



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 6539/89

(22) Indleveringsdag: 21 dec 1989

(24) Løbedag: 24 jun 1988

(41) Alm. tilgængelig: 21 dec 1989

(44) Fremlagt: 27 maj 1991

(86) International ansøgning nr.: PCT/DK88/00103

(86) International indleveringsdag: 24 jun 1988

(85) Videreførelsesdag: 21 dec 1989

(30) Prioritet: 25 jun 1987 DK 3235/87

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> C 07 K 13/00  
// C 12 N 15/12

(71) Ansøger: \*Novo-Nordisk A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK, \*ZymoGenetics, Inc.; 4225 Roosevelt Way NE; Seattle; Washington 98105, US

(72) Opfinder: Else Marie \*Nicolaisen; DK, Søren Erik \*Bjørn; DK, Finn Christoph \*Wiberg; DK, Richard \*Woodbury; US

(74) Fuldmægtig: Novo-Nordisk A/S ; Novo Alle , 2880 Bagsværd

(54) **Modificeret faktor VII/VIIa, DNA-sekvens, som koder herfor, ekspressionsvektor indeholdende en sådan DNA-sekvens, celle, der er transformeret med en sådan vektor og fremgangsmåde til fremstilling af modificeret faktor VII/VIIa**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

**6539-89**

Der tilvejebringes modificeret faktor VII/VIIa stabiliseret mod proteolytisk spaltning ved visse positioner i molekylet. Stabiliseringen opnås ved erstatning af en eller flere proteolytisk følsomme peptidbindinger i nativt humant faktor VII/VIIa med en proteolytisk mere stabil peptidbinding. Fortrinsvis erstattes visse Arg- og/eller Lys-rester med andre aminosyrer.

Den foreliggende opfindelse angår modificeret faktor VII/VIIa, DNA-sekvenser, der koder for sådanne modificerede faktorer og en fremgangsmåde til fremstilling deraf.

Faktor VIIa er en serinprotease, som medvirker i blodkoagulering ved aktivering af faktor X og/eller faktor IX. Faktor VIIa produceres af sin precursor, faktor VII, som syntetiseres i leveren og udskilles i blodet, hvor det cirkulerer som et enkeltkædet glycoprotein (Mw = 50.000). Faktor VII kan in vitro omdannes til den dobbeltkædede form faktor VIIa ved hjælp af faktor Xa, faktor XIIa, faktor IXa eller thrombin. I nærvær af vævsfaktor og kalciumioner menes faktor VIIa in vivo at omdanne faktor X til faktor Xa ved begrænset proteolyse. Det sidstnævnte enzym omdanner på sin side prothrombin til thrombin i nærvær af faktor Va, kalciumioner og phospholipid. Faktor VIIa vil også omdanne faktor IX til faktor IXa i nærvær af vævsfaktor og kalcium.

Faktor VII kan oprenses fra plasma og aktiveres til faktor VIIa ved hjælp af de af Broze og Majerus, J.Biol.Chem. 255 (4): 1242 - 1247, 1980 og af Hedner og Kisiel, J.Clin. Invest 71: 1836 - 1841, 1983 beskrevne metoder.

Faktor VIIa kan også fremstilles ved rekombinant DNA-teknologi ved dyrkning i et egnet medium af mammale celler, der er transficeret med en DNA-sekvens, der koder for faktor VII, ved isolering af det fremstillede protein og aktivering af proteinet til faktor VIIa (se europæisk patentansøgning nr. 86302855.1).

cDNA, der koder for human faktor VII, er blevet karakteriseret (Hagen et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 83: 2412 - 2416, 1986). Den fra cDNA afledte aminosyresekvens angiver, at faktor VII syntetiseres med en præpro-leader sekvens på 60 eller 38 aminosyrer. Den modne faktor VII, som cirkulerer i plasma består af 406 aminosyrerester. Aminosyresekvensanalyse af det aktiverede protein og den fra cDNA afledte aminosyresekvens antyder, at faktor VII omdannes til faktor VIIa ved spaltning af en enkelt peptidbinding mellem arginin (152) og isoleucin (153). Dette resulterer i dannelsen af et

dobbeltkædet molekyle bestående af en let kæde (152 aminosyrerester) og en tung kæde (254 aminosyrerester), som bindes sammen af en disulfidbinding. Den lette kæde indeholder et  $\gamma$ -carboxyglutaminsyre(Gla)område og to potentielle 5 epidermiske vækstfaktorområder, medens den tunge kæde indeholder serinproteasedelen af molekylet.

Faktor VIIa kan anvendes i behandlingen af patienter, som har udviklet inhibitorer mod faktor VIII (Hedner, U. og Kisiel, W., J.Clin.Invest., 71: 1836 - 1841, 1983) og i 10 behandlingen af patienter, der lider af blødningssygdomme, såsom blodpladelidelser, herunder thrombocytopeni, von Willebrand's syndrom og andre, som typisk forekommer i forbindelse med kraftige vævsskader (europæisk patentansøgning nr. 86309197.1).

15 Ifølge opfindernes iagttagelser er faktor VIIa et protein, der er følsomt for proteolytisk spaltning, hvilket giver anledning til et antal nedbrydningsprodukter uden størkningsaktivitet. Den proteolytiske spaltning kan forekomme på forskellige trin i udvindingsproceduren og også under 20 opbevaring. Nedbrydningsprodukter er blevet iagttaget både for faktor VIIa stammende fra plasma så vel som for faktor VIIa fremstillet ved rekombinant DNA-teknologi. Nedbrydningen kan forekomme inden faktor VII er blevet aktiveret til faktor VIIa, d.v.s. under fremstilling og isolering af faktor VII, under 25 selve aktiveringstrinnet eller under isolering, oprensning og/eller opbevaring af det aktiverede produkt.

Eftersom nedbrydningsprodukterne er inaktive molekyler, vil deres forekomst i faktor VIIa præparatet medføre en lavere specifik aktivitet af slutpræparatet. Endvidere kan 30 mængden og arten af nedbrydningsprodukter variere fra produktion til produktion, hvilket giver anledning til præparater med et variabelt indhold af biologisk aktivt faktor VIIa.

Faktor VIIa præparater indeholdende inaktive 35 nedbrydningsprodukter vil som nævnt have en mindre specifik aktivitet sammenlignet med præparater, i hvilke det hele eller en væsentlig del af proteinmaterialet er aktivt. Derfor er højere og hyppigere doser nødvendige for at opnå og

vedligeholde en terapeutisk eller profylaktisk effekt i sammenligning med et præparat med højere specifik aktivitet.

Variable mængder af inaktive nedbrydningsprodukter og som følge heraf variabelt indhold af biologisk aktiv faktor 5 VIIa vil yderligere gøre beregningen af passende doser arbejdskrævende og vanskelig, om ikke under visse omstændigheder umulig.

Endelig kan et indhold af ikke-fysiologiske nedbrydningsprodukter i slutpræparatet udløse patientens immun- 10 system. Ny indgift kan derpå føre til allergiske reaktioner, som i alvorlige tilfælde kan få dødelig udgang. Patienten kan også udvikle høje antistoftitre mod faktor VIIa, hvilket vil gøre påfølgende behandling vanskelig eller ineffektiv. Som følge heraf vil et faktor VIIa præparat med mindre tendens til 15 proteolytisk nedbrydning in vitro være mere tilfredsstillende og potentielt mere nyttigt i faktor VIIa terapi.

