


PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/64, A61K 38/48</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/40474</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. September 1998 (17.09.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01364</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 10. März 1998 (10.03.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 10 190.9 12. März 1997 (12.03.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TURECEK, Peter [AT/AT]; Weidling, Hauptstrasse 59-g, A-3400 Klosterneuburg (AT). RICHTER, Günter [AT/AT]; Ziegelhofstrasse 36/4/28, A-1220 Wien (AT). PHILAPITSCH, Anton [AT/AT]; Hans-Kudlich-Gasse 5, A-2490 Ebenfurt (AT). SCHWARZ, Hans-Peter [AT/AT]; Schindlergasse 32, A-1180 Wien (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav-Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT).</p> <p>(74) Anwälte: KOLB, Helga usw.; Hoffmann . Eitle, Arabellasstrasse 4, D-81925 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	
<p>(54) Title: ACTIVATED VITAMIN K-DEPENDENT BLOOD FACTOR AND METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF</p> <p>(54) Bezeichnung: AKTIVIERTER VITAMIN K-ABHÄNGIGER BLUTFAKTOR UND VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for activating a vitamin K-dependent blood factor by treatment with a protease derived from plants or procaryotes. The invention also comprises the blood factor produced according to the invention, which shows no animal protease contamination, as well as a pharmaceutical preparation and a set for medical application.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Es wird ein Verfahren zur Aktivierung eines Vitamin K-abhängigen Blutfaktors beschrieben, wobei dies durch Behandlung mit einer Protease, die von Pflanzen oder Prokaryonten abgeleitet ist, erfolgt. Ausserdem umfasst die Erfindung den erfindungsgemäss hergestellten Blutfaktor, der keine Kontamination an tierischer Protease aufweist, sowie eine pharmazeutische Präparation und ein Set zur medizinischen Anwendung.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbajdschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Aktivierter Vitamin K-abhängiger Blutfaktor und Verfahren zu dessen Herstellung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen aktivierten Vitamin K-abhängigen Blutfaktor sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung.

Die komplexe Protease/Substrat-Kaskade bei der physiologischen Aktivierung von Profaktoren, insbesondere im Bereich der Blutgerinnung, erfordert hochselektive Proteasen. Diese Proteasen kommen im menschlichen Organismus selbst, insbesondere im Blutplasma, vor. Die Anwendung anderer humaner Proteasen zur Aktivierung von Profaktoren, wie z.B. der Verdauungsenzyme Trypsin und Pepsin, führt daher nicht zu einer selektiven Generierung aktivierter Blutgerinnungsfaktoren, sondern zu einem unspezifischen Abbau des Zielsubstrates. So ist z.B. bekannt, dass der tryptische Abbau des Gerinnungsfaktor X zwar anfänglich aktiviert, aber dann durch unspezifischen Abbau zu niedrig-molekularen Peptiden führt. Aus AT-397 390 ist bekannt, dass für die Aktivierung von Prothrombin mit Hilfe eines Verdauungsenzyms besondere Verfahrensvarianten eingehalten werden müssen, um einen weiteren unspezifischen Abbau des entstehenden Thrombus zu verhindern.

Im Falle der Aktivierung von Faktor X stellt es daher eine Besonderheit dar, dass mit dem Venom aus *Vipera Russellii* (Russell's Viper Venom, RVV) ein selektiver Faktor X-Aktivator zur Verfügung steht, der auch technisch zur Gewinnung von Faktor Xa verwendet werden kann. Seit Kenntnis der Übertragung tierischer Viren auf wenig verwandte Tierarten (Prionenproblematik) wird jedoch die Verwendung xenogener tierischer Proteine als Hilfsstoffe für die Herstellung von Arzneimitteln abgelehnt. Da aber geeignete humane Proteasen nicht in technisch ausreichender Menge zur

Verfügung stehen, ist die Verwendung von RVV zur präparativen Faktor X-Aktivierung nach wie vor Standardmethode.

