PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2003-2454

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7] :
C12N 9/64

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.03.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.03.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/0100477**
(33) Země priority: **DK**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 3/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/DK2002/000189**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/077218**

(71) Přihlašovatel:
NOVO NORDISK HEALTH CARE AG, Zurich, CH

(72) Původce:
Persson Egon, Akarp, SE

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4, 14000

(54) Název přihlášky vynálezu:
Deriváty koagulačního faktoru VII

(57) Anotace:
Navrhované řešení popisuje nové polypeptidy lidského koagulačního faktoru VII, které mají koagulační aktivitu, stejně tak jako konstrukty nukleové kyseliny kódující tyto varianty, vektory a hostitelské buňky obsahující a exprimující nukleovou kyselinu, léčebné prostředky, použití a způsoby léčby.

CZ 2003 - 2454 A3

09.01.04
PV 2003-2454
9774

DERIVÁTY KOAGULAČNÍHO FAKTORU VII

OBLAST TECHNIKY

Navrhovaný vynález se týká nových derivátů lidského koagulačního faktoru VII, polypeptidů faktoru VII, polynukleotidových konstruktů kódujících tyto polypeptidy, vektorů a hostitelských buněk obsahujících a exprimujících polynukleotid, léčebných složení obsahujících deriváty faktoru VII, použití a způsobů léčby.

DOSAVADNÍ STAV TECHNIKY

Koagulace krve je proces, který se skládá ze souboru interakcí různých krevních složek (nebo faktorů), které nakonec dávají vznik krevní sraženině. Obecně, krevní složky, které se účastní procesu, který byl zmíněn jako koagulační „kaskáda", jsou enzymaticky neaktivní proteiny (proenzymy nebo zymogeny), které jsou působením aktivátoru (který je sám o sobě aktivovaný koagulační faktor) přeměněny na proteolytické enzymy. Koagulační faktory, které prodělaly tuto přeměnu jsou obecně popisovány jako „aktivní faktory", a jsou označovány přidáním písmene „a" ke jménu koagulačního faktoru (např. faktor VIIa).

Spuštění procesu zastavujícího krvácení je vyvoláno tvorbou komplexu mezi tkáňovým faktorem odhaleným při poškození cévní stěny, a faktorem VIIa. Tento komplex poté přeměňuje faktory IX a X na jejich aktivní formy. Faktor Xa přeměňuje omezené množství protrombinu na trombin na buňkách tkáně s tímto faktorem. Trombin aktivuje krevní destičky a faktory V a VIII se mění na faktory Va a VIIIa, oba kofaktory v dalším procesu vedou k plné aktivaci trombinu. Tento proces zahrnuje tvorbu faktoru Xa faktorem IXa (v komplexu s faktorem VIIIa) a vyskytuje se na povrchu aktivovaných krevních destiček. Trombin nakonec přeměňuje fibrinogen na fibrin za tvorby fibrinové sraženiny.

Faktor VII je stopový plazmatický glykoprotein, který cirkuluje v krvi jako jednořetězcový zymogen. Zymogen je katalyticky neaktivní. Jednořetězcový faktor VII může být *in vitro* přeměněn na dvouřetězcový faktor VIIa faktorem Xa, faktorem XIIa, faktorem IXa, faktorem VIIa nebo trombinem. Faktor Xa je považován za největší fyziologický aktivátor faktoru VII. K přeměně zymogenu faktoru VII na aktivovanou dvouřetězcovou molekulu dochází štěpením vnitřní Arg_{152}-Ile_{153} peptidové vazby.

Často je u subjektu nutné stimulovat nebo výběrově blokovat koagulační kaskádu. Faktor VIIa byl používán pro kontrolu poruch krvácení, které měly různé příčiny, jako je nedostatek koagulačního faktoru (např. hemofilie A a B nebo nedostatek koagulačních faktorů XI nebo VII) nebo inhibitory koagulačního faktoru. Faktor VIIa byl také používán pro kontrolu

nadměrného krvácení vyskytujícího se u subjektů s normálně fungující krevní koagulační kaskádou (žádné nedostatky koagulačního faktoru nebo inhibitory proti některému z koagulačních faktorů). Takové krvácení může být například způsobeno špatnou funkcí krevních destiček, trombocytopenií nebo Willebrandovou chorobou. Krvácení je také velký problém ve spojení s chirurgií a jinými formami poškození tkáně.

Evropský patent 200 421 (ZymoGenetics) popisuje nukleotidovou sekvenci kódující lidský faktor VII a expresi rekombinantního faktoru VII v savčích buňkách.

Dickinson *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14379-14384, 1996) popisuje polypeptidy faktoru VII, kde Lys157, Val158, Glu296, Met298, Asp334, Ser336 nebo Lys337 byly jednotlivě nahrazeny Ala. Iwanaga *et al.* (Thromb. Haemost. (dodatek, srpen 1999) 466, abstrakt 1474) popisuje varianty faktoru VIIa, kde byly zbytky 316 až 320 odstraněny nebo byly zbytky 311 až 322 nahrazeny odpovídajícími zbytky z trypsinu.

Antikoagulanty jako je heparin, kumarin, deriváty kumarinu, deriváty indandionu nebo jiných činidel, mohou být použity pro výběrovou blokaci koagulační kaskády u pacientů, například během dialýzy ledvin, nebo při léčbě závažné trombózy cév, při diseminované intravaskulární koagulaci (DIC) a u pacientů s dalšími zdravotními poruchami. Například, léčba heparinem nebo mimotělní léčba ionty citrátu (US 4 500 309), může být použita při dialýze, aby se předešlo koagulaci během průběhu léčby. Heparin je také používán pro předcházení závažné cévní trombózy u pacientů podstupujících chirurgický zásah.

Léčba heparinem nebo jinými antikoagulanty může mít nicméně nežádoucí vedlejší účinky. Dostupné antikoagulanty obecně působí spíše než specificky v místě srážení, v celém těle. Heparin může například způsobit těžká krvácení. Navíc, s jeho poločasem rozpadu přibližně 80 minut je heparin rychle odstraněn z krve, což nutí k jeho častému podávání. Jelikož heparin působí jako kofaktor pro antitrombin III (AT III), a AT III je rychle odstraněn při léčbě DIC, je často obtížné udržet přesné dávkování heparinu, což vede k nutné průběžné kontrole hladin AT III a heparinu. Heparin je také neúčinný při extrémním odstranění AT III. Dále, dlouhodobé používání heparinu může také zvýšit shlukování krevních destiček a redukovat počet krevních destiček, což má za následek vznik osteoporózy. Deriváty indandionu mohou mít také toxické vedlejší účinky.

Navíc k výše krátce popsaným antikoagulantům byly nalezeny další přirozeně se vyskytující proteiny, které mají antikoagulační aktivitu. Například, Reutelingsperger (US 4 736 018) izoloval antikoagulační proteiny z aorty skotu a z lidských pupečních žil a tepen. Maki *et al.* (US 4 732 891) popisuje antikoagulační proteiny odvozené od lidské placenty. Navíc, AT III

byl navrhován jako léčebný koagulant (Schipper *et al.*, Lancet 1 (8069): 854-856 (1978); Jordan, US 4 386 025; Bock *et al.*, US 4 517 294).

Přibližně u 30 % nebo více pacientů, u kterých byla provedena plastika krevních cév, odstranění výstelky artérií nebo bypass štěp, trombóza a/nebo množení buněk hladkého svalstva způsobuje opětovné uzavření cév a následně neúspěšnou rekonstrukční chirurgii. Toto uzavření cév následující po chirurgii je známé jako restenóza. Restenóza je výsledek komplexu vzájemného působení biologických procesů zahrnujících ukládání krevních destiček a tvorbu krevní sraženiny, uvolňování hemotaktických a mitogenních faktorů a putování a rozmnožování buněk hladkého svalstva cév do vnitřního obalu rozšířeného arteriálního segmentu.

Inhibice shlukování krevních destiček v místech mechanického poškození může omezit rychlost restonózy u lidí. Jelikož shlukování krevních destiček se vyskytuje v místech akutních cévních poranění, tvorba krevní sraženiny v těchto místech může být zodpovědná za aktivaci krevních destiček a jejich následné shlukování.

Mezinárodní přihláška WO 92/15686 popisuje inaktivovaný faktor VIIa, polynukleovou kyselinu a savčí buněčné linie pro produkci inaktivovaného faktoru VIIa a složení obsahující inaktivovaný faktor VIIa pro inhibici koagulace krve.

Mezinárodní přihláška WO 94/27631 popisuje způsoby inhibice cévní restenózy, aktivity tkáňového faktoru a ukládání krevních destiček.

Mezinárodní přihláška WO 96/12800 popisuje způsob léčby akutního uzavření koronární tepny zahrnující individuální složení, které obsahuje inaktivovaný faktor VIIa ve spojení s tkáňovým aktivátorem plazminogenem nebo streptokinázou.

Většina proteinů podaných do oběhu je u savců rychle odstraněna ledvinami. Tento problém může být částečně překonán podáváním velkého množství proteinu nebo opakovaným podáváním. Nicméně, vyšší dávky proteinu mohou vyvolat vznik protilátek, které mohou vázat a inaktivovat protein a/nebo usnadnit odstranění proteinu z těla subjektu. Opakované podávání léčebného proteinu je v podstatě neúčinné a může být nebezpečné, neboť může vyvolávat alergickou reakci.

Různé pokusy vyřešit problémy spojené s proteinovou léčbou zahrnují mikroobaly, lipozómový směrovaný systém, podávání fúzních proteinů a chemická pozměnění. Nejslibnější z těchto způsobů do této doby je pozměnění léčebného proteinu kovalentním připojením polymerů polyalkylenoxidu, obzvláště polyethylenglykolu (PEG). Například, US 4 179 337 popisuje použití PEG nebo polypropylenglykolu vázanému k proteinům, aby poskytovaly fyziologicky aktivní neimunogenní ve vodě rozpustné polypeptidové složení.

Nucci *et al.* popisuje různé proteiny, které byly pozměněny přidáním PEG zahrnující adenozin deamidázu, L-asparaginázu, interferon alfa 2b (IFN-α2b), superoxid dismutázu, streptokinázu, tkáňový plazminogenový aktivátor (tPA), urokinázu, urikázu, hemoglobin, interleukiny, interferony, TGF-beta, EGF, a další růstové faktory (Nucci *et al.*, 1991, Adv. Drug Delivery Rev. 4:133-151). Takové pokusy vyústily v trochu delší poločas rozpadu proteinů a v redukci proteinové imunogenicity.

Typicky PEGylace proteinů zahrnuje aktivační PEG s funkční skupinou, která reaguje s lysinovým zbytkem na povrchu proteinu. Jestliže je pozměnění proteinu dokončeno, je aktivita proteinu obyčejně ztracena. Postupy pozměnění, které umožňují částečnou PEGylaci proteinu obyčejně vyúsťují v pouze 50 % ztrátu aktivity a ve značně zvýšený poločas rozpadu v séru, takže celková účinná dávka proteinu je nižší.

Současné pokroky ve způsobech PEGylace proteinu zahrnují aktivované PEG činidla, která reagují s thiolovými skupinami proteinu, s následným kovalentním připojením PEG k cysteinu, jehož zbytek byl vložen do místa přirozeně se vyskytujícího lysinu v proteinu. Shaw *et al.* (US 5 166 322) popisuje specifické varianty IL-3, které mají cystein vložený do specifických míst v přirozeně se vyskytující aminokyselinové sekvenci. Sulfhydrylové reaktivní sloučeniny (např. aktivovaný polyethylenglykol) jsou poté připojeny k těmto cysteinům reakcí s variantou IL-3. Katre *et al.* (US 5 206 344) popisuje specifické varianty IL-2, které obsahují cystein vložený do specifického místa v přirozeně se vyskytující aminokyselinové sekvenci. Varianta IL-2 následně reaguje s aktivovaným polyethylenglykolovým činidlem, aby byla tato část připojena k cysteinu.

Stále v současném stavu techniky existuje potřeba zdokonalených polypeptidů faktoru VII majících prodlouženou koagulační nebo antikoagulační aktivitu. Konkrétně, potřebné jsou polypeptidy, které mají zvýšený poločas rozpadu v séru bez nežádoucích vedlejších účinků, jako je systémová aktivace koagulačního systému a krvácení spojené s běžnou léčbou, a které mohou být podávány v poměrně nízkých dávkách, takže je odstraněno opakované podávání většího množství proteinu.

PODSTATA VYNÁLEZU

Vynález se týká nových polypeptidů koagulačního faktoru VIIa se stejnou nebo vyšší aktivitou ve srovnání s kontrolním typem faktoru VIIa a s deriváty faktoru VII mající zvýšený poločas rozpadu v séru.

Byly nalezeny oblasti v molekule faktoru VIIa, kde mohou nastat změny v primární struktuře nebo jiná pozměnění, aniž dojde k ovlivnění nebo omezení biologické aktivity faktoru VIIa. Oblasti ve struktuře faktoru VIIa, které byly určeny, že nejsou zahrnuty do vazby

09-01-04

k tkáňovému faktoru nebo k faktoru X, zahrnují aminokyseliny v pozici 247 až 260 a 393 až 406 v SEQ ID NO:1. Specificky, aminokyseliny v pozicích Q250, R396 a P406 v sekvenci SEQ ID NO:1 byly analyzovány pro vložení cysteinových (Cys) zbytků. Vložení Cys zbytků je následováno spojením s chemickou skupinou, např. polyethylenglykolem (PEG), aby se zvýšil poločas rozpadu derivátu faktoru VII v oběhu. Cysein byl také vložen do C-koncové sekvence SEQ ID NO:1 (týkající se 407C), s následným napojením PEG. Také toto přidání cysteinu k C-koncové sekvenci SEQ ID NO:1 je bez snížení proteolytické aktivity polypeptidů faktoru VIIa. Tyto deriváty faktoru VII, např. polypeptid faktoru VII spojený s molekulou PEG, jsou léčebně užitečné v situacích, kdy je zapotřebí prodloužený účinek polypeptidů faktoru VII, např. v situacích, kdy je opakované podávání nebo podávání velkého množství polypeptidu faktoru VII nevhodné nebo problematické. Navíc, polypeptidy faktoru VIIa podle navrhovaného vynálezu s vloženými aminokyselinami (např. Cys zbytek) schopné spojení s chemickou skupinou v pozicích v molekule faktoru VIIa, které neovlivňují proteolytickou aktivitu, mohou být použity pro vložení jakékoliv funkční skupiny spojeného faktoru VII.

Z prvního hlediska, vynález poskytuje polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopná spojení s chemickou skupinou a přičemž polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z druhého hlediska, vynález poskytuje polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 byla nahrazena odlišnou aminokyselinou. Tím je rozuměno, že jakákoliv aminokyselina v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 může být nahrazena odlišnou aminokyselinou bez podstatného snížení aktivity polypeptidu faktoru VII.

Ze třetího hlediska, vynález poskytuje polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 byla nahrazena odlišnou aminokyselinou. Tím je rozuměno, že první písmeno v R396, Q250 a P406 představuje aminokyselinu vyskytující se přirozeně ve vyznačené pozici v SEQ ID NO:1.

Z dalšího hlediska, vynález poskytuje polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde aminokyselina schopná spojení s chemickou skupinou byla vložena do sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty v pozici, kde polypeptid

faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa. Tím je rozuměno, že aminokyselina může být vložena do sekvence SEQ ID NO:1 bez nahrazení nějaké aminokyseliny. Vložení aminokyseliny může být ve stejném místě v sekvenci SEQ ID NO:1, kde je aminokyselina dále nahrazena. Takto může být v jednom zpracování vložení aminokyseliny následováno nahrazením aminokyseliny nebo naopak.

Z dalšího hlediska, vynález poskytuje polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde aminokyselina schopná spojení s chemickou skupinou byla přidána k N- nebo C-konci SEQ ID NO:1 nebo její varianty.

Zde užívaný pojem „aminokyselina", představuje jednu nebo více aminokyselin. Tím je rozuměno, že aminokyselina nahrazující jinou aminokyselinu, nebo která je vložena nebo přidána k polypeptidu faktoru VII, je schopna spojení s jakoukoliv chemickou skupinou, což zvýší skutečnou molekulární hmotnost polypeptidu faktoru VII. Toto spojení s chemickou skupinou zahrnuje, ale není takto omezeno, kovalentní připojení polyethylenglykolu (PEG), monomethoxypolyethylenglykolu, dextranu, poly-(N-vinylpyrrolidon)-polyethylenglykolu, homopolymerů propylenglykolu, kopolymeru polypropylenoxid/ethylenoxidu, polypropylenglykolu, polyoxyethylovaným polyolům (např. glycerol) a polyvinylalkoholu, kolominových kyselin nebo dalších polymerů založených na uhlohydrátech, polymerů aminokyselin a derivátů biotinu.

Výhodně je chemická skupina biologicky slučitelný, netoxický, neimunogenní a ve vodě rozpustný polymer. Nejvýhodněji je chemická skupina je vodě rozpustná ve všech částech.

Nahrazení, vložení nebo přidání aminokyseliny a spojení s chemickou skupinou je bez podstatného snížení koagulační aktivity aktivované formy derivátu faktoru VII ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Zde užívaný pojem „polypeptid faktoru VII", představuje jakýkoliv protein mající aminokyselinovou sekvenci 1 až 406 nativního lidského faktoru VII (SEQ ID NO:1) nebo její varianty. To zahrnuje lidský faktor VII, lidský faktor VIIa a jejich varianty.

Zde užívané pojmy „faktor VII" nebo „FVII", představují produkt skládající se z neaktivní formy (faktor VII). Zde užívané pojmy „faktor VIIa" nebo „FVIIa", představují produkt skládající se z aktivované formy (faktor VIIa). To zahrnuje proteiny, které mají aminokyselinovou sekvenci 1 až 406 nativního lidského faktoru VII nebo faktoru VIIa. To dále zahrnuje proteiny s mírně pozměněnou aminokyselinovou sekvencí, například, pozměněný N-terminální konec zahrnující odstraňování nebo přidávání na N-terminálním aminokyselinovém konci, pokud si tyto proteiny v podstatě ponechají aktivitu faktoru VIIa.

„Faktor VII“ nebo „faktor VIIa“ v rámci výše zmíněné definice může zahrnovat přírodní alelické variace, které mohou existovat a vyskytovat se u jednoho i druhého jedince. Dále se může lišit stupeň a místo glykosylace nebo jiné post-translační změny v závislosti na vybraných hostitelských buňkách a povaze hostitelského buněčného prostředí.

Zde užívané pojmy „varianta“ nebo „varianty“ představují lidský faktor VII mající sekvenci SEQ ID NO:1, kde jedna nebo více aminokyselin původního proteinu bylo nahrazeno jinou aminokyselinou, a/nebo kde jedna nebo více aminokyselin původního proteinu bylo odstraněno, a/nebo kde jedna nebo více aminokyselin bylo vloženo do proteinu, a/nebo kde jedna nebo více aminokyselin bylo přidáno k původnímu proteinu. Toto přidání může probíhat jak na N-terminálním konci nebo na C-terminálním konci původního proteinu, nebo na obou.

