



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **328022**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/57 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

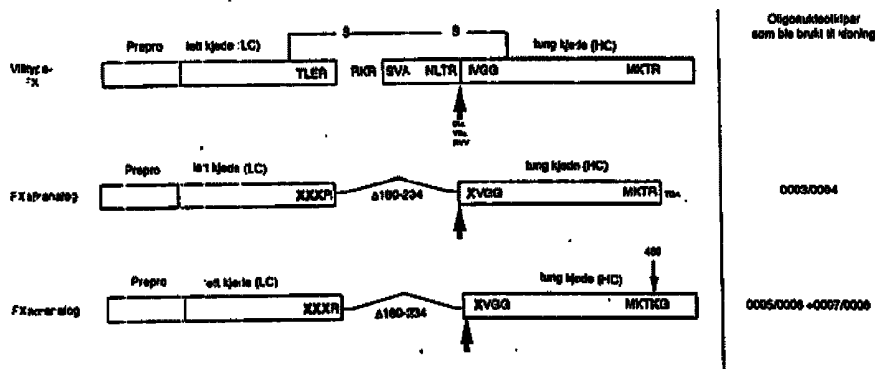
Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19994136	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.02.27 PCT/AT98/00046
(22)	Inng.dag	1999.08.26	(85)	Videreføringsdag	1999.08.26
(24)	Løpedag	1998.02.27	(30)	Prioritet	1997.02.27, AT, 336/97
(41)	Alm.tilgj	1999.10.27			
(45)	Meddelt	2009.11.09			

(73)	Innehaver	Baxter Innovations GmbH, Industristrasse 67, 1221 WIEN, AT
(72)	Oppfinner	Friedrich Dörner, Peterlinigasse 17, 1230 WIEN, AT Johann Eibl, Gustav-Tschermakgasse 2, 1180 WIEN, AT Uwe Schlokat, Hauptstrasse 51, A-2304 Orth/Donau, AT Falko-Günter Falkner, Neusiedlzeile 76 A, A-2304 Orth/Donau, AT Michele Himmelspach, Leopoldsdorf, AT Michael Pfeleiderer, Darmstadt, DE
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO

(54)	Benevnelse	Faktor XΔ-analog, rekombinant DNA som koder for denne, celler inneholdende slikt DNA samt preparat, anvendelse av preparatet og fremgangsmåte for fremstilling av slike preparater inneholdende XΔ-analogene
(56)	Anførte publikasjoner	Wolf et al; The Journal of Biological Chemistry, vol 266, nr 21, 1991, s 13726-13730
(57)	Sammendrag	

Det beskrives faktor XΔ-analoger med en deleksjon av amino-syrene Arg180 til Arg234 og en modifikasjon i området av aminosyresekvensen mellom Gly173 og Arg179, preparater som inneholder disse faktor XΔ-analoger, og fremgangsmåter ved deres fremstilling.



Oppfinnelsen vedrører faktor X Δ -analoger med en delesjon av aminosyrene Arg180 til Arg234 og en modifikasjon i området av aminosyresekvensen fra Gly173 til Arg179 som angitt i krav 1, preparater inneholdende faktor X Δ -analogene eller
5 faktor Xa-analoger ifølge oppfinnelsen som angitt i krav 10, samt fremgangsmåter ved fremstilling av preparater inneholdende faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen, som angitt i krav 38.

Etter initiering av blodlevringsprosessen forløper leveringskaskaden ved en sekvensiell aktivering av forskjellige proenzymer (zymogener) i blodet til sine aktive former, nemlig serinproteasene. Til disse hører bl.a. faktor XII/XIIa, faktor XI/XIa, faktor IX/IXa, faktor X/Xa, faktor VII/VIIa og protrombin/trombin. De fleste av disse enzymer
15 er i fysiologiske tilstander kun aktive hvis de er forbundet i et kompleks på en membranoverflate. Ca-ioner er nødvendige i mange av disse prosesser. Blodlevringen følger enten den intrinsiske vei, hvor alle proteinkomponenter foreligger i blodet, eller den ekstrinsiske vei, hvor vevsfaktor spiller en kritisk rolle. En sårleging finner til slutt sted ved spaltning av fibrinogen til fibrin ved hjelp av trombin.

Protrombinasekompleks er ansvarlig for aktiveringen av protrombin til trombin. Trombin er et viktig enzym, som kan virke både som prokoagulasjonsmiddel og som antikoagulasjonsmiddel. Protrombinasekompleks, i hvilket bl.a. faktor Va (som kofaktor) og faktor Xa (som serinprotease) er omfattet, samles i en Ca-avhengig assosiasjon på overflaten av fosfolipider. Det diskuteres om faktor Xa kan være den
25 katalytiske komponent av protrombinasekomplekset i denne sammenheng.

Faktor X (Stuart/Prower-faktor) er et vitamin K-avhengig koagulasjonsglykoprotein, som kan aktiveres ved den intrinsiske og den ekstrinsiske blodlevringskaskade. Det primære

translasjonsprodukt av faktor X (pre-pro-FX) har 488 aminosyrer og syntetiseres av leveren eller humane hepatomaceller til å begynne med som enkeltkjedet 75 kDa stort forløperprotein. I plasma foreligger faktor X til stor del som tokjedet molekyl (Fair et al., 1984, Blood 64: 194-204).

Under biosyntesen spaltes etter avspaltning av presekvensen ved hjelp av et signalpeptidase (mellom Ser23/Leu24) og av propeptidet (mellom Arg40/Ala41), det enkeltkjedede faktor X-molekyl til den tokjededede form, som består av den ca. 22 kDa store lette kjede og den ca. 50 kDa store tunge kjede som er forbundet med hverandre via en disulfidbro, ved prosessering og fjerning av tripeptidet Arg180-Lys181-Arg182 (figur 1). Faktor X sirkulerer dermed i plasma i form av et tokjedet molekyl.

Under blodleivringsprosessen konverteres faktor X fra et inaktivt zymogen til det aktive protease faktor Xa ved en begrenset proteolyse, hvorved aktiveringen av faktor X til faktor Xa kan finne sted i ett av to membranbundne kompleks: den ekstrinsiske faktor VIIa/vevfaktor-kompleks, eller det intrinsiske faktor VIIa/faktor IXa/fosfolipid-Ca-kompleks, eller "tenase-kompleks" (Mertens et al., 1980, Biochem. J. 185: 647-658). En proteolytisk spaltning mellom aminosyrene Arg234/Ile235 fører til en frigivning av et 52 aminosyrer langt aktiveringspeptid fra N-terminus av den tunge kjede, og dermed til dannelsen av det aktive enzym, nemlig faktor Xa. Det katalytiske sentrum av faktor Xa befinner seg på den tunge kjede.

Aktiveringen via faktor VIIa/Tf(ekstrinsisk)-kompleks fører til dannelse av faktor Xa α (35 kDa) og faktor Xa β (31 kDa), hvorved det ved lave konsentrasjoner av faktor VIIa i komplekset også opptrer et polypeptid med 42 kDa lengde. Dannelsen av faktor Xa α finner sted ved spaltning ved Arg234/Ile235 av den tunge kjede, og representerer aktiveringen av faktor X til faktor Xa. Opptreden av faktor Xa β

stammer antakelig fra en autokatalytisk spaltning ved Arg469/Gly470 i C-terminus av den tunge kjede av faktor X α og en avspaltning av et 4,5 kDa langt peptid. Faktor X β har, liksom også faktor X α , katalytisk aktivitet. Det er imidlertid blitt vist at det ved spaltning av faktor X α til faktor X β opptrer en plasminogenreceptorbindingsposisjon, og at faktor X β eventuelt har fibrinolytisk aktivitet eller omfattes i fibrinolysen i form av en kofaktor. Omdannelsen av faktor X α til faktor X β er imidlertid langsommere enn dannelsen av trombin, hvorved en initiering av fibrinolysen før dannelsen av et blodaggregat, forhindres (Prydzial et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 16614-16620; Prydzial et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 16621-16626).

Det 42 kDa store polypeptid dannes ved en prosessering i C-terminus av den tunge kjede mellom Arg469/Gly470 uten en tidligere prosessering mellom Arg234/Ile235. Dette mellomprodukt har, slik som også et faktor X γ -fragment som dannes ved proteolyse ved Lys370, ingen katalytisk aktivitet (Mertens et al., 1980, Biochem. J. 185: 647-658; Prydzial et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 16614-16620).

En aktivering av faktor X i den intrinsiske bane katalyseres av faktor IXa/faktor VIIIa-kompleks. Under aktiveringen erholdes de samme prosesseringsprodukter, men faktor X β -produktet erholdes imidlertid i et høyere utbytte enn andre faktor X-prosesseringsprodukter (Jesty et al., 1974, J. Biol. Chem. 249: 5614).

In vitro kan faktor X aktiveres f.eks. med "Russell's Viper Venom" (RVV) eller trypsin (Bajaj et al., 1973, J. Biol. Chem. 248: 7729-7741) eller rensede fysiologiske aktivatorer så som FVIIa/TF-kompleks eller faktor IXa/faktor VIIIa-kompleks (Mertens et al., 1980, Biochem. J. 185: 647-658).

Handelstilgjengelige faktor X-produkter fra plasma inneholder som regel en blanding av faktor X α og faktor X β , fordi det etter aktivering av faktor X til faktor Xa i første rekke dannes faktor X α , som i sin tur spaltes til

5 faktor X β i en autokatalytisk prosess.

For å fremstille et enhetlig faktor Xa-produkt med høy molekylær integritet ble det i EP 0.651.054 foreslått å aktivere faktor X med RVV over et lengre tidsrom, slik at det dannede sluttprodukt hovedsaklig inneholdt faktor X β . Både

10 biproduktene, f.eks. faktor X α , og proteasen ble deretter fjernet ved flere kromatografiske trinn.

cDNA for faktor X er blitt isolert og kjennetegnet (Leytus et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3699-3702; Fung et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3591-

15 3595). Human faktor X ble uttrykt *in vitro* i forskjellige celletyper, så som humane embryonale nyreceller eller CHO-celler (Rudolph et al., 1997, Prot. Expr. Purif. 10: 373-378, Wolf et al., 1991, J. Biol. Chem. 266: 13726-13730). Man har imidlertid slått fast at prosesseringen i posisjon

20 Arg40/Ala41 under en rekombinant ekspresjon av human faktor X er ineffektiv i motsetning til *in vivo*-situasjonen, og at det dannes forskjellige N-termini i den lette kjede av faktor X (Wolf et al., 1991, J. Biol. Chem. 266: 13726-13730). Rekombinant faktor X (rFX) ble ved hjelp av RVV aktivert *in*

25 *vitro* til rFaktor Xa (rFXa), eller rFXa ble direkte uttrykt, hvorved aktiveringspeptidet fra aminosyre 183 til aminosyre 234 ble deletert og erstattet med et tripeptid for å muliggjøre en umiddelbar prosessering til en tokjedet rFXa-form. Renset rFX ble til ca. 70% prosessert til den

30 lette og den tunge kjede, mens de øvrige 30% var enkeltkjedet rFX med 75 kDa. En direkte ekspresjon av rFXa førte riktignok til dannelsen av aktiv faktor Xa, men imidlertid også til inaktive mellomprodukter. Wolf et al. (1991, J. Biol. Chem. 266: 13726-13730) fant også at rekombinant fak-

35 tor X hadde en nedsatt aktivitet, som de mente skyldtes en

dårlig aktiverbarhet av rFX ved hjelp av RVV, samt den inaktive populasjon av proteiner og polypeptider i det enkeltkjedede forløpermolekyl. Spesielt fant de en høy instabilitet av rFXa ved ekspresjon ved hjelp av rekombinante
 5 celler, som de mente skyldtes en høy autoproteolyserate.

For å undersøke funksjonen av det C-terminale peptid av faktor Xa α , innførte Eby et al. (1992, Blood 80 (suppl. 1): 1214 A) et stopkodon i posisjon Gly430 av faktor X-sekvensen. De fant imidlertid ingen forskjell mellom aktive-
 10 ringsraten av faktor Xa (FXa α) med β -peptid og en delesjonsmutant uten β -peptid (FXa β).

Faktor Xa er en viktig bestanddel av protrombinasekomplekset som man derfor tror at kan være en primær mediator av en rask stansing av blødninger, hvilket ville gjøre den egnet for behandling av pasienter med forstyrret blodlevering,
 15 f.eks. hemofili.

Spesielt behandlingen av hemofilipasienter med faktor VIII- eller faktor IX-mangel med faktorkonsentrater fremstilt av plasma, blir ved lengre terapivarighet ofte komplisert ved
 20 at det dannes inhibitoriske antistoffer mot disse faktorer. Det er derfor blitt utviklet en rekke alternativer for å behandle hemofilipasienter med faktorer med en bypass-aktivitet. Således er en anvendelse av protrombinkomplekskonsentrat, partielt aktivert protrombinasekompleks (APPC),
 25 faktor VIIa eller FEIBA blitt foreslått. Handelstilgjengelige preparater med faktor VIII-bypassaktivitet (FEIBA) er f.eks. "FEIBA" eller "Autoplex". "FEIBA" inneholder f.eks. omtrent like mengder av faktor II, faktor VII, faktor IX, faktor X og FEIBA, mindre mengder av faktor VIII og faktor
 30 V, samt spor av aktiverte koagulasjonsfaktorer så som trombin og faktor Xa eller en faktor med faktor X-lignende aktivitet (Elsinger, 1982, *Activated Prothrombin Complex Concentrates*, utg. Mariani, Russo, Mandelli, s. 77-87). El-singer viser spesielt til betydningen av en "faktor Xa-lig-

nende" aktivitet i FEIBA. Faktor VIII-bypass-aktiviteten ble demonstrert av Giles et al. (1988, British J. Haematology 9: 491-497) for en kombinasjon av renset faktor Xa og fosfolipider i en dyremodell.

- 5 Det finnes derfor et stort behov og en rekke forskjellige anvendelsesområder for faktor X/Xa eller faktor X/Xa-lignende proteiner, enten for seg selv eller som bestanddel av et koagulasjonskompleks i blodlevringsterapien.

Halveringstiden av faktor Xa er, sammenlignet med zymogenet, sterkt nedsatt både *in vivo* og *in vitro*. Slik kan
10 f.eks. faktor X oppbevares stabilt i glycerin i 18 måneder, mens faktor Xa under like betingelser kun er stabil i 5 måneder (Bajaj et al., 1973, J. Biol. Chem. 248: 7729-2241), hhv. i glycerin ved 4°C etter 8 måneder oppviser en med
15 over 60% nedsatt aktivitet (Teng et al., 1981, Thrombosis Res. 22: 213-220). Halveringstiden av faktor Xa er kun 30 sekunder i serum.

På grunn av instabiliteten av faktor Xa er det blitt foreslått å administrere faktor X-preparater (US 4.501.731).
20 Ved livstruende blødninger, spesielt hos hemofilipasienter, er imidlertid en administrasjon av faktor X virkningsløs, fordi mangelen på funksjonelt "tenasekompleks" i den intrinsiske blodlevringsbane gjør at det ikke kan finne sted noen tilstrekkelig aktivering av faktor X til faktor Xa, og
25 aktiveringen via den ekstrinsiske bane finner ofte sted for langsomt for å oppnå en rask virkning. I tillegg har hemofilipasienter tilstrekkelig faktor X, som imidlertid har en 1000 ganger svakere protrombinaseaktivitet enn faktor Xa. I slike tilfeller er det nødvendig å administrere aktivert
30 faktor Xa direkte, eventuelt sammen med fosfolipider slik det beskrives av Giles et al. (1988, British J. Haematology 9: 491-497), eller med andre koagulasjonsfaktorer, f.eks. med faktor VIII-bypass-aktivitet.

Ved fremstilling av faktor Xa fra faktor X har aktiveringen hittil funnet sted via ikke-fysiologiske aktivatorer av animalsk opphav, så som RVV eller trypsin, hvorved det imidlertid måtte sikres absolutt at sluttproduktet var
5 fullstendig fritt for disse proteaser. Slik det allerede ble nevnt ovenfor, dannes ved aktivering av faktor X til faktor Xa et flertall delvis også inaktive mellomprodukter (Bajaj et al., 1973, J. Bio. Chem. 248: 7729-7741, Mertens et al., 1980, Biochem. J. 185: 647-658). Nærværet av slike
10 mellomprodukter fører til en nedsettelse av den spesifikke aktivitet av produktet, og eventuelt også til mellomprodukter som kan virke som antagonister av det aktive serinprotease. For fremstilling av et enhetlig, rent produkt med en høy spesifikk aktivitet er det ved konvensjonelle metoder
15 derfor nødvendig med kompliserte fremgangsmåter for aktivering og for kromatografisk rensing.

Oppgaven for foreliggende oppfinnelse er derfor å tilveiebringe et preparat som inneholder et polypeptid med faktor X/Xa-aktivitet, som har høy stabilitet og som kan aktiveres
20 til faktor Xa uten bruk av et av de vanlige proteaser, spesielt av animalsk opphav, så som f.eks. RVV eller trypsin. Et ytterligere formål er å tilveiebringe et farmasøytisk preparat med faktor VIII-bypass-aktivitet.