Von proteolytischen Enzymen, die aus Prokaryonten, aus niedrigen Eukaryonten, wie z.B. Pilzen, oder aus höheren Eukaryonten, wie z.B. Pflanzen, isoliert werden können, ist bekannt, dass sie eine geringe Substratspezifität aufweisen. Aus diesem Grunde werden sie hauptsächlich zum Totalabbau von Proteinen in rohen Zellextrakten verwendet, um auf diese Weise andere Zellkomponenten, wie z.B. Kohlenhydrate oder Nukleinsäuren, zu trennen oder zu isolieren. Ausserdem werden diese Proteasen auch zur Sequenzierung und Charakterisierung von Proteinen auf dem Wege des Abbaus zu kleinen Peptiden eingesetzt. Bisher war die Anwendung bakterieller oder pflanzlicher Proteasen oder von Proteasen aus Pilzen als Aktivatoren von Plasmaproteinen oder Plasmaprotein-Cofaktoren oder -Inhibitoren aus der Gruppe der Prothrombin-Komplexproteine nicht bekannt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Aktivierung von Profaktoren im Bereich der Blutgerinnung mit Hilfe hoch-spezifischer Proteasen, die nicht tierischen Ursprungs sind, zur Verfügung zu stellen.

Die vorstehende Aufgabe wird gemäss der Erfindung durch das eingangs genannte Verfahren gelöst, wobei die Aktivierung mittels einer Protease erfolgt, die von Pflanzen oder Prokaryonten abgeleitet ist.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist insbesondere zur Aktivierung von Vitamin K-abhängigen Blutfaktoren geeignet. Besonders geeignet ist die Aktivierung von humanen Blutfaktoren aus der Gruppe Faktor II, VII, IX, X und Protein C. Die nachfolgenden Beispiele zeigen die Vorteile, wie sie bei der Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa- β erhalten werden.

3

Das erfindungsgemässe Verfahren eignet sich gleichermaßen für die Gewinnung von natürlich vorkommenden, gentechnisch hergestellten, wie auch chemisch oder gentechnisch modifizierten Blutfaktoren.

In bezug auf die erfindungsgemäss verwendete Protease kann von einem proteolytischen Enzym aus Prokaryonten ausgegangen werden. Hier sind insbesondere die bakteriellen Proteasen zu nennen, wie z.B. *Thermolysin*, *Clostripain* Proteasen IX und X aus *Bacillus polymyxa* und Protease IX aus *Bacillus thermoproteolyticus*.

Ausserdem lassen sich auch Proteasen aus niedrigen Eukaryonten, wie z.B. Pilzen, insbesondere Protease XXIII aus dem Schimmelpilz *Aspergillus oryzae*, bei dem erfindungsgemässen Verfahren verwenden. Im weiteren eignen sich proteolytische Enzyme aus höheren Eukaryonten, wie z.B. Pflanzen. Es sind insbesondere proteolytische Enzyme geeignet, die der Gruppe der Cysteinproteasen angehören. Hier sind beispielsweise zu nennen: Bromelain (z.B. aus *Ananas comosus*), Papain (z.B. aus dem Milchsaft von *Carica papaya*) oder Ficin (z.B. aus *Ficus carica*). Die genannten proteolytischen Enzyme aus Prokaryonten, Schimmelpilzen und Pflanzen allerdings weisen eine geringe Substratspezifität auf. Es war daher überraschend festzustellen, dass durch Einsatz dieser Enzyme Profaktoren der Blutgerinnung hochspezifisch aktiviert werden können. *Diese Enzyme sind entweder selektierte native Enzyme, aber auch modifizierte Enzyme bzw. Enzymderivate, insbesondere auch durch rekombinante DNA-Technologie hergestellte Enzyme.*

Es ist insbesondere für Cysteinproteasen bekannt, dass sie unter reduktiven Bedingungen oder in Anwesenheit von Sulfhydrylgruppen enthaltenden Aktivatoren ihre breite Protease-Aktivität voll entfalten können. Aus diesem Grunde werden bei der Inkubation mit diesen Enzymen häufig SH-Donoren als Effektoren dem Inkubationspuffer zugegeben. Das

breite Wirkungsspektrum dieser Proteasen kann aber durch Abgehen von den optimalen Inkubationsbedingungen hin zu suboptimalen Verhältnissen, d.h. Bedingungen abseits des pH oder Temperaturoptimums oder bei teilweisem oder vollständigem Fehlen notwendiger Cofaktoren oder Effektoren, oder in Anwesenheit besonderer Effektoren dahingehend verschoben werden, dass spezielle Substrate, wie z.B. Plasmaproteine, nicht mehr vollständig degradiert werden und somit ihre Aktivität, sofern es sich um zu aktivierende Profaktoren handelt, nicht verlieren. Vielmehr wird die Aktivierung auf der Stufe des Zielsubstrates gestoppt und es werden die Aktivierungsprodukte als solche erhalten. Auch dies wird nachfolgend am Beispiel der Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa, insbesondere β -Faktor Xa, erstmalig demonstriert.