Sandsynligvis fjernes faktor VIIa ligesom andre cirkulerende proteiner fra blodstrømmen ved hjælp af enzymatisk nedbrydning. På det initiale trin af denne regu- 20 lerende proces spaltes det biologisk aktive enzym ved en eller nogle få følsomme peptidbindinger til fremstilling af et inaktivt nedbrudt molekyle. Det er meget sandsynligt, at de peptidbindinger, som er mest følsomme over for enzymatisk hydrolyse in vivo er identiske med de labile peptidbindinger, 25 som hyppigst iagttages hydrolyseret under fremstilling, oprensning og/eller opbevaring af faktor VIIa (George J. Broze, Jr., Scot Hichman og Joseph P. Miletich, J.Clin. Invest. 76 (1985) 937 - 946).

Faktor VII indeholder 17 lysinrester (positionerne 30 18, 32, 38, 62, 85, 109, 137, 143, 148, 157, 161, 197, 199, 316, 337, 341, 389) og 24 argininrester (positionerne 9, 15, 28, 36, 79, 110, 113, 144, 152, 202, 223, 224, 247, 266, 271, 277, 290, 304, 315, 353, 379, 392, 396, 402), som i princip alle er følsomme over for proteolytisk spaltning, men i 35 almindelighed er nogle af disse rester ikke "aktive" som spaltningsteder.

Skønt den nøjagtige halveringstid for cirkulerende faktor VIIa er ukendt, viser foreløbige resultater, at faktor

VIIa prokoaguleringsaktivitet hurtigt fjernes fra blodstrømmen ved intravenøs indgift (Ulla Hedner og Walter Kisiel, J.Clin.Invest. 71 (1983) 1836 - 1841).

Behandlingen og patienternes liv vil blive negativt 5 påvirket af den observerede korte in vivo halveringstid af nativt faktor VIIa. Relativt høje doser og hyppig indgift vil være nødvendig for at opnå og opretholde den ønskede terapeutiske eller profylaktiske virkning. Som en følge heraf vil en adækvat dosisregulering være vanskelig at opnå, og behovet for 10 hyppig intravenøs indgift vil medføre begrænsninger i patientens livsførelse.

Som følge heraf er der inden for den kendte teknik et behov for faktor VIIa præparater, som er stabile under fremstilling, oprensning og opbevaring selv ved høje kon- 15 centrationer, og som yderligere har en længere halveringstid og langsommere udskillelse fra blodet end den naturlige eller rekombinante faktor VIIa. Den foreliggende opfindelse imødekommer dette behov ved at tilvejebringe visse modificerede faktor VII/VIIa.

20 I sit bredeste aspekt tilvejebringer den foreliggende opfindelse en modificeret faktor VII/VIIa, der er stabiliseret over for proteolytisk spaltning i visse positioner i molekylet. Mere specifikt tilvejebringer den foreliggende opfindelse modificeret faktor VII/VIIa, i hvilket en eller flere 25 proteolytisk følsomme peptidbinding(er) i naturligt faktor VII/VIIa er blevet erstattet af en proteolytisk mere stabil peptidbinding.

Ifølge den foreliggende opfindelse opnås dette ved modifikationer i visse positioner i det naturlige humane faktor 30 VII/VIIa molekyle. Sådanne modifikationer kan omfatte fjernelse af visse aminosyrerester eller erstatning af en eller flere aminosyrerester med en anden aminosyrerest. For eksempel kan en trypsinlignende proteolytisk spaltning hæmmes ved stabilisering af peptidbindingen ved den C-terminale ende af visse Arg 35 og/eller Lys rester og/eller ved erstatning af visse Arg og/eller Lys rester med andre aminosyrerester og/eller ved fjernelse af visse Arg og/eller Lys rester.

Eksempler på trypsin-lignende spaltningssteder i det humane faktor VII molekyle, hvor spaltninger er blevet iagttaget omfatter

- (i) lysin(38)-leucin(39),
- 5 (ii) lysin(32)-aspartat(33),
- (iii) lysin(143)-arginin(144),
- (iv) arginin(290)-glycin(291),
- (v) arginin(315)-lysin(316),
- (vi) lysin(316)-valin(317),
- 10 (vii) lysin(341)-glycin(342),
- (viii) arginin(392)-serin(393),
- (ix) arginin(396)-prolin(397) og
- (x) arginin(402)-alanin(403).

Mindre chymotrypsinlignende spaltninger er også blevet  
15 iagttaget efter

- (xi) isoleucin(42) og
- (xii) tyrosin(44).

Blandt disse spaltningssteder har det vist sig, at (i), (ii), (iv) og (v) er mest følsomme over for proteolytisk  
20 nedbrydning, medens de resterende er af mindre kvantitativ betydning.

Når man betragter stabiliseringen af faktor VII/VIIa, er det et vigtigt aspekt, at det resulterende modificerede faktor VII bibeholder sin aktivitet. Dette opnås ifølge  
25 den foreliggende opfindelse ved at sammenligne sekvensen for naturligt faktor VII/VIIa i området, der skal modificeres, med tilsvarende sekvenser i beslægtede proteiner, såsom faktor IX, faktor X, faktor II og protein C. Homologe sekvenser omkring de vigtige spaltningssteder er vist nedenfor:

		32	38	
	Faktor II	EEAFEALESSTATDVF	WAKY	
	Faktor VII	EEAREIFKDAERTK	LFWISY	
5	Faktor X	EEAREVFEEDSDKT	NEFWNKY	
	Faktor IX	EEAREVFENTERTT	FEWKQY	
	Faktor C	EEAKEIFQNVDDTL	AFWSKH	
				290
10	Faktor II	RVTGWGNLKETWTAN	VGKQPSV-L	
	Faktor VII	LVSGWGQL-----	LDRGATALEL	
	Faktor X	IVSGFGRT-----	HEKGRQSTRL	
	Faktor IX	YVSGWGRV-----	FHKGRSALVL	
	Protein C	LVTGWGYH-----	SSREKEAKRN	
15		315		341
	Faktor II	C-KDSTRI----	RITDNMFCAGYKP	DCEGDSGGPF
	Faktor VII	CLQQSRKVGDSPN	ITEYMFAGYS--	DGSK-DSCKGDSGGPH
	Faktor X	C-----KLSSSFI	ITQNMFCAGYD--	TKQE-DACQGDSGGPH
20	Faktor IX	CLR-STKFT----	IYNNMFCAGFH--	EGGR-DSCQGDSGGPH
	Protein C	CSEVMSNM-----	VSENMLCAGIL--	DGRQ-DACEGDSGGPM

Det er derfor den foreliggende opfindelses formål at tilvejebringe modificeret faktor VII/VIIa, hvori en, flere eller alle lysin-, arginin-, isoleucin- og tyrosinresterne:

- 25 (i) lysin(38)
- (ii) lysin(32)
- (iii) lysin(143)
- (iv) arginin(290)
- (v) arginin(315)
- 30 (vi) lysin(316)
- (vii) lysin(341)
- (viii) arginin(392)
- (ix) arginin(396)
- (x) arginin(402)
- 35 (xi) isoleucin(42) og
- (xii) tyrosin(44)

er blevet stabiliseret ved substitution eller deletion.

I en foretrukket udførelsesform for den foreliggende opfindelse er en, flere eller alle aminosyrerester i positionerne (32), (38), (290) og (315) blevet stabiliseret ved substitution eller deletion.