Zde používaný pojem „v podstatě stejná nebo zvýšená aktivita ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa“, představuje aktivitu větší než 70 % aktivity rekombinantního kontrolního typu lidského faktoru VIIa. V jednom zpracování je aktivita větší než 80 % aktivity rekombinantního kontrolního typu lidského faktoru VIIa. V jiném zpracování je aktivita větší než 90 % aktivity rekombinantního kontrolního typu lidského faktoru VIIa. V dalším zpracování je aktivita větší než 100 % aktivity rekombinantního kontrolního typu lidského faktoru VIIa. V dalším zpracování je aktivita větší než 120 % aktivity rekombinantního kontrolního typu lidského faktoru VIIa. V dalším zpracování je aktivita větší než 200 % aktivity rekombinantního kontrolního typu lidského faktoru VIIa. V dalším zpracování je aktivita větší než 400 % aktivity rekombinantního kontrolního typu lidského faktoru VIIa.

Zde používaný pojem „derivát faktoru VII“ představuje polypeptid faktoru VII mající sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde jedna nebo více aminokyselin původního peptidu byly chemicky pozměněny, např. alkylací, PEGylací, acylací, tvorbou esteru nebo tvorbou amidu nebo podobně. To zahrnuje PEGylovaný lidský faktor VIIa, cystein-PEGylovaný lidský faktor VIIa a jejich varianty.

Pojem „PEGylovaný lidský faktor VIIa“ představuje faktor VIIa mající PEG molekulu připojenou k aminokyselině lidského polypeptidu faktoru VIIa.

Pojem „cystein-PEGylovaný lidský faktor VIIa“ představuje faktor VIIa mající PEG molekulu spojenou s sulfhydrylovou skupinou cysteinu vloženého do lidského faktoru VIIa.

Zde používaný pojem „odlišná aminokyselina“ představuje jednu nebo více aminokyselin, které jsou odlišné od aminokyseliny přirozeně se vyskytující v této pozici. To zahrnuje aminokyseliny, které mohou být kódovány polynukleotidem. Nejvhodněji je odlišná

aminokyselina v přírodní L-formě a může být kódována polynukleotidem. Specifickým příkladem je L-cystein (Cys).

Zde používaný pojem „aktivita" znamená schopnost polypeptidu faktoru VII nebo jeho varianty přeměnit jeho substrát faktor X na aktivní faktor Xa. Aktivita polypeptidu faktoru VII může být měřena „*In Vitro* proteolytickým rozborem" (viz příklad 6).

Zde používaný pojem „polyethylenglykol" nebo „PEG" představuje sloučeninu polyethylenglykol nebo její derivát, s vazebnými nebo bez vazebných činidel, s vazebnými nebo aktivačními skupinami (např. thiolová, triflátová, azirdinová, oxiranová nebo nejvýhodněji maleimidová skupina). Příkladem aktivovaných PEG sloučenin podle vynálezu jsou sloučeniny jako je maleimidomonomethoxy-PEG.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Zde používaný pojem „chemická skupina" představuje jednu nebo více chemických skupin.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty, přičemž aminokyselina je

spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty, přičemž aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje složení obsahující derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje složení obsahující derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje složení obsahující derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje složení obsahující derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty, přičemž aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost

polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje složení obsahující derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty, přičemž aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje léčebné složení obsahující derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa; a popřípadě léčebně přijatelný nosič.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje léčebné složení obsahující derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa; a popřípadě léčebně přijatelný nosič.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje léčebné složení obsahující derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa; a popřípadě léčebně přijatelný nosič.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje léčebné složení obsahující derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její

variantu, kde byla aminokyselina vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty, přičemž aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa; a popřípadě léčebně přijatelný nosič.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje léčebné složení obsahující derivát faktoru VII zahrnující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty, přičemž aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa; a popřípadě léčebně přijatelný nosič.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje inaktivovaný polypeptid faktoru VII, kde polypeptid faktoru VII je dále pozměněn v jeho katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX. V jednom zpracování je inaktivovaný polypeptid faktoru VII pozměněn v jeho katalytickém místě serin proteinázovým inhibitorem. V dalším zpracování je inaktivovaný polypeptid faktoru VII pozměněn v jeho katalytickém místě peptidem s halomethylketonem vybíraným ze skupiny obsahující: Phe-Phe-Arg chlormethylketon, Phe-Phe-Arg chlormethylketon, D-Phe-Phe-Arg chlormethylketon, D-Phe-Phe-Arg chlormethylketon, Phe-Pro-Arg chlormethylketon, D-Phe-Pro-Arg chlormethylketon, Phe-Pro-Arg chlormethylketon, D-Phe-Pro-Arg chlormethylketon, L-Glu-Gly-Arg chlormethylketon a D-Glu-Gly-Arg chlormethylketon, Dansyl-Phe-Phe-Arg chlormethylketon, Dansyl-Phe-Phe-Arg chlormethylketon, Dansyl-D-Phe-Phe-Arg chlormethylketon, Dansyl-D-Phe-Phe-Arg chlormethylketon, Dansyl-Phe-Pro-Arg chlormethylketon, Dansyl-D-Phe-Pro-Arg chlormethylketon, Dansyl-Phe-Pro-Arg chlormethylketon, Dansyl-D-Phe-Pro-Arg chlormethylketon, Dansyl-L-Glu-Gly-Arg chlormethylketon a Dansyl-D-Glu-Gly-Arg chlormethylketon.

Zde používaný pojem „inaktivovaný polypeptid faktoru VII“ představuje polypeptid faktoru VII, který nemá schopnost aktivovat plazmatický faktor X nebo IX.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje inaktivovaný derivát faktoru VII, kde inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, a který má pozměněné katalytické místo, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a který je dále spojen s chemickou

skupinou, který zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost inaktivovaného polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde

byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje složení obsahující inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje složení obsahující inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje složení obsahující inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje složení obsahující inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje složení obsahující inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje složení obsahující inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje léčebné složení obsahující inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000; a popřípadě léčebně přijatelný nosič.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje léčebné složení obsahující inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000; a popřípadě léčebně přijatelný nosič.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje léčebné složení obsahující inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici

09.01.04

vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000; a popřípadě léčebně přijatelný nosič.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje léčebné složení obsahující inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000; a popřípadě léčebně přijatelný nosič.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje léčebné složení obsahující inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000; a popřípadě léčebně přijatelný nosič.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje léčebné složení obsahující inaktivovaný derivát faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000; a popřípadě léčebně přijatelný nosič.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktor VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je

09-01-04

schopna spojení s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktor VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktor VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktor VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktor VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty.

V jednom zpracování je polynukleotidovým konstruktem vektor.

Pojem „polynukleotid" představuje jedno- nebo dvojřetězcový polymer deoxyribonukleotidových nebo ribonukleotidových bází čtených od 5′ k 3′ konci. Polynukleotidy zahrnují RNA a DNA, a mohou být izolovány z přírodních zdrojů, syntetizovány *in vitro*, nebo připraveny kombinací přírodních a umělých molekul. Délka molekuly polynukleotidu je zde dána z hlediska nukleotidů (zkratka „nt") nebo párů bází (zkratka „bp"). Pojem „nukleotidy" je používán pro jedno- a dvojřetězcové molekuly tam, kde to souvislost umožňuje. Když je pojem použit pro dvojřetězcové molekuly, je použit pro znázornění celé délky a tím se rozumí, že je to ekvivalent pojmu „páry bází". Odborníci v současném stavu techniky rozumí, že dva řetězce dvojřetězcového polynukleotidu se mohou mírně lišit v délce, a že jejich konce mohou být různé jako výsledek enzymatického štěpení; takto, ne všechny nukleotidy dvojřetězcové molekuly polynukleotidu musí být párovány. Takové nespárované konce obecně nebudou přesahovat délku 20 nt.

Zde používaný pojem „vektor" představuje jakoukoli kyselinu nukleovou schopnou množit se v hostitelských buňkách. Takto může vektor být autonomně se množící vektor, např. vektor,

09.01.04

který existuje jako extrachromozomální část, jehož množení je nezávislé na chromozomálním množení, např. plazmid. Jinak může být vektor vložen do hostitelské buňky, je začleněn do genomu hostitelské buňky a je zmnožen dohromady s chromozómem, do kterého byl začleněn. Volba vektoru bude často závislá na hostitelských buňkách, do kterých bude začleněn. Vektory zahrnují, ale nejsou tak limitovány, plazmidové vektory, fágové vektory, viry nebo kosmidové vektory. Vektory obyčejně obsahují počátek replikace a alespoň jeden výběrový gen, např. gen, který kóduje produkt, který je snadno zjistitelný nebo jehož přítomnost je potřebná pro buněčný růst.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje eukaryotické hostitelské buňky obsahující polynukleotidový konstrukt zahrnující sekvenci kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje eukaryotické hostitelské buňky obsahující polynukleotidový konstrukt zahrnující sekvenci kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje eukaryotické hostitelské buňky obsahující polynukleotidový konstrukt zahrnující sekvenci kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje eukaryotické hostitelské buňky obsahující polynukleotidový konstrukt zahrnující sekvenci kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje eukaryotické hostitelské buňky obsahující polynukleotidový konstrukt zahrnující sekvenci kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je

09-01-04

schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty.

Zde používaný pojem „eukaryotické hostitelské buňky" představuje jakékoliv buňky, včetně hybridních buněk, ve kterých může být exprimována heterologní DNA. Typické hostitelské buňky zahrnují, ale nejsou tak limitovány, hmyzí buňky, kvasinky, savčí buňky, zahrnující lidské buňky jako jsou BHK, CHO, HEK a COS buňky. V postupu podle navrhovaného vynálezu jsou kultivované hostitelské buňky výhodně savčí buňky, nejvýhodněji zavedené savčí buněčné linie, zahrnující CHO (např. ATCC CCL 61), COS-1 (např. ATCC CRL 1650), buňky ledvin křečka (BHK) a HEK293 (např. ATCC CRL 1573; Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977) buněčné linie.

Nejvýhodnější BHK buněčná linie je tk$^-$ ts13 BHK buněčná linie (Waechter and Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982), které jsou zde popisovány jako BHK 570 buňky. BHK 570 buněčná linie je dostupná od American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, pod ATCC přístupovým číslem CRL 10314. Tk$^-$ ts13 BHK buněčná linie je také dostupná pod ATCC přístupovým číslem CRL 1632.

Další vhodné buněčné linie zahrnují Rat Hep I (krysí nádorové buňky jater; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (krysí nádorové buňky jater; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), buňky lidských plic (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9,1) a DUKX buňky (Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:4216-4220, 1980). Užitečné jsou také 3T3 buňky, Namalwa buňky, myelomy a fůze myelomů s jinými buňkami. V jednom zpracování jsou eukaryotické hostitelské buňky savčího původu. V dalším zpracování jsou eukaryotické hostitelské buňky vybírány ze skupiny obsahující CHO buňky, BHK buňky nebo HEK buňky.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje transgenní zvíře exprimující polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje transgenní zvíře exprimující polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje transgenní zvíře exprimující polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její

09.01.04

variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje transgenní zvíře exprimující polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje transgenní zvíře exprimující polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje transgenní rostlinu exprimující polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje transgenní rostlinu exprimující polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje transgenní rostlinu exprimující polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje transgenní rostlinu exprimující polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje transgenní rostlinu exprimující polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1

09-01-04

nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci eukaryotických hostitelských buněk ve vhodném růstovém médiu, které obsahují polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, za podmínek umožňujících syntézu proteinu z polynukleotidového konstruktu a získání polypeptidu z kultivačního média.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci eukaryotických hostitelských buněk ve vhodném růstovém médiu, které obsahují polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, za podmínek umožňujících syntézu proteinu z polynukleotidového konstruktu a získání polypeptidu z kultivačního média.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci eukaryotických hostitelských buněk ve vhodném růstovém médiu, které obsahují polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, za podmínek umožňujících syntézu proteinu z polynukleotidového konstruktu a získání polypeptidu z kultivačního média.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci eukaryotických hostitelských buněk ve vhodném růstovém médiu, které obsahují polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, za podmínek umožňujících syntézu proteinu z polynukleotidového konstruktu a získání polypeptidu z kultivačního média.

09.01.04

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci eukaryotických hostitelských buněk ve vhodném růstovém médiu, které obsahují polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty, za podmínek umožňujících syntézu proteinu z polynukleotidového konstruktu a získání polypeptidu z kultivačního média.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje získání polypeptidu faktoru VII z mléka produkovaného transgenním zvířetem, které exprimuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje získání polypeptidu faktoru VII z mléka produkovaného transgenním zvířetem, které exprimuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje získání polypeptidu faktoru VII z mléka produkovaného transgenním zvířetem, které exprimuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje získání polypeptidu faktoru VII z mléka produkovaného transgenním zvířetem, které exprimuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

09.01.04

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje získání polypeptidu faktoru VII z mléka produkovaného transgenním zvířetem, které exprimuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci buněk transgenních rostlin exprimujících polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, a získání polypeptidu faktoru VII z transgenní rostliny.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci buněk transgenních rostlin exprimujících polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a získání polypeptidu faktoru VII z transgenní rostliny.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci buněk transgenních rostlin exprimujících polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a získání polypeptidu faktoru VII z transgenní rostliny.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci buněk transgenních rostlin exprimujících polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, a získání polypeptidu faktoru VII z transgenní rostliny.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci buněk transgenních rostlin exprimujících polynukleotidový

konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty, a získání polypeptidu faktoru VII z transgenní rostliny.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob produkce derivátu faktoru VII zahrnující kroky:

a) produkce polypeptidu faktoru VII;

b) spojení polypeptidu faktoru VII s chemickou skupinou;

c) nanesení derivátu faktoru VII na kationtovou výměnnou chromatografii nebo kolonu pro gelovou filtraci; a

d) vymytí derivátu faktoru VII.

Z dalšího hlediska, vynález poskytuje tvorbu inaktivovaného derivátu faktoru VII zahrnující kroky:

a) produkce polypeptidu faktoru VII;

b) pozměnění polypeptidu faktoru VII v jeho katalytickém místě serin proteinázovým inhibitorem;

c) spojení inaktivovaného polypeptidu faktoru VII s chemickou skupinou;

d) nanesení derivátu faktoru VII na kationtovou výměnnou chromatografii nebo kolonu pro gelovou filtraci; a

e) vymytí inaktivovaného derivátu faktoru VII.

V jednom zpracování podle navrhovaného vynálezu, způsob produkce polypeptidu faktoru VII zahrnuje kultivaci eukaryotických hostitelských buněk ve vhodném růstovém médiu, které obsahují polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, za podmínek umožňujících syntézu proteinu z polynukleotidového konstruktu a získání polypeptidu z kultivačního média.

V jednom zpracování podle navrhovaného vynálezu, způsob produkce polypeptidu faktoru VII zahrnuje kultivaci eukaryotických hostitelských buněk ve vhodném růstovém médiu, které obsahují polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID

09.01.04

NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, za podmínek umožňujících syntézu proteinu z polynukleotidového konstruktu a získání polypeptidu z kultivačního média.

V jednom zpracování podle navrhovaného vynálezu, způsob produkce polypeptidu faktoru VII zahrnuje kultivaci eukaryotických hostitelských buněk ve vhodném růstovém médiu, které obsahují polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, za podmínek umožňujících syntézu proteinu z polynukleotidového konstruktu a získání polypeptidu z kultivačního média.

V jednom zpracování podle navrhovaného vynálezu, způsob produkce polypeptidu faktoru VII zahrnuje kultivaci eukaryotických hostitelských buněk ve vhodném růstovém médiu, které obsahují polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, za podmínek umožňujících syntézu proteinu z polynukleotidového konstruktu a získání polypeptidu z kultivačního média.

V jednom zpracování podle navrhovaného vynálezu, způsob produkce polypeptidu faktoru VII zahrnuje kultivaci eukaryotických hostitelských buněk ve vhodném růstovém médiu, které obsahují polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty, za podmínek umožňujících syntézu proteinu z polynukleotidového konstruktu a získání polypeptidu z kultivačního média.

V dalším zpracování, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje získání polypeptidu faktoru VII z mléka produkovaného transgenním zvířetem, které exprimuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

V dalším zpracování, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje získání polypeptidu faktoru VII z mléka produkovaného transgenním

09.01.04

zvířetem, které exprimuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

V dalším zpracování, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje získání polypeptidu faktoru VII z mléka produkovaného transgenním zvířetem, které exprimuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

V dalším zpracování, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje získání polypeptidu faktoru VII z mléka produkovaného transgenním zvířetem, které exprimuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

V dalším zpracování, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje získání polypeptidu faktoru VII z mléka produkovaného transgenním zvířetem, které exprimuje polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty.

V dalším zpracování, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci buněk transgenních rostlin exprimujících polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, a získání polypeptidu faktoru VII z transgenní rostliny.

V dalším zpracování, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci buněk transgenních rostlin exprimujících polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici

09.01.04

vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a získání polypeptidu faktoru VII z transgenní rostliny.

V dalším zpracování, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci buněk transgenních rostlin exprimujících polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a získání polypeptidu faktoru VII z transgenní rostliny.

V dalším zpracování, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci buněk transgenních rostlin exprimujících polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, a získání polypeptidu faktoru VII z transgenní rostliny.

V dalším zpracování, vynález popisuje způsob produkce polypeptidu faktoru VII, přičemž způsob zahrnuje kultivaci buněk transgenních rostlin exprimujících polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty, a získání polypeptidu faktoru VII z transgenní rostliny.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa pro přípravu léčiva pro léčbu krvácivých příhod nebo posílení normálního hemostatického systému.

Zde používaný pojem „léčba“ představuje podávání účinného množství léčebně aktivní sloučeniny podle vynálezu, aby bylo předcházeno jakýmkoliv symptomům nebo stavům nemoci nebo z důvodu léčby nebo zmírnění těchto symptomů nebo již rozvinutých stavů nemoci. Pojem „léčba“ tak zahrnuje také preventivní léčbu.

Pojem „posílení normálního hemostatického systému“ představuje posílení schopnosti tvořit trombin.

09.01.04

Zde používaný pojem „porucha krvácení" odráží jakoukoli poruchu, vrozenou, získanou nebo vyvolanou, buněčného nebo molekulárního původu, která se projevuje krvácením. Příkladem jsou poruchy koagulačního faktoru (např. hemofilie A a B nebo nedostatek koagulačních faktorů XI nebo VII), inhibitory koagulačního faktoru, špatná funkce krevních destiček, trombocytopenie nebo von Willebrandova choroba.