Im weiteren kann eine höhere Spezifität der Cysteinproteasen auch dadurch erreicht werden, dass man die aus Pflanzen gereinigten rohen Enzympräparationen weiteren Reinigungsmassnahmen unterwirft, z.B. einer Chromatographie, um jene Proteinfraktionen zu isolieren, deren Proteaseaktivität ein eingeschränktes Substratspektrum zeigt. Während diese Massnahme allein möglicherweise noch nicht geeignet ist, um zu den gewünschten hoch-spezifischen Aktivatoren zu gelangen, eignet sie sich in Verbindung mit einer weiteren Massnahme zur Erhöhung der Spezifität von Proteasen, nämlich durch Oxidation derselben, wobei die Proteasen aufgrund des Kontaktes mit Luftsauerstoff in ihrer Aktivität und ihrem Aktivitätsspektrum reduziert werden. Daraus ergibt sich, dass für das erfindungsgemässe Verfahren besonders oxidierte Cysteinproteasen geeignet sind, wobei dies bevorzugt bei chromatographisch angereicherten bzw. gereinigten Cysteinproteasen der Fall ist. Besonders bevorzugt ist es dabei, dass die Protease eine mindestens zweifach erhöhte spezifische Blutfaktor-Aktivierungsaktivität gegenüber dem Rohextrakt aus Pflanzen oder Zellkulturen bzw. gegenüber der unspezifischen proteolytischen Aktivität bzw.

gegenüber der unspezifischen proteolytischen Aktivität aufweist.

Des Weiteren kann das Substratspektrum dadurch eingeengt werden, dass dem Inkubationspuffer der Enzyme mit den zu aktivierenden Substraten Defektoren zugesetzt werden. Als Defektoren sind insbesondere Schwermetallionen oder Erdalkalitionen zu nennen. Besonders bevorzugt ist hier die Zugabe von Calciumionen. So wird z.B. in den nachfolgenden Beispielen gezeigt, dass bei der Aktivierung von Faktor X unter Zusatz von Calciumionen mit hoher Ausbeute das Aktivierungsprodukt β -Faktor Xa erhalten wird, wobei andere Spaltprodukte nur in vernachlässigender Menge entstehen.

Jedoch kann die Aktivierungsreaktion ohne Zusatz von Calciumionen verstärkt ablaufen und auch hinsichtlich des erhaltenen aktivierten Faktors moduliert werden. Bei geeigneten Versuchsanordnungen sind aber auch α -Faktor Xa und/oder β -Faktor Xa erfindungsgemäss herzustellen.

Für eine bevorzugte technische Anwendbarkeit der hier infrage kommenden Enzyme können diese in immobilisierter Form eingesetzt werden. Dadurch wird eine einfache Abtrennung der Protease vom Substrat, z.B. durch Filtration, ermöglicht. Ausserdem gewährleistet die Anwendung von immobilisierten, d.h. an eine feste Phase gebundenen Enzymen den wiederholten Einsatz derselben. Im Falle der sekundär modifizierten Proteine, z.B. durch Oxidation, wird durch die Immobilisierung, d.h. durch eine kovalente Bindung des Enzyms an ein Trägermaterial dasselbe in seiner Konformation, wie sie nach der Umwandlung in einen hoch-spezifischen Aktivator vorliegt, irreversibel fixiert.

Das erfindungsgemässe Verfahren eignet sich zur Aktivierung natürlicher wie auch rekombinant hergestellter Blutfaktoren.

Dabei kann bei einem Blutfaktor als Gerinnungsproenzym die proteolytische Schnittstelle durch eine Aminosäuresequenz modifiziert werden, welche dann gezielt von einer definierten Protease erkannt und gespalten wird, so daß eine Aktivierung nur mehr oder auch mit einer Protease möglich wird, welche nicht dem physiologischen Aktivierungsmechanismus entspricht. Dieses speziell konstruierte Analog ist beispielsweise ein Analog eines Vitamin-K-abhängigen Blutfaktors wie Faktor X.