5 Ifølge den foreliggende opfindelse kan Lys i position 32 (ii) og/eller 38 (i) erstattes med en anden aminosyrerest. Lys(38) kan fortrinsvis erstattes af Thr, Asp, Leu, Gly, Ala, Ser, Asn eller His og Lys(32) kan fortrinsvis erstattes af Gln, Glu, His, Gly, Thr, Ala eller Ser.

10 Også Arg i position 290 (iv) kan erstattes med en anden aminosyrerest, for eksempel Gly, Ala, Ser, Thr eller Lys, fortrinsvis Ser, Ala eller Gly.

Arg(315) (v) kan fortrinsvis erstattes med Gly, Thr, Ala, Ser eller Gln.

15 Endvidere kan Lys(341) (vii) erstattes med Glu, Gln, Gly, Thr, Ala eller Ser, fortrinsvis Glu eller Gln.

Ud over substitution af de ovenfor nævnte Arg henholdsvis Lys rester med andre aminosyrerester kan fjernelse af Arg eller Lys aminosyreresterne også overvejes for at  
20 forhindre proteolytisk spaltning. Endvidere kan en eller flere af aminosyreresterne på enten den N- eller C-terminale side af sådanne Arg eller Lys erstattes af en anden aminosyrerest, der har en stabiliserende virkning på den proteolytisk følsomme peptidbinding. Et eksempel på sådanne modifikationer er  
25 substitution af aminosyreresten forbundet med den C-terminale ende af en Lys eller Arg rest med Pro.

For at undgå proteolytisk spaltning ved position 42 (xi) og 44 (xii), kan Ile(42) og/eller Tyr(44) erstattes med Asn, Ser, Ala eller Gln.

30 Den foreliggende opfindelse tænkes at dække en hvilken som helst kombination af de ovenfor nævnte substitutioner og deletioner.

Andre aspekter af opfindelsen vil blive forklaret i den følgende detaljerede beskrivelse med tegning.

35 Figur 1 viser aminosyresekvensen angivet med enkeltbogstavforkortelser og den foreløbige struktur for faktor VII,

Figur 2 viser konstruktionen af plasmid pFW10-3/6,  
Figur 3 viser konstruktionen af plasmid pFW60-3/6 og  
Figur 4 viser konstruktionen af plasmid pFWx-3/6.

### Definitioner

5 Inden opfindelsen skal beskrives, kan det være en hjælp for forståelsen deraf, at visse udtryk, som anvendes i det følgende, defineres.

Komplementær DNA eller cDNA: Et DNA molekyle eller sekvens, som er blevet syntetiseret enzymatisk fra se-  
10 kvenserne i en mRNA templat eller en klon af et sådant molekyle.

DNA-konstruktion: Et DNA molekyle eller en klon af et sådant molekyle, enten enkelt- eller dobbeltstretet, som kan isoleres i partiel form fra et naturligt forekommende gen,  
15 eller som er blevet modificeret til at indeholde DNA-segmenter, som er kombineret og forbundet på en måde, som ellers ikke ville forekomme i naturen.

Plasmid eller vektor: DNA konstruktion indeholdende genetisk information, som kan sørge for dens replikation, når  
20 den indsættes i en værtscelle. Et plasmid indeholder almindeligvis mindst en gensekvens, der skal udtrykkes i værtscellen, så vel som sekvenser, der koder for funktioner, som letter en sådan genekspression, herunder promotorer og transkriptionsinitieringssteder. Det kan være et lineært eller  
25 lukket cirkulært molekyle. Som det anvendes her, skal udtrykket ekspressionsvektor betegne et plasmid eller en vektor indeholdende en transkriptionspromoter og -terminator, der er funktionelt forbundet med en DNA sekvens, der koder for et protein eller en polypeptid af interesse. Ekspressionsvektorer  
30 kan endvidere indeholde andre elementer herunder selektionsmarkører, transkriptionsforstærkende sekvenser, polyadenyleringssignaler etc., som delvist bliver bestemt af den særlige værtscelle, der er valgt.

Biologisk aktivitet: En funktion eller et sæt af funktioner, der udføres af et molekyle i en biologisk sammenhæng (d.v.s. i en organisme eller et in vitro faksimile). Proteiners biologiske aktiviteter kan opdeles i katalytiske og 5 effektoraktiviteter. Størkningsfaktorers katalytiske aktiviteter involverer ofte aktivering af andre faktorer ved specifik spaltning af precursorer. Effektoraktiviteter omfatter specifik binding af det biologisk aktive molekyle til kalcium eller andre små molekyler, til makromolekyler eller til celler. 10 Effektoraktivitet forøger hyppigt eller er væsentlig for katalytisk aktivitet under fysiologiske betingelser. Katalytiske og effektoraktiviteter kan i nogle tilfælde være tilknyttet det samme domæne i et protein.

For faktor VIIa er biologisk aktivitet kendetegnet 15 ved at være bindeled til blodkoagulering ad den ekstrinsiske bane. Faktor VIIa aktiverer faktor X til faktor Xa, som igen omdanner prothrombin til thrombin og derved igangsætter dannelsen af en fibrinprop.

Det modificerede faktor VIIa ifølge den foreliggende 20 opfindelse har en biologisk aktivitet, som i det væsentlige er den samme som hos nativt faktor VIIa.

Udtrykket "faktor VII/VIIa", som det anvendes i denne ansøgning betegner et produkt, der består af enten den uaktiverede form (faktor VII) eller den aktiverede form (faktor 25 VIIa) eller blandinger deraf. "Modificeret faktor VII/VIIa" skal betegne et biologisk aktivt molekyle afledt fra faktor VII/VIIa ved substitution eller deletion af en eller flere aminosyrerester.

Eftersom modifikationerne ifølge den foreliggende 30 opfindelse udføres på genekspressionsniveau, vil der i det aktiverede produkt (faktor VIIa) også kunne findes modifikationer indført i faktor VII molekylet.

"Faktor VII/VIIa" indenfor den nævnte definition omfatter proteiner, som har aminosyresekvensen for nativt human 35 faktor VII/VIIa. Det omfatter også proteiner med en let modificeret aminosyresekvens for eksempel en modificeret N-terminal ende herunder N-terminale aminosyredeletioner eller

additioner, så længe som disse proteiner i det væsentlige bibeholder faktor VIIa aktivitet.

"Faktor VII" omfatter inden for den nævnte definition også naturlige alleliske varianter, som måtte findes og 5 forekomme fra individ til individ. Også grad og placering af glycosylering eller andre posttranslationsmodifikationer kan variere afhængigt af de valgte værtsceller og egenskaberne hos værtscelleomgivelserne.

Det her anvendte nummereringssystem for amino-10 syresekvensen af faktor VII/VIIa fremgår af figur 1, hvor den N-terminale alanin har nummer 1 og den C-terminale prolin har nummer 406.

Trebogstavs- og enkeltbogstavforkortelserne, der er anvendt for aminosyrerne, er dem, der normalt anvendes inden 15 for dette område, d.v.s.:

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

Tyrosin	Tyr	Y
$\gamma$ -carboxyglutaminsyre	Gla	$\gamma$

Aminosyreændringerne indføres fortrinsvis ved oligonucleotidrettet stedsspecifik mutagenese i faktor VII 5 cDNA. Efter screening af E. coli celler isoleres det muterede faktor VII gen og reklones i en egnet ekspressionsvektor. Ekspressionsvektoren transficerer derpå til en passende værtscelle, som ved dyrkning i et egnet dyrkningsmedium udtrykker og secernerer det modificerede faktor VII, som efter 10 udvinding fra dyrkningsmediet omdannes til den tilsvarende modificerede faktor VIIa ved hjælp af kendt teknik.