Pojem „krvácivé příhody" představuje nekontrolovatelné nebo nadměrné krvácení, které je hlavním problémem ve spojitosti s chirurgií a dalšími formami tkáňového poranění. Nekontrolovatelné a nadměrné krvácení se může vyskytovat u subjektů s normálním koagulačním systémem a u subjektů s poruchami koagulaci nebo krvácení. Nedostatek koagulačních faktorů (hemofilie A a B, nedostatek koagulačních faktorů XI nebo VII) nebo inhibitory koagulačního faktoru mohou být příčinou poruch krvácení. Nadměrná krvácení se vyskytují u subjektů s normálně fungující krevní koagulační kaskádou (žádný nedostatek koagulačního faktoru nebo inhibitory proti koagulačním faktorům) a mohou být způsobeny špatnou funkcí krevních destiček, trombocytopenií nebo von Willebrandovou chorobou. V těchto případech mohou být krvácení podobné těm krvácením, které jsou způsobeny hemofilií, neboť hemostatický systém, jako při hemofilii, nemá, nebo má nenormální nezbytné koagulační „složky" (jako jsou krevní destičky nebo von Willebrandův faktor), které způsobují závažná krvácení. U subjektů s nadměrným tkáňovým poškozením ve spojitosti s chirurgií nebo rozsáhlým trauma může být normální hemostatický mechanismus ochromený nárokem bezprostředního zastavení krvácení a může dojít ke krvácení namísto normálního hemostatického mechanismu. Dosažení dostatečné zástavy krvácení je také problém při krvácení vyskytující se v orgánech, jako je mozek, oblast středního ucha a oči, kde je omezená možnost chirurgické zástavy krvácení. Stejný problém může nastat při odebírání biopsií z různých orgánů (játra, plíce, nádorová tkáň, gastrointestinální trakt), stejně tak jako při laparoskopické chirurgii. Při všech těchto situacích je těžké zajistit zastavení krvácení chirurgickými technikami (stehy, svorky, apod.), což je také v případě, kdy je krvácení rozšířené (krvácející gastritida a nadměrné děložní krvácení). Akutní a nadměrná krvácení se mohou vyskytovat také u subjektů podstupující protisrážlivou léčbu, kde bylo podstoupenou léčbou vyvolána špatná srážlivost krve. Tyto subjekty potřebují chirurgický zásah, v případě, že protisrážlivý účinek musí být rychle neutralizován. Pro subjekty s lokalizovanou rakovinou prostaty je radikální odstranění prostaty běžně používaným postupem. Operace je velmi často komplikována značnou až někdy masivní ztrátou krve. Značná ztráta krve během odstranění prostaty se týká hlavně komplikované anatomické situace s různými hustě cévnatými místy, která nejsou snadná pro udržení chirurgické zástavy krvácení, a která mohou vyústit

09.01.04

v rozsáhlé krvácení z velké oblasti. Jiná situace, která může představovat problémy v nedostatečném zastavení krvácení, může nastat, když subjekt s normálním hemostatickým mechanismem podstupuje protisrážlivou léčbu pro prevenci tromboembolického onemocnění. Tato léčba může zahrnovat heparin, jiné formy proteoglykanů, warfarin nebo jiné formy antagonistů vitamínu K, stejně tak jako aspirin a jiné inhibitory shlukování krevních destiček.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa pro přípravu léčiva pro léčbu krvácivých příhod nebo posílení normálního hemostatického systému.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa pro přípravu léčiva pro léčbu krvácivých příhod nebo posílení normálního hemostatického systému.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina vložena do sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty, přičemž aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa pro přípravu léčiva pro léčbu krvácivých příhod nebo posílení normálního hemostatického systému.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina přidána k N- nebo C-konci SEQ ID NO:1, přičemž aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání

09.01.04

s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa pro přípravu léčiva pro léčbu krvácivých příhod nebo posílení normálního hemostatického systému.

V jednom zpracování podle vynálezu je krvácení spojeno s hemofilií A nebo B. V jiném zpracování je krvácení spojeno s hemofilií se získanými inhibitory. V jiném zpracování je krvácení spojeno s trombocytopenií. V jiném zpracování je krvácení spojeno s von Willebrandovou chorobou. V jiném zpracování je krvácení spojeno s různým poškozením tkáně. V jiném zpracování je krvácení spojeno s různým traumatem. V jiném zpracování je krvácení spojeno s chirurgií. V jiném zpracování je krvácení spojeno s laparoskopickou chirurgií. V jiném zpracování je krvácení spojeno s krvácivou gastritidou. V jiném zpracování je krvácení spojeno s nadměrným děložním krvácením. V jiném zpracování se krvácení vyskytuje u orgánů s omezenou možností mechanického zastavení krvácení. V jiném zpracování se krvácení vyskytuje v mozku, v oblasti středního ucha nebo očí. V jiném zpracování je krvácení spojeno s odebíráním biopsií. V jiném zpracování je krvácení spojeno s protisrážlivou léčbou.

Zde používaný pojem „subjekt" představuje jakéhokoliv živočicha, obzvláště savce, jako jsou lidé, a kde je to vhodné, může být zaměnitelně použit pojem „pacient".

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa, pro přípravu léčiva pro léčbu krvácivých příhod nebo posílení normálního hemostatického systému.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa, pro přípravu léčiva pro léčbu krvácivých příhod nebo posílení normálního hemostatického systému.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID

09-01-04

NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa, pro přípravu léčiva pro léčbu krvácivých příhod nebo posílení normálního hemostatického systému.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina vložena do sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty, přičemž aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa, pro přípravu léčiva pro léčbu krvácivých příhod nebo posílení normálního hemostatického systému.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina přidána k N- nebo C-konci SEQ ID NO:1, přičemž aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa, pro přípravu léčiva pro léčbu krvácivých příhod nebo posílení normálního hemostatického systému.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob léčby krvácivých příhod nebo poruch krvácení u subjektu nebo posílení normálního hemostatického systému, přičemž způsob zahrnuje v případě potřeby podávání léčebně nebo preventivně účinného množství derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob léčby krvácivých příhod nebo poruch krvácení u subjektu nebo posílení normálního hemostatického systému, přičemž způsob zahrnuje v případě potřeby podávání léčebně nebo preventivně účinného množství derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou

09.01.04

hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob léčby krvácivých příhod nebo poruch krvácení u subjektu nebo posílení normálního hemostatického systému, přičemž způsob zahrnuje v případě potřeby podávání léčebně nebo preventivně účinného množství derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob léčby krvácivých příhod nebo poruch krvácení u subjektu nebo posílení normálního hemostatického systému, přičemž způsob zahrnuje v případě potřeby podávání léčebně nebo preventivně účinného množství derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina vložena do sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty, přičemž aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob léčby krvácivých příhod nebo poruch krvácení u subjektu nebo posílení normálního hemostatického systému, přičemž způsob zahrnuje v případě potřeby podávání léčebně nebo preventivně účinného množství derivátu faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina přidána k N- nebo C-konci SEQ ID NO:1, přičemž aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000 a derivát faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem faktoru VIIa.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití inaktivovaného derivátu faktoru VII, kde inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, a který má pozměněné katalytické místo, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a který je dále spojen s chemickou skupinou, který zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost inaktivovaného polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, pro přípravu léčiva pro potlačení tvorby trombu u pacienta.

09.01.04

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití inaktivovaného derivátu faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou a polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, pro přípravu léčiva pro potlačení tvorby trombu u pacienta.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití inaktivovaného derivátu faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, pro přípravu léčiva pro potlačení tvorby trombu u pacienta.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití inaktivovaného derivátu faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, pro přípravu léčiva pro potlačení tvorby trombu u pacienta.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití inaktivovaného derivátu faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, vložena do SEQ ID NO:1 nebo do její varianty tak, aby polypeptid faktoru VII měl v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, pro přípravu léčiva pro potlačení tvorby trombu u pacienta.

09.01.04

Z dalšího hlediska, vynález popisuje použití inaktivovaného derivátu faktoru VII, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, pro přípravu léčiva pro potlačení tvorby trombu u pacienta.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob potlačování tvorby trombu u pacienta, který zahrnuje místní podávání léčebně účinné dávky složení do místa cévy náchylného k tvorbě trombu, přičemž složení obsahuje inaktivovaný derivát faktoru VII, kde inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob potlačování tvorby trombu u pacienta, který zahrnuje místní podávání léčebně účinné dávky složení do místa cévy náchylného k tvorbě trombu, přičemž složení obsahuje inaktivovaný derivát faktoru VII, kde inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob potlačování tvorby trombu u pacienta, který zahrnuje místní podávání léčebně účinné dávky složení do místa cévy náchylného k tvorbě trombu, přičemž složení obsahuje inaktivovaný derivát faktoru VII, kde inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob potlačování tvorby trombu u pacienta, který zahrnuje místní podávání léčebně účinné dávky složení do místa cévy náchylného k tvorbě trombu, přičemž složení obsahuje inaktivovaný derivát faktoru VII, kde inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina odpovídající aminokyselině vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob potlačování tvorby trombu u pacienta, který zahrnuje místní podávání léčebně účinné dávky složení do místa cévy náchylného k tvorbě trombu, přičemž složení obsahuje inaktivovaný derivát faktoru VII, kde inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina schopná spojení s chemickou skupinou vložena do sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

Z dalšího hlediska, vynález popisuje způsob potlačování tvorby trombu u pacienta, který zahrnuje místní podávání léčebně účinné dávky složení do místa cévy náchylného k tvorbě trombu, přičemž složení obsahuje inaktivovaný derivát faktoru VII, kde inaktivovaný polypeptid faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina schopná spojení s chemickou skupinou přidána k N- nebo C-konci SEQ ID NO:1, a je pozměněn v katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje vlastní molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

V jednom zpracování podle vynálezu je chemická skupina v podstatě neutrální.

Zde používaný pojem „neutrální" představuje biologicky slučitelnou chemickou skupinu, což znamená, že není toxická, není imunogenní a je ve vodě rozpustná. V podstatě neutrální chemické skupiny podle této definice zahrnují, ale nejsou tak limitovány, polyethylenglykol (PEG), monomethoxypolyethylenglykol, dextran, poly-(N-vinylpyrrolidon)polyethylenglykol, homopolymery propylenglykolu, kopolymer polypropylenoxid/ethylenoxidu, polypropylenglykol, polyoxyethylované polyoly (např. glycerol) a polyvinylalkohol,

09.01.04

kolominiové kyseliny nebo jiné polymery založené na uhlohydrátech, polymery aminokyselin a deriváty biotinu.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina ve vodě rozpustná.

V dalším zpracování podle vynálezu má chemická skupina molekulovou hmotnost 1000 až 80000.

V dalším zpracování podle vynálezu má chemická skupina molekulovou hmotnost 5000 až 60000.

V dalším zpracování podle vynálezu má chemická skupina molekulovou hmotnost 10000 až 40000.

V dalším zpracování podle vynálezu má chemická skupina molekulovou hmotnost 500 až 20000.

V dalším zpracování podle vynálezu má chemická skupina molekulovou hmotnost 500 až 5000.

V dalším zpracování podle vynálezu má chemická skupina molekulovou hmotnost 750 až 5000.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina polyethylenglykol.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina vybírána z jedné do šesti molekul polyethylenglykolu.

V nejvýhodnějším zpracování podle vynálezu je chemická skupina jedna molekula polyethylenglykolu.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina monomethoxypolyethylenglykol.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina dextran.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina poly-(N-vinylpyrrolidon)--polyethylenglykol.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina homopolymer propylenglykolu.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina polypropylenoxid.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina polyoxyethylovaný polyol.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina polyvinylalkohol.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina polymer založený na uhlohydrátech.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina polymer aminokyselin.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina derivát biotinu.

09.01.04

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina spojena s volnou sulfhydrylovou skupinou přítomnou na aminokyselině, která byla zaměněna za jinou aminokyselinu, která byla vložena nebo přidána k polypeptidu.

V dalším zpracování podle vynálezu je chemická skupina spojena s cysteinem.

V dalším zpracování podle vynálezu je nahrazená, vložená nebo přidaná aminokyselina schopná spojení s chemickou skupinou.

V dalším zpracování podle vynálezu má aminokyselina schopná spojení s chemickou skupinou volnou sulfhydrylovou skupinu.

V dalším zpracování podle vynálezu je aminokyselina, která je schopná spojení s chemickou skupinou, cystein.

V dalším zpracování podle vynálezu obsahuje nahrazená, vložená nebo přidaná aminokyselina sulfhydryl, jako je cystein.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina vložena v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající R396 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající Q250 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající P406 v SEQ ID NO:1 nahrazena odlišnou aminokyselinou.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla přídavná aminokyselina schopná spojení s chemickou skupinou vložena do sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty tak, že polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla další aminokyselina schopná spojení s chemickou skupinou přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina přidána k C-konci sekvence SEQ ID NO:1.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina přidána k N-konci sekvence SEQ ID NO:1.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byl přidán cystein.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byl vložen cystein.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina vybíraná ze skupiny zahrnující K157, V158, E296, M298, L305, D334, S336, K337 a F374 v SEQ ID NO:1 byla

09.01.04

nahrazena jinou aminokyselinou, přičemž aminokyselina zvýší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající K157 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z G, V, S, T, N, Q, D a E.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající V158 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z S, T, N, Q, D a E.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající V158 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z T a D.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající E296 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z R, K a V.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající E296 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou V.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající E298 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z R, K, Q a N.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající E298 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou Q.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající L305 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z A, V, L, I, M, F, W, P, G, S, T, C, Y, N, E, K, R, H, D a Q.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající L305 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou V.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající D334 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou E.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající S336 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou G.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající K337 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z A, G, V, S, T, N, Q, D a E.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající K337 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou A.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající F374 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z A, V, L, I, M, F,W, P, G, S, T, C, Y, N, E, K, R, H, D a E.

V dalším zpracování polypeptidu faktoru VII byla aminokyselina odpovídající F374 v SEQ ID NO:1 nahrazena aminokyselinou P.

09.01.04

V dalším zpracování podle vynálezu je polypeptid faktoru VII lidský faktor VII.

V dalším zpracování podle vynálezu je polypeptid faktoru VII lidský faktor VIIa.

V přítomném přesném popisu jsou aminokyseliny znázorněny zkratkami, tak jak je naznačeno v tabulce 1, které jsou schváleny IUPAC-IUB komisí pro biochemické názvosloví (CNB). Aminokyseliny a jejich izomery znázorněné jménem nebo následujícími zkratkami jsou v přírodní L-formě, pokud není vyznačeno jinak. Dále, levý a pravý konec aminokyselinové sekvence peptidu představuje N- a C-terminální konec, pokud není vyznačeno jinak.

Tabulka 1: Zkratky aminokyselin:

aminokyselina	třípísmenný kód	jednopísmenný kód
Glycin	Gly	G
Prolin	Pro	P
Alanin	Ala	A
Valin	Val	V
Leucin	Leu	L
Isoleucin	Ile	I
Methionin	Met	M
Cystein	Cys	C
Fenylalanin	Phe	F
Tyrosin	Tyr	Y
Tryptofan	Trp	W
Histidin	His	H
Lysin	Lys	K
Arginin	Arg	R
Glutamin	Gln	Q
Asparagin	Asn	N
Kyselina glutamová	Glu	E
Kyselina asparagová	Asp	D
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T

Vynález také popisuje způsob přípravy lidského polypeptidu faktoru VII, jak je zmíněno výše. Lidské polypeptidy faktoru VII jsou výhodně produkovány rekombinantními DNA technikami. DNA sekvence kódující lidský faktor VII může být izolován připravením genomové nebo cDNA knihovny a následným hledáním DNA sekvence, která kóduje všechny nebo část proteinu hybridizací při použití umělých oligonukleotidových značek podle standardních technik (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Pro zdejší použití je DNA

09.01.04

sekvence kódující protein nejvýhodněji lidského původu, tj. odvozena od lidské genomové nebo cDNA knihovny.

DNA sekvence kódující polypeptidy lidského faktoru VII mohou být připraveny uměle zavedenými standardními metodami, např. fosfoamiditovou metodou popsanou v Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859-1869, nebo způsobem popsaným v Matthes *et al.*, EMBO Journal 3 (1984), 801-805. Podle fosfoamiditové metody jsou oligonukleotidy syntetizovány, např. v automatickém DNA syntezátoru, pak vyčištěny, spojovány a klonovány do vhodných vektorů.

DNA sekvence mohou být připraveny také polymerázovou řetězovou reakcí při použití specifických primerů, jak je popsáno například v US 4 683 202, Saiki *et al.*, Science 239 (1988), 487-491, nebo v Sambrook *et al.*, viz výše.

DNA sekvence kódující lidské polypeptidy faktoru VII jsou obyčejně vloženy do rekombinantního vektoru, což může být kterýkoliv vektor, který může být běžně použit pro postupy s rekombinantní DNA, a volba vektoru bude často záviset na hostitelských buňkách, do kterých bude vložen. Takto může být vektorem autonomně se množící vektor, tj. vektor, který se vyskytuje jako extrachromozomální součást, kdy se množení vyskytuje nezávisle na chromozomálním množení, např. plazmid. Jinak může být vektor po vložení do hostitelské buňky začleněn do genomu hostitelské buňky a zmnožen dohromady s chromozómem, do kterého byl vložen.

Nejvhodněji je vektorem expresní vektor, ve kterém je DNA sekvence kódující lidské polypeptidy faktoru VII operabilně spojena s dalšími segmenty, které jsou vyžadovány pro transkripci DNA. Obecně, expresní vektor je odvozen od plazmidu nebo virové DNA, nebo může obsahovat oba prvky. Pojem „operabilně spojen" znamená, že segmenty jsou uspořádány tak, že plní svoji funkci ve shodě se zamýšleným účelem, např. spouští v promotoru transkripci a ta postupuje po celé DNA sekvenci kódující polypeptid.

Promotorem může být jakákoliv DNA sekvence, která vykazuje transkripční aktivitu ve vybraných hostitelských buňkách a může být odvozena od genů kódujících proteiny homologní nebo heterologní k hostitelským buňkám.

Příklady vhodných promotorů pro řízení transkripce DNA kódující polypeptid lidského faktoru VII v savčích buňkách zahrnují SV40 promotor (Subramani *et al.*, Mol. Cell. Biol. 1 (1981), 854-864), MT-1 (metalothioneniový gen) promotor (Palmiter *et al.*, Science 222 (1983), 809-814), CMV promotor (Boshart *et al.*, Cell 41:521-530, 1985) nebo hlavní pozdní promotor adenoviru 2 (Kaufman and Sharp, Mol. Cell. Biol. 2:1304-1319, 1982).