Am Beispiel des Faktor X könnte die Region um die Arg52-Ile53-Position, welche die Schnittstelle für den Faktor IXa darstellt, durch eine andere Aminosäuresequenz ausgetauscht werden. Zum Beispiel könnten die Aminosäuren Arg52, Ile53 gegen die Sequenz Glu-Gly ersetzt werden, welche dann eine Spaltung durch FIXa und eine Aktivierung durch Faktor IXa ausschließt, aber den proteolytischen Verdau mit Endoproteinase Glu C aus *Staphylococcus aureus* V8 ermöglicht. Somit kann ein bakterielles Enzym, welches hochrein dargestellt werden kann und keine Kontaminationsgefahr mit einem tierischen oder humanen Protein darstellt, für die Aktivierung von Faktor X eingesetzt werden. Analog kann als Spaltsequenz auch Gly-Ser eingeführt werden, womit dann eine Spaltung mit pflanzlichen Proteasen, z.B. mit Ficin, möglich wird.

Es ist bevorzugt, dass der erfindungsgemäss aktivierte Blutfaktor weiteren Reinigungsmaßnahmen unterworfen wird, um auf diese Weise etwa entstandene proteolytische Abbauprodukte zu entfernen. Besonders bevorzugt sind hier chromatographische Reinigungsverfahren oder eine Reinigung durch Gelfiltration.

Die Erfindung umfasst auch eine pharmazeutische Präparation, die einen Blutfaktor und eine von Pflanzen oder Prokaryonten abgeleitete Protease mit einer Spezifität für den Blutfaktor enthält. Die Protease kann auch eine von Säugetieren, insbesondere ein von Menschen abgeleitete Protease sein.

Dabei wird jedoch erfindungsgemäss als Protease kein Gerinnungsfaktor verwendet. Als Blutfaktoren sind insbesondere Plasmaproteine, z.B. auch Vitamin K-abhängige Proteine, in dieser pharmazeutischen Präparation enthalten. Insbesondere umfasst die pharmazeutische Präparation einen aktivierten Vitamin K-abhängigen Blutfaktor und die Protease. Dieser Blutfaktor ist vorzugsweise human und nativ.

Zur topischen Anwendung zur Blutstillung ist auch die Protease, insbesondere eine gereinigte Protease, als solche einzusetzen, wobei der Vitamin K-abhängige Blutfaktor in diesem Fall aus einer blutenden Wunde stammt. Durch Aufbringen des Faktor X-Aktivators in einem pharmazeutischen Trägermaterial, z.B. in einem Verbandsstoff oder in einem Puder oder als Salbe, kann hier der die Blutgerinnung auslösende Effekt des Gerinnungsaktivators genützt werden. Eine andere pharmazeutische Zubereitung umfasst auch einen Blutfaktor, der als Pro-Protein vorliegt, und eine aus Pflanzen, Pilzen oder Prokaryonten isolierte oder in Zellen dieser Spezies gentechnisch hergestellte Pro-Protein-spaltende Protease enthält. Proteasen dieses Typs mit einer Spezifität für Pro-Proteine sind z.B. als Furin (Van de Ven, W. J. et al, Enzyme 45:257-270, 1991) oder Paired Basic Amino Acid Residue Cleaving Enzyme, PACE, (Rehemtulla, A et al, Biochemistry 32:11586-11590, 1993) bekannt. Wenn das aus dem Pro-Protein resultierende reife Protein in einer pharmazeutischen Präparation besonders labil ist, kann durch gleichzeitige Verabreichung des Pro-Protein-prozessierenden Enzyms das reife Protein in situ dargestellt werden und steht dann therapeutisch zur Verfügung. Des weiteren ist eine weitere Aktivierung mit einer Aktivatorprotease, sofern das reife Protein durch weiteren proteolytischen Verdau erst in eine aktive Form übergeführt werden muss, möglich. Ein therapeutisches Set, bestehend aus dem stabilen Pro-Protein und dem prozessierenden bzw. aktivierenden proteolytischen Enzym, ermöglicht daher erstmalig die Verabreichung auch labiler Proteine als Wirkstoffe.