Forskellige værtsceller kan anvendes herunder mammale celler, gær og andre svampe og bakterier. Imidlertid foretrækkes mammale celler. En særligt foretrukket mammal 15 cellelinie er BHK cellelinien tk'ts13 (Waechter og Basserga, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79: 1106-1110, 1982). Fremgangsmåder til ekspression af klonede gener i hver af disse værtstyper er kendt teknik, se f.eks. EP offentliggjort patentansøgning nr. 200.421 (ekspression af faktor VII og IX i mammale celler), 20 EP publiceret patentansøgning nr. 191.606 (ekspression af protein C i bakterielle celler) og EP publiceret patentansøgning nr. 167.420 (ekspression af faktor IX i gær).

Til udtrykkelse af modificeret faktor VII ifølge opfindelsen i dyrkede mammale celler indføres ekspressions- 25 vektorer indeholdende klonede modificerede faktor VII sekvenser i cellerne ved passende transfektionsteknik, såsom kalciumphosphatmedieret transfektion (Graham og Van der Eb, Virology 52: 456-467, 1973; som modificeret af Wigler et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77: 3567-3570, 1980). Elektro- 30 poreringstranfektionsteknik kan også anvendes (Neuman et al., EMBO.J. 1: 841-845, 1982). Et DNA-kalciumphosphatprecipitat dannes, og dette precipitat tilsættes cellerne. En del af cellerne optager DNA og beholder det i cellen i adskillige dage. En lille del af cellerne integrerer DNA i værtscellens 35 genom. Disse integranter identificeres ved cotransfektion med et gen, som giver en selekterbar fenotype (en selekterbar markør). En foretrukket selekterbar markør er

musedihydrofolatreduktasegenet (DHFR), som giver cellulær modstandskraft over for lægemidlet methotrexat (MTX). Efter at værtscellerne har optaget DNA, anvendes lægemiddelselektion for at udvælge en cellepopulation, som udtrykker den selekterbare 5 markør på stabil måde.

Modificeret faktor VII fremstillet af de trans-  
ficerede celler kan fjernes fra cellekulturmediet ved adsorp-  
tion til bariumcitrat. Brugt medium blandes med natriumcitrat  
og bariumchlorid og bundfaldet opsamles. Det udfældede  
10 materiale kan derpå analyseres for tilstedeværelsen af den  
passende størkningsfaktor. Yderligere oprensning kan foretages  
ved immunoadsorption. Det foretrækkes, at immunoad-  
sorptionssøjlen omfatter et højspecifikt monoklonalt antistof.  
Alternativt kan oprensning af det bariumcitratudfældede  
15 materiale udføres ved hjælp af mere konventionelle biokemiske  
metoder eller ved high-performance liquid chromatography  
(HPLC).

Omdannelse af enkeltkædet modificeret faktor VII til  
aktivt dobbeltekædet modificeret faktor VIIa kan opnås ved  
20 anvendelse af faktor XIIa, som beskrevet af Hedner and Kisiel  
(J.Clin.Invest. 71: 1836-1841, 1983), eller med andre prote-  
aser med trypsinlignende specificitet (Kisiel og Fujikawa,  
Behring Inst. Mitt. 73: 29-42, 1983). Alternativt kan modifi-  
ceret faktor VII aktiveres ved at føre det gennem en ion-  
25 bytterchromatografisøjle, såsom mono Q<sup>®</sup> (Pharmacia Fine  
Chemicals) eller lignende (Bjoern et al., Research Disclo-  
sures, 269, September 1986, pp. 564-565).

## EKSEMPLER

### Materialer og metoder

30 Restriktionsenzymet var fra Bethesda Research  
Laboratories (BRL), New England Biolabs, og Stratagene og blev  
anvendt i overensstemmelse med producentens anvisninger,  
medmindre andet er angivet. Oligonucleotider blev syntetiseret  
på en automatisk DNA-syntesemaskine under anvendelse af

phosphoramiditkemi på et reguleret poreglasunderlag (S.L. Beaucage og M.H. Caruthers (1981) Tetrahedron Letters **22**, 1859 - 1869). E. coli celler blev transformeret som beskrevet af Maniatis et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, 1982).

En repræsentativ modificeret faktor VII blev fremstillet ved ændring af aminosyre nr. 32 fra Lys → Gln og aminosyre nr. 38 fra Lys → Thr ved oligonucleotidrettet mutagenese.

10 Oligonucleotiderne med disse ændringer har sekvenserne:

I)		BglII		Lys(32)							
cDNA:	...	...	GAG	...	...	AAG	...	...			
			↓			↓					
15 oligonucleotid:	5'	GCC	CGG	GAA	ATC	TTC	CAG	GAC	GCG	GAG	3'
				↑			↑				
nucleotidposition				228			235				
				Glu			Gln				

som er en 27-mer med ændringer ved nucleotidposition 228, som  
20 ødelægger et BglII site uden at ændre aminosyren, og ved position 235, som ændrer aminosyren Lys(32) til Gln.

II)		Lys(38)							
cDNA	...	...	AAG	...	...	...	...	...	
			↓						
25 oligonucleotid:	5'	AGG	ACG	ACG	CTG	TTC	TGG	ATT	3'
				↑					
nucleotidposition				254					
				Thr					

som er en 21-mer med ændringer ved nucleotidposition 254, der  
30 ændrer aminosyren Lys(38) til Thr.

En yderligere repræsentativ modificeret faktor VII blev fremstillet ved ændring af aminosyre nr. 290 fra Arg → Ser og aminosyre nr. 315 fra Arg → Ser ved oligonucleotidrettet mutagenese.

35 Oligonucleotider med disse ændringer har sekvenserne:



1982. Et af disse plasmidpræparater betegnes pFW 10-3/6. Konstruktionen af pFW 10-3/6 er vist i fig. 2.

#### **Tilsætning af 5' phosphatgrupper til oligonucleotider**

Tilsætning af enten mærkede eller umærkede phosphatgrupper til oligonucleotider blev udført som beskrevet (Maniatis et al., som ovenfor).

#### **Oligonucleotidrettet stedsspecifik mutagenese under anvendelse af dobbeltstrenget plasmid DNA**

Den stedsrettede mutagenesereaktion blev udført ved 10 at modificere metoden af Morinaga et al. 1984 (BIO/TECHNOLOGY vol. 2, p. 636). Plasmid pFW10-3/6 indeholdende FVII cDNA blev nedbrudt med BglI, et unikt sted i plasmidet. Denne spaltning frembragte fragment a) vist i fig. 3 og fig. 4 og ødelægger ampicillinresistensen. Fragment a) blev oprenset ved 15 elektroeluering fra agarosegel og behandlet med kalvetarms alkalisk phosphatase (CIAP) som beskrevet i Maniatis et al., som ovenfor.

En anden prøve af pFW 10-3/6 blev nedbrudt med BssHII og SacII dannende fragment b) i fig. 3 med et vindue på 575 bp 20 i FVII cDNA. Fragment b) blev oprenset ved elektroeluering fra agarosegel efter elektroforese.