Oppgaven løses ifølge oppfinnelsen ved at det tilveiebringes en faktor X Δ -analog som oppviser en delesjon av aminosyrene Arg180 til Arg234 av faktor X Δ -aminosyresekvensen samt en modifikasjon av deres faktor X Δ -delesjonsmutanter i området av aminosyresekvensen mellom Gly173 og Arg179 idet modifikasjonen tilsvarer en prosesseringsposisjon for en
25 protease som i naturen ikke spalter faktor X-sekvensen i denne posisjon. Ved delesjon av aminosyresekvensen fra Arg180 til Arg234 deleteres både tripeptidet Arg180 til Arg182 og også aktiveringspeptidet Ser183 til Arg234, og det dannes en direkte fusjon mellom den lette og den tunge
30 kjede av faktor X og aminosyrene Arg179 og Ile 235. Denne

fusjonssekvens inneholder imidlertid ingen naturlig fore-
 kommende spaltningsposisjon for en protease. Ved modifika-
 sjon av området av faktor X-sekvensen mellom aminosyre
 Gly173 og Arg179, og eventuelt av Ile235, erholdes en fak-
 5 tor X-delesjonsmutant ifølge oppfinnelsen som oppviser en
 ny gjenkjennings- hhv. prosesseringsposisjon som i polypep-
 tidet ikke finnes i denne posisjon, for en protease som
 normalt ikke ville ha spaltet polypeptidet på dette sted.
 Modifikasjonen er herved minst en erstatning av minst én
 10 aminosyre mellom posisjon Gly173 og Arg179 og eventuelt av
 Ile235 av faktor X-aminosyresekvensen. Posisjonen av amino-
 syrene er her i henhold til nummereringen av sekvensen som
 vises på figur 1, startende med Met1 og avsluttende med
 Lys488. For den modifiserte faktor X-delesjonsmutant ifølge
 15 oppfinnelsen beholdes for en enklere nomenklatur aminosyre-
 nummereringen som er angitt for den fullstendige faktor X-
 sekvens; imidlertid benevnes den modifiserte faktor X-dele-
 sjonsmutant i det følgende faktor X Δ -analog.

Modifikasjonen kan her være en substitusjon av minst én
 20 aminosyre eller en innføyelse av en peptidsekvens som ut-
 gjør en proteasegjenkjennings- hhv. spaltningsposisjon. Mo-
 difikasjonen i faktor X Δ -analogen ifølge oppfinnelsen er
 fortrinnsvis slik at den for en protease fra gruppen endo-
 proteaser, så som f.eks. kexin/Kex2, furin/PACE, PC1/PC3,
 25 PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7 (slik som beskrevet i Barr et
 al., 1991, Cell, 66: 1-3 eller i US 5.460.950), serinprote-
 aser, så som f.eks. faktor IIa, faktor VIIa, faktor IXa,
 faktor XIIa, faktor XIa, faktor Xa, eller kallikrein, eller
 et derivat av disse proteaser, utgjør en gjenkjennings-
 30 hhv. spaltningssekvens.

Modifikasjonen velges fortrinnsvis slik at prosesseringen
 ved hjelp av en av disse proteaser fører til et polypeptid
 som i sin biologiske aktivitet tilsvarer nativ faktor Xa og
 som har faktor Xa-aktivitet. For å oppnå en optimal proses-
 35 sering kan det i enkelte tilfeller være nødvendig å i til-

legg skifte ut aminosyren Ile235. Fortrinnsvis bør imidlertid den NH₂-terminale aminosyre isoleucin av den tunge kjede bevares etter aktiveringen, fordi isoleucin utgjør en av aminosyrene som har en vesentlig funksjon ved dannelse
 5 av substratbindingslommen (Watzke et al., 1995, Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis, utg. Katherine High & Harold Roberts). Faktor XΔ-analogene ifølge oppfinnelsen har en strukturell forskjell, spesielt på aminosyrenivå sammenlignet med den native faktor X-sekvens, men har imid-
 10 lertid etter aktivering en lignende aktivitet som naturlig forekommende faktor X hhv. faktor Xa.

Oppfinnelsen tilveiebringer en rekke faktor XΔ-analoger i form av eksempler, som oppviser en delesjon og i tillegg en modifikasjon mellom Gly173 og Arg179 og eventuelt av
 15 Ile235. Modifikasjoner kan foreligge i én eller flere posisjoner i området mellom aminosyre Gly173 og Arg179, og eventuelt Ile235, under henvisning til faktor X-sekvensen med nummereringen fra Met1 til Lys488 ifølge figur 1. Aminosyresubstitusjoner kan være i posisjon Ile235 (R1),
 20 Arg179, Glu178 (R2), Leu177 (R3), Thr176 (R4), Gln175 (R5) og Lys174 (R6), hvor Arg179 imidlertid fortrinnsvis holdes uforandret.

Faktor XΔ-analogene ifølge oppfinnelsen inneholder fortrinnsvis en faktor X-sekvens med Gly173-R6-R5-R4-R3-R2-
 25 Arg179-R1 med R1 = Ile, Val, Ala, Ser eller Thr, R2 = Glu, Thr, Pro, Gly, Lys eller Arg; R3 = Leu, Phe, Lys, Met, Gln, Ser, Val, Arg eller Pro; R4 = Thr, Asn, Asp, Ile, Ser, Pro, Arg eller Lys; R5 = Asn, Lys, Ser, Glu, Gln, Ala, His eller Arg, og R6 = Arg, Asp, Phe, Thr, Leu eller Ser.

30 Foretrukne utførelser av faktor X-analogene ifølge oppfinnelsen er faktor X-analoger som oppviser en modifikasjon med

- a) R1 = Ile, R2 = Thr, R3 = Leu, R4 = Asn og eventuelt
R5 = Asn og/eller R6 = Asp og som prosesseres av fak-
tor VIIa eller faktor IXa;
- 5 b) R1 = Val, R2 = Thr, R3 = Phe, R4 = Asp og eventuelt
R5 = Asn og/eller R6 = Phe og/eller R1 = Ile eller Val
(Fig. 2A) og som prosesseres av faktor XIa;
- c) R1 = Ile eller Val, R2 = Phe, R3 = Lys, R4 = Ile og
eventuelt R5 = Lys og/eller R6 = Thr (fig. 2C) eller
R1 = Ile, R2 = Thr, R3 = Ser, R4 = Thr og eventuelt
10 R5 = Lys og/eller R6 = Thr (fig. 2I) og som prosesse-
res av faktor XIIa;
- d) R1 = Ile eller Val, R2 = Thr, R3 = Met, R4 = Ser og
eventuelt R5 = Ser og/eller R6 = Leu (fig. 2D) og pro-
sesseres av kallikrein;
- 15 e) R1 = Ile, R2 = Gly, R3 = Gln, R4 = Pro og eventuelt
R5 = Lys og/eller R6 = Ser (fig. 2H) eller
R1 = Ile, R2 = Gly, R3 = Glu, R4 = Ile (fig. 2F) eller
R1 = Ile, R2 = Thr, R3 = Lys, R4 = Met (fig. 2E) og
som prosesseres av faktor Xa;
- 20 f) R1 = Ile, R2 = Lys, R3 = Arg, R4 = Arg og eventuelt
R5 = Glu og/eller R6 = Leu eller
R1 = Ile, R2 = Thr, R3 = Val, R4 = Arg og eventuelt
R5 = Ala og/eller R6 = Leu eller
R1 = Ile, R2 = Arg, R3 = Val, R4 = Arg og eventuelt
25 R5 = Gln og/eller R6 = Leu eller
R1 = Ile, R2 = Arg, R3 = Arg, R4 = Arg og eventuelt
R5 = His og/eller R6 = Leu eller
R1 = Ile, R2 = Lys, R3 = Pro, R4 = Arg og eventuelt
R5 = Asn og/eller R6 = Leu eller
30 R1 = Ile, R2 = Lys, R3 = Arg, R4 = Ile og eventuelt
R5 = Arg og/eller R6 = Leu eller
R1 = Ile, R2 = Lys, R3 = Ser og R4 = Arg eller
R1 = Ile, R2 = Thr, R3 = Val og R4 = Arg eller
R1 = Ile, R2 = Lys, R3 = Leu og R4 = Arg (jfr. for
35 alle fig. 2G),

hvor sekvensene som er nevnt i punkt f), prosesseres av et bibasisk endoprotease, så som f.eks. kexin/Kex2, furin/-PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7 eller et derivat av disse proteaser.

- 5 Et mulig utvalg av modifikasjoner og aminosyreerstatninger som fører til en endret proteasespesifisitet, vises på fig. 2.

Modifikasjonene kan utføres f.eks. ved målrettet *in vitro*-mutagenese eller PCR eller ved andre gentekniske metoder
10 som er kjent innen faget og som er egnet for spesifikt å endre en DNA-sekvens, for en målrettet utførelse av aminosyreerstatninger.

Aktiveringen av faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen til faktor Xa-analoger utføres ifølge oppfinnelsen derfor for-
15 trinnsvis ved en protease utvalgt fra gruppen av endoproteaser, så som f.eks. kexin/Kex2, furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, serinproteaser, så som f.eks. faktor IIa, faktor VIIa, faktor IXa, faktor XIIa, faktor XIa, faktor Xa, eller kallikrein, eller et derivat av disse protea-
20 ser.

Faktor X Δ -analogene ifølge foreliggende oppfinnelse fore-
ligger som enkeltkjedede polypeptider i en enzymatisk inak-
tiv form. Først etter spaltning ved hjelp av en protease
til den tokjedede form erholdes en aktiv faktor Xa-analog.
25 Modifikasjonen muliggjør dermed en aktivering av den inak-
tive, enkeltkjedede faktor X Δ -analog-polypeptid til den to-
kjedede, aktive form.

En av vanskelighetene ved fremstilling av aktiv faktor Xa er dens instabilitet, fordi det, foruten faktor Xa α og
30 faktor Xa β , ved autokatalyse dessuten dannes andre, inak-
tive mellomprodukter.

For fremstilling av hovedsaklig intakte, aktive faktor X/Xa- hhv. Faktor X/Xa-lignende molekyler ville det derfor være ønskelig å kun erholde proteiner som fører til stabile sluttprodukter.

- 5 Det er kjent at en foretrukket spaltningsposisjon for prosesseringen av faktor Xa α (FXa α) til faktor Xa β (FXa β) ligger mellom Arg469/Gly470. På grunnlag av undersøkelser som er blitt foretatt av Eby et al. (1992, Blood. Vol. 80, suppl. 1, 1214), finnes i tillegg til et prominent karboksyterminalt peptid (aminosyrerester 476-487) av faktor X, 10 også et ytterligere, kortere peptid (aminosyrerester 474-477), som dannes ved autokatalyse av faktor Xa α . For å fokusere en målrettet prosessering av intakt faktor X til hovedsaklig aktiv faktor Xa, uten å erholde inaktive prosesseringsmellomprodukter, oppviser faktor X Δ -analogene ifølge 15 oppfinnelsen eventuelt ytterligere modifikasjoner.

Faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen oppviser dermed i henhold til en spesiell utførelse en ytterligere modifikasjon i C-terminalt område av faktor X-aminosyresekvensen.

- 20 I henhold til en utførelsesform oppviser en faktor X Δ -analog av den ovenfor beskrevne type et intakt β -peptid (FX Δ a). Faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen har spesielt en modifikasjon i området av den C-terminale β -peptidspaltningsposisjon, som forhindrer at det etter aktivering 25 av faktor X Δ til faktor Xa-analoger finner sted en avspaltning av β -peptidet av faktor X. På denne måte erholdes et faktor Xa-molekyl som til 100% kan isoleres som intakt faktor Xa α -molekyl.

- 30 Modifikasjonen kan være en mutasjon, delesjon eller innføyelse i området av faktor X-aminosyresekvensen mellom aminosyreposisjon Arg469 og Ser476 og eventuelt av Lys370. Imidlertid foretrekkes en aminosyresubstitusjon som forhindrer at aminosyreerstatningen fører til en folding av polypepti-

det som kunne påvirke strukturen og dermed eventuelt funksjonen og aktiviteten av proteinet.

Ifølge én utførelse oppviser faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen en erstatning av aminosyrene i posisjon Arg469 og/eller Gly470, hvor Arg469 fortrinnsvis er erstattet med Lys, His eller Ile, og Gly470 fortrinnsvis er erstattet med Ser, Ala, Val eller Thr.

Faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen kan foruten en mutasjon i posisjon Arg469 og/eller Gly470, oppvise en ytterligere mutasjon i posisjon Lys370 og/eller Lys475 og/eller Ser476. Ved en aminosyresubstitusjon i denne eller disse posisjoner, unngås en prosessering av faktor X α -analoger til faktor X β -analoger hhv. C-terminalt avkortede faktor X α -analoger, fordi den eller de naturlig forekommende prosesseringssekvenser er modifisert således at det ikke lenger kan finne sted noen eventuelt autokatalytisk avspaltning av et karboksyterminalt peptid.

Ifølge en annen utførelse oppviser faktor X-analogene ifølge oppfinnelsen en delesjon av det karboksyterminale β -peptid (FX $\Delta\beta$). En slik faktor X-analog kan fremstilles ved at et cDNA som koder for faktor X Δ -analog, uttrykkes i et rekombinant ekspresjonssystem, hvor kun sekvensene som koder for aminosyrene Met1 til Arg179/Ile235 til Arg469, klonnes.

Ifølge en ytterligere utførelse oppviser faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen et translasjonsstoppsignal i C-terminalt område av faktor X-sekvensen. Translasjonsstoppsignalet foreligger fortrinnsvis i en posisjon som følger en C-terminal aminosyre som oppstår ved naturlig prosessering. Translasjonsstoppsignalet foreligger dermed fortrinnsvis i posisjonen av aminosyre 470 av faktor X-sekvensen, slik at det endestående Arg469 av faktor X $\Delta\beta$ bevares. Med

denne hensikt erstattes kodonet GGC som koder for aminosyren Gly470, med TAA, TAG eller TGA.

Et ytterligere trekk av foreliggende oppfinnelse vedrører faktor X Δ -analoger som aktiveres *in vitro* til faktor Xa-analoger, dvs. de aktiverte faktor X Δ -analoger, ved behandling med et tilsvarende protease. Avhengig av faktor X Δ -analogen som brukes og aktiveres, erholdes en faktor Xa Δ -analog som i den C-terminale ende av den lette kjede oppviser tilsvarende aminosyremodifikasjoner sammenlignet med den naturlige faktor Xa-sekvens. Modifikasjonene er ifølge oppfinnelsen imidlertid valgt slik at de ikke forstyrrer den biologiske aktivitet.

Hvis en slik faktor X-analog eventuelt i tillegg oppviser et translasjonsstoppsignal i C-terminalt område av β -peptidet, erholdes modifiserte faktor Xa β -molekyler. Ved bruk av en faktor X-analog som oppviser én eller flere modifikasjoner i β -peptidsekvensen som førte til at β -peptidet ikke ble avspaltet, erholdes imidlertid en faktor Xa α -analog med en aminosyreerstatning i C-terminus av molekylet.

Faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen oppviser utelukkende modifikasjoner som endrer spesifisiteten for aktiverbarheten og som ikke påvirker aktiviteten vesentlig. Det erholdes dermed i hvert fall biologisk og funksjonelt aktive faktor Xa-molekyler hhv. faktor Xa-analoger.

Aktiveringen *in vitro* kan utføres ved hjelp av en protease valgt fra gruppen endoproteaser, så som f.eks. kexin/Kex2, furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, serinproteaser, så som f.eks. faktor IIa, faktor VIIa, faktor IXa, faktor XIIa, faktor XIa, faktor Xa eller kallikrein, eller et derivat av disse proteaser. Det ligger imidlertid innen rammen for foreliggende oppfinnelse å bruke hvilket som helst vilkårlige protease, unntatt RVV eller trypsin, så

sant det er egnet for prosessering av faktor X Δ -analogen ifølge oppfinnelsen til en faktor Xa-analog.

Selv om f.eks. Wolf et al. (1991, J. Biol. Chem. 266: 13726-137309) formodet at en endopeptidase så som Kex2, furin eller PACE er omfattet i prosesseringen av faktor Xa-
5 delesjonsmutantene som beskrives av denne gruppe, gir de ingen informasjon om virkningen av disse proteaser ved prosesseringen av faktor X. Likeledes beskrives i US 5.660.950 en rekombinant fremstilling av PACE og bruk av proteasen
10 for forbedring av prosessering av vitamin K-avhengige proteiner. I en rekke opplisteringer med andre blodfaktorer benevnes også faktor X, men imidlertid mangler data som sannsynliggjør dette utsagn.

Innen rammen for foreliggende oppfinnelse er det for første
15 gang entydig blitt vist at en av proteasene som er nødvendig for modningsprosessen av faktor X, er en bibasisk endoprotease, spesielt endogent forekommende furin. *In vivo* formidler endoproteasen i første rekke spaltningen av den enkeltkjededede faktor X-molekyl til den modne form bestående
20 av tung og lett kjede. *In vitro* formidler det dessuten avspaltningen av faktor X pro-peptidsekvensen (eksempel 2).

Ifølge en spesiell utførelsesform tilveiebringes en faktor X Δ -analog, som fortrinnsvis foreligger i renset form som enkeltkjedet molekyl. Faktor X Δ -analoger, som i det modifiserte område oppviser en spaltningsposisjon for en protease
25 som ikke foreligger i rekombinante celler, bevares etter ekspresjonen som enkeltkjedet molekyl. Det enkeltkjededede faktor X Δ -molekyl utmerker seg spesielt ved sin høye stabilitet og molekulære integritet. Hittil kunne man ikke isolere noe enkeltkjedet, inaktivt faktor X Δ -molekyl i renset
30 form, fordi det i rekombinante celler prosesseres til faktor Xa og en rekke ytterligere, også inaktive, mellomprodukter (Wolf et al., 1991, J. Biol. Chem. 266: 13726-13730). Den isolerte enkeltkjededede faktor X Δ -analog kan ved

en spesifikk prosessering aktiveres direkte til den tokjede faktor Xa-analog-form. Dette kan utføres ved at et enkeltkjedet faktor X Δ -molekyl som er isolert fra en rekombinant celle, bringes i berøring med en protease som spalter aktiveringsposisjonen som foreligger i faktor X Δ -analogen. Hvis f.eks. en faktor X Δ -analog med en furinaktiveringsposisjon uttrykkes i en furindefisient celle, kan den isoleres som enkeltkjedet faktor X Δ -analog og prosesseres til aktiv, tokjededet faktor X Δ a-analog ved å bringe den i berøring med en bibasisk protease, så som furin/PACE eller Kex2. Faktor X Δ -analoger som har en prosesseringsposisjon for en serinprotease eller kallikrein, kan også isoleres som enkeltkjedet molekyl i furinuttrykkende celler, og deretter prosesseres til aktiv faktor Xa-analog med serinprotease.

En på denne måte fremstilt faktor Xa-analog har på grunn av den selektive og målrettede prosesseringsreaksjon en høy stabilitet og strukturell integritet, og er spesielt fri for inaktive faktor X/Xa-analog-mellomprodukter og autoproteolytiske spaltningsprodukter.

Faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen tilveiebringes ifølge foreliggende oppfinnelse både i form av en faktor X Δ a med intakt β -peptid og i form av en faktor X Δ -analog med en delesjon av β -peptidet.

Et ytterligere trekk av foreliggende oppfinnelse vedrører det rekombinante DNA som koder for faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen. Det rekombinante DNA fører etter ekspresjon til en faktor X Δ -analog med en aminosyresekvens som tilsvarer human faktor X, unntatt en delesjon av aminosyrene fra Arg180 til Arg234 og en modifikasjon som muliggjør en prosessering og aktivering til aktiv faktor Xa-analog, både med intakt og deletert β -peptid.

Et ytterligere trekk av oppfinnelsen vedrører et preparat som inneholder en renset faktor X Δ -analog som oppviser en delesjon av aminosyrene fra Arg180 til Arg234 og en modifikasjon av aminosyrene i området mellom Gly173 og Arg179 og eventuelt av Ile235. Modifikasjonen fører til en ny gjenkjennings- hhv. spaltningsposisjon i polypeptidet som ikke foreligger naturlig i denne posisjon av polypeptidet, for en protease som normalt ikke prosesserer polypeptidet på dette sted. Preparatet kan være et renset preparat som inneholder enkeltkjedet faktor X Δ -analog, hvor polypeptidene erholdes fra et cellekultursystem enten etter isolering fra cellekultursupernatanten eller fra et ekstrakt av en cellekultur. En rekombinant faktor X Δ -analog som er forhåndsrenset fra et cellekultursystem, kan renses ytterligere ved bruk av fremgangsmåter som er kjent innen teknikkens stand. Til dette egner seg spesielt kromatografiske teknikker, så som gelfiltrasjon, ionebytter- eller affinitetskromatografi.

Ifølge en utførelse inneholder preparatet ifølge oppfinnelsen faktor X Δ -analogen som enkeltkjedet molekyl i enzymatisk inaktiv form, hvor faktor X Δ -analogen foreligger i en renhet på minst 80%, fortrinnsvis minst 90%, spesielt foretrukket minst 95%, og hvor det i det rensede preparat ikke foreligger inaktive, proteolytiske mellomprodukter av faktor X/Xa-analogen.

Ifølge et spesielt trekk inneholder preparatet enkeltkjedet X Δ -analog med en modifikasjon som muliggjør en aktivering til faktor Xa-analoger ved hjelp av en protease valgt fra gruppen av bibasiske endoproteaser, så som f.eks. kexin/-Kex2, furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, serinproteaser, så som f.eks. faktor IIa, faktor VIIa, faktor IXa, faktor XIIa, faktor XIa, faktor Xa, eller kallikrein, eller et derivat av disse proteaser. Aktiveringen skjer ved å bringe faktor X Δ -analogen i berøring med den

tilsvarende protease, som spalter ved den modifiserte sekvens, hvorved det erholdes en faktor Xa-analog.

I preparatet ifølge oppfinnelsen kan faktor X Δ -analogen foreligge enten som faktor X $\Delta\alpha$ (FX $\Delta\alpha$) med intakt β -peptid, eller med en delesjon av β -peptidet som faktor X $\Delta\beta$ eller andre C-terminale delesjoner.

Ifølge en ytterligere utførelse inneholder preparatet ifølge oppfinnelsen faktor X Δ -analogen fortrinnsvis i form av et enkeltkjedet molekyl i isolert form. Med denne hensikt erholdes f.eks. ved rekombinant fremstilling, faktor X Δ -analogen i form av et enkeltkjedet molekyl med en modifikasjon som tillater en aktivering til faktor Xa-analogen *in vitro*. Aktiveringen av faktor X Δ -analogen til faktor Xa-analogen kan utføres ved å bringe faktor X-analogen i berøring med en protease valgt fra gruppen bibasiske endoproteaser, så som f.eks. kexin/Kex2, furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, serinproteaser, så som f.eks. faktor IIa, faktor VIIa, faktor IXa, faktor XIIa, faktor XIa, faktor Xa, eller kallikrein, eller et derivat av disse proteaser. Proteasen kan herved være immobilisert på en bærer.

Preparatet ifølge oppfinnelsen kan tjene som utgangsstoff for fremstilling og utvinning av faktor Xa-analoger. I en storteknisk fremgangsmåte bringes preparatet, som inneholder en enkeltkjedet faktor X Δ -analog, i berøring med en eventuelt immobilisert protease, under betingelser som tillater en optimal aktivering av faktor X Δ -analogen til faktor Xa-analogen, og det erholdes en faktor Xa-analog. Den således erholdte faktor Xa-analog kan deretter renses ved allment kjente fremgangsmåter, og formuleres til en farmasøytisk sammensetning med faktor Xa-aktivitet.

Ifølge et ytterligere trekk av foreliggende oppfinnelse tilveiebringes et preparat som inneholder en faktor Xa-analog med høy stabilitet og strukturell integritet, som spe-

sielt er fri for inaktive faktor X/Xa-analog-mellomprodukter og autoproteolytiske spaltningsprodukter, og som kan beholdes ved at en faktor X Δ -analog av den ovenfor beskrevne type aktiveres og tilberedes til et tilsvarende preparat.

Ifølge en spesiell utførelse inneholder preparatet som inneholder den rensede, enkeltkjedede eller tokjedede faktor X Δ -analog, en fysiologisk akseptabel bærer, og er eventuelt formulert som farmasøytisk preparat. Formuleringen kan utføres på i og for seg vanlig måte, og kan være blandet med en buffer som inneholder salter, så som NaCl, CaCl₂, og aminosyrer, så som glycin og/eller lysin, i et pH-område fra 6-8, og formulert som farmasøytisk preparat. Det rensede preparat som inneholder faktor X-analog, kan tilveiebringes som ferdig oppløsning, lyofilisat eller dypfrosset inntil sluttbruken som lagerstabil produkt. Fortrinnsvis utføres lagringen av preparatet i lyofilisert form, og løses med en tilsvarende rekonstitusjonsoppløsning opp til å bli en optisk klar oppløsning.

Preparatet ifølge foreliggende oppfinnelse kan imidlertid også tilveiebringes som flytende preparat hhv. i flytende dypfrossen form.

Preparatet ifølge oppfinnelsen er spesielt stabilt, dvs. det kan også i oppløst form få stå over lengre tid før anvendelse. Det har vist seg at preparatet ifølge oppfinnelsen ikke oppviser noe tap av aktivitet i løpet av flere timer til dager.

Preparatet ifølge oppfinnelsen kan foreligge i en egnet anordning, fortrinnsvis en applikasjonsanordning, i kombinasjon med en protease valgt fra gruppen endoproteaser, så som f.eks. kexin/Kex2, furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, serinproteaser, så som f.eks. faktor IIa,

faktor VIIa, faktor IXa, faktor XIIa, faktor XIa, faktor Xa, eller kallikrein, eller et derivat av disse proteaser.

Preparatet ifølge oppfinnelsen som inneholder en faktor X Δ -analog i kombinasjon med en protease som er i stand til å
5 aktivere faktor X Δ -analogen til faktor Xa-analog, kan til-
veiebringes som kombinasjonspreparat bestående av en behol-
der som inneholder en protease som er immobilisert på en
bærer, eventuelt i form av en minisøyle eller en sprøyte
som er utstyrt med immobilisert protease, og en beholder
10 som inneholder det farmasøytiske preparat med faktor X Δ -
analog. For aktivering av faktor X Δ -analogen presses den
faktor X Δ -analogholdige oppløsning f.eks. over den immobi-
liserte proteasen. Den faktor X Δ -analogholdige oppløsning
holdes i dette tilfelle fortrinnsvis under lagring av pre-
15 paratet romlig adskilt fra den immobiliserte proteasen.
Preparatet ifølge oppfinnelsen kan foreligge i samme behol-
der som proteasen, hvor komponentene imidlertid holdes rom-
lig adskilt fra hverandre ved hjelp av en ugjennomtrengelig
skillevegg som er lett å fjerne før bruk. Oppløsningene kan
20 også oppbevares i hver sin beholder og først kort tid før
bruk bringes i berøring med hverandre.

I en spesiell utførelse er proteasen som brukes for aktive-
ringen, en serinprotease som er naturlig involvert i blod-
levring, så som f.eks. faktor XIIa, som da ikke trenger å
25 adskilles fra den aktiverte faktor Xa-analogen før bruk,
men kan administreres sammen med den.

Aktiveringen av faktor X Δ -analogen til faktor Xa-analogen
kan finne sted rett før den direkte bruk, dvs. før admi-
nistrasjonen til pasienten. Aktiveringen kan utføres ved å
30 bringe den i berøring med en immobilisert protease eller
ved blanding av oppløsninger hvorav den ene inneholder pro-
tease og den andre inneholder faktor X Δ -analogen. Det er
dermed mulig å holde de to komponenter i oppløsning adskilt
fra hverandre og å blande dem sammen ved hjelp av en egnet

anordning, hvor komponentene bringes i berøring med hverandre under gjennomstrømningen, hvorved faktor X Δ -analogen aktiveres til faktor Xa-analog. Til pasienten administreres dermed en blanding av faktor Xa og en ytterligere serinprotease som har bevirket aktiveringen. I denne sammenheng er doseringsmengden spesielt viktig, fordi den ytterligere administrasjon av en serinprotease også bevirker en aktivering av endogen faktor X, og levringstiden kan dermed forkortes.

- 10 Ifølge en spesiell utførelse tilveiebringes det farmasøytiske preparat i en egnet anordning, fortrinnsvis en applikasjonsanordning, enten i flytende/frossen eller lyofilisert form. En egnet applikasjonsanordning kan være en dobbeltkammersprøyteanordning ifølge AT 366.916 eller AT
15 382.783.

- Ifølge et ytterligere trekk av oppfinnelsen inneholder preparatet ifølge oppfinnelsen eventuelt som ytterligere bestanddel en blodfaktor i form av zymogen eller en aktiv serinprotease. Herved foretrekkes som ytterligere bestanddeler komponenter med FEIB-aktivitet. Til disse hører spesielt faktor II, faktor VII, faktor IX, faktor VIII, faktor V og/eller de aktive serinproteaser derav. Ytterligere bestanddeler kan imidlertid også være fosfolipider, Ca-ioner o.l. Ifølge en spesiell utførelse av oppfinnelsen inneholder
20 preparatet ifølge oppfinnelsen minst én ytterligere komponent med FEIB-aktivitet.

- Preparatet ifølge oppfinnelsen kan tilveiebringes som farmasøytisk preparat med faktor Xa-aktivitet som énkomponentpreparat, eller i kombinasjon med andre faktorer som fler-
30 komponentpreparat.

Før opparbeidelse til et farmasøytisk preparat underkastes det rensede protein de vanlige kvalitetskontroller og bringes i en terapeutisk administrerbar form. Spesielt testes

ved den rekombinante fremstilling det rensede preparat for å bekrefte fraværet av cellulære eller fra ekspresjonsvektoren stammende nukleinsyrer, fortrinnsvis ifølge en fremgangsmåte så som den som beskrives i EP 0.714.987.

- 5 På grunn av at i prinsippet ethvert biologisk materiale kan være kontaminert med smittekimmer, blir preparatet eventuelt behandlet for å inaktivere hhv. utarme virusser, for fremstilling av et sikkert preparat.

Et ytterligere trekk av oppfinnelsen vedrører anvendelsen
10 av et preparat av den ovennevnte type for fremstilling av et legemiddel. Et legemiddel som inneholder en faktor X Δ -analog ifølge oppfinnelsen og tilsvarende aktivert faktor X-analog, er spesielt godt egnet for behandling av pasienter med forstyrret blodlevring, så som f.eks. hemofili-
15 pasienter eller pasienter som har utviklet inhiberende antistoffer mot det administrerte terapeutikum, f.eks. mot faktor VIII eller faktor IX.

Et ytterligere trekk av oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte ved fremstilling av faktor X Δ -analogen, og et preparat
20 som inneholder faktor X Δ -analogen ifølge oppfinnelsen. Med denne hensikt bringes sekvensen som koder for faktor X Δ -analogen, inn i et egnet ekspresjonssystem, og tilsvarende celler transfigureres med det rekombinante DNA. Fortrinnsvis etableres permanente cellelinjer som uttrykker faktor X Δ -
25 analogen. Cellene dyrkes under optimale betingelser for genekspresjonen, og faktor X-analoger isoleres enten fra et ekstrakt av en cellekultur eller av cellekultursupernatanten. Det rekombinante molekyl kan renses ytterligere ved hvilke som helst kjente kromatografiske fremgangsmåter, så
30 som anione- eller kationebytter-, affinitets- eller immunoaffinitetskromatografi eller en kombinasjon derav.

For fremstilling av faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen klones det fullstendige cDNA som koder for faktor X, i en

ekspresjonsvektor. Dette utføres ved allment kjente kloneteknikker. Nukleotidsekvensen som koder for faktor X, modifieres deretter slik at sekvensene som koder for aminosyrene Arg180 til Arg234, deleteres, og aminosyrer i området mellom Gly173 og Arg179, eventuelt Ile235, forandres slik at det kan fremstilles et faktor X Δ -molekyl av den ovenfor beskrevne type. Dette utføres ved gentekniske fremgangsmåter som er kjent innen faget, så som målrettet *in vitro*-mutagenese, delesjon av sekvenser, f.eks. ved restriksjonsspaltning ved hjelp av endonukleaser og innføyelse av andre forandrede sekvenser, eller ved PCR. De således fremstilte faktor X Δ -mutanter innføres deretter i et ekspresjonssystem som er egnet for rekombinant ekspresjon, og uttrykkes.

Faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen kan eventuelt fremstilles ved kjemisk syntese.

Faktor X Δ -analogene fremstilles fortrinnsvis ved rekombinant ekspresjon. Den gentekniske fremstilling kan utføres med alle vanlige ekspresjonssystemer, så som f.eks. permanente cellelinjer eller virale ekspresjonssystemer. De permanente cellelinjer fremstilles ved en stabil integrasjon av fremmed-DNA'et i vertcellekromosomet av f.eks. Vero, MRC5, CHO, BHK, 293, SK-Hep1, spesielt lever- og nyreceller, eller ved hjelp av en episomal vektor avledet fra f.eks. papillomavirus. Virale ekspresjonssystemer så som f.eks. vacciniavirus, baculovirus eller retrovirale systemer, kan også brukes. Som cellelinjer brukes generelt Vero, MRC5, CHO, BHK, 293, Sk-Hep1, kjertel-, lever- og nyreceller. Som eukaryotiske ekspresjonssystemer kan også gjærer, endogene kjertler (f.eks. kjertler av transgene dyr) og andre celletyper brukes. Naturligvis kan også transgene dyr brukes for ekspresjon av polypeptidene ifølge oppfinnelsen eller derivater derav. For ekspresjon av de rekombinante proteiner har spesielt CHO-DHFR⁻-celler vist seg å være nyttige (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77: 4216-4220, 1980).

For en rekombinant fremstilling av faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen kan også prokaryotiske ekspresjonssystemer brukes. Til dette egner seg spesielt systemer som tillater en ekspresjon i *E. coli* eller *B. subtilis*.

- 5 Faktor X Δ -analogene uttrykkes i de tilsvarende ekspresjonssystemer under styring av en egnet promotor. I tilfellet av ekspresjon i eukaryoter, egner seg alle kjente promotorer, så som SV40-, CMV-, RSV-, HSV-, EBV-, β -aktin-, hGH eller induserbare promotorer så som f.eks. hsp- eller metallotio-
- 10 neinpromotor. Fortrinnsvis uttrykkes faktor X-analogene under styring av β -aktin-promotoren i CHO-DHFR⁻-celler.

- Ifølge en utførelse av oppfinnelsen omfatter fremgangsmåten ved fremstilling av preparatet ifølge oppfinnelsen trinnene å: tilveiebringe DNA som koder for en faktor X Δ -analog,
- 15 transformere en celle med det rekombinante DNA, uttrykke faktor X-analogen, eventuelt i nærvær av en protease, isolere faktor X-analogen og eventuelt rense ved en kromatografisk metode.

- Ifølge en utførelse av fremgangsmåten isoleres faktor Xa-analogen direkte i form av et dobbeltkjedet molekyl. Med denne hensikt uttrykkes en faktor X Δ -analog som oppviser en modifikasjon som tillater en prosessering ved hjelp av et bibasisk protease så som furin, i en celle, og faktor X Δ -analogene prosesseres til tokjedet faktor Xa-analog. Cellen
- 25 er i denne sammenheng fortrinnsvis en celle som uttrykker en protease som har evnen til prosesseringen, f.eks. et bibasisk protease så som furin eller et derivat derav. Eventuelt kan man for å heve hhv. forbedre prosesseringseffisiteten, modifisere cellen slik at proteasen uttrykkes forsterket. Dette kan f.eks. utføres ved koekspresjon av en
- 30 tilsvarende bibasisk endoprotease, så som furin/PACE, Kex2 eller et derivat derav. Faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen kan likeledes uttrykkes i en celle som oppviser en normal, dvs. for prosesseringen suboptimal, endogen konsen-

trasjon av en protease, og hvor det dermed finner sted en ufullstendig prosessering til den tokjedede aktive form. Den påfølgende prosessering til faktor Xa-analogen finner i dette tilfelle sted, hvis enkeltkjedet faktor X-analog ut-
5 skilles i cellekultursupernatanten slik det ble beskrevet ovenfor, ved kokultivering med proteaseuttrykkende celler eller ved å bringe den i kontakt med en eventuelt immobilisert protease. Cellesupernatanten kan også pumpes over en bæreratriks som det er bundet en protease på, hvorved man
10 i eluatet erholder tokjedet faktor Xa-analog.