Im weiteren umfasst die Erfindung einen aktivierten Vitamin K-abhängige Blutfaktor, wie er nach dem erfindungsgemässen Verfahren erhalten wird. Der erfindungsgemäss erhaltene humane, aktivierte Blutfaktor zeichnet sich dadurch aus, dass er nicht durch eine tierische Protease kontaminiert ist.

Das erfindungsgemässe Verfahren wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert. Diese Beispiele betreffen die Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa, wobei die verschiedenen Verfahrensvarianten gemäss den Unteransprüchen Anwendung finden.

BEISPIEL 1

Herstellung des Substrates Faktor X

Die Reinigung von Faktor X erfolgte aus einem Prothrombinkomplexfaktorenpräparat, welches die Faktoren FII, FIX, FX, Protein C und Protein S enthielt, und welches nach der Methode von Brummelhuis, (Brummelhuis HGJ, Preparation of the Prothrombincomplex. In: *Methods of Plasma Protein Fractionation*, edited by Curling, JM, New York: Academic Press, 1980, p. 117-128). hergestellt und zur Virusinaktivierung nach EP 0 159 311 hitzebehandelt wurde. Ein die Prothrombinkomplexfaktoren enthaltendes Lyophilisat wurde entsprechend einer Aktivität von 50.000 E FX/l in destilliertem Wasser gelöst und auf pH 7,0 eingestellt. Nach Zusatz von 12 % (v/v) TWEEN 80 wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt, anschliessend wurde mit destilliertem Wasser auf das 5-fache Volumen verdünnt, mit Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat (7 g/l) versetzt und auf pH 7,0 eingestellt. Anschliessend wurde mit 30 g/l $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die feste Phase

durch Zentrifugation abgetrennt und zweimal mit je 25 ml/g Calciumphosphat eines Puffers 20 mmol/l Tris-HCl, pH 7,0, enthaltend 10 % Ammoniumsulfat, durch Resuspendieren gewaschen und jeweils neuerlich abzentrifugiert. Danach wurde eine dritte Waschung mit 25 ml/g Calciumphosphat eines Puffers 20 mmol/l Tris-HCl, enthaltend 150 mmol/l NaCl, pH 7,0, durch neuerliches Resuspendieren und anschliessendes Abzentrifugieren vorgenommen. Zur Elution des adsorbierten Faktor X wurde das Pellet mit 1 mmol/l Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, (25 ml Elutionslösung/g eingesetztem Calciumphosphat) 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die feste Phase durch Zentrifugation abgetrennt und der Faktor X-enthaltende Überstand durch Chromatographie über DEAE Sepharose[®] Fast Flow, Fa. Pharmacia, weitergereinigt. Dazu wurde eine Säule, gefüllt mit gequollenem, gewaschenem DEAE Sepharose[®] Fast Flow-Gel, und einer Konfiguration von Säuleninnendurchmesser : Gelbetthöhe = 1 : 8,3 verwendet. Das Chromatographiematerial wurde mit 10 E FX/ml Gel beladen. Zuvor wurde die FX-haltige Lösung durch Gelfiltration gegen einen Puffer, 25 mmol/l Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat, 100 mmol/l NaCl, pH 6,0, umgepuffert. Diese Faktor X-Lösung wurde bei einer Flussrate von 2 ml/min an die DEAE Sepharose[®] Fast Flow adsorbiert und die Säule mit einem Fluss von 2 ml/min mit dem 1,7-fachen Gelvolumen, 100 mmol/l NaCl in 25 mmol/l Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat, pH 6,0, und weiters mit dem 2,6-fachen Gelvolumen, 250 mmol/l NaCl, 25 mmol/l Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat, pH 6,0, nachgewaschen. Die Elution von Faktor X erfolgte mit dem 5,2-fachen Gelvolumen eines Citratpuffers, pH 6,0, enthaltend 280 mmol/l NaCl, pH 6,0. Bei der Elution wurden Fraktionen gesammelt, die auf den Gehalt der Prothrominkomplexproteine Faktor X, Protein C,