Fragmenterne a) og b) blev yderligere oprenset ved adskillige phenolekstraktioner, phenol/chloroform (1:1, v/v) og chloroform/isoamylalkohol (24:1, v/v) ekstraktioner, 25 udfældet med 0,3 M Na-acetat og 70% (v/v) ethanol og opløst i TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,6).

Derpå blev 0,1 - 0,15 pmol af både fragment a) og b) blandet med 25 pmol af det phosphorylerede syntetiske oligonucleotid I) i et Eppendorf-rør.

30 Derpå blev 10  $\mu$ l 5Xpolymerase-ligase puffer (0,5 M NaCl, 33 mM Tris HCl pH 7,5, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM 2-ME) tilsat.

Fra slutblandingen blev 15  $\mu$ l prøver udtaget og opbevaret på is til senere anvendelse som markør i gelelektroforese. Restblandingen blev inkuberet i et kogende vandbad 35 i 4 minutter for at denaturere DNA fragmenterne. Efter inkubering blev blandingen gradvist nedkølet. Ved genbasepar-

ring dannedes heteroduplekser og under anvendelse af agarosegelelektroforese påvistes dannelsen af en ny cirkulær DNA med den korrekte mutation ved sammenligning med den før omtalte uopvarmede prøve.

5           Derpå tilsattes 10  $\mu$ l af de fire deoxyribonucleosidtriphosphater (2,5 mM hver), 3  $\mu$ l 20 mM ATP, 1  $\mu$ l Klenow-fragment af DNA polymerase I (5 U/ $\mu$ l) og 1  $\mu$ l T4 DNA ligase (10 U/ $\mu$ l) blev tilsat blandingen (20  $\mu$ l) af heteroduplekser (slutvolumen 40  $\mu$ l). Den resulterende blanding blev inkuberet 10 ved 12°C natten over.

Transformation af E. coli MC 1061 og MC 1000 med inkubationsblandingen resulterede i ampicillinresistente transformanter. Transformanter, der bærer det muterede FVII gen blev selekteret ved kolonihybridisering (Maniatis et al.) 15 med 5'-<sup>32</sup>P-mærket 27-mer og 21-mer syntetiske oligonucleotider.

Efter retransformation blev plasmid DNA oprenset fra udvalgte kolonier, analyseret og sekvensbestemt (efter Maxam-Gilbert metoden og dideoxymetoden) for at verificere den af det 20 syntetiske oligonucleotid forårsagede mutation.

Konstruktionen af plasmid pFW 60-3/6, der indeholder et muteret faktor VII gen, hvori Lys(32) er blevet erstattet med Gln er vist i fig. 3.

pFW 60-3/6 blev nedbrudt med EcoRI og EcoRI-EcoRI 25 faktor VII fragmentet blev ligeret i EcoRI skåret pDX plasmid for at opnå plasmid pFW 78-3/6 indeholdende faktor VII-(Gln(32)) genet i samme orientering som i plasmid FVII(565 + 2463)/pDX. Plasmid pFW 78-3/6 blev derpå transficeret i BHKtk<sup>-</sup>ts13 celler, idet den ovenfor generelle fremgangsmåde fulgtes.

30           Den af cellerne fremstillede modificerede faktor VII udfældes derpå med barium citrat; oprenses ved immuno-adsorption; og aktiveres til modificeret faktor VIIa ved at føre den gennem en ionbytterkromatograferingssøjle som beskrevet af Bjoern et al., supra.

### 35 Aktivitetstest

Ligesom aktiveret naturlig faktor VIIa forkortede den aktiverede modificerede faktor VIIa koaguleringsperioden i et

enkeltrinsstørkningsassay. Den aktiverede modificerede faktor VIIa blev inkuberet ved en koncentration på ca. 0,9 mg/ml i en 10 mM Tris-HCl puffer ved pH 8,5 omfattende 390 mM NaCl og 5 mM EDTA. Nedbrydningen blev fulgt ved SDS-PAGE af reducerede 5 prøver, og da en væsentlig nedbrydning havde fundet sted, blev en portion udtaget og sat til en HPLC søjle. Den præparative kromatografi tjente hovedsageligt til at fjerne Tris fra prøven til aminosyresekvensbestemmelse, da intakt og nedbrudt modificeret faktor VIIa koeluerede fra søjlen. N-terminal 10 aminosyresekvensbestemmelse afslørede, at der ikke var foregået hydrolyse af peptidbindingen mellem glutaminresten nr. 32 og asparaginsyreresten nr. 33. Derimod iagttoges kraftig nedbrydning ved lysinrest nr. 32, når aktiveret nativ faktor VIIa blev udsat for den samme behandling og analyse i en 15 parallel undersøgelse.

#### Eksempel 2

Fremstilling af en modificeret faktor VIIa hvori Lys(38) er erstattet med Thr (faktor VIIa(Thr 38))

Ved at følge fremgangsmåden fra eksempel 1 blot med 20 undtagelse af, at det syntetiske oligonucleotid II) anvendtes i stedet for I), fremkom et udtrykkelsesplasmid indeholdende det muterede faktor VII gen.

Dette plasmid transficeres derpå til BHKtk<sup>ts13</sup> celler og faktor VII(Thr38) udvindes fra cellesupernatanten og 25 aktiveres til faktor VIIa(Thr38) som beskrevet.

#### Eksempel 3

Fremstilling af en modificeret faktor VIIa hvori Lys(32) og Lys(38) er erstattet med henholdsvis Gln og Thr (faktor VIIa (Gln32, Thr38))

30 Ved at følge fremgangsmåden fra eksempel 1 med undtagelse af, at 12,5 pmol af både oligonucleotid I) og II)

anvendes i den stedsrettede mutagenesereaktion, opnåede man et udtrykkelsesplasmid indeholdende det muterede faktor VII gen.

Dette plasmid transficeres derpå til BHKtk<sup>-</sup>ts13 celler, og faktor VII (Gln32, Thr38) udvindes fra cellesupernatanten og 5 aktiveres til faktor VIIa (Gln32, Thr38) som beskrevet.

#### Eksempel 4

Fremstilling af en modificeret faktor VIIa hvori Arg(290) er erstattet med Ser (faktor VIIa(Ser(290)))

Konstruktionen af plasmid pFW A-3/6 indeholdende et 10 muteret faktor VII gen hvori Arg(290) er erstattet med Ser er vist i fig. 4.

Plasmid pFW 10-3/6 anvendtes til fremstilling af fragment a) fra eksempel 1, og en anden prøve af pFW 10-3/6 blev nedbrudt med SacII og DraIII dannende fragment b) i fig. 15 4 med et vindue på 1366 i FVII cDNA.

Fragmenterne b) og a) blev derpå behandlet som beskrevet i eksempel 1 med undtagelse af anvendelsen af oligonucleotid III) i stedet for I).

pFW A-3/6 blev nedbrudt med EcoRI og EcoRI-EcoRI 20 faktor VII fragmentet blev ligeret i EcoRI skåret pDx plasmid til opnåelse af plasmid pFW X-3/6 indeholdende faktor VII(Ser290) genet med samme orientering som i plasmid FVII(565 + 2463)/pDX. Plasmid pFW X-3/6 blev derpå transficeret i BHKtk<sup>-</sup>ts13 celler, idet den ovenfor beskrevne generelle procedure 25 fulgtes.

