eukaryotiska transformerade värdcellen är en däggdjurscell.

5 8. Förfarande enligt något av patentkrav 1-7, **kännetecknat** därav, att den första genen innehåller en icke-translaterad 5'-DNA-sekvens ur human faktor VIII:C, vilken ökar expressionen av den polypeptid som den första genen kodar.

10 9. Förfarande enligt något av patentkrav 1-7, **kännetecknat** därav, att den första genen innehåller en icke-translaterad 3'-DNA-sekvens ur human faktor VIII:C, vilken ökar expressionen av den polypeptid som den första genen kodar.

15 10. DNA-sammansättning för användning vid transformering av värdcell, varvid sagda DNA-sammansättning omfattar den första och den andra plasmiden, **kännetecknad** därav, att den första plasmiden omfattar den första expressionskassetten, vilken omfattar den första genen som kodar en signalsekvens och en polypeptid vilken har samma aminosyresekvens som A-domänen hos human faktor VIII:C eller en aminosyresekvens som inte skiljer sig mer än 10 % från denna, och möjligen innehåller mindre än hela längden hos sekvensen i B-domänen hos human faktor VIII:C, men vilken inte innehåller sekvensen i C-domänen, underlydande de i värdcellen gällande reglersignalerna för transkription och translation;

20 och att ytterligare den andra plasmiden omfattar den andra expressionskassetten som kodar en signalsekvens och en polypeptid vilken har samma aminosyresekvens som C-domänen hos human faktor VIII:C eller en aminosyresekvens som inte skiljer sig mer än 10 % från denna, samt inte innehåller vare sig A- eller B-domänen, underlydande de i nämnda värdcell gällande reglersignalerna för transkription och translation.

30

35 11. DNA-sammansättning enligt patentkrav 10, **kännetecknad** därav, att nämnda första kassettagen kodar en polypeptid, vilken omfattar minst ca 90 % av aminosyresekvensen hos aminosyrorna 1-740 hos human faktor VIII:C, och att nämnda andra kassettagen kodar en polypeptid, vilken omfattar minst ca 90 % av aminosyresekvensen hos aminosyrorna 1649-2332 hos human faktor VIII:C.

12. Vårdcell av däggdjur, **kännetecknad** därav, att den är transformerad med en DNA-sammansättning enligt patentkrav 10 eller 11.

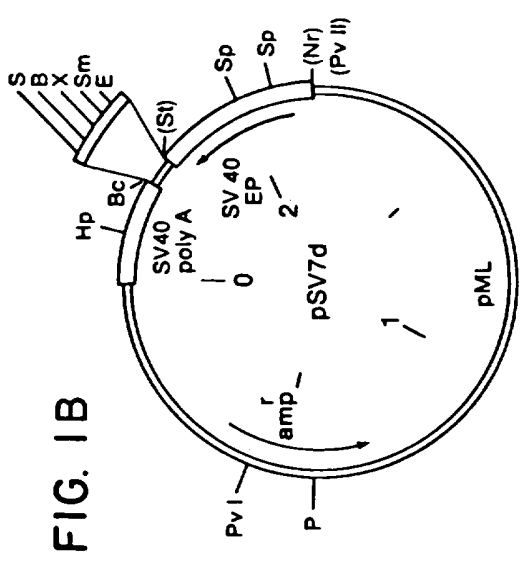


FIG. 1B

FIG. 1C

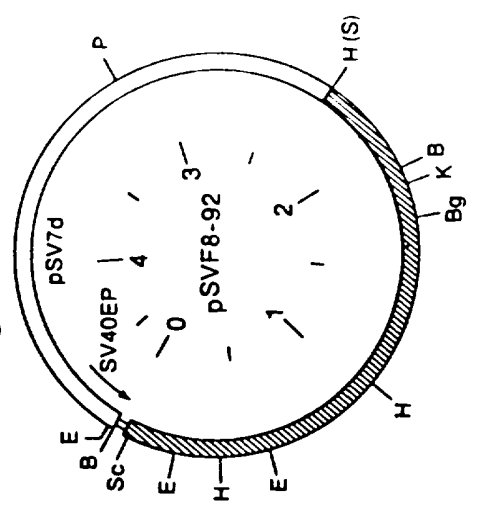


FIG. 1D

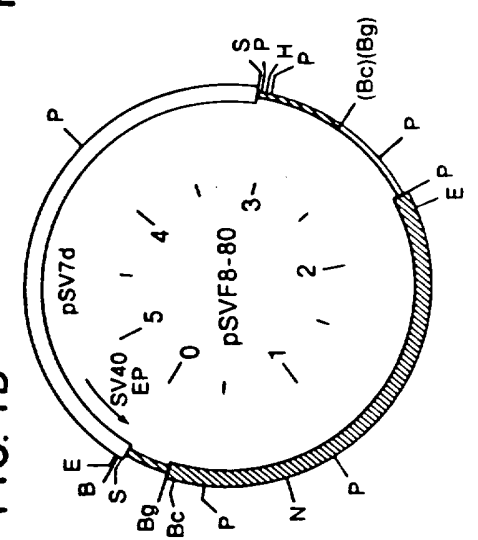


FIG. 1E

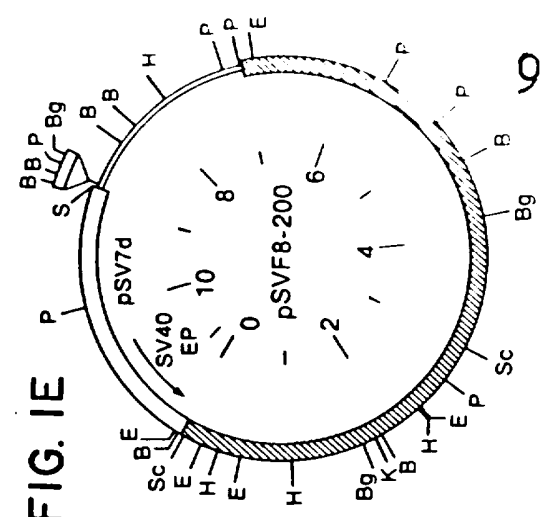


FIG. 1A