Den således erholdte faktor Xa-analog kan deretter isoleres, renses og slik det ble beskrevet ovenfor, eventuelt formuleres som farmasøytisk sammensetning og lagres stabilt inntil videre bruk. Reaksjonsbetingelsene for prosesseringsreaksjonen og aktiveringen kan uten videre optimeres
15 for de gitte rammebetingelser av fagmannen avhengig av forsøksanordningen. I denne sammenheng er strømningshastigheten av de foreliggende reaktanter av spesiell betydning for kontaktvarigheten. Denne bør ligge mellom 0,01 ml/min og 1
20 ml/min. Som ytterligere parametere er temperatur, pH-verdi og elueringsbetingelsene av betydning. Etter gjennomløpet kan faktor Xa-analogen eventuelt ytterligere renses ved selektiv kromatografi. Gjennomføringen av fremgangsmåten med en protease som er bundet på en bærer, er spesielt fordelaktig på grunn av at reaksjonsanordningen muliggjør et yt-
25 terligere rensetrinn ved bruk av en bærer, fortrinnsvis av kromatografisøyler.

Ifølge en utførelse finner aktiveringen sted ved et kromatografisk trinn hvor proteasen er immobilisert på en bærer.
30 Renset enkeltkjedet faktor X Δ -analog føres med denne hensikt over en matriks som proteasen er bundet på, og fra eluatet isoleres renset faktor Xa-analog.

Ifølge et trekk av oppfinnelsen erholdes et preparat som inneholder aktiv faktor Xa-analog, ved at en på ovennevnte

måte fremstilt faktor X Δ -analog underkastes et prosesserings-/aktiveringstrinn, og at det aktive polypeptid viderebearbeides til et rensset preparat, som eventuelt er formulert som farmasøytisk sammensetning.

- 5 Ifølge et ytterligere trekk for fremstilling av et preparat som inneholder enkeltkjedet faktor X Δ -analog, uttrykkes f.eks. faktor X Δ -analog som oppviser en prosesseringssekvens for en bibasisk protease, i en celle som oppviser en endoproteasemangel. Cellen oppviser her fortrinnsvis en
- 10 mangel på en bibasisk endoprotease, så som f.eks. kexin, furin, PACE eller homologe derivater derav. Fra en slik endoproteasemanglende mutantcelle kan faktor X Δ -analog isoleres som enkeltkjedet molekyll. Faktor X Δ -analoger som oppviser en prosesseringsposisjon for en serinprotease, kan
- 15 uttrykkes i hvilken som helst vanlig celle, også furin-positiv celle, og isoleres som enkeltkjedet molekyll.

En på denne måte isolert og eventuelt rensset faktor X-analog bringes deretter i berøring med en protease valgt fra gruppen endoproteaser, så som f.eks. kexin/Kex2, furin/-

20 PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, serinproteaser, så som f.eks. faktor IIa, faktor VIIa, faktor IXa, faktor XIIa, faktor XIa, faktor Xa, eller kallikrein, eller et derivat av disse proteaser, under betingelser hvor enkeltkjedet faktor X-analog blir spaltet og aktivert til faktor Xa-analog.

25

Med faktor X Δ -analogene ifølge oppfinnelsen, som aktiveres til faktor Xa-analoger ved en fremgangsmåte så som de som ble beskrevet ovenfor, erholdes rensset faktor Xa-analog med høy stabilitet og strukturell integritet, og som spesielt

30 er fri for inaktive faktor X/Xa-mellomprodukter.

Oppfinnelsen skal beskrives nærmere ved hjelp av de følgende eksempler og de vedlagte tegninger.

Eksempel 1 beskriver konstruksjonen og ekspresjonen av en rFaktor X; eksempel 2 beskriver prosesseringen av rFaktor X til tung og lett kjede ved hjelp av furin; eksempel 3 beskriver prosessering av pro-faktor X ved hjelp av immobilisert protease; faktor 4 beskriver aktiviteten av *in vitro*-prosessert rFaktor X; eksempel 5 beskriver ekspresjonen av rFaktor X i furinmanglende celler; eksempel 6 beskriver konstruksjon og ekspresjon av rFaktor X Δ -analoger; eksempel 7 beskriver bestemmelsen av N-termini av faktor X-proseseringsproduktene; eksempel 8 beskriver ekspresjonen og karakteriseringen av FX-analogen med posisjonen Arg-Val-Thr-Arg/Ile (rFX $\Delta^{RVTR/I}$); eksempel 9 beskriver *in vitro*-aktivering av rFX $\Delta^{RVTR/I}$ -proteinet ved hjelp av rFurin-derivater.

- Figur 1 viser nukleotid- og aminosyresekvensen av faktor X;
- Figur 2 viser skjematisk faktor X Δ -analogene med modifiserte proteasespaltningsposisjoner;
- Figur 3 viser skjematisk ekspresjonsvektoren phAct-rFX;
- Figur 4 viser en "western blot"-analyse av rFaktor X som er uttrykt i CHO-celler, før og etter amplifikasjon;
- Figur 5 viser en "western blot"-analyse av rFaktor X etter *in vitro*-spaltning med furinderivater;
- Figur 6 viser en "western blot"-analyse av rFaktor X-molekyler som ble uttrykt i furinholdige og furinmanglende celler;
- Figur 7 viser skjematisk rFaktor X Δ -analog-konstruktene med forandrede C-termini i den tunge kjede;
- Figur 8 viser skjematisk N-termini av rFaktor X-proseseringsproduktene fra CHO-, CHO/rFurin og furinmanglende celler;
- Figur 9 viser en "western blot"-analyse av rFaktor X $\Delta^{RVTR/I}$, uttrykt i CHO-celler; og
- Figur 10 viser en "western blot"-analyse av rFaktor X $\Delta^{RVTR/I}$ etter *in vitro*-aktivering med furinderivat.

Ekspresjonsvektorene ble fremstilt ved standard-kloneteknikker (Maniatis et al., *"Molecular Cloning"* - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1983). Fremstillingen av DNA-fragmenter ved
 5 hjelp av polymerasekjedereaksjon (PCR) ble utført ved vanlige metoder (Clackson et al., 1991, *PCR A practical approach.*, utg. McPherson, Quirke, Taylor, s. 187-214).

Eksempel 1:

Ekspresjon og prosessering av enkeltkjedet rFX til rFX- 10 lett/tung kjede

a. Fremstilling av rFX-ekspresjonsvektor

For fremstilling av rekombinant FX (rFX) ble cDNA av FX isolert fra en human lever-lambda-cDNA-bank slik det beskrives av Messier et al. (1991, Gene 99: 291-294). Fra en
 15 positiv klon amplifiserte man ved PCR med oligonukleotid nr. 2911 (5'-ATTACTCGAGAAGCTTACCATGGGGCGCCCACTG-3') (SEKV. ID NR: 1) som 5'-primer og oligonukleotid nr. 2912 (5'-ATTACAATTGCTGCAGGGATCCAC-3') (SEKV. ID NR: 2) som 3'-primer et DNA-fragment som inneholdt den 1,467 kB lange FX-kodende
 20 sekvens samt 39 bp av ikke-translatert 3'-region, flankert av en XhoI-spaltningssposisjon i 5'-ende og en MfeI-spaltningssposisjon i 3'-ende. I tillegg innførte man ved hjelp av primer nr. 2911 sekvensen ACC før ATG av FX, slik at det oppstod en optimal Kozak-translasjonsinitieringssekvens.
 25 Deretter ble dette PCR-produkt klonet inn i den med SalI og EcoRI spaltede ekspresjonsvektor phAct, i form av et XhoI/MfeI-fragment. Den dannede ekspresjonsplasmid ble benevnt phAct-rFX (figur 3). Ekspresjonsvektoren phAct omfatter human betaaktin-promoter, 78 bp 5'UTR samt intronet, en
 30 multippel kloningsspaltningsposisjon og SV40-polyadenyleringsposisjonen.

b. Ekspresjon av rFX i CHO-celler

For etablering av en stabil rFX-uttrykkende cellelinje ble dhfr-defisiente CHO-celler ko-transfisert med ekspresjonsplasmidet phAct-rFX og seleksjonsmarkerplasmidet pSV-dhfr.

5 For alle andre ekspresjons- og funksjonsanalyser ble cellekulturene inkubert med serumfritt seleksjonsmedium i nærvær av 10 µg/ml vitamin K i 24 timer. Ekspresjonen av rFX i de dannede cellekloner ble bestemt på grunnlag av antigenmengden (ELISA, Asserachrom, Boehringer Mannheim), og det re-

10 kombinante protein ble deretter kjennetegnet ved hjelp av SDS-PAGE (figur 4A og 4B). I initialklonene og subklonene derav foreligger, slik det fremgår av "western blot" (figur 4A), det rekombinante FX-protein i form av en lett kjede (LC) med 22 kDa lengde, og en tung kjede (HC) med ca. 50

15 kDa lengde, som er identiske med plasmatiske faktor X-protein. I tillegg synes et proteinbånd ved 75 kDa, som tilsvarende enkeltkjedet (SC)-molekyl, og hvis nærvær er blitt beskrevet i FX-transfiserte CHO-celler (Wolf et al., J. Biol. Chem. 266: 13726-13730, 1991) samt i human plasma

20 (Fair et al., Blood 64: 194-204, 1984). For fremstilling av høyt uttrykkende kloner ble initialklonene amplifisert med økende mengder metotreksat og deretter subklonet inntil stabilisering. Ekspresjonen kunne heves fra ca. 200-500 ng/10E6 celler hhv. 1 µg/ml til 78 µg/10E6 celler hhv. 120

25 µg/ml pr. 24 timer. En "western blot"-analyse av disse høyt uttrykkende celleklonsupernatanter (figur 4B og figur 5A, spor 2), viser en anrikning av det enkeltkjededede rFX-molekyl samt nærværet av ytterligere former for den lette kjede. Foruten den 22 kDa lange form for den lette kjede, som tilsvarende den plasmatiske form (fullstendig karboksylert og uten propeptid), foreligger tre ytterligere varianter av den lette kjede, med ca. 21 kDa, 22,5 kDa og 20 kDa. Heterogenisiteten av den lette kjede i disse kloner kunne ved hjelp av en N-terminal sekvensiering av det rekombinante

30 materiale føres tilbake på en ufullstendig avspaltning av propeptidet (her: ca. 50% av rFX-materialet) samt en un-

derkarboksylasjon (her: ca. 50% av rFX). Det 21 kDa lange protein er en underkarboksylert propeptidholdig, og det 20 kDa lange protein en underkarboksylert propeptid-fri form for den lette kjede, mens 22,5 kDa-båndene representerer en
 5 fullstendig karboksylert, men imidlertid pro-peptid-holdig LC-form.

Eksempel 2:

Prosessering av enkeltkjedet rFX til rFX lett/tung kjede ved hjelp av rFurin-derivater

10 På grunn av likheten mellom spaltningsposisjonene for faktor X propeptid/N-terminus av den lette kjede (RVTR↓A) og mellom den lette/tunge kjede (RRKR↓S) med furin-konsensus-gjenkjenningsssekvensen (RXK/RR↓X), hadde man muligheten til å forbedre prosesseringen *in vitro* av både enkeltkjedede og
 15 propeptidholdige rFX-molekyler ved hjelp av rFurin-derivater. I litteraturen foreslås proteaser for de to prosesseringstrinnene, men det dreier seg der imidlertid ikke om furin (Rehemtulla et al., 1992, Blood 79: 2349-2355; Wallin et al., 1994, Thromb. Res. 1994: 395-403).

20 Cellekultursupernatanter fra CHO-rFX og CHO-rFurin ΔTM6xHis (patentsøknad EP 0.775.750) samt CHO-rFX og ikke-transfiserste CHO (som negativkontroll) ble blandet i forholdet 1:1 og inkubert ved 37°C. Alikvoter av reaksjonsblandningene ble før inkuberingen (t=0) og etter forskjellige inkubasjons-
 25 varigheter (t=2, 4, 6 timer) testet ved "western blot" for å påvise prosessert rFX (figur 5). Påvisningen av rFX i cellekultursupernatantene ble utført ved hjelp av et anti-human FX-antiserum (figur 5A) hhv. et monoklonalt anti-stoff som var spesifikt for den lette kjede av FX (figur
 30 5B).

I motsetning til CHO-rFX/CHO-blandingen oppviser CHO-rFX/CHO-rFurin allerede etter 2 timers inkubasjon ved 37°C (figur 5A spor 7; figur 5B spor 8) en nesten fullstendig

prosessering. Enkeltkjedet rFX er i det vesentlige blitt omsatt til den lette og den tunge kjedeform. I området av den lette kjede fant man kun de prosesserte propeptidfrie former med 22 kDa (karboksylert form) og 20 kDa (underkarboksylert form) i et forhold på ca. 50:50. Ved optimering av cellekulturbetingelsene kan dette forhold forbedres til fordel for den karboksylerte form. En riktig avspaltning av prosekvensen mellom Arg-1 og Ala+1, og homogeniteten av N-terminus av den lette kjede ble fastslått ved N-terminal sekvensiering. I kontrolleksperimentet, hvor CHO-rFX ble blandet med CHO-supernatanter, kan man heller ikke etter 6 timers inkubasjon se noen forandring av rFX-båndmønstret (Fig. 5A, spor 5; Figur 5B, spor 6). Dermed er det bevist at rFurin i supernatanten av CHO-celler er biologisk aktivt, og kan gjennomføre både prosesseringen av propeptidet og av den tunge/lette kjede av rFX.

Eksempel 3:

Prosessering av faktor X ved hjelp av på chelattentakkelgel immobilisert rFurin

For å bestemme om et substrat kan spaltes ved hjelp av et søylebundet rFurin-derivat, undersøkte man om man som søylematriks i en eksperimentell fremgangsmåte kan bruke "Fractogel EMD"-tentakkelgel (firma Merck) istedenfor Ni^{2+} -NTA-agarose. På grunn av at metallionene her befinner seg i en større avstand fra den egentlige søylematriks enn i tilfellet av Ni^{2+} -NTA-agarose, kunne det være mulig å oppnå en forbedret sterisk tilgjengelighet for det bundne rFurin-derivat. I denne fremgangsmåte ble pro-faktor X prosessert av rFurin-derivat som var bundet på tentakkelgel:

"Fractogel EMD"-tentakkelgel ble ladet med Ni^{2+} -ioner ifølge produsentens anvisninger, og ble ekvilibrert med ferskt serumfritt cellekulturmedium. Deretter ble søylen ladet med serumfri CHO-rFurin-derivatsupernatant. Vaske-trinn ble utført med serumfritt cellekulturmedium som inne-

holdt økende imidazolkonsentrasjoner opptil 40 mM. Deretter ble profaktor X ledet over søylen i form av en serumfri CHO-supernatant. Ved hjelp av "western blot"-analyse med spesifikt faktor X-antiserum ble prosesseringen av profaktor X til tokjedet faktor X påvist i gjennomløpet av søylen.

Eksempel 4:

Aktivitet av *in vitro*-prosessert rekombinant faktor X

Rekombinant faktor X-forløper ble inkubert ved 4°C med og uten rFurin. Til forskjellige tidspunkter tok man prøver og frøs dem ned ved -20°C. Etter avsluttet inkubasjon (etter 4 dager) ble alle probene testet ved hjelp av "FX-Coatest Kit" (firma Chromogenix) for å bestemme FX-aktiviteten. Med denne hensikt ble 50 µl av hver supernatant blandet med 50 µl FX-manglende, humant plasma, og rFX ble omsatt til rFXa med slangegift (RVV) ifølge produsentens anvisninger i nærvær av CaCl₂; rFXa hydrolyserer deretter det kromogene substrat (S-2337) og fører til en frigivning av gult paranitroanilin. På grunn av at mengden av rFXa og fargeintensiteten er proporsjonale med hverandre, kan man på grunnlag av en justeringslinje som er interpolert fra verdier av en plasma-fortynningsrekke, bestemme mengden av rFX/ml-cellekultursupernatant som kan aktiveres til rFXa. Med disse resultater og den kjente rFX-antigenmengde (ELISA-data) kan andelen av rFaktor X som er aktivert til faktor Xa, beregnes i prosent. Resultatene vises i tabell 1.

For å utelukke en uspesifikk, proteolytisk aktivitet i CHO- og CHO-rFurin-supernatanter, ble også blandingen av disse to cellekultursupernatanter undersøkt.

CHO-rFX inkubert med CHO-supernatanter (uten rFurin) som kontroll viste heller ikke etter 4 dager noen vesentlig endring av rFXa-aktiviteten, som på grunn av de eksperimentelle forandringer lå på ca. 800 mU/ml og tilsvarte 50-60%

funksjonelt rFX. Hvis man som sammenligning inkuberte CHO-rFX med CHO-rFurin, oppstod under inkubasjonstiden en konstant stigning av rFX-aktiviteten, som steg fra ca. 60% (tidspunkt T = 0) til 86% (tabell 1). På denne måte beviste man at andelen av rFX som kan aktiveres til funksjonelt rFXa, forbedres vesentlig ved *in vitro*-prosessering av CHO-rFX fra høytuttrykkende kloner ved hjelp av rFurin-derivat.

Tabell 1

	Inkubasjon i dager	Aktivitet i mU	Antigen- mengde i µg/ml	Funksjonell andel av rFX i %
CHO-rFX + CHO	0	814	14	58
	1	847	14	61
	2	835	14	60
	3	790	14	56
	4	763	14	55
CHO-rFX + CHO-rFurin	0	853	14	61
	1	1018	14	73
	2	1099	14	79
	3	1135	14	81
	4	1198	14	86
CHO + CHO-rFurin		0		
Plasma-FX 500 mU		585		

Eksempel 5:

Ekspresjon av rekombinant faktor X i furinmanglende celler

Slik det ble vist i eksemplene ovenfor, formidles for faktor X-forløperproteinet både propeptidavspaltningen og spaltningen av den enkle kjede til lett/tung kjede *in vitro* av furin. Dette gjør det nærliggende at disse trinn også i cellen utføres endogent ved det ubikvitært foreliggende furin, avhengig av den uttrykte rFaktor X-mengde med forskjellig effektivitet. Dette fører i sin tur til dannelsen av en blanding av heterogene rFaktor X-former.

En mulighet til å fremstille en mest mulig homogen og i tillegg stabil form for rFaktor X-molekyler, er å unngå en spaltning av rFaktor X ved hjelp av endogene proteaser, spesielt furin, og dermed danne funksjonelt inaktiv rFaktor X-forløper (som ved en senere nedstrømsprosessering, ideelt direkte før bruk, kan omdannes til sin funksjonelt aktive form).