09.01.04

Příkladem vhodného promotoru pro použití v hmyzích buňkách je polyhedrinový promotor (US 4 745 051; Vasuvedan *et al.*, FEBS Lett. 311, (1992) 7-11), P10 promotor (J.M. Vlak *et al.*, J. Gen. Virology 69, 1988, 765-776), promotor základního proteinu polyhedrosového viru u *Autographa californica* (EP 397 485), promotor časného genu 1 bakuloviru (US 5 155 037; US 5 162 222), nebo promotor opožděně časného genu bakuloviru 39K (US 5 155 037; US 5 162 222).

Příkladem vhodného promotoru pro použití v kvasinkových hostitelských buňkách zahrnují promotory kvasinkových glykolytických genů (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255(1980), 12073-12080; Alber and Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419-434) nebo geny alkoholdehydrogenázy (Young *et al.*, Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender *et al.*, eds.), Plenum Press, New Yor, 1982) nebo TPI1 (US 4 599 311) nebo ADH2-4c (Russell *et al.*, Nature 304 (1983), 652-654) promotory.

Příklady vhodných promotorů pro použití vláknitých hostitelských buněk hub jsou například ADH3 promotor (McKnight *et al.*, The EMBO J. 4 (1985), 2093-2099) nebo tpiA promotor. Příklady dalších užitečných promotorů jsou promotory odvozené od genu kódujícího *A. oryzae* TAKA amylázu, *Rhizomucor miehei* proteinázu, *A. niger* neutrální α-amylázu, *A. niger* nebo *A. awamori* glukoamylázu (gluA), *Rhizomucor miehei* lipázu, *A. oryzae* alkatickou proteinázu, *A. oryzae* fosfát izomerázu nebo *A. nidulans* acetamidázu. Nejvýhodnější jsou TAKA amyláza a gluA promotory. Vhodné promotory jsou zmíněny například v EP 238 023 a EP 383 779.

DNA sekvence kódující lidské polypeptidy faktoru VII mohou být také v případě potřeby operabilně spojeny s vhodným terminátorem, jako je terminátor lidského růstového hormonu (Palmiter *et al.*, Science 222, 1983, 809-814) nebo TPI1 (Alber and Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1, 1982, 419-434) nebo ADH3 (McKnight *et al.*, The EMBO J. 4, 1985, 2093-2099) terminátory. Vektor může také obsahovat sadu RNA sestřihových míst umístěných ve směru od promotoru a proti směru od místa vložení samotné sekvence faktoru VII. Nejvhodnější RNA sestřihová místa mohou být získána z adenoviru a/nebo z imunoglobulinových genů. Expresní vektory obsahují také polyadenylační signál, který je umístěn ve směru místa vložení. Nejvhodnější polyadenylační signály zahrnují časný nebo pozdní polyadenylační signál z SV40 (Kaufman and Sharp), polyadenylační signál z adenoviru 5 Elb oblasti, terminátor genu pro lidský růstový hormon (DeNoto *et al.*, Nucl. Acids Res. 9:3719-3730, 1981) nebo polyadenylační signál z genu pro lidský faktor VII nebo genu pro hovězí faktor VII. Expresní vektory mohou také zahrnovat nekódující virovou vedoucí sekvenci, jako je

09.01.04

třísložková vedoucí sekvence adenoviru 2, umístěná mezi promotorem a místy sestřihu RNA; a sekvenci zesilovačů, jako je zesilovač SV40.

Rekombinantní vektor může dále obsahovat DNA sekvenci umožňující vektoru se množit v příslušné hostitelské buňce. Příkladem takové sekvence (jestliže hostitelská buňka je savčí buňka) je SV40 počátek replikace.

Jestliže hostitelkou buňkou je kvasinková buňka, jsou vhodnými sekvencemi umožňující vektoru se množit 2μ replikační geny REP 1 až 3 kvasinkového plazmidu a počátek replikace.

Vektor může také obsahovat volitelný znak, např. gen, jehož produkt doplňuje nějaký nedostatek v hostitelské buňce, jako je gen kódující dihydrofolát reduktázu (DHFR) nebo TPI gen *Schizosaccharomyces pombe* (popsán v P.R. Russell, Gene 40, 1985, 125-130), nebo geny, které udělují odolnost proti léčivům, např. ampicilin, kanamycin, tetracyklin, chloramfenikol, neomycin, hygromycin a methotrexát.Volitelné znaky pro vláknité houby zahrnují amdS, pyrG, argB, niaD nebo sC.

Pro řízení lidských polypeptidů faktoru VII podle navrhovaného vynálezu k sekreci hostitelskými buňkami, může být do rekombinantního vektoru zavedena sekreční signální sekvence (známá také jako vedoucí sekvence, prepro- sekvence nebo pre- sekvence). Sekreční signální sekvence je spojena s DNA sekvencí kódující lidské polypeptidy faktoru VII ve správném čtecím rámci. Sekreční signální sekvence jsou běžně umístěny 5´ k DNA sekvenci kódující peptid. Sekreční signální sekvence tak může být normálně spojena s proteinem nebo může být z genu kódující jiný sekretovaný protein.

Pro sekreci z kvasinek, může sekreční signální sekvence kódovat jakýkoliv signální peptid, který zaručuje účinné řízení exprimovaných lidských polypeptidů faktoru VII k sekreci buňkou. Signální peptid může být přirozeně se vyskytující signální peptid, nebo jeho funkční část, nebo to může být umělý peptid. Vhodnými signálními peptidy je signální peptid α-faktoru (US 4 870 008), signální peptid myší slinné amylázy (O. Hagenbuchle *et al.*, Nature 289, 1981, 643-646), signální peptid pozměněné karboxypeptidázy (L.A. Valls *et al.*, Cell 48, 1987, 887-897) BAR1 signální peptid kvasinek (WO 87/02670), nebo signální peptid kvasinkové proteinázy 3 (YAP3) (M. Egel-Mitani *et al.*, Yeast 6, 1990, 127-137).

Pro účinnou sekreci kvasinkami může být sekvence kódující vedoucí peptid vložena ve směru signální sekvence a od směru DNA sekvence kódující polypeptidy lidského faktoru VII.

Funkcí vedoucího peptidu je směrovat exprimovaný peptid z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu a dále do sekrečních váčků, aby došlo k sekreci do kultivačního média (tj. přemístění polypeptidu lidského faktoru VII přes buněčnou stěnu nebo alespoň skrze buněčnou membránu do periplazmatického prostoru kvasinek). Vedoucí peptid může být

09.01.04

vedoucí peptid α-faktoru kvasinek (použití je popsáno např. v US 4 546 082, US 4 870 008, EP 16 201, EP 123 294, EP 123 544 a EP 163 529). Nebo jinak může být vedoucí peptid umělý vedoucí peptid, což je vedoucí peptid, který se nenachází v přírodě. Umělé vedoucí peptidy mohou být vytvořeny například tak jak je popsáno v WO 89/02463 nebo WO 92/11378.

Pro použití u vláknitých hub může být signální peptid běžně odvozen od genu kódujícího *Aspergillus sp.* amylázu nebo glukoamylázu, genu kódujícího *Rhizomucor miehei* lipázu nebo proteinázu nebo *Humicola lanuginosa* lipázu. Signální peptid je nejvýhodněji odvozen od genu kódujícího *A. oryzae* TAKA amylázu, *A. niger* neutrální α-amylázu, *A. niger* stabilní amylázu, nebo *A. niger* glukoamylázu. Vhodné signální peptidy jsou popsány např. v EP 238 023 a EP 215 594.

Pro použití v hmyzích buňkách může být signální peptid běžně odvozen od hmyzího genu (WO 90/05783), jako je signální peptid prekurzoru adipokinetického hormonu motýlu *Manduca sexta* (US 5 023 328).

Odborníkům v současném stavu techniky jsou dobře známy postupy používané pro spojování DNA sekvencí kódujících polypeptidy lidského faktoru VII, promotoru a popřípadě terminátoru a/nebo sekreční signální sekvence, a pro jejich vkládání do vhodných vektorů obsahujících informaci potřebnou pro množení (například Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Způsoby transfekce savčích buněk a exprese DNA sekvencí vložených do buněk jsou popsány např. v Kaufman and Sharp. J. Mol. Biol. 159 (1982), 601-621; Southern and Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 327-341; Loyter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982), 422-426; Wigler *et al.*, Cell 14 (1978), 725; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7 (1981) 603; Graham and Van der Eb, Virology 52 (1973), 456; a Neumann *et al.*, EMBO J. 1 (1982), 841-845.

Volitelné znaky mohou být do buněk zavedeny na samostatném plazmidu ve stejnou dobu jako gen zájmu, nebo mohou být zavedeny na stejném plazmidu. Jestliže jsou zavedeny na stejném plazmidu, mohou být volitelný znak a gen zájmu řízeny různými promotory nebo stejným promotorem, s pozdějším uspořádáním za vzniku dicistronního produktu. Konstrukty tohoto typu jsou v současném stavu techniky známy (například, Levinson and Simonsen, US 4 713 339). Výhodné může být také přidání přídatné DNA, známé jako „nosičová DNA“, ke směsi, která je vložena do buněk.

09.01.04

Poté co buňky přijmou DNA, jsou kultivovány ve vhodném růstovém médiu pro expresi žádaného genu, typicky 1 až 2 dny. Zde používaný pojem „vhodné růstové médium" představuje médium obsahující živiny a další složky potřebné pro růst buněk a expresi požadovaných polypeptidů lidského faktoru VII. Média obyčejně obsahují zdroj uhlíku, zdroj dusíku, esenciální aminokyseliny, esenciální cukry, vitamíny, soli, fosfolipidy, proteiny a růstové faktory. Pro produkci gamma karboxylovaných proteinů médium obsahuje vitamín K, nejvhodněji v koncentraci 0,1 μg/ml až 5 μg/ml. Poté je použito určité léčivo pro omezení růstu buněk, které exprimují vybraný znak stálým způsobem. Pro buňky, které byly transfektovány se zesíleným vybraným znakem, by měla být koncentrace léčiva zvýšena pro zvýšený počet kopií klonované sekvence, a tím i zvýšení hladiny exprese. Klony stabilně transfektovaných buněk jsou poté kontrolovány pro expresi požadovaného polypeptidu lidského faktoru VII.

Hostitelskou buňkou, do které je vložena DNA sekvence kódující polypeptidy lidského faktoru VII, může být jakákoliv buňka, která je schopna produkce posttranslačně pozměněných polypeptidů lidského faktoru VII a zahrnují kvasinky, houby a vyšší eukaryotické buňky.

Příklady savčích buněčných linií pro použití podle navrhovaného vynálezu jsou COS-1 (ATCC CRL 1650), buňky ledvin křečků (BHK) a 293 (ATCC CRL 1573; Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977) buněčné linie. Nejvhodnější BHK buněčnou linií je tk^- ts13 BHK buněčná linie (Waechter and Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982), dále používaná jako BHK 570 buněčná linie. BHK 570 buněčná linie je dostupná od American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, pod ATCC přístupovým číslem CRL 10314. Tk^- ts13 BHK buněčná linie je také dostupná od ATCC pod přístupovým číslem CRL 1632. Dále může být použito mnoho dalších buněčných linií, jako je Rat Hep I (krysí nádorové buňky jater; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (krysí nádorové buňky jater; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), buňky lidských plic (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9,1), CHO (ATCC CCL 61) a DUKX buňky (Urlaub and Cahsin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980).

Příklady vhodných kvasinkových buněk zahrnují buňky *Saccharomyces* spp. Nebo *Schizosaccharomyces* spp., obzvláště kmeny *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Saccharomyces kluyveri*. Způsoby transformace kvasinek heterologní DNA a následná produkce heterologních polypeptidů jsou popsány např. v US 4 599 311, US 4 931 373, US 4 870 008, 5 037 743 a US 4 845 075, všechny jsou zde zařazeny svým odkazem. Transformované buňky jsou rozpoznány fenotypem určeným volitelným znakem, obyčejně odolností k léčivům nebo

09.01.04

schopností růstu v nepřítomnosti konkrétní živiny, např. leucinu. Nejvýhodnějším vektorem pro použití u kvasinek je POT vektor popsaný v US 4 931 373. DNA sekvence kódující polypeptidy lidského faktoru VII mohou být předcházeny signální sekvencí a popřípadě vedoucí sekvencí, např. jak je popsáno výše. Další příklady vhodných kvasinkových buněk jsou kmeny *Kluyveromyces*, jako *K. lactis*, *Hansenula*, např. *H. polymorpha*, nebo *Pichia*, např. *P. pastoris* (Gleeson *et al.*, J. Gen. Microbiol. 132, 1986, 3459-3465; US 4 882 279).

Příklady dalších buněk hub jsou buňky vláknitých hub, např. *Aspergillus* spp., Neurospora spp., *Fusarium* spp. Nebo *Trichoderma* spp., obzvláště kmeny *A. oryzae*, *A. nidulans* nebo *A. niger*. Použití *Aspergillus* spp. pro expresi proteinů je popsáno např. v EP 272 277, EP 238 023, EP 184 438. Transformace *F. oxysporum* může být provedena například tak jak je popsáno v Malardier *et al.*, 1989, Gene 78:147-156. Transformace *Trichoderma* spp. může být provedena například tak, jak je popsáno v EP 244 234.

Jestliže jsou jako hostitelské buňky použity vláknité houby, mohou být transformovány DNA konstruktem podle vynálezu, obvykle začleněním DNA konstruktu do hostitelského chromozómu za tvorby rekombinantních hostitelských buněk. Začlenění je obecně považováno za výhodu, neboť DNA sekvence udržovaná v buňce je stabilnější. Začlenění DNA konstruktů do hostitelského chromozómu může být provedeno běžnými metodami, např. homologní nebo heterologní rekombinací.

Transformace hmyzích buněk a následná produkce heterologních polypeptidů může být provedena jak je popsáno v US 4 745 051; US 4 879 236; US 5 155 037; US 5 162 222; EP 397 485, všechny jsou zde zařazeny svým odkazem. Vhodnou hmyzí buněčnou linií použitou jako hostitel může být *Lepidoptera* buněčná linie, jako jsou buňky *Spodoptera frugiperda* nebo buňky *Trichoplusia ni* (US 5 077 214). Vhodné kultivační podmínky mohou být například jak je popsáno v WO 89/01028 nebo v nějakém výše uvedeném odkazu.

Výše popsané transformované nebo transfektované hostitelské buňky jsou poté kultivovány ve vhodném živném médiu za podmínek umožňujících expresi polypeptidu lidského faktoru VII, přičemž jsou pak výsledné peptidy nebo jejich část získány z kultury. Používané médium pro kultivaci buněk může být jakékoliv běžné médium vhodné pro růst hostitelských buněk, jako je minimální nebo komplexní médium obsahující vhodné doplňky. Vhodná média jsou dostupná od komerčních dodavatelů, nebo mohou být připravena podle publikovaných návodů (např. v katalozích American Type Culture Collection). Polypeptidy lidských faktorů VII produkovaných buňkami mohou být poté získány z kultivačního média běžnými postupy, které zahrnují oddělení hostitelských buněk z média odstřeďováním nebo filtrací, srážení proteinových složek v tekutině nebo filtrátu pomocí soli, např. síran amonný, přečištěním

09.01.04

různými chromatografickými postupy, např. chromatografie s výměnou iontů, chromatografie s gelovou filtrací, afinní chromatografie nebo podobně, v závislosti na druhu příslušného polypeptidu.

Pro přípravu rekombinantních polypeptidů lidského faktoru VII je použit klonovaný kontrolní typ DNA sekvence faktoru VII. Sekvence může být pozměněna tak, aby kódovala požadovanou variantu faktoru VII. Jsou známy kompletní nukleotidové a aminokyselinové sekvence lidského faktoru VII. Viz US 4 784 950, kde je popsáno klonování a exprese rekombinantního lidského faktoru VII. Sekvence hovězího faktoru VII je popsána v Takeya *et al.*, J. Biol. Chem. 263:14868-14872 (1988), která je zde začleněna svým odkazem.

Úpravy aminokyselinových sekvencí mohou být prováděny různými technikami. Změna sekvence nukleové kyseliny může být provedena místně specifickou mutagenezí. Techniky pro místně specifické mutageneze jsou velmi dobře známé v současném stavu techniky a jsou popsány například v Zoller and Smith (DNA 3:479-488, 1984).

DNA sekvence pro použití podle navrhovaného vynálezu, bude typicky kódovat pre-propolypeptid na aminovém konci proteinu faktoru VII, aby došlo ke vhodnému posttranslačnímu zpracování (např. gamma karboxylace zbytků glutamové kyseliny) a pro sekreci z hostitelských buněk. Pre-propolypetid může být faktor VII nebo jiný plazmatický protein závislý na vitamínu K, jako je faktor IX, faktor X, protrombin, protein C nebo protein S. Odborníci v současném stavu techniky ocení, že přídatné změny mohou být v aminokyselinové sekvenci faktoru VII provedeny tam, kde tyto změny významně neovlivňují schopnost proteinu působit jako koagulační faktor. Například, faktor VII v katalytické trojici může být také pozměněn v aktivačním štěpném místě, aby došlo k inhibici přeměny zymogenu faktoru VII na jeho aktivovanou dvojřetězcovou formu, jak je obecně popsáno v US 5 288 629, který je zde začleněn svým odkazem.

K produkci polypeptidu lidského faktoru VII podle vynálezu může být použita technologie transgenních zvířat. Nejvhodnější je produkovat proteiny v savčích žlázách hostitelské savčí samice. Exprese v savčích žlázách a následná sekrece požadovaného proteinu do mléka překonává mnoho potíží, které se vyskytují při izolaci proteinů z jiných zdrojů. Mléko je snadno sbíráno, je dostupné ve velkém množství a je biochemický dobře charakterizováno. Navíc, hlavní proteiny mléka jsou v mléce přítomny ve vysokých koncentracích (typicky 1 až 15 g/l). Z komerčního hlediska je jasné, že nejvhodnější je použití takových hostitelských druhů, které dávají vysoký mléčný výtěžek. I když mohou být používány menší zvířata, jako jsou myši a krysy (a jsou vhodné z hlediska teorie), je vhodné použít hospodářská zvířata, která především zahrnují prasata, kozy, ovce a dobytek. Ovce jsou obzvláště vhodné kvůli

09.01.04

dříve zmiňovaným faktorům, jako je průběh transgeneze u těchto druhů, výtěžek mléka, cena a okamžitá dostupnost zařízení pro sběr ovčího mléka, viz například WO 88/00239 pro srovnání faktorů ovlivňujících výběr hostitelských druhů. Obecně je vyžadováno vybírat chov hostitelských zvířat, které jsou chovány pro denní použití, jako je East Friesland ovce, nebo získat mléčné zásoby chovem transgenní linie v pozdější době. V každém případě, měla by být používána známá a zdravá zvířata.