Faktor IX und Faktor II, mit Standardgerinnungstests untersucht wurden. Die Fraktionen enthaltend Faktor X, welche arm an anderen Prothrombinkomplexproteinen waren, wurden vereinigt und anschliessend über einen, aus Ascites gereinigten monoklonalen Antikörper, welcher gegen Faktor X gerichtet war, und der an Actigel ALD (Sterogene, Bioseparations, Arcadia, CA), immobilisiert war, weiter gereinigt. Die FX-haltige Proteinlösung wurde an das Gel adsorbiert, mit einer Beladung von 10 E FX/ml Gel. Anschliessend wurde mit dem 5-fachen Säulenvolumen eines Puffers, 20 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4, nachgewaschen. Die Elution erfolgte mit dem 10-fachen Säulenvolumen eines Puffers enthaltend 100 mmol 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat, 25 mmol/l NaCl, pH 10,5. Die mit diesem Puffer eluierende Proteinfraction wurde gesammelt und anschliessend durch Ultrafiltration über eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 10.000 Dalton auf $1/20$ des Ausgangsvolumens aufkonzentriert. Anschliessend wurde die FX-haltige Lösung gegen einen Puffer enthaltend 4 g/l Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat, 8 g/l NaCl, pH 7,0, diafiltriert. Diese Faktor X-Präparation wurde von Spuren verunreinigendem Proteins, insbesondere aus der Immunaффinitäts-Chromatographiesäule ausblutendem monoklonalem Antikörper durch Adsorption an Phenylsepharose[®] High Performance, Pharmacia-Biotech, befreit. Dazu wurde die FX-haltige Lösung nach der Diafiltration auf 1,8 mmol/l NaCl und einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Das hydrophobe Interaktionschromatographiegel wurde in einer Chromatographiesäule mit 20 mmol/l Tris-HCl, 2 mol/l NaCl, 7,4, äquibriert und die eingestellte Faktor X-Lösung mit einer Beladung von 30 E FX/ml Gel auf die Säule aufgetragen.

II

Der FX-enhaltende Durchlauf aus der Säule wurde aufgefangen und anschliessend durch Ultrafiltration über eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 10.000 Dalton auf $1/20$ des Ausgangsvolumens aufkonzentriert und dann gegen einen Puffer enthaltend 20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 7,4, diafiltriert. Die so gewonnene hochgereinigt Faktor X-Lösung hatte eine spezifische Aktivität von ca. 100 E/mg Protein.

BEISPIEL 2

Quantitative Bestimmung von Faktor Xa

Testprinzip:

Das chromogene Peptidsubstrat $\text{CH}_3\text{OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA}$ wird durch Faktor Xa hydrolysiert, wobei $\text{CH}_3\text{OCO-D-CHA-Gly-Arg-OH}$ und Paranitroanilin entsteht. Die Kinetik der Zunahme von Paranitroanilin wird spektrophotometrisch bei 405 nm gemessen. Die Zunahme der optischen Dichte (OD) ist proportional dem Gehalt an Faktor Xa in der zu quantifizierenden Probe.

Reagenzien:

Verdünnungspuffer:

3,7 g/l Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

2,1 g/l Imidazol

18,0 g/l NaCl

1,0 g/l Humanalbumin

pH 8,4

Substratlösung:

1,3 mmol/l $\text{CH}_3\text{OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA}$

in Verdünnungspuffer

Methode:

50 μ l einer Faktor Xa enthaltenden Probe werden mit 50 μ l Verdünnungspuffer versetzt und 90 Sekunden bei 37 °C inkubiert. Dann werden 100 μ l der Substratlösung zugesetzt und die Zunahme der OD pro Minute bei 37 °C bei 405 nm bestimmt. Die Zunahme der OD muss über den Messzeitraum konstant linear bleiben.

Zur Erstellung einer Bezugskurve wird die Standardpräparation von bovinem Faktor Xa "NIBSC-Reagent 75/595" verwendet, wobei eine Ampulle nach Rekonstitution mit 1 ml A.dest. 1 E FXa enthält (s. Datasheet, National Institute for Biological Standards and Controls).