Denne fremgangsmåte vil være spesielt nyttig ved fremstilling av FX-delesjonsmutanter som inneholder en furin-spaltningssposisjon istedenfor den opprinnelige aktiveringsposisjon. Med disse konstrukter kan aktiveringen av en slik rekombinant rFX-mutant finne sted *in vivo* ved hjelp av det endogene furin, og føre til utsondring av aktiverte ustabile rFX-former. Degraderingen av disse former av CHO-proteaser, f.eks. i cellekulturbetingelser med høy cellelyse, under lagring av cellekultursupernatantene eller rensemetoden, kan føre til inaktive spaltningsprodukter (Wolf et al., 1991).

Dette mål kan f.eks. oppnås ved supplementering av cellekulturmediet med midler som kan redusere eller utelukke den intracellulære furinaktivitet.

En annen mulighet er å bruke *a priori* furinmanglende celler (Möhring et al., 1983, Infect. Immun. 41: 998-1009; Ohnishi et al., 1994, J. Virol. 68: 4075-4079; Gordon et al., 1995, Infect. Immun. 63: 82-87).

Med denne hensikt ble en furinmanglende CHO-celleklon FD11 (Gordon et al., 1995, Infect. Immun. 63: 82-87) ko-transfisert med 20 µg phAct-FX og 1 µg pUCSV-neo (som inneholdt neomycin-resistensgenet i pUC-vektor under styring av SV40-promotor). For å erholde stabile kloner, ble mediet supplementert med 0,8 µg G418/ml. Ved sammenligning av utskilte rFaktor X-molekyler i serumfrie supernatanter av en furinholdig og en furinmanglende CHO-klon, viser det seg i "wes-

tern blot" at rFaktor X-forløperprosesseringen uteblir i furinmanglende celler og at det kun foreligger enkeltkjedet faktor X-forløper (fig. 6); i motsetning til dette blir rFaktor X fra "normale" celler ved beskjedne ekspresjon 5 prosessert fullstendig, men ved høyere ekspresjon, til tross for endogent furin, kun prosessert delvis. På grunn av den lave rFX-ekspresjonsgrad av den brukte celleklon, er den lette kjede av rFaktor X her ikke synlig på "blottet".

Eksempel 6:

- 10 **Fremstilling av faktor X Δ -analoger** (for tiden etter Søkers mening den beste måte å utøve oppfinnelsen)

6.1. Konstruksjon av ekspresjonsplasmider for fremstilling av FX-delesjonsmutanter

- 15 Faktor X-delesjonsmutantene skiller seg fra faktor X-vill-
typesekvensen ved delesjonen av de ca. 4,5 kDa store aktiveringspeptider mellom aminosyrene 180 og 234. I tillegg ble det ved mutagenese i C-terminus av den lette kjede og/eller N-terminus av den tunge kjede innført forskjellige spaltningsposisjoner som tjener til aktivering av den er-
20 holdte enkeltkjededede faktor X-molekyl til aktivert polypeptid. Ekspresjonsplasmidene for disse faktor X-delesjonsmutanter er alle avledet fra phAct-FX (beskrevet i eksempel 1).

- 25 For å forenkle kloningen av faktor X-delesjonsmutantene ble HindIII-NaeI-DNA-fragmentet fra plasmid phAct-FX, som omfatter det faktor X-kodende parti fra posisjon +1 til +1116, innskåret i HindIII/SmaI-restriksjonsspaltningsposisjonene av plasmid pUC19. Det dannede plasmid ble benevnt pUC/FX. For delesjon av aktiveringspeptidet og innføyelse
30 av nye spaltningsposisjoner, f.eks. furin-, FXIa-, FXIIa-, FXa-, FIIa-spaltningsposisjoner, ble Bsp120I/BstXI-FX-DNA-fragmentet av pUC/FX-vektor erstattet med syntetiske oligonukleotider. For innføring av en trombin- eller FXIa-spalt-

ningsposisjon ble BstXI-3'-overhenget gjort butt-endet ved hjelp av "Mung Bean"-nuklease slik at aminosyren Ile i posisjon 235 kunne skiftes ut. Deretter ble de deleterte faktor X-DNA-fragmenter i plasmid pAct-FX klonet over HindIII-AgeI.

For fremstilling av FXIa-spaltningsposisjonen Asp-Phe-Thr-Arg/Val, brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0009 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG GAC TTC ACC AGG GTG-3') (SEKV. ID NR: 3) og antisense-oligonukleotidet nr. 0010 (5'-CAC CCT GGT GAA GTC CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 4), og innførte dem i Bsp120I- og i den med "Mung Bean"-nuklease behandlede BstXI-posisjonen. På denne måte muterte man aminosyrene fra posisjon 176 til 178 og 235 til henholdsvis Asp-Phe-Thr og Val (fig. 2A).

For fremstilling av FIIa-spaltningsposisjonen Arg/Thr brukte man sense-nukleotidet nr. 0011 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC CTG GAA CGG ACC-3') (SEKV. ID NR: 5) og antisense-oligonukleotidet nr. 0012 (5'-GGT CCG TTC CAG GGT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 6) og innførte dem i Bsp120I- og den med "Mung Bean"-nuklease behandlede BstXI-posisjonen. På denne måte ble aminosyren Ile i posisjon 235 mutert til Thr (fig. 2B).

For fremstilling av FXIIa-spaltningsposisjonen Ile-Lys-Pro-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0013 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ATC AAG CCC AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 7) og antisense-oligonukleotidet nr. 0014 (5'-CT GGG CTT GAT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 8) og innførte dem i Bsp120I- og BstXI-posisjonene. Dermed ble aminosyrene fra posisjon 176 til 178 mutert til Ile-Lys-Pro (fig. 2C).

For fremstilling av kallikrein-spaltningsposisjonen Ser-Met-Thr-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0015 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGC ATG ACC AGG ATC-3')

(SEKV. ID NR: 9) og oligonukleotidet nr. 0016 (5'-CT GGT CAT GCT CTG TTT CCC AGA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 10) og innførte dem i Bsp120I- og BstXI-posisjonene. På denne måte ble aminosyrene fra posisjon 176 til 178 mutert til Ser-Met-Thr (fig. 2D).

For fremstilling av en FXa-spaltningsposisjon Met-Lys-Thr-Arg/Ile, brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0033 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ATG AAA ACG AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 11) og antisense-oligonukleotidet nr. 0034 (5'-CT CGT TTT CAT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 12) og innførte dem i Bsp120I- og BstXI-posisjonene. På denne måte ble aminosyrene i posisjon 176 til 178 mutert fra Thr-Leu-Glu til Met-Lys-Thr (fig. 2E).

For fremstilling av en FXa-spaltningsposisjon Ile-Glu-Gly-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0035 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ATC GAG GGA AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 13) og antisense-oligonukleotidet nr. 0036 (5'-CT TCC CTC GAT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 14) og innførte dem i Bsp120I- og BstXI-posisjonene. Dermed ble aminosyrene i posisjon 176 til 178 mutert fra Thr-Leu-Glu til Ile-Glu-Gly (fig. 2F).

For fremstilling av en furin-spaltningsposisjon Arg-Arg-Lys-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0017 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG AGG AAG AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 15) og antisense-oligonukleotidet nr. 0018 (5'-CT CTT CCT CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 16) og innførte dem i Bsp120I- og BstXI-posisjonene. På denne måte ble aminosyrene fra posisjon 176 til 178 mutert til Arg-Arg-Lys (fig. 2G).

For fremstilling av en furin-spaltningsposisjon Arg-Val-Arg-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0019 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG GTG AGG AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 17) og antisense-oligonukleotidet nr. 0020

(5'-CT CCT CAC CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 18) og innførte dem i Bsp120I- og BstXI-posisjonene. På denne måte ble aminosyrene fra posisjon 176 til 178 mutert til Arg-Val-Arg (fig. 2G).

- 5 For fremstilling av en furin-spaltningssposisjon Arg-Arg-Arg-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0021 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG AGG AGG AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 19) og antisense-oligonukleotidet nr. 0022 (5'-CT CCT CCT CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 20) og innførte dem i Bsp120I- og BstXI-posisjonene. På denne måte ble aminosyrene fra posisjon 176 til 178 mutert til Arg-Arg-Arg (fig. 2G).

- For fremstilling av en furin-spaltningssposisjon Arg-Pro-Lys-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0023 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG CCC AAG AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 21) og antisense-oligonukleotidet nr. 0024 (5'-CT CTT GGG CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 22) og innførte dem i Bsp120I- og BstXI-posisjonene. På denne måte ble aminosyrene fra posisjon 176 til 178 mutert til Arg-Pro-Lys (fig. 2G).

- For fremstilling av en furin-spaltningssposisjon Ile Arg-Lys-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0025 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ATC AGG AAG AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 23) og antisense-oligonukleotidet nr. 0026 (5'-CT CTT CCT GAT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 24) og innførte dem i Bsp120I- og BstXI-posisjonene. På denne måte ble aminosyrene fra posisjon 176 til 178 mutert til Ile-Arg-Lys (fig. 2G).

- For fremstilling av en furin-spaltningssposisjon Arg-Ser-Lys-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0027 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG AGC AAG AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 25) og antisense-oligonukleotidet nr. 0028 (5'-CT CTT GCT CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID

NR: 26) og innførte dem i Bspl20I- og BstXI-posisjonene. På denne måte ble aminosyrene fra posisjon 176 til 178 mutert til Arg-Ser-Lys (fig. 2G).

For fremstilling av en furin-spaltningsposisjon Arg-Val-Thr-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0029 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG GTC ACG AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 27) og antisense-oligonukleotidet nr. 0030 (5'-CT CGT GAC CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 28) og innførte dem i Bspl20I- og BstXI-posisjonene. På denne måte ble aminosyrene fra posisjon 176 til 178 mutert til Arg-Val-Thr (fig. 2G).

For fremstilling av en furin-spaltningsposisjon Arg-Leu-Lys-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0031 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG CTG AAA AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 29) og antisense-oligonukleotidet nr. 0032 (5'-CT TTT CAG CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 30) og innførte dem i Bspl20I- og BstXI-posisjonene. På denne måte ble aminosyrene fra posisjon 176 og 178 mutert til Arg og Lys (fig. 2G).

For fremstilling av en FXa-spaltningsposisjon Pro-Gln-Gly-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0037 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG CCC CAA GGA AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 31) og antisense-oligonukleotidet nr. 0038 (5'-CT TCC TTG GGG CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 32) og innførte dem i Bspl20I- og BstXI-posisjonene. På denne måte ble aminosyrene fra posisjon 176 til 178 mutert fra Thr-Leu-Glu til Pro-Gln-Gly (fig. 2H).

For fremstilling av en FXIIa-spaltningsposisjon Thr-Ser-Thr-Arg/Ile brukte man sense-oligonukleotidet nr. 0039 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACG AGC ACG AGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 33) og antisense-oligonukleotidet nr. 0040 (5'-CT CGT GCT CGT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 34) og innførte dem i Bspl20I- og BstXI-posisjonene. På

denne måte ble aminosyrene fra posisjon 176 og 178 mutert til Ser og Thr (fig. 2I).

For fremstilling av en trypsin-spaltningssposisjon Arg/Ile brukte man oligonukleotidet nr. 0041 (5'-GG CCC TAC CCC TGT
 5 GGG AAA CAG ACC CTG GAA CGG ATC-3') (SEKV. ID NR: 35) og
 antisense-oligonukleotidet nr. 0042 (5'-CG TTC CAG GGT CTG
 TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEKV. ID NR: 36) og innførte dem i Bsp120I- og BstXI-posisjonene (fig. 2J).

10 De dannede ekspresjonsplasmider (jfr. fig. 3) omfatter human beta-aktin-promoter, 78 bp av 5'UTR, beta-aktin-intron, modifisert faktor X-sekvens samt 39 bp av 3'UTR og SV40-polyadenylasjonssposisjonen.

6.2. Konstruksjon av ekspresjonsplasmider for fremstilling av FX β -analoger

15 Disse konstrukter ble avledet fra de ovenfor beskrevne faktor X Δ -analog-konstrukter idet det ble satt inn et TGA-stopkodon i posisjon 470. Med denne hensikt ble aminosyrene fra posisjon 457 frem til stopkodonet fjernet ved hjelp av SpeI- og partiell BstEII-spaltning og erstattet med oligo-
 20 nukleotidparet nr. 0003 (5'-GTC ACC GCC TTC CTC AAG TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AGG TGA A-3') (SEKV. ID NR: 37) og nr. 0004 (5'-CTA GTT CAC CTG GTT TTC ATG GAC CTG TCG ATC CAC TTG AGG AAG GCG-3') (SEKV. ID NR: 38). En skjematisk visning av faktor X $\Delta\beta$ -analog-konstruktene finnes på fig. 7.
 25 For forenkling av avbildningen vises alle faktor X $\Delta\beta$ -analoger som en generell konstrukt, hvor de variable aminosyrer i spaltningssposisjonsområdet vises i form av et skyggelagt "X".

6.3. Konstruksjon av ekspresjonsplasmider for fremstilling av FX Δ α -analoger

Med aktiveringen av faktor X ved avspaltning av det 4,5 kDa store aktiveringspeptid i N-terminal ende av den tunge
 5 kjede, dannes faktor X α -formen. Denne form omsettes deretter ved autoproteolytisk aktivitet og avspaltning av C-terminus av den tunge kjede mellom Arg469 og Gly470 til FX α β -formen. For fremstilling av faktor X-ekspresjonsplasmider som fører til dannelsen av faktor X Δ -analoger som etter
 10 aktiveringen foreligger utelukkende i FX α -form med intakt β -peptid, ble aminosyren Arg469 mutert til Lys, slik at det ikke lenger kan finne sted noen prosessering i C-terminalt område av den tunge kjede.

Med denne hensikt ble DNA-sekvensen som koder for den C-terminale aminosyresekvens av faktor X fra posisjon 1363
 15 til stopkodon, fjernet ved partiell BstEII-SpeI-spaltning og erstattet med to sammenligerte oligonukleotid-par. Oligonukleotidene nr. 0005 (5'-GTC ACC GCC TTC CTC AAG TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AAG GGC TTG CCC AAG-3') (SEKV. ID
 20 NR: 39) og oligonukleotid nr. 0006 (5'-TTG GCC TTG GGC AAG CCC TTG GTT TTC ATG GAC CTG TCG ATC CAC TTG AGG AAG GCG-3') (SEKV. ID NR: 40) ble ligert med oligonukleotid nr. 0007 (5'-GCC AAG AGC CAT GCC CCG GAG GTC ATA ACG TCC TCT CCA TTA AAG TGA GAT CCC A-3') (SEKV. ID NR: 41) og oligonukleotid
 25 nr. 0008 (5'-CTA GTG GGA TCT CAC TTT AAT GGA GAG GAC GTT ATG ACC TCC GGG GCA TGG CTC-3') (SEKV. ID NR: 42). Mutasjonen av aminosyren Arg469 innføres ved hjelp av oligonukleotid-parret nr. 0005-0006. En skjematisk visning av FX Δ -analogen finnes på figur 7.

30 Eksempel 7:

Bestemmelse av N-termini for faktor X og prosesseringsprodukter med og uten rFurin.

Rekombinant faktor X ble, slik det ble beskrevet i eksempel 1, uttrykt i CHO-celler med endogent furin, hhv. slik det ble beskrevet i eksempel 5, i furinmanglende celler. rFaktor X ble isolert både fra cellekultursupernatant av høyt-
 5 teksprimerende CHO-rFX-kloner som a) ikke var forbehandlet, b) var blitt inkubert i 12 timer ved 37°C og c) var blitt forbehandlet i 12 timer ved 37°C med CHO-rFurin-supernatant, men også fra cellekultursupernatant fra CHO-FD11-rFX-kloner som d) ikke var forbehandlet, og e) var blitt forbe-
 10 handlet i 12 timer ved 37°C med CHO-rFurin-supernatant. De endestående N-terminale aminosyrer av faktor X og prosesseringsproduktene av de enkelte reaksjonssatser a) til e) ble bestemt ved en Edman-analyse. Figur 8 viser skjematiske resultater.

15 rFaktor X fra høytuttrykkende CHO-celler opptrer i form av den modne tunge og lette kjede, samt enkeltkjedet, til dels fortsatt propeptidholdig. Etter en inkubasjon av disse cellekultursupernatanter i 12 timer ved 37°C (b) opptrer i tillegg, slik det allerede ble beskrevet av Wolf et al.
 20 (1991, J. Bio. Chem. 266: 13726-13730), feilaktige N-termini av rFX-lett kjede med 3 ytterligere aminosyrer Val38-Thr39-Arg40. Disse kryptiske ender finnes også ved sekvenseringen av rFX-materiale fra ikke-forbehandlede CHO-FD11-celler (d). Denne observasjon viser at opptreden av disse
 25 feilaktige N-termini kan unngås hvis man bruker tilpassede betingelser hhv. cellekulturbetingelser, lagring og rensemetoder for minimering av CHO-proteasers rFX-proteolyse.

I motsetning til det rensede materiale fra CHO-celler (a og b), foreligger rFX fra ikke-amplifiserte, furinmanglende
 30 celler (d) kun i form av uprosessert enkeltkjedet forløper. Man finner heller ingen N-terminale sekvenser som tilsvarer propeptiddelen. Dermed ble det vist at prosesseringen av enkeltkjedet rFX-forløper til den lette/tunge kjede i furinmanglende CHO-celler (d) ikke lenger finner sted, hvilket
 35 tyder på at endoproteasen furin spiller en sentral

rolle *in vivo* i dette prosesseringstrinn. I tillegg ble det vist at prosesseringen av propeptidholdige rFX-molekyler også finner sted i furinmanglende CHO-celler, og at furin dermed ikke spiller noen vesentlig rolle *in vivo* i dette prosesseringstrinn. Ved inkubasjon av rFX fra CHO-celler (c) og CHO-FD11-celler (e) i nærvær av furin finnes utelukkende lette og tunge kjeder med korrekte N-termini. Dermed ble det vist at både den enkeltkjededede FX-forløper og de propeptidholdige rFX-molekyler omsettes ved *in vitro*-prosessering til homogent, modent faktor X. Dermed oppviser faktor X som ble prosessert i nærvær av furin, en usedvanlig strukturell integritet.