Den modificerede faktor VII fremstillet af cellerne udfældes derpå med bariumcitrat, oprensnes ved immunoabsorption og aktiveres til modificeret faktor VIIa ved at føre det gennem en ionbytterkromatografisøjle som beskrevet af Bjørn et al., 30 supra.

#### Eksempel 5

Fremstilling af en modificeret faktor VIIa hvori Arg(315) er erstattet med Ser (faktor VIIa(Ser315))

Ved at følge fremgangsmåden i eksempel 4 med undtagelse af, at det syntetiske oligonucleotid IV) anvendtes i stedet for III) fremkom et ekspressionsplasmid indeholdende det muterede faktor VII gen.

- 5 Dette plasmid transficeres derpå til BHKtk<sup>ts</sup>13 celler og faktor VII(Ser315) udvindes fra celledsupernatanten og aktiveres til faktor VIIa(Ser315) som beskrevet.

#### Eksempel 6

Bestemmelse af tre aktive proteolytiske spaltnings-  
10 steder

For at identificere nogle aktive spaltningssteder blev et kraftigt nedbrudt rekombinant faktor VII præparat underkastet N-terminal sekvensanalyse ved automatisk Edman nedbrydning, idet der anvendtes et Applied Biosystems model 15 470 A gasfasesekvensbestemmelsesapparat. Resultaterne er vist i tabel I.

Tabel 1

Cyklus nr.	PTH-a.a. (pmol)	Udbytte (pmol)	PTH-a.a. (pmol)	Udbytte (pmol)	PTH-a.a. (pmol)	Udbytte (pmol)	PTH-a.a. (pmol)	Udbytte (pmol)
1	Leu	593	Ile	756	Gly	706	Lys	425
2	Phe	497	Val*	1183	Ala	232	Val*	1183
3	Trp	341	Gly*	1128	Thr	38	Gly*	1128
4	Ile	458	Gly	780	Ala	166	Asp	413
5	Ser*	213	Lys	936	Leu	262	Ser*	213
6	Tyr	397	Val	885	Glu	154	Pro	386
7	Ser	94	(1/2Cys)	n.d.	Leu	240	Asn**	n.d.
8	Asp	312	Pro	690	Met	136	Ile	416
9	Gly	400	Lys	815	Val	289	Thr	104
10	Asp	278	Gly	647	Leu	225	Glu	354
11	Gln	274	Glu	670	Asn	122	Tyr	389
12	(1/2Cys)	n.d.	(1/2Cys)	n.d.	Val	267	Met	363
13	Ala	379	Pro*	604	Pro*	604	Phe	370
14	Ser	31	Trp	8	Arg	270	(1/2Cys)	n.d.
15	Ser	66	Gln	394			Ala	427

(\*) Den totale mængde aminosyrerester, der forekommer i de to givne sekvenser

20(\*\*) Glycosyleret Asn

n.d. Ikke bestemt

I denne prøve blev fire N-terminaler udledt, Leu-39 (søjle 1), Gly-291 (søjle 3) og Lys-316 (søjle 4) svarende til proteolytisk spaltning og Ile-153 (søjle 2) svarende til aktivering af FVII til FVIIa.

## 5 PATENTKRAV

1. Modificeret faktor VII/VIIa, k e n d e t e g n e t ved, at en, flere eller alle lysin-, arginin-, isoleucin- og tyrosinresterne

- (i) Lys(38)
- 10 (ii) Lys(32)
- (iii) Lys(143)
- (iv) Arg(290)
- (v) Arg(315)
- (vi) Lys(316)
- 15 (vii) Lys(341)
- (viii) Arg(392)
- (ix) Arg(396)
- (x) Arg(402)
- (xi) Ile(42)
- 20 (xii) Tyr(44)

er erstattet og/eller fjernet, idet fortrinsvis en, flere eller alle aminosyreresterne (i), (ii), (iv) og (v) er erstattet eller fjernet.

2. Modificeret faktor VII/VIIa ifølge krav 1, k e n -  
 25 d e t e g n e t ved, at Lys(38) er erstattet med Thr, Asp, Leu, Gly, Ala, Ser, Asn eller His, fortrinsvis Ser, Ala, Gly eller Thr; og/eller at Lys(32) er erstattet med Gln, Glu, His, Gly, Thr, Ala eller Ser, fortrinsvis Gln; og/eller at Arg(290) er erstattet med Gly, Ala, Ser, Thr eller Lys; og/eller at  
 30 Arg(315) er erstattet med Gly, Thr, Ser, Ala eller Gln;

og/eller at Lys(341) er erstattet med Glu, Gln, Thr, Ser, Ala eller Gly, fortrinsvis Glu eller Gln; og/eller at Ile(42) er erstattet med Asn, Ser, Ala eller Gln; og/eller at Tyr(44) er erstattet med Asn, Ser, Ala eller Gln.

5 3.           Modificeret faktor VII/VIIa ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at Lys(38) er erstattet med Thr, og Lys(32) er erstattet med Gln.

4.           DNA-sekvenser, k e n d e t e g n e t ved, at de koder for en modificeret faktor VII/VIIa ifølge et hvilket som 10 helst af kravene 1 til 3.

5.           Ekspressionsvektorer, k e n d e t e g n e t ved, at de indeholder en DNA-sekvens ifølge krav 4.

6.           Celler, k e n d e t e g n e t ved, at de er transformeret til at fremstille modificeret faktor VII/VIIa 15 ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 3.

7.           Fremgangsmåde til fremstilling af modificeret faktor VII/VIIa, k e n d e t e g n e t ved, at et gen, der koder for ekspressionen af faktor VII, muteres i en, flere eller alle de kodoner, der er ansvarlige for udtrykkelsen af lysin-, arginin- 20 , isoleucin- og tyrosinresterne

- (i)     Lys(38)
- (ii)    Lys(32)
- (iii)   Lys(143)
- (iv)    Arg(290)
- 25 (v)     Arg(315)
- (vi)     Lys(316)
- (vii)   Lys(341)
- (viii)  Arg(392)
- (ix)    Arg(396)
- 30 (x)     Arg(402)
- (xi)    Ile(42)
- (xii)   Tyr(44)

i nativt faktor VII, dannende et muteret gen, der er i stand til at udtrykke en modificeret faktor VII, i hvilken en, flere eller alle nævnte aminosyrerester er substitueret eller fjernet, det muterede gen indsættes i en egnet vært, der er i stand til at udtrykke det muterede gen, værten dyrkes i et hensigtsmæssigt dyrkningsmedium, hvorved det modificerede faktor VII/VIIa udtrykkes, som derpå isoleres og eventuelt aktiveres til dannelse af et modificeret faktor VIIa produkt.