BEISPIEL 3**Aktivierung von Faktor X**

Die Aktivierung von gereinigtem Faktor X aus Beispiel 1 wurde mit den Enzymen, Clostripain (Calbiochem, La Jolla, CA) 10 E/ml, Thermolysin (Calbiochem, La Jolla, CA) 200 E/ml, Papain (Boehringer Mannheim, BRD) 400 μ g/ml und Ficin (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) 20 μ g/ml, in einem Puffer enthaltend 20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 5 mmol/l CaCl_2 , pH 7,4, bei 37 °C und Inkubation über mehrere Stunden durchgeführt. Die Konzentration des Faktor X betrug 3,2 E/ml. Zu den Zeitpunkten 5 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden und 19 Stunden wurden aus den jeweiligen Inkubationsgemischen Proben genommen und auf Faktor Xa-Aktivität, wie in Beispiel 2 beschrieben, untersucht. Die Resultate sind Abbildung 1 zu entnehmen. Es zeigte sich, dass eine Aktivierung von Faktor X

mit allen eingesetzten Enzymen möglich war und für Thermolysin nach 2 Stunden zur höchsten Ausbeute an Faktor Xa führte. Ausser für die Inkubation mit Ficin war die Aktivierungsphase, welche je nach Enzym ein Maximum zwischen 30 Minuten und 2 Stunden erreichte, von einer Inaktivierung des entstandenen Faktor Xa gefolgt. Bei der Aktivierung von Ficin konnte eine stetige Aktivierung mit stabiler Faktor Xa-Aktivität auch nach 19 Stunden nachgewiesen werden.

BEISPIEL 4

Aktivierung von Faktor X

Vergleich Ficin und Russell's Viper Venom

Aus der Literatur ist Faktor X-Aktivator aus *Vipera russellii* (RVV, Pentapharm AG, Basel, CH) als ein nicht plasmatischer Faktor X-Aktivator mit einer hohen Selektivität bekannt, der für *in vitro*-Aktivierungen von Faktor X gängigerweise eingesetzt wird.

In diesem Beispiel wurde die Aktivierung von hochgereinigtem Faktor X aus Beispiel 1 mit RVV im Vergleich zur Aktivierung mit dem pflanzlichen Faktor X-Aktivator, Ficin, untersucht. Zu diesem Zweck wurde der hochgereinigte Faktor X in einer Konzentration von 4 E/ml in einem Puffer enthaltend 20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 5 mmol/l CaCl₂, pH 7,4, eingesetzt und mit entweder 2,7 µg/ml RVV (Pentapharm AG, Basel, CH) oder 20 µg/ml Ficin (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden innerhalb von 22 Stunden aus den Inkubationsgemischen Proben entnommen und, wie in Beispiel 2 beschrieben, auf Faktor X-Aktivität untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung ist in

Abbildung 2 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Inkubation von Faktor X mit dem Faktor X-Aktivator aus Ficin zu einer Faktor Xa-Aktivität führte, welche mit der, die durch Inkubation mit RVV erreicht werden konnte, vergleichbar war. Die Aktivierungsprodukte des Faktor X, die nach Inkubation mit den beiden Aktivatoren nach 22 Stunden erreicht werden konnten, wurden auch durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gradientengelen 8 - 18 % unter nicht reduzierenden Bedingungen untersucht. Dazu wurde nach elektrophoretischer Auftrennung der Faktor X vor Aktivierung, der Faktor X nach Aktivierung mit RVV und nach Aktivierung mit Ficin, und nachfolgendem Blot auf Nitrocellulose-Membranen und Detektion mit einem anti-Faktor X-polyklonalen Antikörper und Immunfärbung nach Standardmethoden analysiert. Das Resultat ist Abbildung 3 zu entnehmen. Es zeigte sich, dass der homogene Faktor X vor Aktivierung sowohl durch den Aktivator RVV als auch den Aktivator Ficin in mehrere Faktor X-spezifische Proteinfragmente kleinerer Molekülmasse als des nicht aktivierten Faktor X gespalten wurde, wobei nach Aktivierung mit RVV ein Gemisch aus alpha- und beta-Faktor Xa entstand, wobei diese beiden Aktivierungsprodukte des Faktor X in etwa gleicher Menge enthalten waren, und noch mindestens drei weitere Aktivierungsprodukte identifiziert werden konnten. Dagegen zeigte die Aktivierung durch Ficin, dass als Hauptprodukt beta-Faktor Xa gewonnen wurde (siehe Pfeil), wobei wie bei der Aktivierung mit RVV auch drei weitere Aktivierungsprodukte nachgewiesen werden konnten, die allerdings im Gegensatz zur Aktivierung mit RVV einen grösseren Molmasseunterschied zum Hauptprodukt beta-Faktor Xa aufwiesen, sodass diese durch einfache weitere Methoden, z.B. Gelfiltration, abgetrennt werden konnten.