Pro dosažení exprese v savčí žláze je používán transkripční promotor z genu mléčného proteinu. Geny pro mléčný protein zahrnují geny kódující kaseiny (viz US 5 304 489, začleněný zde svým odkazem), beta-laktoglobulin, a-laktalbumin, a syrovátkový kyselý protein. Nejvhodnější je promotor beta-laktoglobulinu (BLG). V případě genu ovčího beta-laktoglobulinu bude obyčejně použita oblast alespoň proximálních 406 bp 5′ koncové sekvence genu, ačkoliv jsou vhodnější větší části 5′ koncové sekvence, až do 5 kbp, jako je 4,25 kbp DNA segment obsahující 5′ koncový promotor a nekódující část beta-laktoglobulinového genu, viz Whitelaw *et al.*, Biochem. J. 286: 31-39 (1992). Podobné fragmenty DNA promotoru z jiných druhů jsou také vhodné.

Aby mohly být genomové oblasti genu exprimovány, mohou být do konstruktů vloženy také jiné oblasti beta-laktoglobulinového genu. Obecně je v současném stavu techniky uznáváno, že konstrukty neobsahující introny, například vykazují slabší expresi ve srovnání s konstrukty, které takové DNA sekvence obsahují (viz Brinster *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 836-840 (1988); Palmiter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 478-482 (1991); Whitelaw *et al.*, Transgenic Res. 1: 3-13 (1991); WO 89/01343; a WO 91/02318, každý zde vložen odkazem). V této souvislosti je obecně vhodné, tam kde je to možné, použít genomovou sekvenci obsahující všechny nebo některé z původních intronů genu kódujících požadovaný protein nebo polypeptid, a tak je vhodné další zařazení alespoň některých intronů z např. beta-laktoglobulinového genu. Jednou takovou oblastí je DNA segment, který umožňuje sestřih intronu a RNA polyadenylaci z 3′ nekódující oblasti ovčího beta-laktoglobulinového genu. Když je zaměněna za vlastní 3′ nekódující sekvence genu, tento ovčí beta-laktoglobulinový segment zvyšuje a stabilizuje hladinu exprese požadovaného proteinu nebo polypeptidu. V jiných zpracování je oblast obklopující počáteční ATG sekvence varianty faktoru VII zaměněna za odpovídající sekvence z genu mléčného specifického proteinu. Tato záměna poskytuje údajné tkáňově specifické spuštění pro zesílení exprese. Je vhodné nahradit pre-pro a 5′ nekódující sekvence polypeptidu lidského faktoru VII například sekvencemi BLG genu, ačkoliv mohou být nahrazeny menší oblasti.

09.01.04

Pro expresi polypeptidu lidského faktoru VII v transgenních zvířatech může být DNA segment kódující polypeptid faktoru VII operabilně spojen s přídavnými DNA segmenty, které jsou vyžadovány pro jejich expresi a tvorbu expresních jednotek. Takové přídavné segmenty zahrnují výše zmiňovaný promotor, stejně tak jako sekvence, které poskytují ukončení transkripce a polyadenylaci mRNA. Expresní jednotky budou dále zahrnovat DNA segment kódující sekvenci sekrečního signálu, který je operabilně spojen se segmentem kódující polypeptid lidského faktoru VII. Sekvence sekrečního signálu může představovat vlastní sekvence sekrečního signálu polypeptidu lidského faktoru VII nebo může být z jiného proteinu, jako je mléčný protein, viz například von Heijne, Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986); a Meade *et al.*, US 4 873 316, které jsou zde vloženy odkazem.

Konstrukce expresních jednotek pro použití v transgenních zvířatech je vhodně provedena vložením sekvence polypeptidu lidského faktoru VII do plazmidu nebo fágového vektoru obsahující přídavné DNA segmenty, ačkoli expresní jednotka může být sestavena v podstatě z jakékoliv sekvence ligací. Obzvláště vhodné je poskytovat vektor obsahující DNA segment kódující mléčný protein a zaměnit kódující sekvenci pro mléčný protein za sekvenci polypeptidu lidského faktoru VII; a tím splynutí genů, které zahrnují expresi kontrolních sekvencí genu mléčného proteinu. V každém případě, klonování expresních jednotek do plazmidů nebo jiných vektorů usnadňuje zdvojení sekvence polypeptidu lidského faktoru VII. Zdvojení probíhá obyčejně v bakteriálních hostitelských buňkách (např. *E. coli*), a tak vektory budou typicky zahrnovat počátek replikace a volitelný funkční znak v bakteriálních hostitelských buněk. Expresní jednotka je poté vložena do oplodněných vajíček (zahrnující časné zárodky) vybraných hostitelských druhů. Zavedení heterologní DNA může být provedeno jedním z různých způsobů, zahrnující mikroinjekci (např. US 4 873 191), retrovirovou infekci (Jaenisch, Science 240: 1468-1474 (1988)) nebo místně řízeným začleněním při použití embryonálních kmenových buněk (ES), (Bradley *et al.*, Bio/Technology 10: 534-539 (1992)). Vajíčka jsou poté zasazena do vejcovodů nebo do dělohy pseudogravidních samic a je jim umožněn vývoj do doby porodu. Potomci nesoucí vnesenou DNA ve svých zárodečných buňkách mohou přenést DNA na svoje potomstvo normálním způsobem (podle Mendela), a umožňují vývoj transgenních stád.

Základní postupy tvorby transgenních zvířat jsou známy v současném stavu techniky (viz například, Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simons *et al.*, Bio/Technology 6: 179-183 (1988); Wall *et al.*, Biol. Reprod. 32: 645-651 (1985) Buhler *et al.*, Bio/Technology 8:140-143 (1990); Ebert *et al.*, Bio/Technology 9: 835-839-8 (1991); Krimpenfort *et al.*, Bio/Technology 9: 844-847 (1991);

Wall *et al.*, J. Cell. Biochem. 49: 113-120 (1992); US 4 873 191; US 4 873 316; WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; a GB 87/00458, začleněné zde svým odkazem. Techniky vpravení cizí DNA sekvence do savců a jejich zárodečných buněk byly původně vyvinuty u myši, viz např. Gordon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384 (1980); Gordon and Ruddle, Science 214: 1244-1246 (1981); Palmiter and Brinster, Cell 41: 343-345 (1985); a Brinster *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-4442 (1985). Tyto techniky byly následně přizpůsobeny pro použití větších zvířat, které zahrnují také druhy hospodářských zvířat, viz např., WO 88/00239, WO 90/05188, a WO 92/11757; a Simons *et al.*, Bio/Technology 6: 179-183 (1988). Pro shrnutí, nejúčinnějším způsobem produkce transgenních myší nebo hospodářských zvířat používaným do dnešní doby, je vpravení spousty různých lineárních molekul požadované DNA do jednoho jádra vajíčka nebo spermatu v oplodněném vajíčku podle stanovených technik. Může být použito také vložení DNA do cytoplazmy zygoty. Produkce může probíhat také v transgenních rostlinách. Exprese může být všeobecná, nebo může být směřována do konkrétního orgánu, jako je hlíza, viz Hiatt, Nature 344: 469-479 (1990); Edelbaum *et al.*, J. Interferon Res. 12: 449-453 (1992); Sijmons *et al.*, Bio/Technology 8: 217-221 (1990); a EP 0 255 378.

Faktor VII produkovaný podle navrhovaného vynálezu může být přečištěn afinní chromatografií na koloně s anti-faktor VII protilátkou. Nejvýhodnější je použití imunoadsorpční kolony, která obsahuje vysoce specifické monoklonální protilátky. Obzvláště výhodné je použití na vápníku závislých monoklonálních protilátek, jak je popsáno v Wakabayashi *et al.*, J. Bio. Chem. 261: 11097-11108 (1986) a Thim *et al.*, Biochemistry 27: 7785-7793 (1988). Další přečištění může být dosaženo běžnými chemickými čistícími způsoby, jako je vysoce výkonná plynová chromatografie. Další způsoby čištění jsou známy v současném stavu techniky, jako je srážení citrátem barnatým, a mohou být použity pro přečištění zde popisovaných faktorů VII (viz například, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag. N.Y., 1982). Nejvýhodněji je faktor VII přečištěn do alespoň 90 až 95 % stejnorodosti, pro léčebné použití výhodněji do alespoň 98 až 99 % stejnorodosti nebo vyšší. Po částečném přečištění nebo po přečištění do stejnorodosti jak je požadováno, může být faktor VII použit léčebně.

Přeměny jednořetězcového faktoru VII na aktivní dvojřetězcový faktor VIIa může být dosaženo použitím faktoru XIIa, jak je popsáno v Hedner and Kisiel, (1983, J. Clin. Invest. 71:1836-1841), nebo dalšími proteinázami, které mají specificitu jako má trypsin (Kisiel and Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73:29-42 (1983). Nebo jinak faktor VII může být autoaktivován prostoupením skrze chromatografickou kolonou s výměnou iontů, jako je Mono Q.RTM.

09.01.04

(Pharmacia fine Chemicals) nebo podobně (Bjoern *et al.*, 1986, Research Disclosure 269:564-565). Molekuly faktoru VII podle navrhovaného vynálezu a léčebné složení jsou obzvláště užitečné pro podávání lidem pro léčbu různých potíží, které zahrnují intravaskulární koagulaci.

Vynález také poskytuje vhodné rozbory pro zvolené nejvýhodnější polypeptidy faktoru VIIa a deriváty faktoru VIIa podle vynálezu. Rozbory mohou být provedeny jako jednoduchý předběžný *in vitro* test.

Takto, příklad 5 zde popisuje jednoduchý test (pojmenovaný „*In vitro* hydrolyzační rozbor") aktivity polypeptidů faktoru VIIa podle vynálezu. Podle toho jsou varianty faktoru VIIa, o které je konkrétní zájem takové varianty, kde poměr mezi aktivitou varianty a aktivitou přirozeného faktoru VII na obr. 1 je 1,0, nebo vyšší, pokud jsou testovány zde popisovaným „*in vitro* hydrolyzačním rozborem".

Aktivita variant může být měřena také při použití fyziologického substrátu, jako je faktor *X* („*In vitro* proteolytický rozbor") (viz příklad 6), ve vhodné koncentraci 100 až 1000 nM, přičemž vzniklý faktor Xa je měřen po přidání vhodného chromogenního substrátu (př. S-2765). Navíc, rozbor aktivity může probíhat při fyziologické teplotě.

Schopnost polypeptidů prokoagulantu faktoru VIIa vytvářet trombin může být měřena také rozborem, který obsahuje důležité koagulační faktory a inhibitory ve fyziologických koncentracích (bez faktoru VII při napodobování podmínek hemofilie A) a aktivované krevní destičky (jak je popsáno na str. 543 v Monroe *et al.* (1997), Brit. J. Haematol. 99, 542-547, který je zde zařazen svým odkazem).

Deriváty prokoagulantu faktoru VII podle navrhovaného vynálezu mohou být používány pro kontrolu poruch krvácení, které mají různé příčiny, jako je nedostatek koagulačního faktoru (např. hemofilie A a B nebo nedostatek koagulačních faktorů XI nebo VII) nebo inhibitory koagulačního faktoru, nebo mohou být použity pro kontrolu nadměrného krvácení, které se vyskytuje u subjektů s normálně fungující krevní koagulační kaskádou (žádné nedostatky koagulačního faktoru nebo inhibitory proti některému z koagulačních faktorů). Takové krvácení může být například způsobeno špatnou funkcí krevních destiček, trombocytopenií nebo von Willebrandovou chorobou. Může se vyskytovat také u subjektů, u kterých byla různými podněty navozena zvýšená fibrinolytická aktivita.

U subjektů, u kterých došlo k rozsáhlému poškození tkáně ve spojitosti s chirurgií nebo poškození cév, může být hemostatický mechanismus ochromený nutností nastolení okamžité zástavy krvácení a místo normálního hemostatického mechanismu se může vyvinout krvácení. Dosažení dostatečné zástavy krvácení je také problémem, když ke krvácení dochází

09.01.04

v orgánech, jako je mozek, oblast středního ucha a očí, a může být také problémem v případech rozšířených krvácení (krvácivá gastritida a silné děložní krvácení), kdy je obtížné určit zdroj. Stejný problém může nastat při odebírání biopsií z různých orgánů (játra, plíce, nádorová tkáň, gastrointestináltní trakt) stejně tak jako při laparoskopické chirurgii. Při těchto situacích je těžké docílit zástavy krvácení chirurgickými způsoby (švy, svorky atd.). Akutní a silná krvácení se mohou také vyskytovat u subjektů na protisrážlivé léčbě, u kterých může být podávanou léčbou navozena špatná zástava krvácení. Tyto subjekty, v případě, že musí být protisrážlivý účinek nastolen rychle, potřebují chirurgický zásah. Jiná situace, která může způsobovat problémy v případě nedostatečné zástavy krvácení, představuje subjekty s normálním hemostatickým mechanismem, který podstupuje protisrážlivou léčbu pro prevenci tromboembolického onemocnění. Taková léčba může zahrnovat heparin, další formy proteoglykanů, warfarin nebo jiné formy antagonistů vitamínu K, stejně tak jako aspirin a další inhibitory shlukování krevních destiček.

Systémová aktivace koagulační kaskády může vést k diseminované intravaskulární koagulaci (DIC). Nicméně, tyto komplikace nebyly zpozorovány u subjektů léčených vysokými dávkami rekombinantního FVIIa díky místnímu hemostatickému procesu vyvolanému tvorbou komplexu mezi FVIIa a TF, který je vystaven v místě narušení cévní stěny. Deriváty prokoagulantu faktoru VII podle vynálezu tak mohou být užívány také v jejich aktivované formě, aby tak kontrolovaly nadměrná krvácení ve spojitosti s normálním hemostatickým mechanismem.

Při léčbě spolu se záměrným zásahem budou varianty faktoru VII podle vynálezu typicky podávány během 24 hodin před provedením zásahu, a poté po dobu 7 dní nebo déle. Koagulant může být podáván různými způsoby, jak je zde popsáno.

Dávka derivátů faktoru VII se pohybuje v rozmezí 0,05 mg až 500 mg denně, výhodně 1 mg až 200 mg denně, a výhodněji 10 mg až 175 mg denně, pro 70 kg vážící subjekt jako zátěžové a udržovací dávky, v závislosti na hmotnosti subjektu a na dalších podmínkách.

Léčebné prostředky jsou zamýšleny především pro mimostřevní podávání pro preventivní a/nebo léčebnou kůru. Výhodně, léčebné prostředky jsou podávány mimostřevně, tj., intravenózně, pod kůži nebo nitrosvalově, nebo mohou být podávány plynulou nebo pulsační infuzí. Prostředky pro mimostřevní podávání obsahují derivát faktoru VII podle vynálezu v kombinaci s léčebně vhodným nosičem, nejlépe v něm rozpuštěné, nejlépe ve vodném nosiči. Může být použito množství vodných nosičů, jako je voda, upravená voda, 0,4 % solný roztok, 0,3 % glycin a podobně. Deriváty faktoru VII podle vynálezu mohou být také vytvořeny jako lipozómové přípravky pro podávání nebo směrování do míst zranění.

09.01.04

Lipozómové přípravky jsou obecně popsány v např. US 4 837 028, US 4 501 728 a US 4 975 282. Prostředky mohou být sterilizovány běžnými, dobře známými sterilizačními technikami. Výsledné vodné roztoky mohou být baleny pro použití, nebo mohou být za sterilních podmínek filtrovány a sublimačně sušeny, sublimačně sušené přípravky jsou před podáváním smíchány se sterilním vodným roztokem. Prostředky mohou obsahovat léčebně přijatelné pomocné částice, jak je vyžadováno pro přibližné fyziologické podmínky, jako je upravení pH a vyrovnávající činidla, činidla pro upravení napětí a podobně, například, acetát sodný, laktát sodný, chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý apod.

Koncentrace derivátu faktoru VII v těchto formách se může velmi lišit, tj. může činit méně než 0,5 % hmotnosti, obyčejně alespoň 1 % hmotnosti až do množství 15 nebo 20 % hmotnosti a bude zvolena především objemem tekutiny, lepkavostí apod., podle zvoleného konkrétního způsobu podávání.

Takto může typický léčebný prostředek pro intravenózní infuzi obsahovat 250 ml sterilního Ringer´s roztoku a 10 mg polypeptidu faktoru VII. Současné způsoby přípravy mimostřevně podávaných prostředků budou známy nebo budou zřejmé odborníkům v současném stavu techniky a jsou blíže popsány například v Remington´s Rharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990).

Prostředky obsahující deriváty faktoru VII podle navrhovaného vynálezu mohou být podávány preventivně a/nebo léčebně. V léčebném využití jsou prostředky podávány subjektu, který již trpí nemocí, jak je popsáno výše, v množství dostatečném pro vyléčení, pro ulehčení nebo částečné zastavení nemoci a jejích komplikací. Množství odpovídající dosažení těchto účinků je definováno jako „léčebně účinné množství“. Odborník v současném stavu techniky bude rozumět, že množství účinné pro tyto účely bude záviset na vážnosti nemoci nebo zranění, stejně tak jako na hmotnosti a celkovém stavu subjektu. Obecně, i když je účinné množství v rozmezí 0,05 mg až 500 mg derivátu faktoru VII denně pro 70 kg subjekt, běžně se užívají dávky 1,0 mg až 200 mg derivátu faktoru VII denně.

Musíme mít na paměti, že materiály podle navrhovaného vynálezu mohou být obyčejně používány u stavů vážných chorob nebo zranění, což jsou život ohrožující nebo potenciálně život ohrožující situace. V takových případech, vzhledem k minimalizaci cizích částic a nedostatečně imunogenních lidských derivátů faktoru VII u lidí, je možné a ošetřujícím lékařem také vyžadováno, aby byl podáván podstatný nadbytek prostředků těchto variant faktoru VII.

U preventivního využití jsou prostředky obsahující derivát faktoru VII podle vynálezu podávány subjektu náchylnému nebo jinak ohroženému nemocí nebo zraněním, aby došlo ke

09.01.04

zlepšení vlastní schopnosti srážení. Takové množství je definováno jako „preventivně účinná dávka". U preventivních využití je přesná dávka opět závislá na zdravotním stavu a hmotnosti subjektu, ale dávka se obyčejně pohybuje v rozmezí 0,05 mg až 500 mg denně pro 70 kg subjekt, běžněji 1,0 mg až 200 mg denně pro 70 kg subjekt.

Jednotlivé nebo vícenásobné podávání prostředků může probíhat v dávkách a způsoby podle ošetřujícího lékaře. Pro ambulantně léčené subjekty, kteří vyžadují denní udržovací hladiny mohou být deriváty faktoru VII podávány plynulou infuzí s použitím např. přenosného pumpového systému.

Deriváty faktoru VII podle navrhovaného vynálezu mohou být použity pro místní podávání, jako je například aktuální použití, například prostřednictvím spreje, postříkáním, dvojitými balónovými katetry, vložením do cévních štěpů, hydrogelů použitých pro pokrytí balónových katetrů, nebo dalšími zavedenými způsoby. V každém případě by léčebné prostředky měly poskytovat množství derivátů faktoru VII dostatečných pro účinnou léčbu subjektu.