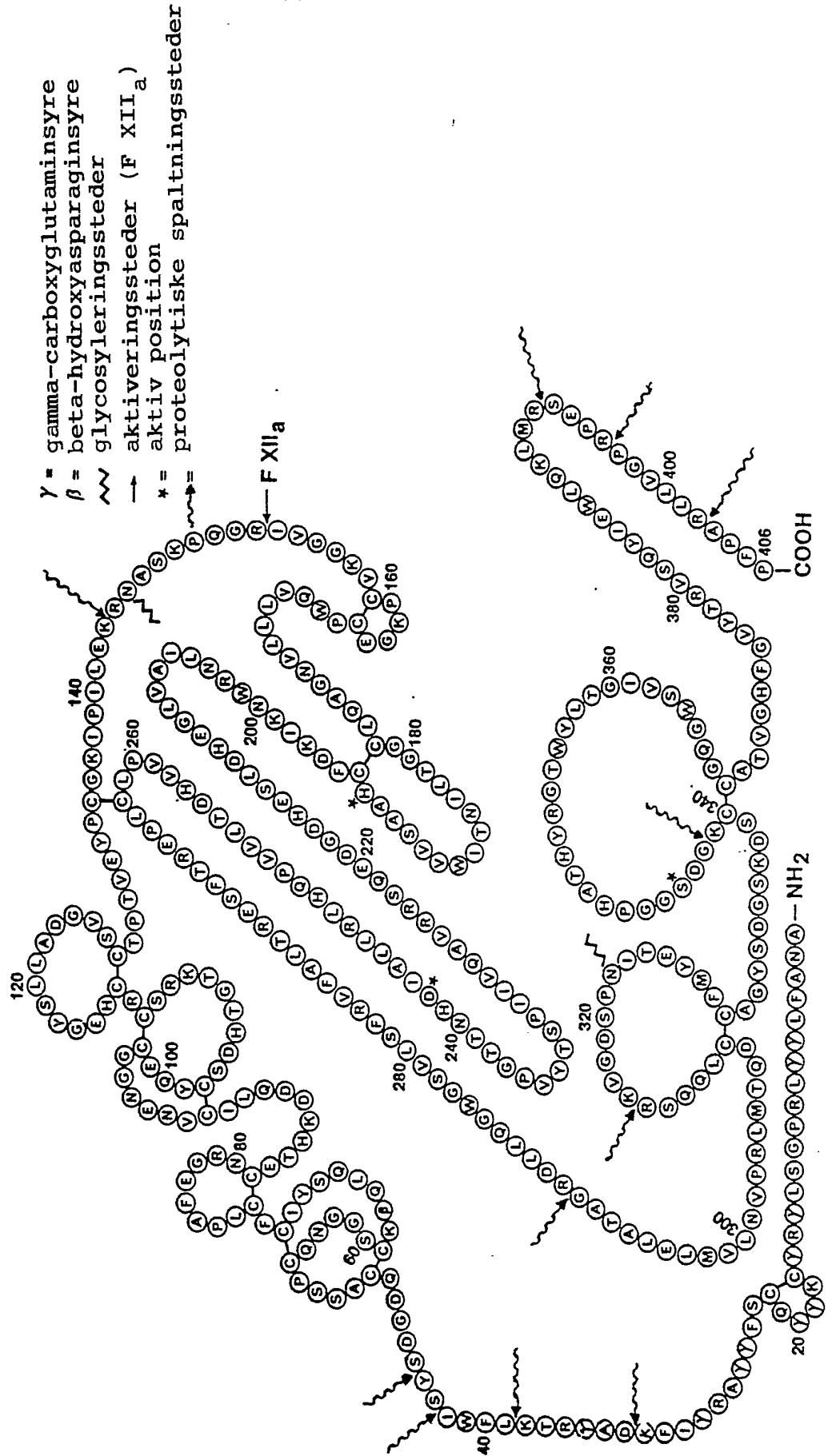


FIG. 1

2/4

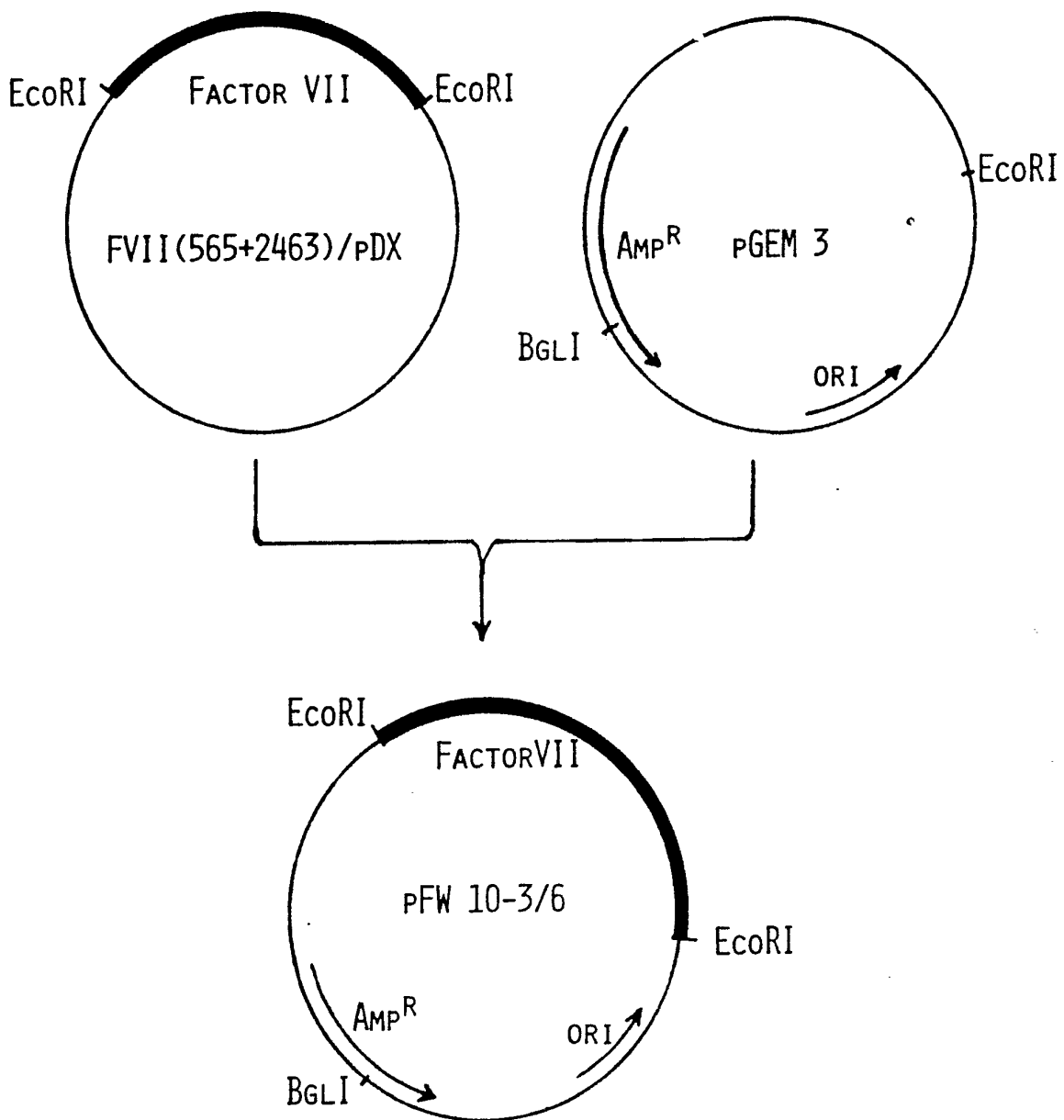


FIG. 2