Eksempel 8:

Ekspresjon og karakterisering av de rekombinante FX-delesjonsmutanter med spaltningsposisjonen Arg-Val-Thr-Arg/Ile ($\text{FX}\Delta^{\text{RVTR/I}}$)

Ekspresjonsplasmidet som koder for FX-delesjonsmutantene med spaltningsposisjonen Arg-Val-Thr-Arg/Ile ($\text{FX}\Delta^{\text{RVTR/I}}$), ble, slik det ble beskrevet allerede i eksempel 1, ko-transfisert i dhfr-manglende CHO-celler med seleksjonsmarkøren pSV/dhfr. Det rekombinante protein $\text{FX}\Delta^{\text{RVTR/I}}$ fra permanente CHO-kloner ble karakterisert ved hjelp av "western blot"-analyse. Slik det fremgår av figur 9, spor 4, opptrer det rekombinante protein i form av et dobbelbånd på ca. 56 og 50 kDa. I cellekultursupernatanten av ikke-transfiserte CHO-celler er intet FX-reaktivt materiale påvisbart (spor 2). Disse resultater utelukker at disse proteinbånd opptrer på grunn av en forurensning av de analyserte supernatanter av villtype-FX fra rester av bovint serum i cellekulturmediet. Det er derfor sannsynlig at dobbelbåndet skyldes forskjellige posttranslasjonelle modifikasjoner, f.eks. nærværet av propeptidet eller en forskjellig glykosylering av $\text{rFX}\Delta^{\text{RVTR/I}}$ -molekylet.

Spaltningsposisjonen Arg-Val-Thr-Arg/Ile som ble innført i denne konstrukt, er identisk med propeptid-spaltningsposisjonen av villtype-FX-molekylet, som virksomt gjenkjennes og spaltes *in vivo* av et CHO-endoprotease (jfr. eksempel 5 7). "Western blot"-analysen oppviser ingen ytterligere 35 kDa hhv. 31 kDa tunge FX-molekyler som kunne tilsvare de aktiverte α - og β -former av $\text{rFX}\Delta^{\text{RVTR/I}}$ -tung kjede. Disse resultater viser at enten er mengden av endoprotease ikke tilstrekkelig for aktivering av proteinet, og/eller at 10 spaltningsstedet Arg-Val-Thr-Arg/Ile i den foreliggende sekvensomgivelse ikke, eller ikke virksomt, gjenkjennes og spaltes *in vivo*. $\text{rFX}\Delta^{\text{RVTR/I}}$ foreligger dermed praktisk talt utelukkende i enkeltkjedet form.

Eksempel 9:

15 **Aktivering av det rekombinante $\text{rFX}\Delta^{\text{RVTR/I}}$ -protein ved hjelp av rekombinante furinderivater *in vitro***

Selv om spaltningsstedet Arg-Val-Thr-Arg i rFX-propeptidet gjenkjennes *in vivo* av et annen protease enn furin, beviste man i eksempel 2 at denne sekvens *in vitro* spaltes meget 20 virksomt og riktig av et rFurin-derivat.

For å teste aktiverbarheten av $\text{rFX}\Delta^{\text{RVTR/I}}$ -proteinet ved hjelp av rFurin, utførte man blandingeksperimenter. Med denne hensikt ble cellekultursupernatanten fra CHO-FX $\Delta^{\text{RVTR/I}}$ -celler blandet i 1:1-forhold med det rensede rFurin-derivat rFurin Δ Cys-avstandsholder-10xHis (jfr. patentsøknad EP 25 0.775.750 A2) i nærvær av 20 mM Hepes, pH 7,0, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ og 0,1% BSA. I kontrolleksperimentet ble CHO- $\text{rFX}\Delta^{\text{RVTR/I}}$ -supernatanten blandet med kun den BSA-holdige buffer i samme forhold. Tilsetningen av BSA skal stabilisere 30 den enzymatiske aktivitet av rFurin-derivatet samt de deretter dannede aktiverte $\text{rFX}\Delta^{\text{RVTR/I}}$ -produkter. Alikvoter av reaksjonsblandingene før og etter en inkubasjonstid på 6, 24, 48 og 72 timer (t=0, t=6, t=24, t=48, t=72) ved 37°C ble testet ved "western blot" for å bestemme $\text{rFX}\Delta^{\text{RVTR/I}}$ -pro-

sesseringen (figur 10). I blandingseksperimentet uten rFurin-tilsetning (fig. 10B) er det ikke synlig noen endring av båndmønstret i løpet av inkubasjonstiden (spor 4 til 9). På grunn av nærværet av BSA i reaksjonsblandingene er kun
 5 de lettere $rFX\Delta^{RVTR/I}$ -molekyler (50 kDa) godt synlige, fordi de 56 kDa tunge molekyler dekkes av BSA-båndet.

I nærvær av rFurin-derivatet (fig. 10A) opptrer allerede etter 6 timers inkubasjon (spor 5) et 35 kDa stort proteinbånd, som tilsvarer α -formen av FX-tung kjede (sammenlig-
 10 ning med spor 9). Dette protein akkumuleres i løpet av inkubasjonen, og omsettes deretter, slik det er kjent for plasma-FX, til den proteolytiske β -form, som dannes fra α -formen ved en proteolytisk omdannelse (spor 7 og 8). Parallelt med påvisningen av de aktiverte former av den tunge
 15 kjede blir lette kjeder med 22 kDa og 20 kDa synlige, som i eksempel 1b ble identifisert som propeptidfritt, karboksylert LC2 (som tilsvarer den egentlige funksjonelle form) hhv. propeptidfritt, underkarboksylert LC4-form av den lette kjede. Nærværet av den underkarboksylerte LC4-form
 20 bekrefter at de posttranslasjonelle modifikasjonsmekanismer er begrenset i de analyserte CHO-kloner. Selv om 50 kDa-båndet virker uforandret mens 56 kDa-formen tydeligvis spaltes direkte til lette/tunge kjeder, omdannes faktisk 56 kDa-molekylet først til en 50 kDa-form og spaltes først
 25 deretter til en lett og en tung kjede. Dette skyldes nærværet av propeptidet i 56 kDa-molekylet, som først fjernes ved dannelse av 50 kDa-formen.

Dermed ble det vist at $rFX\Delta^{RVTR/I}$ -konstruktet ved hjelp av den innførte spaltningsposisjon Arg-Val-Thr-Arg/Ile kan ak-
 30 tiveres *in vitro* av rFurin-derivater, og at de dannede prosesseringsprodukter av $rFX\Delta^{RVTR/I}$ -konstrukten har tilsvarende størrelse som plasma-FXa. Opptreden av $FX\Delta\beta$, som dannes ved en autoproteolytisk prosessering av $FX\Delta\alpha$, er et bevis for funksjonaliteten av $rFX\Delta^{RVTR/I}$ -molekylet.

P a t e n t k r a v

1. Faktor X Δ -analog, k a r a k t e r i s e r t v e d
at den oppviser en delesjon av aminosyrene Arg180 til
Arg234 av faktor X Δ -aminosyresekvensen og en modifikasjon i
5 området av aminosyresekvensen mellom Gly173 og Arg179 idet
modifikasjonen tilsvarer en prosesseringsposisjon for en
protease som i naturen ikke spalter faktor X-sekvensen i
denne posisjon.

2. Faktor X Δ -analog ifølge krav 1,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at modifikasjonen er
minst én aminosyreerstatning i området av aminosyresekven-
sen mellom Gly173 og Arg179 i henhold til aminosyrenummere-
ringen ifølge fig. 1.

3. Faktor X Δ -analog ifølge et av kravene 1-2,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder en
faktor X-sekvens med Gly173-R6-R5-R4-R3-R2-Arg179/R1 , hvor
 - a) R1 er en aminosyre valgt fra gruppen Val, Ser, Thr,
Ile eller Ala;
 - b) R2 er en aminosyre valgt fra gruppen Glu, Thr, Pro,
20 Gly, Lys eller Arg;
 - c) R3 er en aminosyre valgt fra gruppen Leu, Phe, Lys,
Met, Gln, Glu, Ser, Val, Arg eller Pro;
 - d) R4 er en aminosyre valgt fra gruppen Thr, Asp, Asn,
Ile, Ser, Met, Pro, Arg eller Lys;
 - 25 e) R5 er en aminosyre valgt fra gruppen Asn, Lys, Ser,
Glu, Gln, Ala, His eller Arg; og
 - f) R6 er en aminosyre valgt fra gruppen Asp, Phe, Thr,
Arg, Leu eller Ser.

4. Faktor X Δ -analog ifølge et av kravene 1-3,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at modifikasjonen utgjør
en prosesseringsposisjon for et protease valgt fra gruppen
endoproteaser, så som f.eks. kexin/Kex2, furin/PACE, PC1/-

PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, serinproteaser, så som f.eks. faktor IIa, faktor VIIa, faktor IXa, faktor XIIa, faktor XIa, faktor Xa, eller kallikrein, eller et derivat av disse proteaser.

- 5 5. Faktor X Δ -analog ifølge et av kravene 1-4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det foreligger som
enkeltkjedet molekyll i enzymatisk inaktiv form.
6. Faktor X Δ -analog ifølge et av kravene 1-5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at modifikasjonen tillat-
10 ter en aktivisering av det inaktive, enkeltkjedede faktor X Δ -
analog-polypeptid til den tokjedede, aktive faktor Xa-ana-
log-form.
7. Faktor X Δ -analog ifølge et av kravene 1-6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den oppviser en yt-
15 terligere modifikasjon i området av den C-terminale faktor
X-aminosyresekvens.
8. Faktor X Δ -analog ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den oppviser en modi-
fikasjon i C-terminalt område av β -peptid-spaltningssposi-
20 sjonen.
9. Faktor X Δ -analog ifølge krav 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at modifikasjonen er en
mutasjon, delesjon eller innføyelse i området av faktor X-
aminosyresekvensen mellom aminosyreposisjon Arg469 og
25 Ser476.
10. Faktor X Δ -analog ifølge et av kravene 7-9,
k a r a k t e r i s e r t v e d at modifikasjonen for-
hindrer en avspaltning av β -peptidet.

11. Faktor X Δ -analog ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den oppviser en dele-
sjon av faktor X- β -peptidet.
12. Faktor X Δ -analog ifølge krav 11,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at den oppviser et
translasjonsstopsignal i C-terminalt område av faktor X-
sekvensen.
13. Faktor X Δ -analog ifølge krav 12,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det oppviser et
10 translasjonsstopsignal i posisjonen for aminosyren Lys470
av faktor X-sekvensen.
14. Faktor X Δ -analog ifølge et av kravene 1-13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at modifikasjonen i om-
rådet av aminosyresekvensen mellom Gly173 og Arg179 tillå-
15 ter en aktivisering *in vitro* av den inaktive faktor X-analog
til aktiv faktor X Δ -analog.
15. Faktor X Δ -analog ifølge krav 14,
k a r a k t e r i s e r t v e d at modifikasjonen tillå-
ter en aktivisering ved hjelp av et protease valgt fra grup-
20 pen endoproteaser, så som f.eks. kexin/Kex2, furin/PACE,
PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, serinproteaser, så som
f.eks. faktor IIa, faktor VIIa, faktor IXa, faktor XIIa,
faktor XIa, faktor Xa, eller kallikrein, eller et derivat
av disse proteaser.
- 25 16. Faktor X Δ -analog ifølge et av kravene 1-15,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det oppviser et in-
takt β -peptid og foreligger i form av faktor X $\Delta\alpha$.
17. Faktor X Δ -analog ifølge et av kravene 1-15,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det oppviser en dele-
30 sjon av β -peptidet.

18. Rekombinant DNA som koder for en faktor $X\Delta$ -analog ifølge et av kravene 1-17, foreliggende i en vektor for rekombinant ekspresjon av proteinet som kodes for.
19. Transformerte celler som inneholder et rekombinant DNA
5 ifølge krav 18.
20. Preparat som inneholder rensset faktor $X\Delta$ -analog som oppviser en delesjon av aminosyrene Arg180 til Arg234 av faktor X-aminosyresekvensen og en modifikasjon i området av aminosyresekvensen mellom Gly173 og Arg179 idet modifikas-
10 sjonen tilsvarende en prosesseringsposisjon for en protease som i naturen ikke spalter faktor X-sekvensen i denne posisjon.
21. Preparat ifølge krav 20,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder en enkeltkjedet faktor $X\Delta$ -analog i enzymatisk inaktiv form, med
15 en renhet på minst 80%, fortrinnsvis 90%, spesielt foretrukket 95%, og ikke oppviser noen inaktive, proteolytiske mellomprodukter av faktor X/Xa-analog.
22. Preparat ifølge et av kravene 20 eller 21,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder faktor $X\Delta$ -analog i form av faktor $X\Delta\alpha$.
23. Preparat ifølge et av kravene 20 eller 21,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder faktor $X\Delta$ -analog som $FX\Delta\beta$.
24. Preparat ifølge et av kravene 20-23,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder faktor $X\Delta$ -analog som enkeltkjedet molekyl i isolert form.
25. Preparat ifølge et av kravene 20-24,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder en faktor $X\Delta$ -analog som oppviser en modifikasjon som tillater

en aktivering *in vitro* av faktor X Δ -analogen til en faktor Xa-analog.

26. Preparat ifølge et av kravene 20-25,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er formulert som
5 et farmasøytisk preparat.

27. Preparat ifølge krav 26,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det foreligger i en
egnet anordning, fortrinnsvis en applikasjonsanordning, i
kombinasjon med et protease valgt fra gruppen endoprotea-
10 ser, så som f.eks. kexin/Kex2, furin/PACE, PC1/PC3, PC2,
PC4, PACE 4, LPC/PC7, serinproteaser, så som f.eks. faktor
IIa, faktor VIIa, faktor IXa, faktor XIIa, faktor XIa, fak-
tor Xa, eller kallikrein, eller et derivat av disse protea-
ser.

15 28. Preparat ifølge krav 27,
k a r a k t e r i s e r t v e d at komponentene forelig-
ger romslig atskilt fra hverandre.

29. Preparat som inneholder en renset faktor X Δ -analog
ifølge ethvert av kravene 1-17 som spesielt er fritt for
20 intaktive faktor X Δ /Xa-analog-mellomprodukter og autopro-
teolytiske spaltningsprodukter, og som kan erholdes ved ak-
tivering av en faktor X Δ -analog ifølge et av kravene 1-17.

30. Preparat ifølge krav 29,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder en ak-
25 tiv faktor Xa-analog som tokjedet molekyl i isolert form.

31. Preparat ifølge et av kravene 29-30,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det oppviser en fak-
tor Xa-analog med en renhet på minst 80%, fortrinnsvis 90%,
spesielt foretrukket 95%, og ikke oppviser noen inaktive,
30 proteolytiske mellomprodukter fra faktor X/Xa-analog.

32. Preparat ifølge et av kravene 29-31,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det foreligger i en
fysiologisk akseptabel bærer og i lagerstabil form.

33. Preparat ifølge et av kravene 20-32,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det som ytterligere
bestanddel eventuelt inneholder en blodfaktor eller en ak-
tivert form av en blodfaktor.

34. Preparat ifølge krav 33,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det som ytterligere
10 bestanddel inneholder minst én komponent med faktor VIII-
bypass-aktivitet.

35. Preparat ifølge et av kravene 20 eller 34,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er formulert som
farmasøytisk sammensetning.

15 36. Anvendelse av et preparat ifølge et av kravene 20 til
35 ved fremstilling av et legemiddel egnet til behandling
av en blodsykdom.

37. Anvendelse av et preparat ifølge et av kravene 20 til
35 ved fremstilling av et legemiddel for behandling av pa-
20 sienter med forstyrret blodlevring, så som f.eks. hemofili-
pasienter eller hemofile pasienter, som har utviklet inhi-
bitor-antistoffer.

38. Fremgangsmåte ved fremstilling av et preparat som
inneholder renset rekombinant faktor X Δ -analog ifølge krav
25 1-17,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter de føl-
gende trinn:

- tilveiebringelse av en nukleinsyre som koder for en
faktor X Δ -analog ifølge et av kravene 1-18,
- 30 - transfeksjon av en egnet celle

- ekspresjon av faktor X Δ -analogen
- isolasjon av enkeltkjedet faktor X Δ -analog og
- rensing av polypeptidet, fortrinnsvis ved kromatografi.

- 5 39. Fremgangsmåte ifølge krav 38 ved fremstilling av et preparat som inneholder aktiv faktor X Δ -analog, k a r a k t e r i s e r t v e d at et preparat som er blitt fremstilt i henhold til krav 38, underkastes et aktiveringstrinn.
- 10 40. Fremgangsmåte ifølge krav 39, k a r a k t e r i s e r t v e d at preparatet som inneholder enkeltkjedet faktor X Δ -analog, bringes i berøring med et protease valgt fra gruppen endoproteaser, så som f.eks. kexin/Kex2, furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4,
- 15 LPC/PC7, serinproteaser, så som f.eks. faktor IIa, faktor VIIa, faktor IXa, faktor XIIa, faktor XIa, faktor Xa, eller kallikrein, eller et derivat av disse proteaser, under betingelser som gjør det mulig for det å spaltes til den to-kjedede faktor Xa-analog-form.
- 20 41. Fremgangsmåte ifølge krav 40, k a r a k t e r i s e r t v e d at proteaset er immobilisert.
42. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 38 til 41, k a r a k t e r i s e r t v e d at det erholdes en ren-
- 25 set faktor Xa-analog, som spesielt er fri for inaktive faktor X Δ /Xa-analog-mellomprodukter.