Inaktivované polypeptidy faktoru VII podle navrhovaného vynálezu jsou schopné se vázat na tkáňový faktor buněčného povrchu. Například, DEGR-faktor VIIa váže tkáňový faktor buněčného povrchu se stejnou nebo vyšší afinitou než kontrolní typ faktoru VIIa. Nicméně, DEGR-faktor VIIa nemá enzymatickou aktivitu, ale váže se na tkáňový faktor a funguje jako konkurenční soupeř pro kontrolní typ faktoru VIIa, a tím potlačuje následující kroky ve vnější cestě vedoucí k tvorbě trombinu.

Inaktivované polypeptidy faktoru VII jsou obzvláště užitečné pro podávání lidem pro léčbu různých stavů, které zahrnují intravaskulární koagulaci. Například, ačkoli hluboká žilní trombóza nebo plicní embolie mohou být léčeny běžnými antikoagulanty, zde popsané deriváty inaktivovaného faktoru VII mohou být použity pro předcházení výskytu tromboembolických komplikací u pacientů, u kterých bylo zjištěno vysoké nebezpečí obtíží, jako jsou lidé podstupující chirurgický zásah nebo lidé s poruchou srdce. Navíc, deriváty inaktivovaného faktoru VII může fungovat jako antagonista pro vyvolání srážení zprostředkované tkáňovým faktorem, a tak blokuje tvorbu trombinu a následné ukládání fibrinu. Takto mohou být deriváty inaktivovaného faktoru VII užitečné pro potlačování aktivity tkáňového faktoru, což má za následek například potlačení krevního srážení, trombózu nebo ukládání krevních destiček.

Inaktivované polypeptidy faktoru VII jsou obzvláště užitečné pro léčbu hyperplazie intimy, restenózy z akutního cévního poranění, trombózy hlubokých žil, tepenné trombózy, trombózy po chirurgickém zákroku, bypass na koronárních tepnách (CABG), perkutánní transdermální koronární anagioplastiku (PTCA), mrtvice, rakoviny, nádorových metastáz, vývoj krevních

09.01.04

cév, ischemie/reperfuze, revmatoidní artritidy, trombolýzy, arterioskleróza a restenózy po angioplastice, akutních a chronických známek, jako je zánět, septický šok, otrava krve, nízký krevní tlak, syndrom akutní respirační tísně (ARDS), diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC), embolie plic, ukládání krevních destiček, infarkt myokardu, nebo pro preventivní léčbu savců s arterosklerózou při nebezpeční vzniku trombózy. Akutní cévní zranění jsou taková, která se vyskytují náhle (např. za dny až měsíce), na rozdíl od chronických cévních zranění (např. arterioskleróza), které se vyvíjejí po celý život. Akutní cévní zranění často vznikají jako následek chirurgického zákroku, jako je cévní rekonstrukce, kde se používají techniky angioplastiky, endarterektomie, ateroktomie, umístění cévních štěpů a podobně. Dále se může objevit také hyperplázie jako zpožděný následek odpovědi na např. umístění štěpu nebo transplantace orgánu. Jelikož deriváty inaktivovaného faktoru VII jsou více výběrové než je heparin, neboť obyčejně váží jen tkáňový faktor, který byl vystaven v místech poranění, a jelikož deriváty inaktivovaného faktoru VII neničí další koagulační proteiny, bylo by použití faktoru více účinné a komplikace krvácení by byly méně pravděpodobné, které způsobuje heparin používaný preventivně pro předcházení trombózy hlubokých cév.

Deriváty inaktivovaného faktoru VII, které si ponechávají schopnost vázat tkáňový faktor, potlačují shlukování krevních destiček v místě cévního poranění blokováním produkce trombinu a následného ukládání fibrinu.

Díky schopnosti DEGR-faktoru VII blokovat tvorbu trombinu a omezit ukládání krevních destiček v místě akutního cévního zranění, mohou být deriváty inaktivovaného faktoru VII, které si ponechávají schopnost vázat tkáňový faktor, ale postrádají enzymatickou aktivitu faktoru VIIa, použity pro potlačování cévní restenózy.

Složení obsahující deriváty inaktivovaného faktoru VII jsou zvláště užitečné pro způsoby léčby pacientů, kdy jsou složení vytvořené do léčebného prostředku podávány jedincům, kteří trpí některým stádiem nemoci, pro léčbu stavů příbuzných koagulaci. Takové deriváty inaktivovaného faktoru VII, které jsou schopné vázat tkáňový faktor, ale mají podstatně sníženou schopnost katalyzovat aktivaci dalších faktorů v koagulační kaskádě, mohou mít delší poločas rozpadu v séru a proto i delší odpovídající dobu antikoagulační aktivity při srovnání s jinými antikoagulanty. Mezi lékařské příznaky pro složení pro subjekt obyčejně léčený antikoagulanty jsou například, trombóza hlubokých cév, plicní embolie, mrtvice, desiminovaná intravaskulární koagulace (DIC), ukládání fibrinu v plících a ledvinách spojené s endotoxemií Gram-negativních bakterií a infarkt myokardu. Složení mohou být použita pro potlačení cévní restenózy, která se vyskytuje po mechanickém poranění cév, jako je zranění

09.01.04

způsobené balónkovou angioplastikou, endarterektomií, reduktivní arterotoktomií, umístěním stentu, laserovou léčbou nebo rotablací, nebo které se vyskytuje sekundárně k cévním štěpům, stentům, bypass štěpům nebo při transplantaci orgánů. Složení mohou být použita pro potlačování ukládání krevních destiček a podobných poruch. Takto, způsob potlačování koagulace, cévní restenózy nebo ukládání krevních destiček, zahrnuje například podávání směsi obsahující deriváty inaktivovaného faktoru VII pacientovi, přičemž obsahují alespoň jednu aminokyselinovou záměnu v katalytické triádě Ser344, Asp242 a His193, v množství dostatečném pro účinné potlačení koagulace, cévní restenózy nebo ukládání krevních destiček. Způsoby mohou být použity také pro léčbu akutního uzavření koronární arterie u jedince (např. akutní infarkt myokardu), které zahrnují podávání derivátů inaktivovaného faktoru VII, který obsahuje DEGR-faktor VII a FFR-faktor VII, současně s aktivátorem tkáňového plasminogenu nebo streptokinázy, a může zrychlit tPA vyvolávanou trombolýzu. Deriváty inaktivovaného faktoru VII jsou podávány společně nebo krátce po podávání trombolytického činidla, jako je aktivátor tkáňového plasminogenu.

Složení derivátů inaktivovaného faktoru VII bude mít také podstatné využití v předcházení embolie srdce a v léčbě trombotické mrtvice. Jelikož deriváty faktoru VII mají nízkou schopnost způsobit krvácivé komplikace a jsou výběrové, mohou být podávány pacientům s mrtvicí a mohou tak předcházet rozšíření uzávěrů arteriálního trombu. Množství podávaných derivátů faktoru VII se bude lišit u každého pacienta v závislosti na povaze a vážnosti mrtvice, ale dávky budou obecně v rozmezí, které je navrhováno níže.

Deriváty inaktivovaného faktoru VII a jejich složení mohou být také používány pro potlačování škodlivých jevů spojených s ischemickou reperfuzí. Těžká ischemie tkáně, orgánu nebo končetiny může být způsobena poklesem krevního oběhu a může být spojována s traumatem, chirurgickým zásahem, nebo sníženým krevním tlakem. Jedna z komplikací spojovaná s těžkou ischemií je zvýšení koncentrace tkáňového faktoru v arteriálním systému. Tato zvýšená exprese tkáňového faktoru pravděpodobně stimuluje prokoagulační odpověď, především v kapilárním řečišti. Po reperfuzi ischemické tkáně se může vytvořit trombus, který může být uzavřený nebo neuzavřený. Tvorba trombu v arteriích a ukládání krevních destiček podél trombu vede k sekundárnímu vzniku ischemie tkáně. Tvorba trombu a přítomnost krevních destiček může poté způsobit tvorbu a uvolňování mnoha biologicky aktivních faktorů, které zahrnují faktory vytvořené během koagulační kaskády, jako je trombin a faktoru X, stejně tak jako faktory uvolněné z aktivovaných krevních destiček. Postupně pak tyto faktory mohou vyvolat tvorbu přídavných faktorů endoteliálními buňkami a buňkami hladkého svalstva, nebo přilehlými mononukleárními buňkami, jako je TNF-α a IL-1. Tyto

09.01.04

faktory pak postupně mohou aktivovat endoteliální buňky, což vede ke zvýšené expresi různých adhezivních molekul spojovaných s vazbou monocytů a neutrofilů. Vazba a přechod monocytů a neutrofilů, uvolňování biologicky aktivních sloučenin těmito buňkami, což zahrnuje tvorbu volných kyslíkatých radikálů, může zhoršit úroveň aktivace endoteliálních buněk a jejich poškození. Nakonec, není-li kaskáda těchto jevů omezována, vede to k systémovým komplikacím a k možnému hromadnému selhání orgánů. Blokováním tkáňového faktoru podle navrhovaného vynálezu podáváním specifického inhibitoru vazby tkáňového faktoru a faktoru VII (např. FFR-FVIIa), a tím blokováním počátku vnější cesty koagulace, může být zabráněno počátku kaskády těchto jevů, čímž dojde k odstranění nebo k minimalizování škodlivých jevů spojovaných s ischemií a reperfuzí.

Dávka derivátů inaktivovaného faktoru VII pro předcházení hluboké žilní trombózy je v rozmezí 50 μg až 500 mg denně, typicky 1 mg až 200 mg denně, a nejvhodněji 10 až 175 mg denně pro pacienta vážícího 70 kg, a podávání by mělo začínat alespoň 6 hodin před chirurgickým zásahem a mělo by pokračovat, dokud pacient nebude schopný odchodu. Dávka derivátů inaktivovaného faktoru VII v léčbě restenózy se bude lišit u každého pacienta, ale bude obecně ve stejném rozmezí, jak je doporučováno výše.

Složení obsahující deriváty inaktivovaného faktoru VII budou typicky podávány během 24 hodin před zásahem, a po 7 dní nebo více po něm. Podávání může být prováděno různými způsoby, jak je zde dále popsáno. Složení obsahující deriváty inaktivovaného faktoru VII mohou být také podávány systémově nebo lokálně pro umístění cévních štěpů (např. potažení umělými nebo pozměněnými přirozenými arterálními cévními štěpy), v místech anastomózy, chirurgické endarterektomie (typicky endarterektomie krční tepny), bypass štěpů a podobně.

Při léčbě trombózy vnitřních žil a/nebo embolie plic se dávka derivátů faktoru VII pohybuje 50 μg až 500 mg denně, typicky 1 mg až 200 mg denně, a nejvhodněji 10 až 175 mg denně pro pacienta vážícího 70 kg, jako zátěžové a udržující dávky, v závislosti na hmotnosti pacienta a různých podmínkách. Jelikož infuze derivátů inaktivovaného faktoru VII snižují pravděpodobnost komplikací krvácení, mohou deriváty inaktivovaného faktoru VII nahradit nebo snížit dávku heparinu během nebo po chirurgickém zákroku současně s tromboktomií nebo embolektomií.

V případě akutní bakterémie, endotoxemie nebo DIC, je pacientovi podávána zátěžová dávka derivátu faktoru VII alespoň 50 μg až 500 mg denně, typicky 1 mg až 200 mg denně, a nejvhodněji 10 až 175 mg denně pro pacienta vážícího 70 kg, s udržovacími dávkami po zásahu v rozmezí 50 μg až 500 mg denně, typicky 1 mg až 200 mg denně pro pacienta vážícího 70 kg.

09.01.04

Nejvhodněji má derivát faktoru VII poločas rozpadu ($t_{1/2}$), který je zvýšený ve srovnání s poločasem rozpadu nespojeného faktoru VII, od kterého byl odvozen. S výhodou je poločas rozpadu derivátu faktoru VII zvýšen alespoň 1,5- až 2-krát, výhodněji 2- až 3-krát, nejvýhodněji 5- až 10-krát, optimálně 100-krát, obyčejně 6-krát ve srovnání s poločasem rozpadu nepozměněného původního faktoru VII.

Běžné způsoby napojení polyethylenglykolu k proteinům jsou popsány v US 4 179 337 vydaným 18.12.1979 (vložen zde svým odkazem, obsahuje způsoby připojení polyethylenglykolu k proteinům). Dále, další způsoby připojení polyethylenglykolu jsou popsány v US 5 122 614 vydaným 16.6.1992, také vložený zde svým odkazem, popisujícím způsoby připojení polyethylenglykolu k proteinům. Nejužitečnějším činidlem pro cystein-PEGylaci je maleimido-PEG, ale pro specifické pozměnění cysteinem jsou možné další chemikálie.

PŘEHLED OBRÁZKŮ NA VÝKRESECH

Navrhovaný vynález je dále popsán ve větších detailech v příkladech s odkazy na připojené obrázky:

Obr. 1. Struktura správně zpracovaného lidského koagulačnícho faktoru VII, aminokyseliny 1 až 406 s gamma karboxylovanými Glu zbytky (γ) a glykosylací (*). Šipka u aminokyselinového zbytku 152 znázorňuje místo, kde je jednořetězcový faktoru VII štěpen, aby tak byl přeměněn na aktivovaný dvojřetězcový faktor VII (FVIIa).

Obr. 2. Konstrukce plazmidů pro expresi rekombinantních polypeptidů lidského faktoru VII. Plazmid pLN174 exprimuje lidský faktor VII se spojeným pro-peptidem, který se přirozeně spojuje s faktorem VII.

Navrhovaný vynález je dále doložen následujícími příklady, které nicméně nejsou míněny jako omezující rozsah ochrany. Znaky obsažené v dřívějším popisu a v následujících příkladech mohou, odděleně a v jakékoliv kombinaci, být předlohou pro provedení vynálezu v různých formách.

PŘÍKLADY PROVEDENÍ VYNÁLEZU

Terminologie aminokyselinových záměn užívaná v následujících příkladech je následující: První písmeno představuje aminokyselinu přirozeně se vyskytující v pozici SEQ ID NO:1. Následující číslo představuje pozici v SEQ ID NO:1. Druhé písmeno představuje odlišnou aminokyselinu zaměněnou za původní aminokyselinu. Příkladem je R396C, kde arginin v pozici 396 v SEQ ID NO:1 je nahrazen cysteinem. V jiném příkladě, V158T/M298Q je

09-01-04

valin v pozici 158 v SEQ ID NO:1 zaměněn treoninem a metionin v pozici 298 v SEQ ID NO:1 je zaměněn glutaminem ve stejném polypeptidu faktoru VII.

PŘÍKLAD 1.

Konstrukce DNA kódující FVII-(R396C), FVII-(Q250C), FVII-(P406C), FVII-(407C), FVII-(V158T/M298Q), FVII-(L305V/M306D/D309S), FVII-(K337A), FVII-(L305V) a FVII-(F374P):

Konstrukty DNA kódující FVII-(R396C), FVII-(Q250C), FVII-(P406C), FVII-(407C), FVII-V158T/M298Q), FVII-(L305V/M306D/D309S), FVII-(K337A), FVII-(L305V) a FVII-(F374P) byly připraveny místně řízenou mutagenezí při použití spirálovitého, dvojšroubovicového DNA vektoru s inzertem lidského FVII (pLN174) a dvou syntetických primerů obsahující požadovanou mutaci. Byly použity následující dvojice primerů:

Pro FVII-(R396C):

5′-GCG CTC AGA GCC ATG CCC AGG AGT CCT CC-3′ (SEQ ID NO:3)

5′-GGA GGA CTC CTG GGC ATG GCT CTG AGC GC-3′ (SEQ ID NO:4)

Pro FVII-(Q250C):

5′-GCT CCG CCT GCA CTG TCC CGT GGT CCT CAC TGA CC-3′ (SEQ ID NO:5)

5′-GGT CAG TGA GGA CCA CGG GAC AGT GCA GGC GGA GC-3′ (SEQ ID NO:6)

Pro FVII-(P406C):

5′-GCG AGC CCC ATT TTG CTA GAC TAG AGG ATC TGG G-3′ (SEQ ID NO:7)

5′-CCC AGA TCC TCT AGT CTA GCA AAA TGG GGC TCG C-3′ (SEQ ID NO:8)

Pro FVII-(P407C):

5′-CCT GCG AGC CCC ATT TCC CTG TTA GAC TAG AGG ATC TGG G-3′ (SEQ ID NO:9)

5′-CCC AGA TCC TCT AGT CTA ACA GGG AAA TGG GGC TCG CAG G-3′ (SEQ ID NO:10)

Pro FVII-(M298Q):

5′-GCC CTG GAG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3′ (SEQ ID NO:11)

5′-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CTC CAG GGC-3′ (SEQ ID NO:12)

09.01.04

Pro FVII-(L305V):
5′-CGT GCC CCG GGT GAT GAC CCA GGA C-3′ (SEQ ID NO:13)
5′-GTC CTG GGT CAT CAC CCG GGG CAC G-3′ (SEQ ID NO:14)

Pro FVII-(M306D/D309S):
5′-TCT AGA TAC CCA GTC TTG CCT GCA GCA GTC ACG GAA-3′ (SEQ ID NO:15)
5′-TTC CGT GAC TGC TGC AGG CAA GAC TGG GTA TCT AGA-3′ (SEQ ID NO:16)

Pro FVII-(K337A):
5′-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3′ (SEQ ID NO:17)
5′-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3′ (SEQ ID NO:18)

Pro FVII-(F374P):
5′-CCG TGG GCC ACC CTG GGG TGT ACA CC-3′ (SEQ ID NO:19)
5′-GGT GTA CAC CCC AGG GTG GCC CAC GG-3′ (SEQ ID NO:20)

Oligonukleotidové primery, každý komplementární k opačnému řetězci vektoru, byly prodlouženy během teplotních cyklů pomocí Pfu DNA polymerázy. Byl vytvořen mutovaný plazmid obsahující specifická místa. Po teplotních cyklech byl produkt opracován s DpnI, který je specifický pro metylovanou a polometylovanou DNA, aby došlo k rozštěpení původní molekuly DNA a pro nalezení syntetizované DNA obsahující mutaci.
Postupy přípravy DNA konstruktu při použití polymerázové řetězové reakce a při použití specifických primerů jsou dobře známy odborníkům v současném stavu techniky (viz. PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, USA).