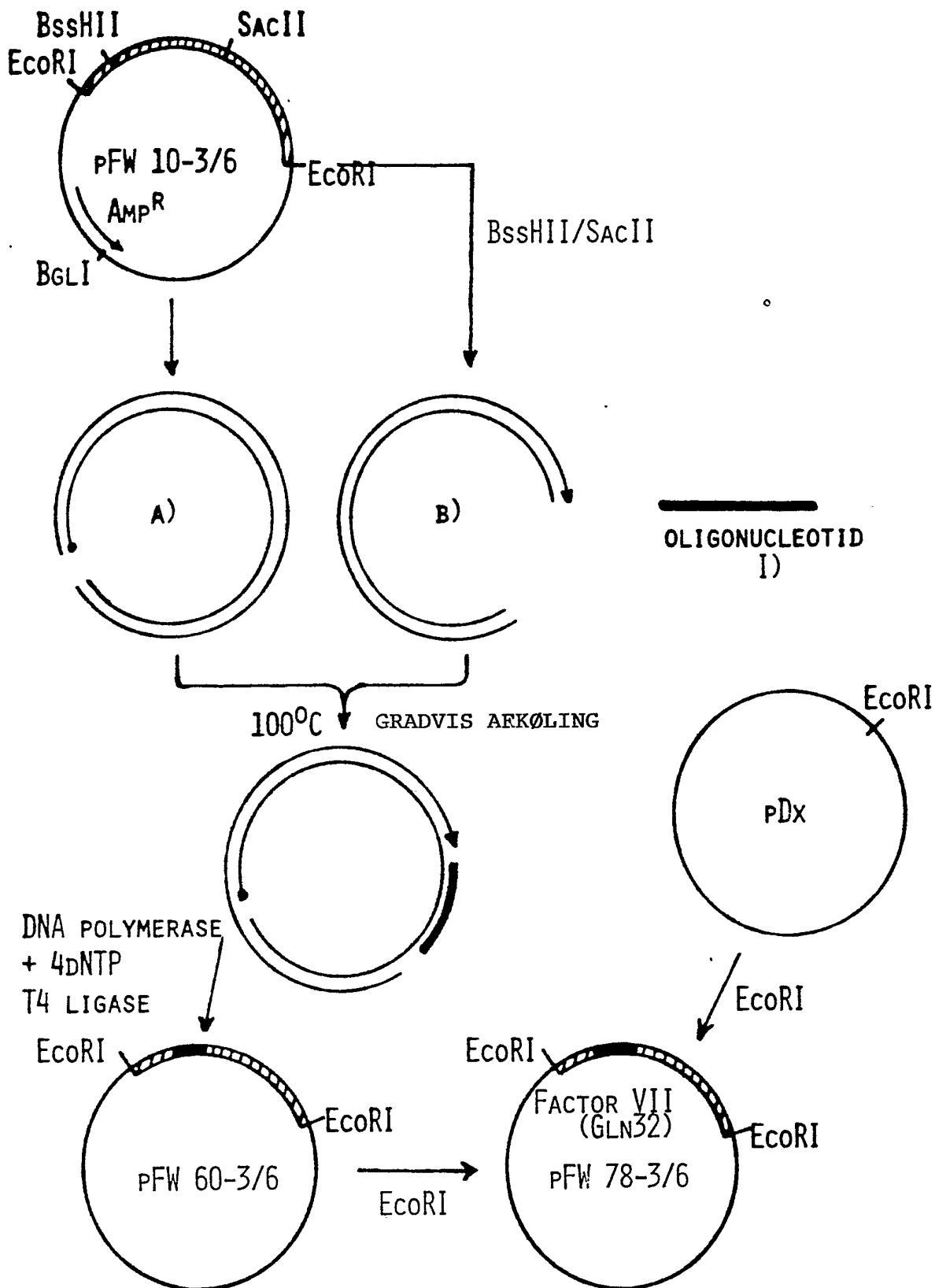


FIG. 3

4/4

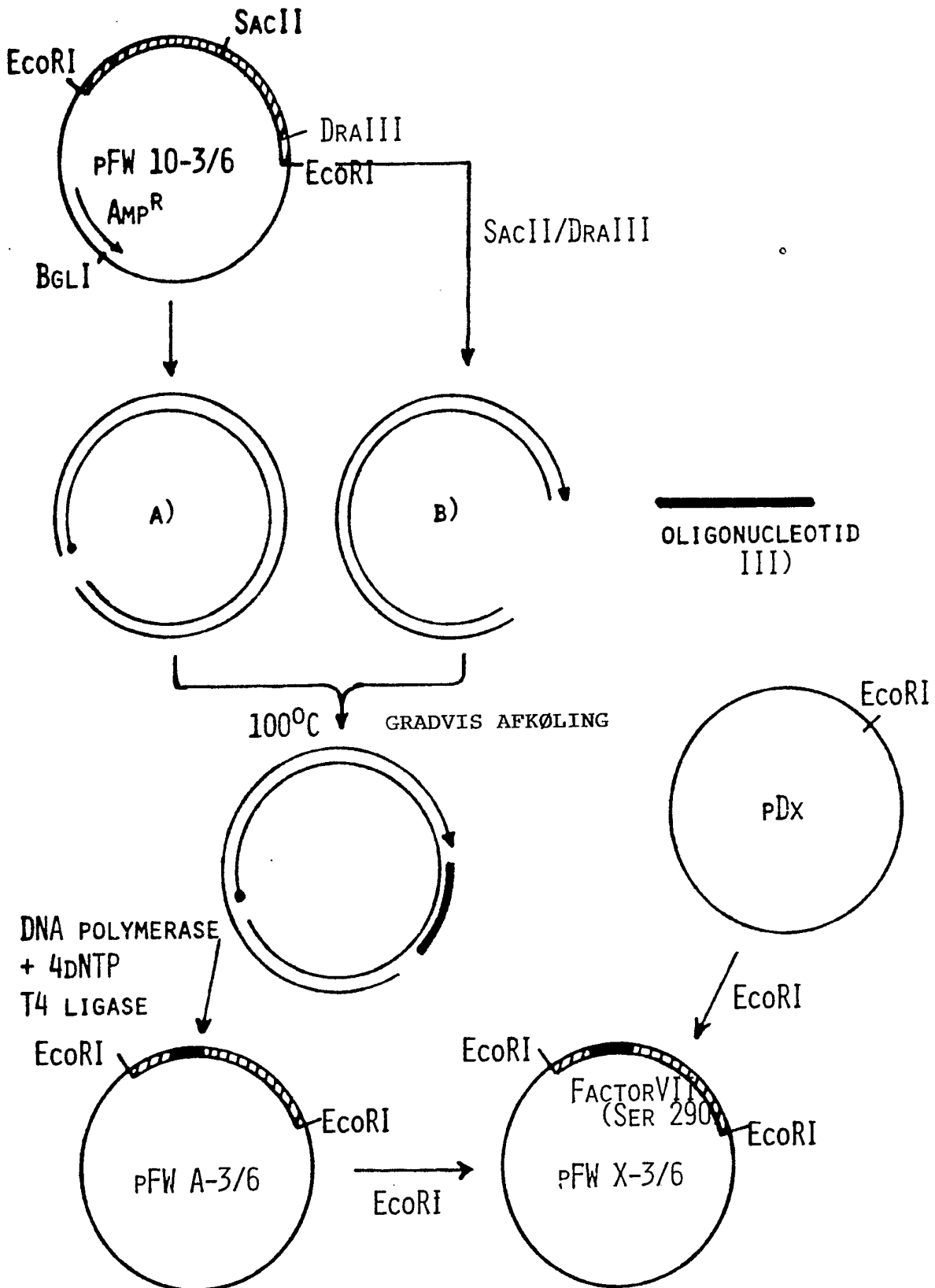


FIG. 4