1/12

```

(-40)
  1
Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly Leu Leu Leu
ATG GGG CGC CCA CTG CAC CTC GTC CTG CTC AGT GCC TCC CTG GCT GGC CTC CTG CTG
          9          18          27          36          45          54

(-4)      (-1)
              40
Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg
CTC GGG GAA AGT CTG TTC ATC CGC AGG GAG CAG GCC AAC AAC ATC CTG GCG AGG GTC ACG AGG
          66          75          84          93          102          111          120

(+1)
  41
Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr
GCC AAT TCC TTT CTT GAA GAG ATG AAG AAA GGA CAC CTC GAA AGA GAG TGC ATG GAA GAG ACC
          129          138          147          156          165          174          183

Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn
TGC TCA TAC GAA GAG GGC CGC GAG GTC TTT GAG GAC AGC GAC AAG ACG AAT GAA TTC TGG AAT
          192          201          210          219          228          237          246

Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp
AAA TAC AAA GAT GGC GAC CAG TGT GAG ACC AGT CCT TGC CAG AAC CAG GGC AAA TGT AAA GAC
          255          264          273          282          291          300          309

Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe
GGC CTC GGG GAA TAC ACC TGC AOC TGT TTA GAA GGA TTC GAA AAA AAC TGT GAA TTA TTC
          318          327          336          345          354          363          372

Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn
ACA CGG AAG CTC TGC AGC CTG GAC AAC GGG GAC TGT GAC CAG TTC TGC CAC GAG GAA CAG AAC
          381          390          399          408          417          426          435

Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro
TCT GTG GTG TGC TCC TGC GGC CGC GGG TAC ACC CTG GCT GAC AAC GGC AAG GCC TGC ATT CCC
          444          453          462          471          480          489          498

R6 R5 R4 R3 R2
173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183
Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala
ACA GGG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC CTG GAA GGC AGG AAG AGG TCA GTG GCC CAG GCC
          507          516          525          534          543          552          561

Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu
ACC AGC AGC AGC GGG GAG GGC CCT GAC AGC ATC ACA TGG AAG CCA TAT GAT GCA GCC GAC CTG
          570          579          588          597          606          615          624

Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp
GAC CCC ACC GAG AAC CCC TTC GAC CTG CTT GAC TTC AAC CAG ACG CAG CCT GAG AGG GGC GAC
          633          642          651          660          669          678          687

R1
234 235
Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala
AAC AAC CTC ACC AGG ATC GTG GGA GGC CAG GAA TGC AAG GAC GGG GAG TGT CCC TGG CAG GCC
          696          705          714          723          732          741          750

```

Fig. 1-1

2/12

Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile
CTG CTC ATC AAT GAG GAA AAC GAG GGT TTC TGT GGT GGA ACT ATT CTG AGC GAG TTC TAC ATC
759 768 777 786 795 804 813

Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn
CTA ACG GCA GCC CAC TGT CTC TAC CAA GCC AAG AGA TTC AAG GTG AGG GTA GGG GAC GCG AAC
822 831 840 849 858 867 876

Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg
ACG GAG CAG GAG GAG GGC GGT GAG GCG GTG CAC GAG GTG GAG GTG GTC ATC AAG CAC AAC CCG
885 894 903 912 921 930 939

Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe
TTC ACA AAG GAG ACC TAT GAC TTC GAC ATC GCC GTG CTC CCG CTC AAG ACC CCC ATC ACC TTC
948 957 966 975 984 993 1002

Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr
CGC ATG AAC GTG GCG CCT GCC TGC CCC GAG CGT GAC TGG GCC GAG TCC ACG CTC ATG ACG
1011 1020 1029 1038 1047 1056 1065

Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg
CAG AAG ACG GCG ATT GTG AGC GGC TTC GCG ACC CAC GAG AAG GCG CCG CAG TCC ACC AGG
1074 1083 1092 1101 1110 1119 1128

Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile
CTC AAG ATG CTG GAG GTG CCC TAC GTG GAC CGC AAC AGC TGC AAG CTG TCC AGC AGC TTC ATC
1137 1146 1155 1164 1173 1182 1191

Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp
ATC ACC CAG AAC ATG TTC TGT GCC GGC TAC GAC ACC AAG CAG GAG GAT GCC TGC CAG GCG GAC
1200 1209 1218 1227 1236 1245 1254

Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp
AGC GGG GCG CCG CAC GTC ACC CGC TTC AAG GAC ACC TAC TTC GTG ACA GCG ATC GTC AGC TGG
1263 1272 1281 1290 1299 1308 1317

Gly Glu Ser Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys
GGA GAG AGC TGT GCC CGT AAG GGG AAG TAC GGG ATC TAC ACC AAG GTC ACC GCC TTC CTC AAG
1326 1335 1344 1353 1362 1371 1380

Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val
TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AGG GGC TGG CCC AAG GCC AAG AGC CAT GCC CCG GAG GTC
1389 1398 1407 1416 1425 1434 1443

488
Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys TER
ATA ACG TCC TCT CCA TTA AAG TGA
1452 1461 1467

Pra-/Propeptid
Connecting Tripeptid
Aktivierungs-Peptid

Fig. 1-2

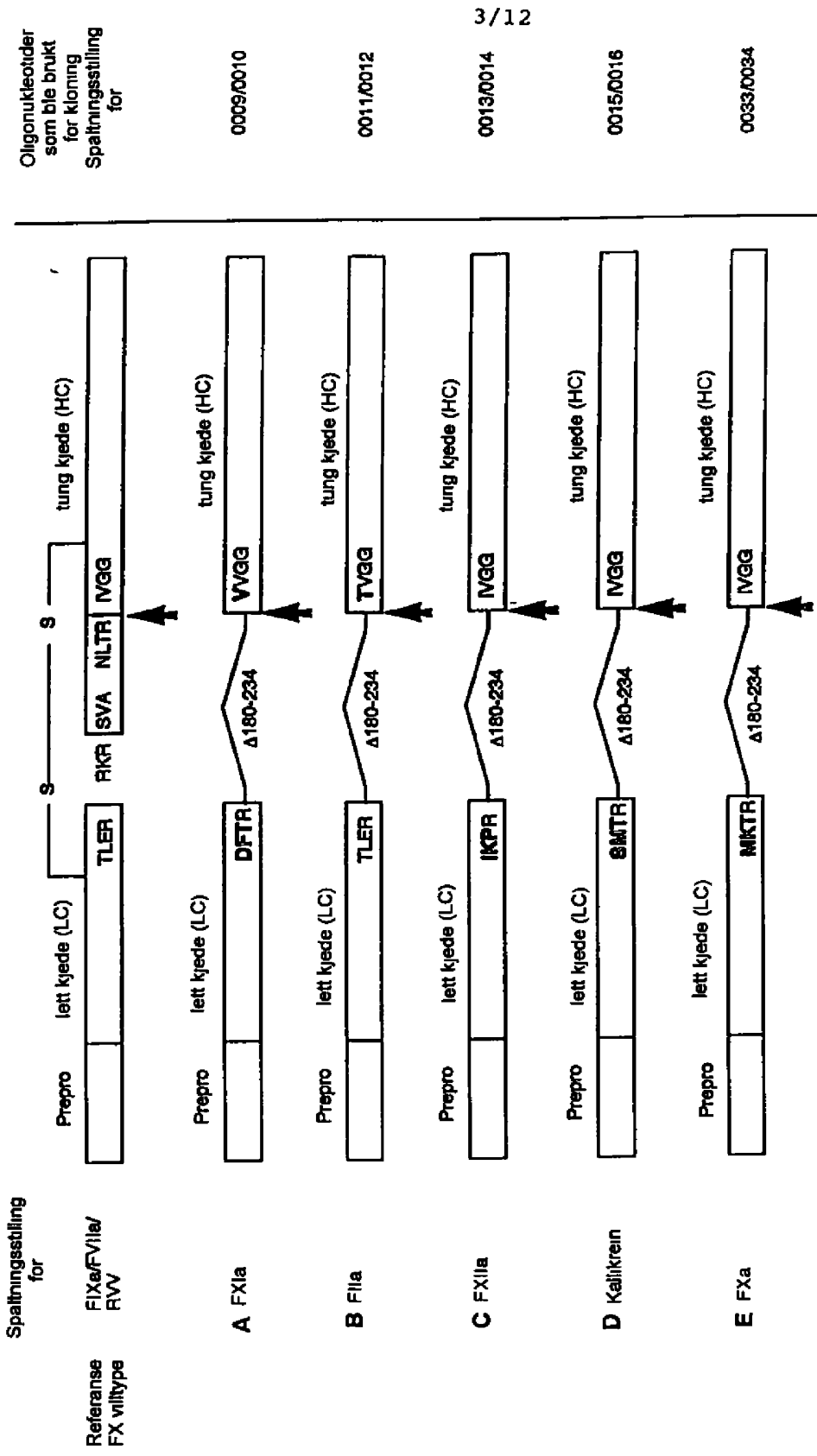


Fig. 2.1.

Oligonukleotider
som ble brukt
for kloning

Spaltingsstilling
for

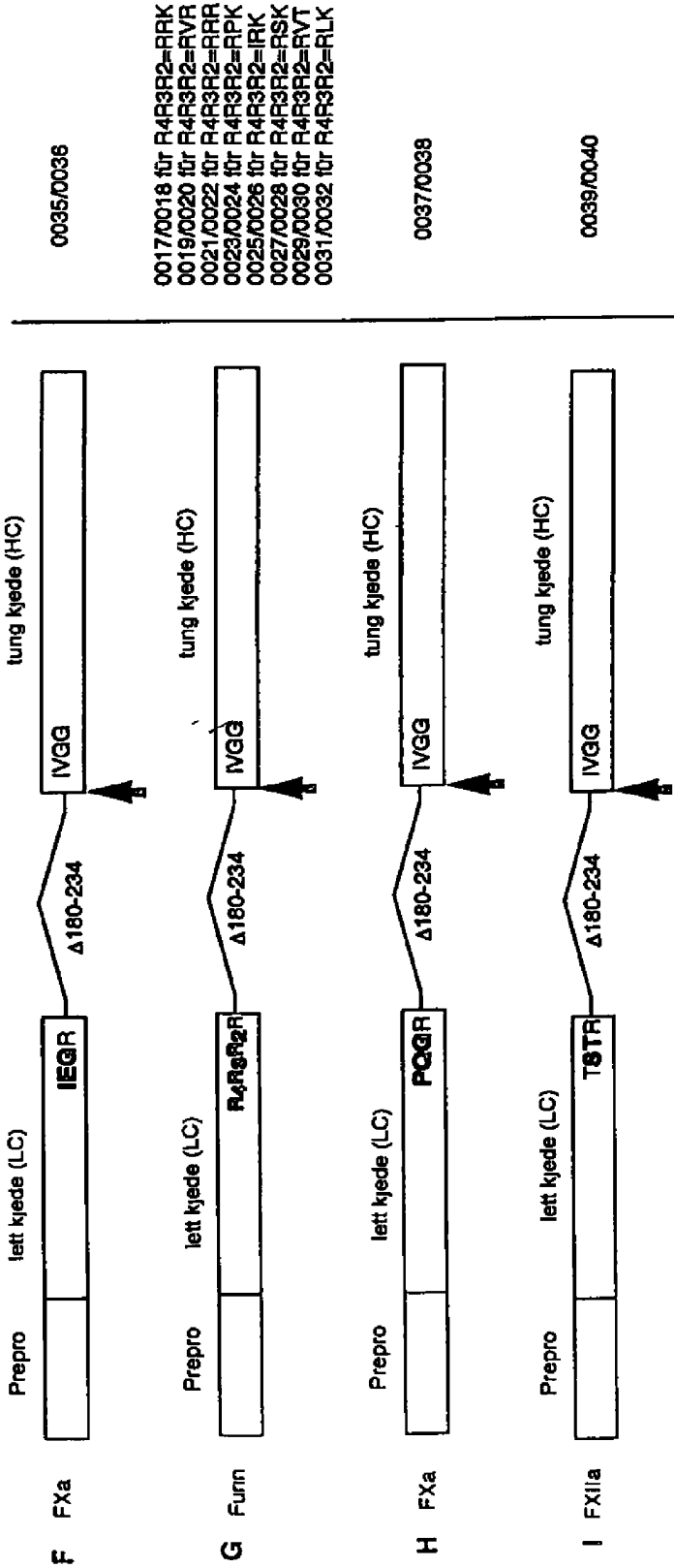


Fig. 2.2

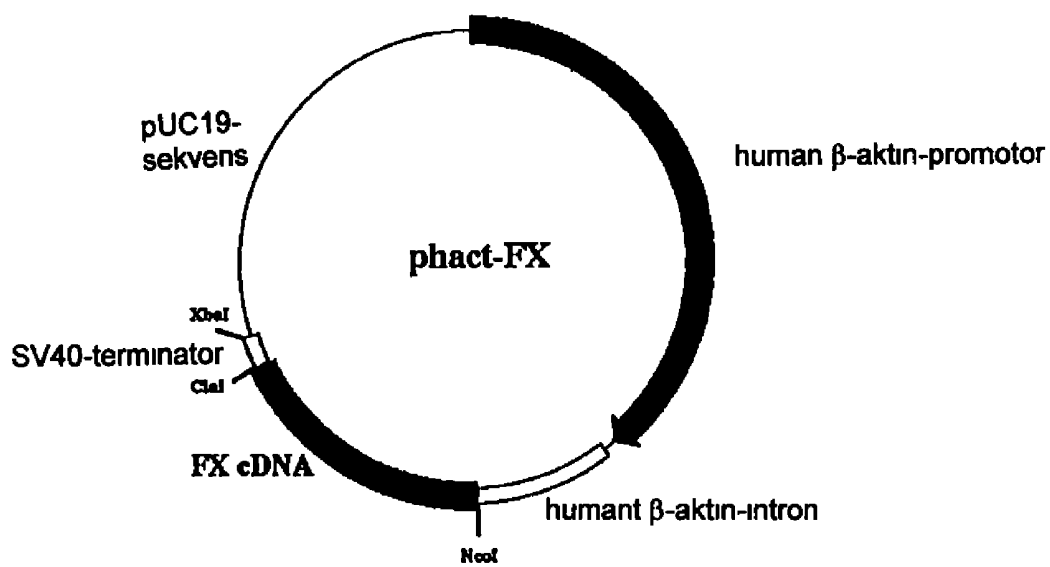


Fig. 3

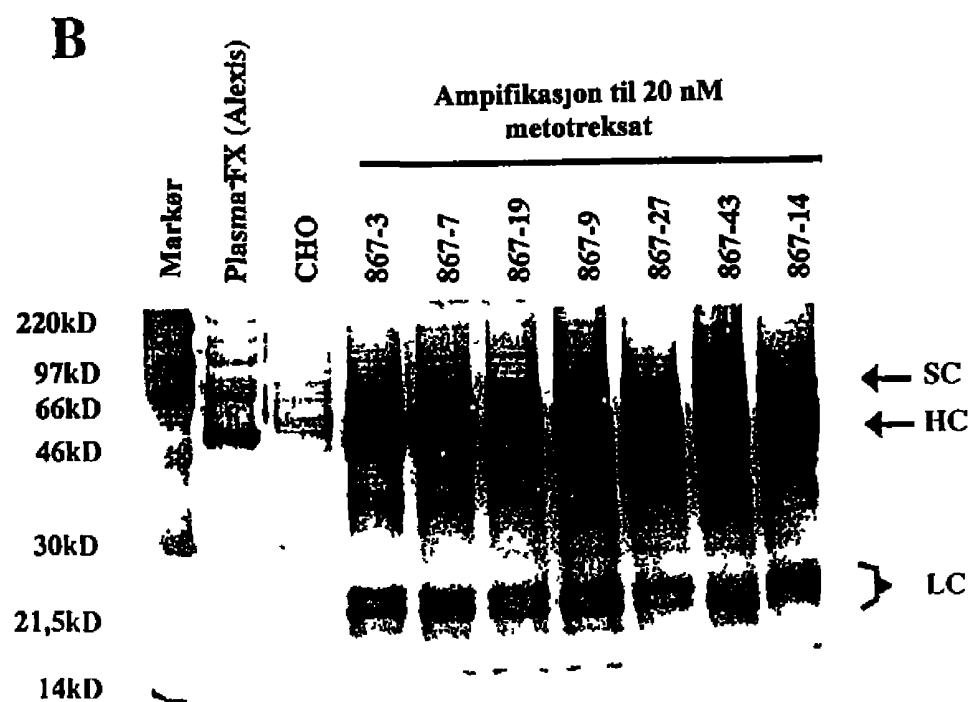
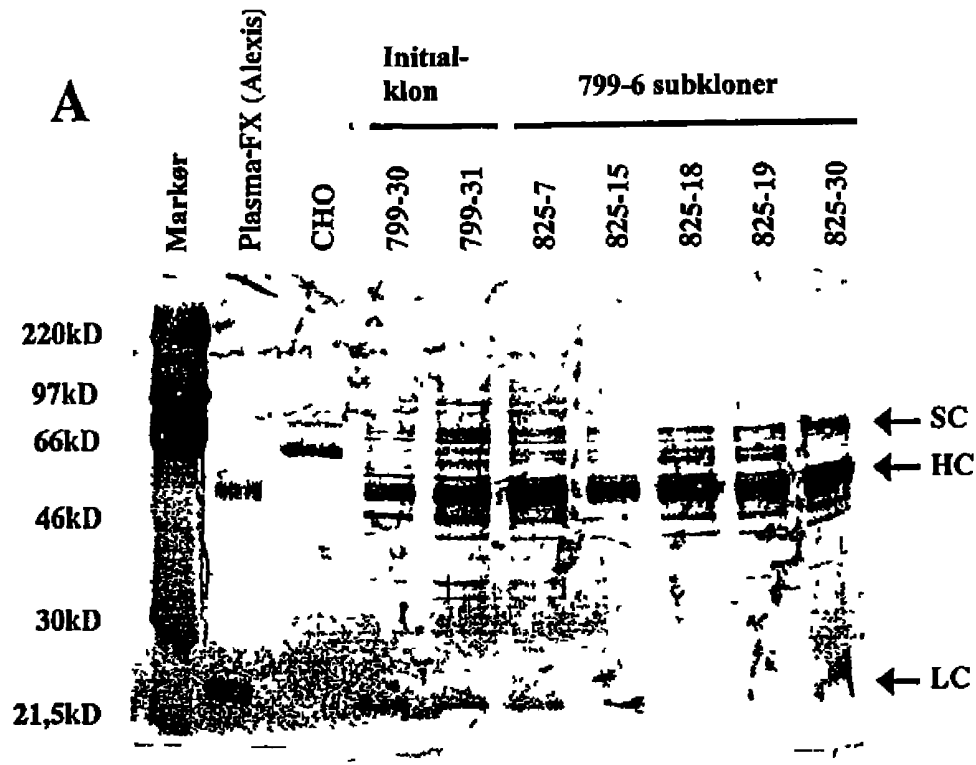
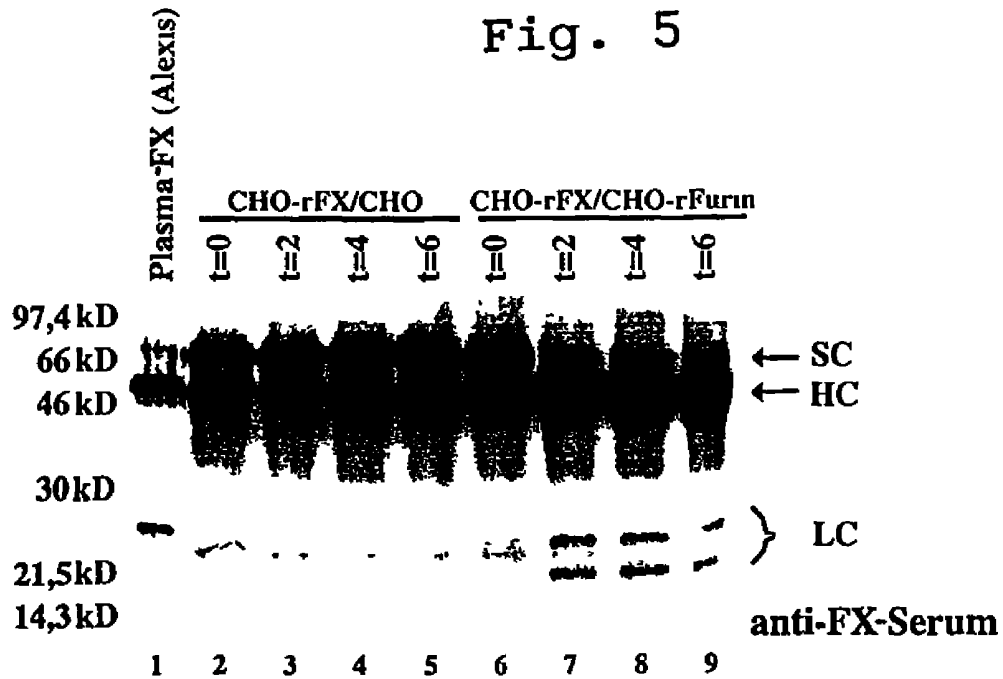