PŘÍKLAD 2.
Příprava FVII-(R396C).
BHK buňky byly transfektovány v podstatě tak, jak bylo popsáno dříve (Thim *et al.* (1988) Biochemistry 27, 7785-7793; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243), aby bylo dosaženo exprese varianty FVII-(R396C). Polypeptid faktoru VII byl přečištěn následovně:
Upravené médium bylo naneseno na 25 ml kolonu Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech), po přidání 5 mM EDTA, 0,1 % Triton-X-100 a 10 mM Tris bylo upraveno pH na 8,0 a vodivost byla upravena na 10 až 11 mS/cm přidáním vody. Protein byl z kolony vymyt

09.01.04

nejlépe gradientem od 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, pH 8,0 na 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 25 mM $CaCl_2$, 0,1 % Triton X-100, pH 7,5. Frakce obsahující FVII-(R396C) byly slity dohromady a byly naneseny na 25 ml kolonu obsahující monoklonální protilátky F1A2 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) navázanými na CNBr-aktivovanou Sepharose 4B (Pharmacia Biotech). Kolona byla uvedena do rovnováhy 50 mM Hepes, pH 7,5, obsahující 10 mM $CaCl_2$, 100 mM NaCl a 0,02 % Triton X-100. Po promytí roztokem udržujícím rovnováhu a roztokem udržujícím rovnováhu obsahujícím 2 M NaCl, byl navázaný materiál vymyt vyvažujícím roztokem obsahujícím 10 mM EDTA místo $CaCl_2$. Před použitím nebo uskladněním byl přidán přebytek $CaCl_2$ nad EDTA nebo byl FVII-(R396C) přemístěn do roztoku obsahující Ca^{2+}. Výtěžek v každém kroku byl sledován měřením faktoru VII v ELISA testech a přečištěný protein byl analyzován SDS elektroforézou.

PŘÍKLAD 3.

Příprava FVII-(M298Q).

BHK buňky byly transfektovány v podstatě tak, jak bylo popsáno dříve (Thim *et al.* (1988) Biochemistry 27, 7785-7793; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243), aby bylo dosaženo exprese varianty FVII-(V158T/M298Q). Polypeptid faktoru VII byl přečištěn následovně:

Upravené médium bylo naneseno na 25 ml kolonu Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech), po přidání 5 mM EDTA, 0,1 % Triton-X-100 a 10 mM Tris bylo upraveno pH na 8,0 a vodivost byla upravena na 10 až 11 mS/cm přidáním vody. Protein byl z kolony vymyt nejlépe gradientem od 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, pH 8,0 na 10 mM Tris, 1 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0,1 % Triton X-100, pH 7,5. Frakce obsahující FVII-(V158T/M298Q) byly slity dohromady, byl přidán 10mM $CaCl_2$, a byly naneseny na 25 ml kolonu obsahující monoklonální protilátky F1A2 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) navázanými na CNBr-aktivovanou Sepharose 4B (Pharmacia Biotech). Kolona byla uvedena do rovnováhy 50 mM Hepes, pH 7,5, obsahující 10 mM $CaCl_2$, 100 mM NaCl a 0,02 % Triton X-100. Po promytí roztokem udržujícím rovnováhu a roztokem udržujícím rovnováhu obsahujícím 2 M NaCl, byl navázaný materiál vymyt vyvažujícím roztokem obsahujícím 10 mM EDTA místo $CaCl_2$. Před použitím nebo uskladněním byl přidán přebytek $CaCl_2$ nad EDTA nebo byl FVII-(V158T/M298Q) přemístěn do roztoku obsahující Ca^{2+}. Výtěžek v každém kroku byl sledován měřením faktoru VII v ELISA testech a přečištěný protein byl analyzován SDS elektroforézou.

09.01.04

PŘÍKLAD 4.

Příprava FVII-(L305V/M306D/D309S).

BHK buňky byly transfektovány v podstatě tak, jak bylo popsáno dříve (Thim *et al.* (1988) Biochemistry 27, 7785-7793; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243), aby bylo dosaženo exprese varianty FVII-(L305V/M306D/D309S). Polypeptid faktoru VII byl přečištěn následovně:

Upravené médium bylo naneseno na 25 ml kolonu Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech), po přidání 5 mM EDTA, 0,1 % Triton-X-100 a 10 mM Tris bylo upraveno pH na 8,0 a vodivost byla upravena na 10 až 11 mS/cm přidáním vody. Protein byl z kolony vymyt nejlépe gradientem od 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, pH 8,0 na 10 mM Tris, 1 M NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0,1 % Triton X-100, pH 7,5. Frakce obsahující FVII-(L305V/M306D/D309S) byly slity dohromady, byl přidán 10 mM $CaCl_2$, a byly naneseny na 25 ml kolonu obsahující monoklonální protilátky F1A2 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) navázanými na CNBr-aktivovanou Sepharose 4B (Pharmacia Biotech). Kolona byla uvedena do rovnováhy 50 mM Hepes, pH 7,5, obsahující 10 mM $CaCl_2$, 100 mM NaCl a 0,02 % Triton X-100. Po promytí roztokem udržujícím rovnováhu a roztokem udržujícím rovnováhu obsahujícím 2 M NaCl, byl navázaný materiál vymyt vyvažujícím roztokem obsahujícím 10 mM EDTA místo $CaCl_2$. Před použitím nebo uskladněním byl přidán přebytek $CaCl_2$ nad EDTA nebo byl FVII-(L305V/M306D/D309S) přemístěn do roztoku obsahující Ca^{2+}. Výtěžek v každém kroku byl sledován měřením faktoru VII v ELISA testech a přečištěný protein byl analyzován SDS elektroforézou.

PŘÍKLAD 5.

In Vitro Hydrolyzační rozbor.

Původní (kontrolní) faktor VIIa a varianta faktoru VIIa (oba zde používané jako „faktor VIIa“) jsou souběžně měřeny pro přímé porovnání jejich specifických aktivit. Rozbor probíhá v mikrotitrační destičce (MaxiSorp, Nunc, Denmark). K faktoru VIIa (konečná koncentrace 100 nM) v 50 mM Hepes, pH 7,4 obsahující 0,1 M NaCl, 5 mM $CaCl_2$ a 1 mg/ml hovězí sérový albumin je přidán chromogenní substrát D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilid (S-2288, Chromogenix, Sweden), v konečné koncentraci 1 mM. Je měřena plynule absorbance při 405 nm na SpectraMax™ 340 destičkovém snímači (Molecular Devices, USA). Pro výpočet poměru mezi aktivitami varianty a kontrolního faktoru VIIa byla použita absorbance změřená během 20 minut inkubace po odečtení absorbance v kontrolní jamce, která neobsahuje enzym:

Poměr = ($A_{405\ nm}$ varianty faktoru VIIa)/($A_{405\ nm}$ původního faktoru).

09.01.04

PŘÍKLAD 6.

In Vitro proteolytický rozbor.

Původní (kontrolní) faktor VIIa a varianta faktoru VIIa (oba zde používané jako „faktor VIIa") jsou souběžně měřeny pro přímé porovnání jejich specifických aktivit. Rozbor probíhá v mikrotitrační destičce (MaxiSorp, Nunc, Denmark). Faktor VIIa (10 nM) a faktor X (0,8 μM) ve 100 μl 50 mM Hepes, pH 7,4 obsahující 0,1 M NaCl, 5 mM $CaCl_2$ a 1 mg/ml hovězí sérový albumin, jsou inkubovány po dobu 15 min. Štěpení faktoru X je poté zastaveno přidáním 50 μl 50 mM Hepes, pH 7,4, obsahující 0,1 M NaCl, 20 mM EDTA a 1 mg/ml hovězí sérový albumin. Množství vytvořeného faktoru Xa je měřeno přidáním chromogenního substrátu Z-D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilid (S-2765, Chromogenix, Sweden), v konečné koncentraci 0,5 mM. Je měřena plynule absorbance při 405 nm na SpectraMax™ 340 destičkovém snímači (Molecular Devices, USA). Pro výpočet poměru mezi proteolytickými aktivitami varianty a kontrolního faktoru VIIa byla použita absorbance vyvinutá během 10 minut inkubace po odečtení absorbance v kontrolní jamce, která neobsahuje FVIIa:

Poměr = ($A_{405\ nm}$ varianty faktoru VIIa)/($A_{405\ nm}$ přirozeného faktoru).

PŘÍKLAD 7.

Poměrné aktivity polypeptidů FVIIa měřené v rozborech popisovaných v příkladech 5 a 6.

Varianta	Poměr v příkladu 5	Poměr v příkladu 6
FVIIa-(M298Q)	3,5±0,2	12±1
FVIIa-(V158D/E296V/M298Q)	7,5±0,4	38±5
FVIIa-(K337A)	4,0±0,2	4,1±0,4
FVIIa-(L305V/M306D/D309S)	3,0±0,1	3,7±0,3
FVIIa-(L305V)	3,2±0,2	3,3±0,2
FVIIa-(F374P)	1,4	<1
FVIIa-(R396C)	1,0	1,0
FVIIa-(Q250C)	1,0	1,5
FVIIa-(P406C)	0,8	1,0
FVIIa-(407C)	1,1	1,4
kontrolní FVIIa	1,0	1,0

09.01.04

PŘÍKLAD 8.

Spojení FVII-(R396C), FVII-(Q250C), FVII-(P406C), FVII-(407C) s PEG.

Varianty faktoru VIIa, jak jsou popsány v příkladu 1, s volnou thiolovou skupinou vloženou do kteréhokoliv ze zmíněných míst (250, 396, 406 nebo 407 (poslední prodloužený na C-konci)), reagují s 5-násobným přebytkem PEG-vinylsulfonem nebo PEG-maleimidem (nebo některý jiný derivát sulfhydryl-reaktivního PEG) ve vodném roztoku po 3 hodiny, dokud reakce nedojde v podstatě k úplnému konci. Molekulová hmotnost PEG derivátu je alespoň 10000. Výsledné PEG-FVIIa jsou testovány pro amidolytickou a proteolytickou aktivitu, jak je popsáno v příkladech 5 a 6 a měly by mít aktivitu kontrolního lidského FVIIa, nebo jestliže byl do varianty FVIIa s vyšší aktivitou vložen Cys, měla by aktivita po reakci s derivátem PEG zůstat vyšší, než má kontrolní lidský FVIIa. FVIIa spojený s PEG je od nereagující varianty FVIIa a volného derivátu PEG oddělen pomocí chromatografie, jako je gelová filtrace na koloně Superdex-200 nebo podobně.

Spojování proteinů s PEG v místě Cys zbytků je známé odborníkům v současném stavu techniky a je popisováno v různých publikacích, včetně Goodson, R.J. & Katre, N.V. (1990), Bio/Technology 8, 343 a Kogan, T.P. (1992), Synthetic Comm. 22, 2417.

09.01.04

PV 2003-2454

92470

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polypeptid faktoru VII, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde aminokyselina byla nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž tato odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou, a přičemž tento polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou aktivitu nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

2. Polypeptid faktoru VII, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1 byla nahrazena odlišnou aminokyselinou.

3. Polypeptid faktoru VII, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde aminokyselina odpovídající aminokyselině v pozici vybírané z R396, Q250 nebo P406 v SEQ ID NO:1 byla nahrazena odlišnou aminokyselinou.

4. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde aminokyselina odpovídající R396 v SEQ ID NO:1 byla nahrazena odlišnou aminokyselinou.

5. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, kde aminokyselina odpovídající Q250 v SEQ ID NO:1 byla nahrazena odlišnou aminokyselinou.

6. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, kde aminokyselina odpovídající P406 v SEQ ID NO:1 byla nahrazena odlišnou aminokyselinou.

7. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 2 až 6, kde odlišná aminokyselina je schopna spojení s chemickou skupinou.

8. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, kde odlišná aminokyselina je cystein.

9. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, kde přídavná aminokyselina schopna spojení s chemickou skupinou byla vložena do sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty v pozici, kde polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

10. Polypeptid faktoru VII obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde přídavná aminokyselina schopna spojení s chemickou skupinou byla vložena

09.01.04

do sekvence SEQ ID NO:1 nebo do její varianty v pozici, kde polypeptid faktoru VII má v podstatě stejnou nebo vyšší aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

11. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 9 až 10, kde aminokyselina byla vložena v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1.

12. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 11, kde další aminokyselina schopna spojení s chemickou skupinou byla přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty.

13. Polypeptid faktoru VII obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde aminokyselina schopna spojení s chemickou skupinou byla přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty.

14. Polypeptid faktoru podle kteréhokoliv z nároků 12 až 13, kde aminokyselina byla přidána k C-konci sekvence SEQ ID NO:1.

15. Polypeptid faktoru podle kteréhokoliv z nároků 9 až 14, kde aminokyselina je cystein.

16. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15, kde aminokyselina vybíraná ze skupiny obsahující K157, V158, E296, M298, L305, D334, S336, K337 a F374 v SEQ ID NO:1 byla nahrazena odlišnou aminokyselinou, kde aminokyselina zvyšuje aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

17. Polypeptid faktoru VII podle nároku 16, kde K157 byla nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z G, V, S, T, N, Q, D a E.

18. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 16 až 17, kde V158 byla nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z S, T, N, Q, D a E.

19. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 16 až 18, kde E296 byla nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z R, K a V.

20. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 16 až 19, kde M298 byla nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z R, K, Q a N.

09.01.04

21. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 16 až 20, kde L305 byla nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z A, V, I, M, F, W, P, G, S, T, C, Y, N, E, K, R, H, D a Q.

22. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 16 až 21, kde D334 byla nahrazena E.

23. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 16 až 22, kde S336 byla nahrazena G.

24. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 16 až 23, kde K337 byla nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z A, G, V, S, T, N, Q, D a E.

25. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 16 až 24, kde F374 byla nahrazena aminokyselinou nezávisle vybíranou z A, V, L, I, M, W, P, G, S, T, C, Y, N, E, K, R, H, D a Q.

26. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 25, kde polypeptid faktoru VII je lidský faktor VII.

27. Polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 25, kde polypeptid faktoru VII je lidský faktor VIIa.

28. Polypeptid inaktivovaného faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 27, kde polypeptid faktoru VII je dále pozměněn v jeho katalytickém místě, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktoru X nebo IX.

29. Polypeptid inaktivovaného faktoru VII podle nároku 28, kde polypeptid faktoru VII je pozměněn v jeho katalytickém místě serin proteinázovým inhibitorem.

30. Polypeptid inaktivovaného faktoru VII podle nároku 29, kde proteinázový inhibitor je peptid s halomethylketonem vybíraný ze skupiny obsahující: Phe-Phe-Arg chlormethylketon, Phe-Phe-Arg chlormethylketon, D-Phe-Phe-Arg chlormethylketon, D-Phe-Phe-Arg chlormethylketon, Phe-Pro-Arg chlormethylketon, D-Phe-Pro-Arg chlormethylketon, Phe-Pro-Arg chlormethylketon, D-Phe-Pro-Arg chlormethylketon, L-Glu-Gly-Arg chlormethylketon a D-Glu-Gly-Arg chlormethylketon, Dansyl-Phe-Phe-Arg chlormethylketon, Dansyl-Phe-Phe-Arg chlormethylketon, Dansyl-D-Phe-Phe-Arg chlormethylketon, Dansyl-D-Phe-Phe-Arg chlormethylketon, Dansyl-Phe-Pro-Arg chlormethylketon, Dansyl-D-Phe-Pro-Arg chlormethylketon

09.01.04

Dansyl-Phe-Pro-Arg chlormethylketon, Dansyl-D-Phe-Pro-Arg chlormethylketon, Dansyl-L-Glu-Gly-Arg chlormethylketon a Dansyl-D-Glu-Gly-Arg chlormethylketon.

31. Derivát faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, přičemž aminokyselina byla nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou aktivitu nebo zvýšenou aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

32. Derivát faktoru VII podle nároku 31, přičemž polypeptid faktoru VII je podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, 11 až 12, 14 až 27.

33. Derivát faktoru VII podle nároku 31, přičemž aminokyselina odpovídá aminokyselině v pozici vybírané z 247 až 260, 393 až 405 nebo 406 v SEQ ID NO:1.

34. Derivát faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina vložena do sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty, a aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou aktivitu nebo zvýšenou aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

35. Derivát faktoru VII podle nároku 34, přičemž polypeptid faktoru VII je podle kteréhokoliv z nároků 9 až 12, 14 až 27.

36. Derivát faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina přidána k N- nebo C-konci sekvence SEQ ID NO:1 nebo její varianty, a aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou aktivitu nebo zvýšenou aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

37. Derivát faktoru VII podle nároku 36, přičemž polypeptid faktoru VII je podle kteréhokoliv z nároků 12 až 27.

38. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 37, přičemž chemická skupina je v podstatě neutrální.

09.01.04

39. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 31 až 38, přičemž chemická skupina zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost derivátu faktoru VII z 1000 na 80000.

40. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 31 až 39, přičemž chemická skupina zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost derivátu faktoru VII z 5000 na 60000.

41. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 31 až 40, přičemž chemická skupina zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost derivátu faktoru VII z 10000 na 40000.

42. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 31 až 41, přičemž chemická skupina je polyethylenglykol.

43. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 31 až 42, přičemž chemická skupina je vybírána z jedné do šesti molekul polyethylenglykolu.

44. Derivát faktoru VII nároku 43, přičemž chemická skupina je jedna molekula polyethylenglykolu.

45. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 31 až 44, přičemž chemická skupina je spojena s volnou sulfhydrylovou skupinou přítomnou na aminokyselině nahrazené jinou aminokyselinou, vloženou nebo přidanou k polypeptidu.

46. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 31 až 45, přičemž chemická skupina je spojena s cysteinem.

47. Derivát inaktivovaného faktoru VII, kde polypeptid inaktivovaného faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, má pozměněné jeho katalytické místo, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost polypeptidu inaktivovaného faktoru VII z 300 na 100000.

48. Derivát faktoru VII podle nároku 47, přičemž inaktivovaný polypeptid faktoru VII je podle kteréhokoliv z nároků 28 až 30.

49. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 47 až 48, přičemž chemická skupina je v podstatě neutrální.

09.01.04

50. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 47 až 49, přičemž chemická skupina zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost derivátu faktoru VII z 1000 na 80000.

51. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 47 až 50, přičemž chemická skupina zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost derivátu faktoru VII z 5000 na 60000.

52. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 47 až 51, přičemž chemická skupina zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost derivátu faktoru VII z 10000 na 40000.

53. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 47 až 52, přičemž chemická skupina je polyethylenglykol.

54. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 47 až 53, přičemž chemická skupina je vybírána z jedné do šesti molekul polyethylenglykolu.

55. Derivát faktoru VII nároku 54, přičemž chemická skupina je jedna molekula polyethylenglykolu.

56. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 47 až 55, přičemž chemická skupina je spojena s volnou sulfhydrylovou skupinou přítomnou na aminokyselině nahrazené jinou aminokyselinou, vloženou nebo přidanou k polypeptidu.

57. Derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 47 až 56, přičemž chemická skupina je spojena s cysteinem.

58. Složení zahrnující derivát faktoru VII obsahující polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou aktivitu nebo zvýšenou aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

59. Složení zahrnující derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 31 až 46.

60. Složení zahrnující derivát inaktivovaného faktoru VII, kde polypeptid inaktivovaného faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, má pozměněné jeho katalytické místo, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou

09.01.04

skupinou, která zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost polypeptidu inaktivovaného faktoru VII z 300 na 100000.

61. Složení zahrnující derivát inaktivovaného faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 47 až 57.

62. Léčebné složení zahrnující derivát faktoru VII, který obsahuje polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou aktivitu nebo zvýšenou aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa; popřípadě léčebně vhodný nosič.

63. Léčebné složení zahrnující derivát faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 31 až 46; popřípadě léčebně vhodný nosič.

64. Léčebné složení zahrnující derivát inaktivovaného faktoru VII, kde polypeptid inaktivovaného faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, a má pozměněné jeho katalytické místo, přičemž pozměnění potlačuje schopnost polypeptidu faktoru VII aktivovat plazmatický faktor X nebo IX, a je dále spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost polypeptidu inaktivovaného faktoru VII z 300 na 100000; popřípadě léčebně vhodný nosič.

65. Léčebné složení zahrnující derivát inaktivovaného faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 47 až 57; popřípadě léčebně vhodný nosič.

66. Polynukleotidový konstrukt kódující polypeptid faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 27.

67. Polynukleotidový konstrukt podle nároku 66, který představuje vektor.

68. Eukaryotické hostitelské buňky obsahující polynukleotidový konstrukt podle kteréhokoliv z nároků 66 až 67.

69. Eukaryotické hostitelské buňky podle nároku 68, které jsou savčího původu.

70. Eukaryotické hostitelské buňky podle nároku 69, kde buňky jsou vybírány ze skupiny zahrnující CHO buňky, BHK buňky nebo HEK buňky.

09.01.04

71. Transgenní zvíře, které exprimuje polynukleotidový konstrukt podle kteréhokoliv z nároků 66 až 67.

72. Transgenní rostlina, která exprimuje polynukleotidový konstrukt podle kteréhokoliv z nároků 66 až 67.

73. Způsob výroby polypeptidu faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 27, vyznačující se tím, že zahrnuje kultivaci buněk podle kteréhokoliv z nároků 68 až 70 ve vhodném růstovém médiu za podmínek umožňujících syntézu proteinu z polynukleotidového konstruktu a získání výsledného polypeptidu z kultivačního média.

74. Způsob výroby polypeptidu faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 27, vyznačující se tím, že zahrnuje získání polypeptidu faktoru VII z mléka produkovaného transgenním zvířetem podle nároku 71.

75. Způsob výroby polypeptidu faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 1 až 27, vyznačující se tím, že zahrnuje kultivaci buněk transgenní rostliny podle nároku 72 a získání polypeptidu faktoru VII z výsledné rostliny.

76. Způsob výroby derivátu faktoru VII, vyznačující se tím, že zahrnuje kroky:

a) tvorba polypeptidu faktoru VII způsobem podle kteréhokoliv z nároků 73 až 75;

b) spojení polypeptidu faktoru VII s chemickou skupinou;

c) nanesení derivátu faktoru VII na kationtovou výměnnou chromatografii nebo kolonu gelové filtrace; a

d) vymytí derivátu faktoru VII.

77. Způsob výroby derivátu faktoru VII, vyznačující se tím, že zahrnuje kroky:

a) tvorba polypeptidu faktoru VII způsobem podle kteréhokoliv z nároků 73 až 75;

b) pozměnění polypeptidu faktoru VII v jeho katalytickém místě serin proteinázovým inhibitorem;

c) spojení polypeptidu inaktivovaného faktoru s chemickou skupinou;

09.01.04

d) nanesení derivátu faktoru VII na kationtovou výměnnou chromatografii nebo kolonu pro gelovou filtraci; a

e) vymytí inaktivovaného derivátu faktoru VII.

78. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 76 až 77, vyznačující se tím, že chemická skupina má molekulovou hmotnost 300 až 100000.

79. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 76 až 78, vyznačující se tím, že chemická skupina je v podstatě neutrální.

80. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 76 až 79, vyznačující se tím, že chemická skupina má molekulovou hmotnost 1000 až 80000.

81. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 76 až 80, vyznačující se tím, že chemická skupina má molekulovou hmotnost 5000 až 60000.

82. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 76 až 81, vyznačující se tím, že chemická skupina má molekulovou hmotnost 10000 až 40000.

83. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 76 až 82, vyznačující se tím, že chemická skupina je polyethylenglykol.

84. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 76 až 83, vyznačující se tím, že chemická skupina je vybírána z jedné do šesti molekul polyethylenglykolu.

85. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 76 až 84 vyznačující se tím, že chemická skupina je jedna molekula polyethylenglykolu.

86. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 76 až 85 vyznačující se tím, že chemická skupina je spojena s volnou sulfhydrylovou skupinou přítomnou na aminokyselině nahrazené jinou aminokyselinou, vloženou nebo přidanou k polypeptidu.

87. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 76 až 82, vyznačující se tím, že chemická skupina je spojena s cysteinem.

88. Použití derivátu faktoru VII, který obsahuje polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, kde byla aminokyselina nahrazena odlišnou aminokyselinou, přičemž odlišná aminokyselina je spojena

09.01.04

s chemickou skupinou, která zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou aktivitu nebo zvýšenou aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa pro přípravu léku pro léčbu krvácivých příhod nebo pro posílení normálního hemostatického systému.

89. Použití derivátu faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 31 až 46, pro přípravu léku pro léčbu krvácivých příhod nebo pro posílení normálního hemostatického systému.

90. Použití podle kteréhokoliv z nároků 88 až 89, pro léčbu hemofilie A nebo B.

91. Způsob léčby krvácivých příhod nebo poruch krvácení u subjektu, nebo způsob posílení normálního hemostatického systému, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje podávání léčebného nebo preventivně účinného množství derivátu faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, přičemž aminokyselina byla nahrazena odlišnou aminokyselinou, a odlišná aminokyselina je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, a přičemž derivát faktoru VII má v podstatě stejnou aktivitu nebo zvýšenou aktivitu ve srovnání s rekombinantním kontrolním typem lidského faktoru VIIa.

92. Způsob léčby krvácivých příhod nebo poruch krvácení u subjektu, nebo způsob posílení normálního hemostatického systému, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje podávání léčebného nebo preventivně účinného množství derivátu faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 31 až 46.

93. Použití derivátu inaktivovaného faktoru VII, kde inaktivovaný polypeptid faktoru VII, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její variantu, je spojen s chemickou skupinou, která zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000, pro přípravu léku pro potlačování tvorby trombu u pacienta.

94. Použití derivátu inaktivovaného faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 47 až 57, pro přípravu léku pro potlačování tvorby trombu u pacienta.

95. Způsob potlačování tvorby trombu u pacienta, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje lokální podávání léčebně účinné dávky složení zahrnující derivát inaktivovaného faktoru VII do místa cévy podléhající tvorbě trombu u pacienta, přičemž polypeptid inaktivovaného faktoru VII má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její

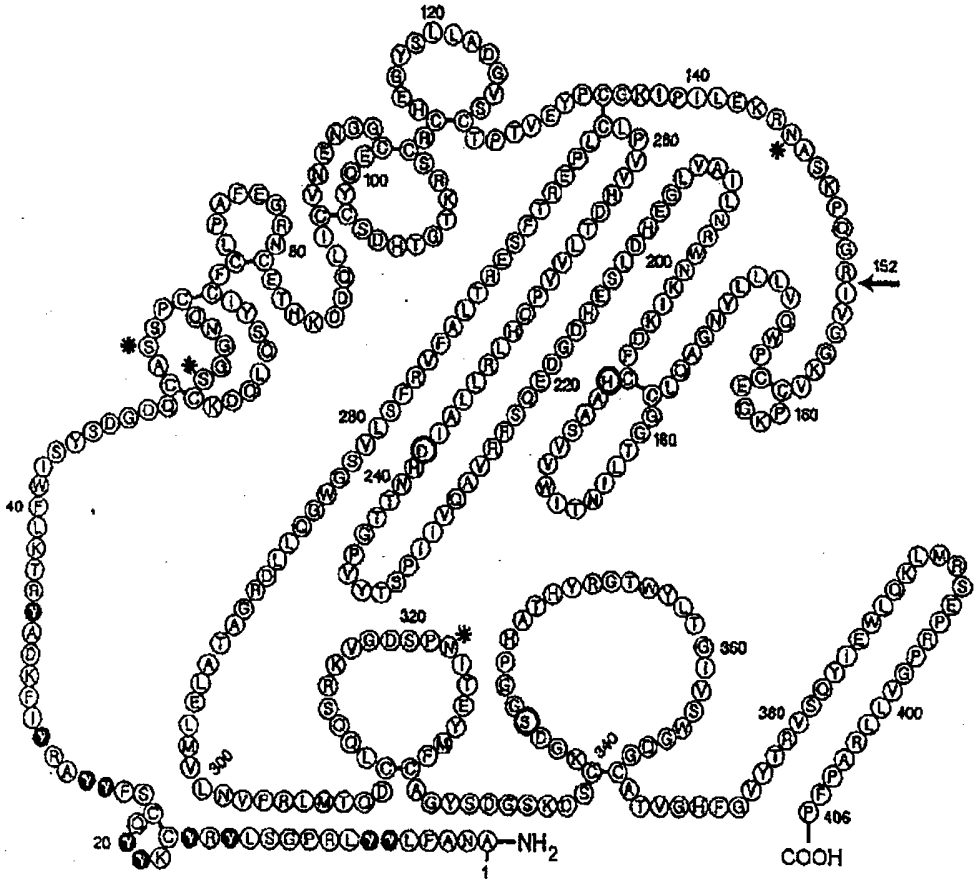
09.01.04

variantu, a je spojena s chemickou skupinou, která zvyšuje aktuální molekulovou hmotnost polypeptidu faktoru VII z 300 na 100000.

96. Způsob potlačování tvorby trombu u pacienta, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje lokální podávání léčebně účinné dávky složení zahrnující derivát inaktivovaného faktoru VII podle kteréhokoliv z nároků 47 až 57 do místa cévy podléhající tvorbě trombu u pacienta.

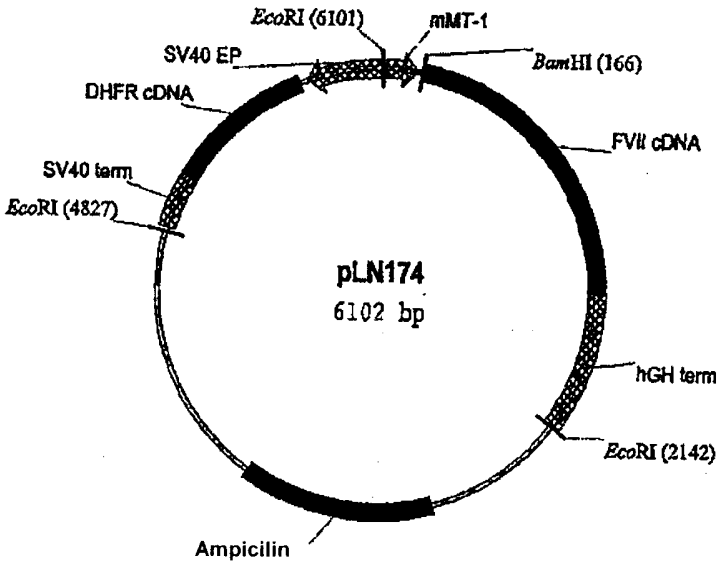
09.01.04

PV 2003-2454



Obr. 1

09.01.04


EcoRI (6101)
mMT-1
SV40 EP
BamHI (166)
DHFR cDNA
FVII cDNA
SV40 term
EcoRI (4827)
pLN174
6102 bp
hGH term
EcoRI (2142)
Ampicilin

Obr. 2

09.01.04

PV 2003-4154

9770

Seznam sekvence

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Deriváty koagulačního faktoru VII

<130> 6286-WO

<150> DK PA 2001 00477
<151> 2001-03-22

<160> 20

<170> Verze patentu 3.1

<210> 1
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_znak
<222> (1)..(406)
<223> Xaa představuje 4-karboxyglutamovou kyselinu (gama-karboxyglutamát)

<400> 1

Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Pro Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15

Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Lys
20 25 30

Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110

Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140

Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160

Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175

Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190

His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205

Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220

Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240

His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255

His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270

Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285

Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335

Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350

Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 2

<211> 6098

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> plazmid DNA pLN174

<400> 2

ttcgagctct gcactccgcc cgaaaagtgc gctcggctct gccaaggacg cggggcgcgt 60

gactatgcgt gggctggagc aaccgcctgc tgggtgcaaa ccctttgcgc ccggactcgt 120

ccaacgacta taaagagggc aggctgtcct ctaagcgtca cccgggatcc atggtctccc 180

aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct gcagtcttcg 240

taacccagga ggaagcccaa ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac gcgttcctgg 300

aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc tccttcgagg 360

aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt tcttacagtg 420

atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag gaccagctcc 480

agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag acgcacaagg 540

atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc agtgaccaca 600

cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca gacggggtgt 660

cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa aaaagaaatg 720

ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg gagtgtccat 780

ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg atcaacacca 840

tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg aacctgatcg 900

cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc cggcgggtgg 960

cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac atcgcgctgc 1020

tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc ctgcccgaac 1080
ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc ggctggggcc 1140
agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg ccccggctga 1200
tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat atcacggagt 1260
acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg gacagtggag 1320
gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc agctggggcc 1380
agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag tacatcgagt 1440
ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga gccccatttc 1500
cctagactag aggatctggg gtggcatccc tgtgaccccc ccccagtgcc tctcctggcc 1560
ctggaagttg ccactccagt gcccaccagc cttgtcctaa taaaattaag ttgcatcatt 1620
ttgtctgact aggtgtcctt ctataatatt atggggtgga ggggggtggt atggagcaag 1680
gggcaagttg ggaagacaac ctgtagggcc tgcggggtct attgggaacc aagctggagt 1740
gcagtggcac aatcttggct cactgcaatc tccgcctcct gggttcaagc gattctcctg 1800
cctcagcctc ccgagttgtt gggattccag gcatgcatga ccaggctcag ctaatttttg 1860
ttttttggt agagacgggg tttcaccata ttggccaggc tggtctccaa ctcctaatct 1920
caggtgatct acccaccttg gcctcccaaa ttgctgggat tacaggcgtg aaccactgct 1980
cccttccctg tccttctgat tttaaaataa ctataccagc aggaggacgt ccagacacag 2040
cataggctac ctggccatgc ccaaccggtg ggacatttga gttgcttgct tggcactgtc 2100
ctctcatgcg ttgggtccac tcagtagatg cctgttgaat tcgagctcgc ccgggctcta 2160
gctagagtcg acctgcaggc atgcaagctt tggcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg 2220
actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc cctttcgcca 2280
gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga 2340
atggcgaatg gcgcctgatg cggtattttc ttccttacgc atctgtgcgg tatttcacac 2400
cgcatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagccccga 2460
cacccgccaa cacccgctga cgcgccctga cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac 2520
agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc gtcatcaccg 2580
aaacgcgcga gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata 2640
ataatggttt cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt 2700
tgtttatttt tctaaatata ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa 2760
atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt 2820
attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa 2880
gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac 2940
agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt 3000
aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt 3060

cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat 3120
cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac 3180
actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg 3240
cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcggttgg gaaccggagc tgaatgaagc 3300
cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa 3360
actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 3420
ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc 3480
tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 3540
tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 3600
acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga 3660
ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat 3720
ctaggtgaag atccttttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt 3780
ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 3840
gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg 3900
gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 3960
aatactgtcc ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 4020
cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 4080
tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 4140
acgggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 4200
ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat 4260
ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 4320
tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 4380
tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc 4440
ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 4500
gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 4560
cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 4620
gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc 4680
agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac 4740
tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga 4800
aacagctatg accatgatta cgaattcatc gatatctaga tccagacatg ataagataca 4860
ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa 4920
tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacaa gttaacaaca 4980
acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggaggt gtgggaggtt ttttaaagca 5040
agtaaaacct ctacaaatgt ggtatggctg attatgatct aaagccagca aaagtcccat 5100

ggtcttataa aaatgcatag ctttaggagg ggagcagaga acttgaaagc atcttcctgt 5160
tagtctttct tctcgtagac ttcaaactta tacttgatgc ctttttcctc ctggacctca 5220
gagaggacgc ctgggtattc tgggagaagt ttatatttcc ccaaatcaat ttctgggaaa 5280
aacgtgtcac tttcaaattc ctgcatgatc cttgtcacaa agagtctgag gtggcctggt 5340
tgattcatgg cttcctggta aacagaactg cctccgacta tccaaaccat gtctacttta 5400
cttgccaatt ccggttgttc aataagtctt aaggcatcat ccaaactttt ggcaagaaaa 5460
tgagctcctc gtggtggttc tttgagttct ctactgagaa ctatattaat tctgtccttt 5520
aaaggtcgat tcttctcagg aatggagaac caggttttcc tacccataat caccagattc 5580
tgtttacctt ccactgaaga ggttgtggtc attctttgga agtacttgaa ctcgttcctg 5640
agcggaggcc agggtaggtc tccgttcttg ccaatcccca tattttggga cacggcgacg 5700
atgcagttca atggtcgaac catgatggca cggatctcga gctcgcgaaa gctttttgca 5760
aaagcctagg cctccaaaaa agcctcctca ctacttctgg aatagctcag aggccgaggc 5820
ggcctcggcc tctgcataaa taaaaaaaat tagtcagcca tggggcggag aatgggcgga 5880
actgggcgga gttaggggcg ggatgggcgg agttaggggc gggactatgg ttgctgacta 5940
attgagatgc atgctttgca tacttctgcc tgctggggag cctggggact ttccacacct 6000
ggttgctgac taattgagat gcatgctttg catacttctg cctgctgggg agcctgggga 6060
ctttccacac cctaactgac acacattcca caggggaa 6098

<210> 3
<211> 29
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Nukleotidový primer

<400> 3
gcgctcagag ccatgcccag gagtcctcc 29

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Nukleotidový primer

<400> 4
ggaggactcc tgggcatggc tctgagcgc 29

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 5
gctccgcctg cactgtcccg tggtcctcac tgacc 35

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 6
ggtcagtgag gaccacggga cagtgcaggc ggagc 35

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 7
gcgagcccca ttttgctaga ctagaggatc tggg 34

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 8
cccagatcct ctagtctagc aaaatggggc tcgc 34

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 9
cctgcgagcc ccatttcccc gttagactag aggatctggg 40

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 10
cccagatcct ctagtctaac agggaaatgg ggctcgcagg 40

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 11
gccctggagc tccaggtcct caacgtgccc 30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 12
gggcacgttg aggacctgga gctccagggc 30

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 13
cgtgccccgg gtgatgaccc aggac 25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 14
gtcctgggtc atcacccggg gcacg 25

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 15
tctagatacc cagtcttgcc tgcagcagtc acggaa 36

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 16
ttccgtgact gctgcaggca agactgggta tctaga 36

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 17
cggatggcag cgcggactcc tgcaaggg 28

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 18
cccttgcagg agtccgcgct gccatccg 28

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 19
ccgtgggcca ccctggggtg tacacc 26

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Nukleotidový primer

<400> 20
ggtgtacacc ccagggtggc ccacgg 26