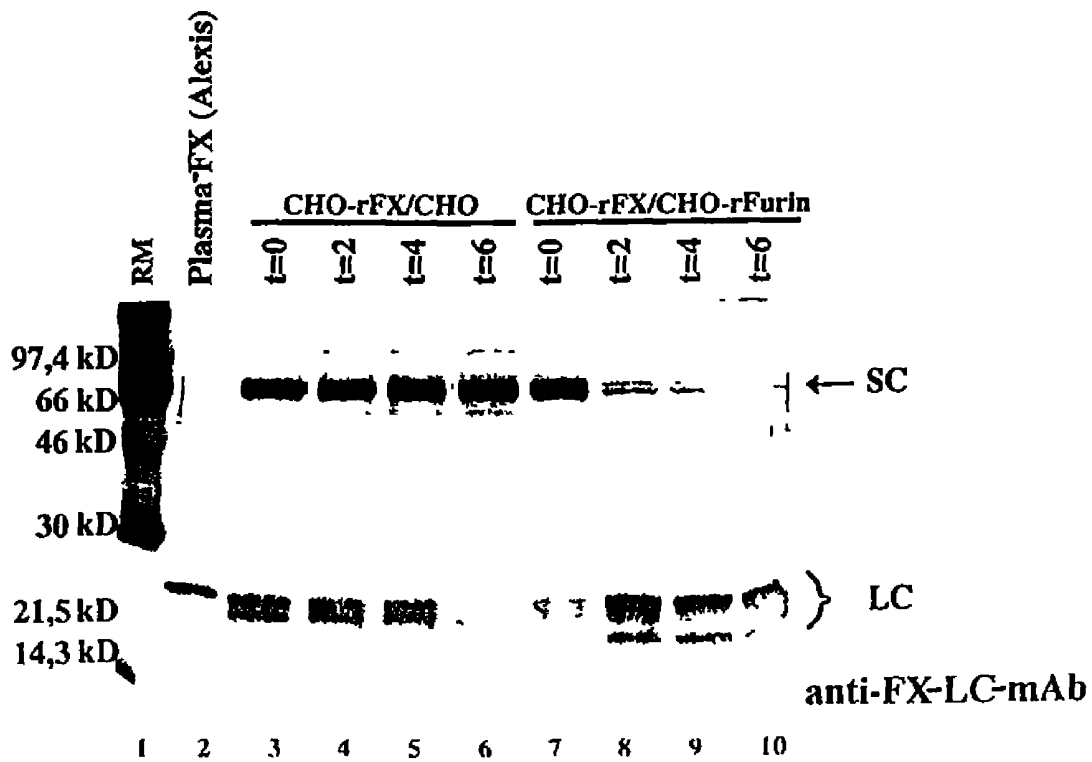
Fig. 4

Fig. 5

A

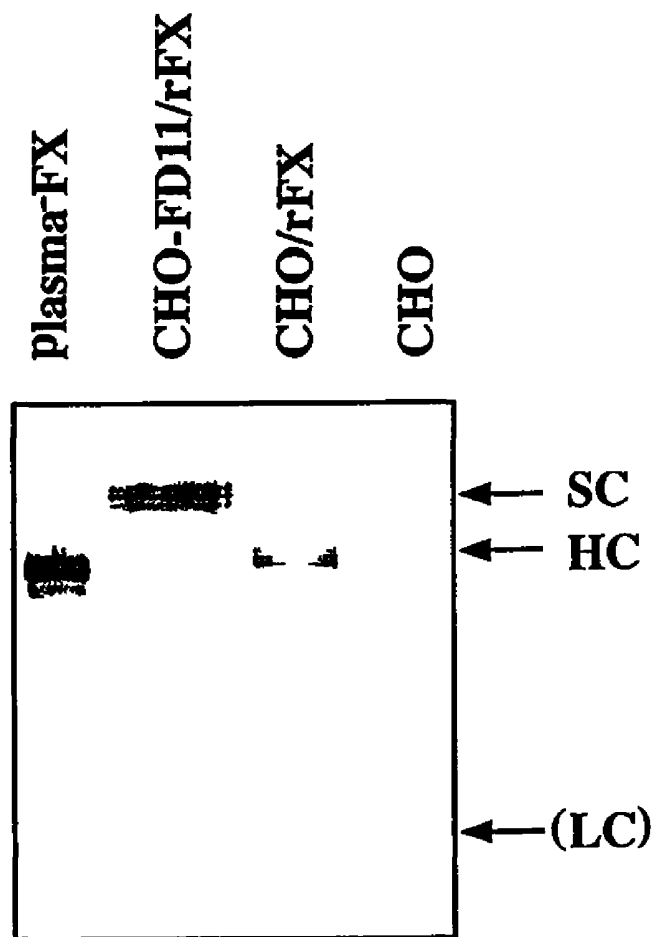


B



t = inkubasjon ved 37°C
angitt i timer

Fig. 6



Oligonukleotidpar
som ble brukt til kloning

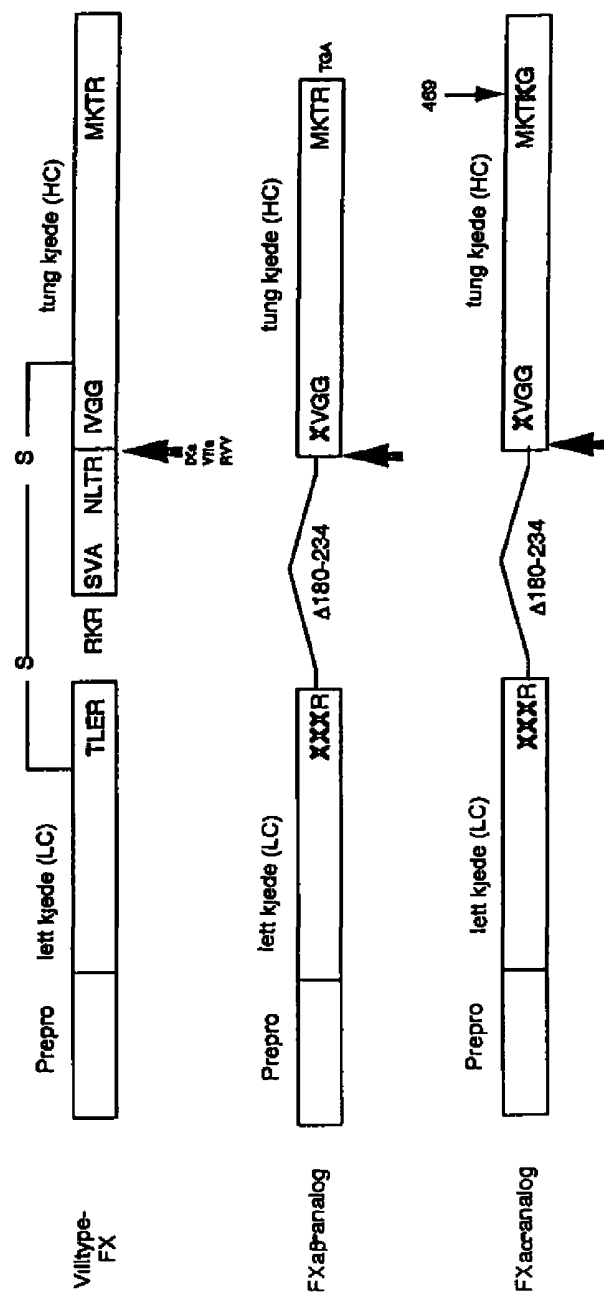


Fig. 7

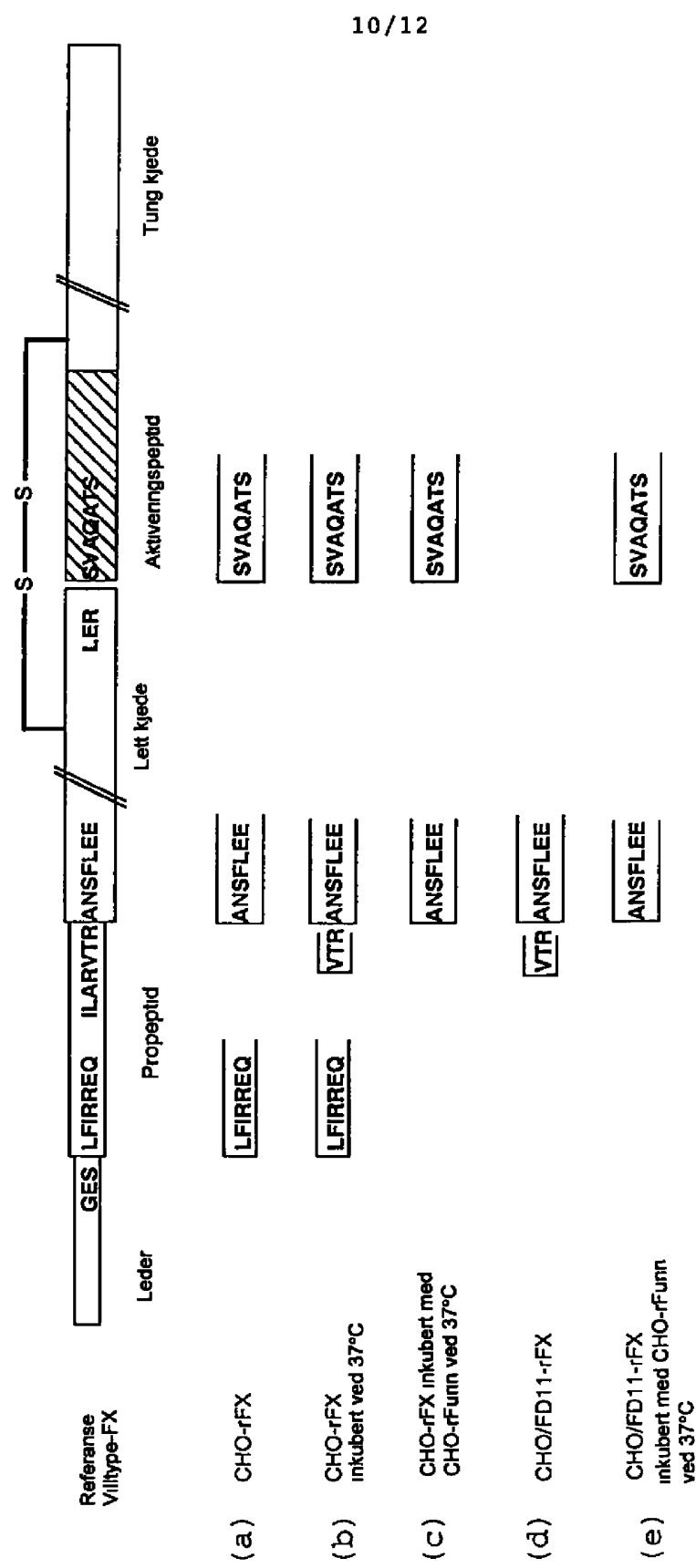
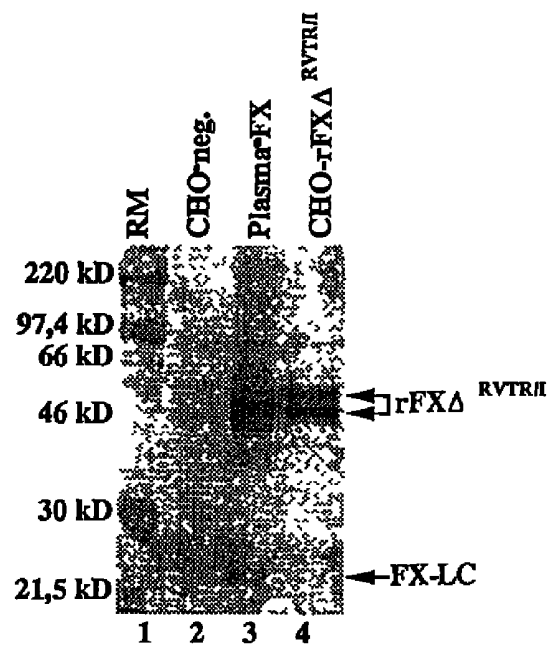
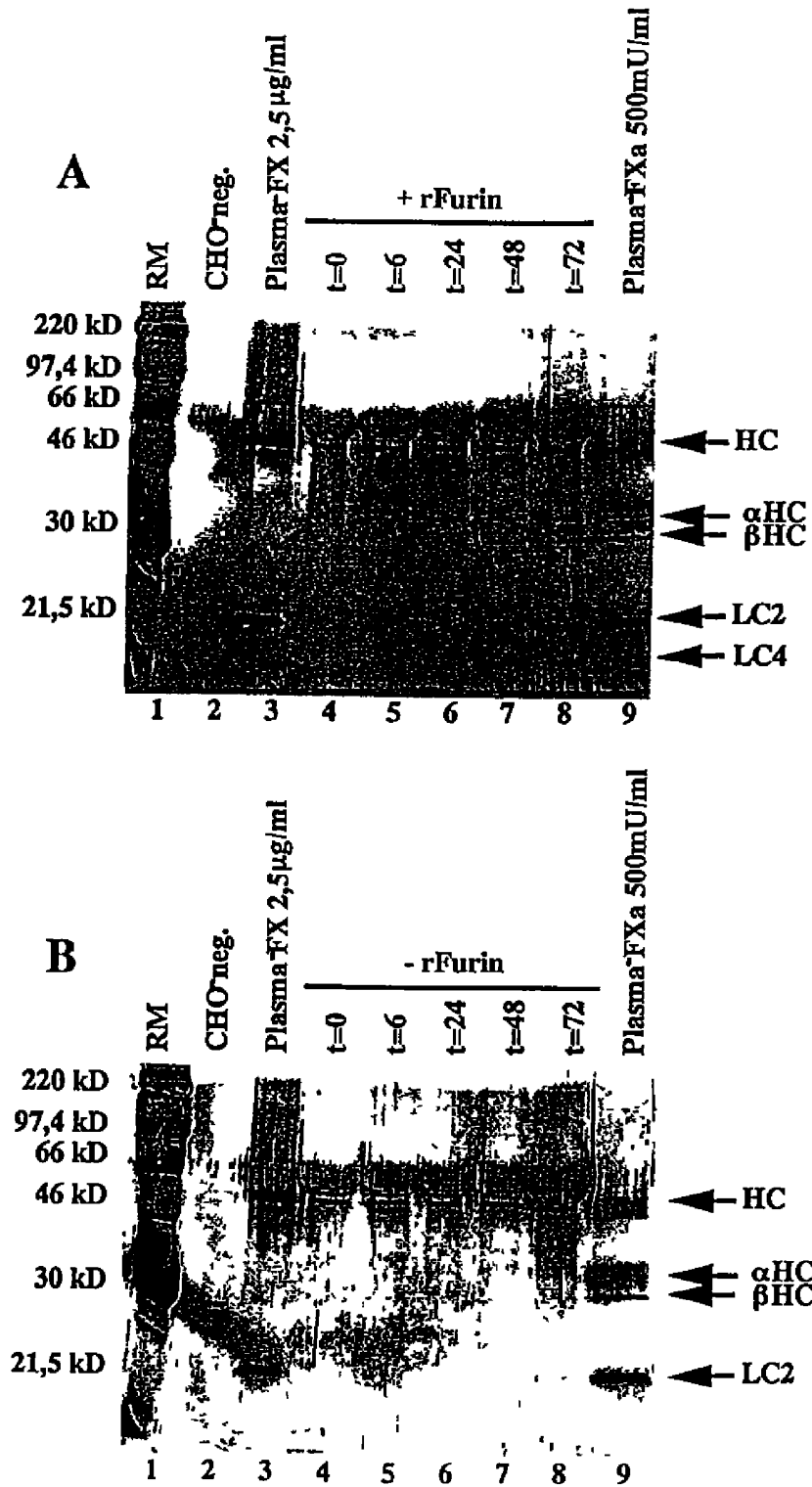


Fig. 8



Figur 9



Figur 10