BEISPIEL 5

Einfluss von Effektoren auf die Faktor X-Aktivierung mit Ficin

Die in der Literatur angegebenen Inkubationsbedingungen für den proteolytischen Abbau mit Ficin weisen Puffersysteme auf, die zumeist Cystein als SH-Reagens und -Aktivator für die Protease enthalten. Ferner ist auch der Zusatz eines Metallionenkomplexbildners, z.B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), beschrieben, weil bekannt ist, dass solche SH-abhängige Proteasen, insbesondere durch Schwermetallionen inaktiviert werden. In diesem Beispiel wurde Faktor X in einer Konzentration von 4 E/ml in einem Puffer enthaltend 20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 7,4, mit 2 µg Ficin/ml analog zu Beispiel 4 bei 37 °C 24 Stunden inkubiert, wobei dem Puffermedium (1) 2 mmol/l CaCl₂, (2) 1 mmol/l Cystein, (3) 1 mmol/l Cystein und 2 mmol/l EDTA und (4) 1 mmol/l Cystein und 2 mmol/l CaCl₂ zugesetzt wurde. Nach 24 Stunden Inkubation wurde die Faktor Xa-Aktivität gemäss Beispiel 2 bestimmt. Die Resultate sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Ansatz	FXa-Aktivität nach 24 h (E/ml)
2 mM CaCl ₂	42.1
1 mM Cystein	17.5
1 mM Cystein, 2 mM EDTA	10.3
1 mM Cystein, 2 mM CaCl ₂	45.1

Tabelle 1: Faktor X-Aktivierung mit Ficin, Einfluss von Effektoren

Es zeigte sich, dass durch den Zusatz von Calciumchlorid eine deutlich höhere Ausbeute an Faktor Xa erreicht werden konnte, während unter Standardbedingungen (Cystein ± EDTA) nur geringere Faktor X-Ausbeuten realisiert werden konnten. Die Ansätze wurden wie oben beschrieben auch mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf die Zusammensetzung der Aktivierungsprodukte untersucht. Das Ergebnis der elektrophoretischen Untersuchung nach Färbung der Proteine nach der Silberfärbemethode als auch nach spezifischer Immunfärbung mit einem anti-Faktor X-Antikörper ist Abbildung 4 zu entnehmen. Es zeigte sich, dass der Zusatz von Calciumionen zum Inkubationsmedium zu einem deutlich höheren Anteil an beta-Faktor Xa unter den Faktor X-Spaltprodukten führt. Der so gewonnene beta-Faktor Xa kann nun leicht durch konventionelle chromatographische Reinigungsmethoden vom im Gemisch noch enthaltenen Resten an Ficin befreit werden. Dazu zählen einfache Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie oder Substrataffinitätschromatographie, beispielsweise an immobilisiertem Benzamidin, welches in der Lage ist, Faktor Xa selektiv zu binden.

BEISPIEL 6

Isolierung des Faktor X-Aktivators aus Pflanzenlatex

10 mg eines pulverisierten Latex aus *Ficus glabrata* enthaltend 2 mg Protein wurden in 2,5 ml eines 5 mmol/l Natriumphosphatpuffers enthaltend 1 mmol/l EDTA, pH 5,5, suspendiert und mit 100 µl 50 mmol/l Cystein-Lösung zur Aktivierung der Cysteinprotease versetzt. Anschliessend wurde durch Gelfiltration über Sephadex® G50 das freie Cystein entfernt und mit dem gleichen Phosphatpuffer 1 + 3

weiterverdünnt. Die Gesamtmenge wurde nun auf eine Mono S HR 5/5 Kationenaustausch-chromatographiesäule, Fa. Pharmacia, bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Anschliessend wurde mit 45 Säulenvolumina des gleichen Phosphatpuffers nachgewaschen und anschliessend eine Gradientenelution durchgeführt, wobei die Phosphatkonzentration auf 185 mmol/l in derselben Pufferzusammensetzung über 55 Säulenvolumina kontinuierlich erhöht wurde. Das Resultat ist Abbildung 5 zu entnehmen. Durch die Elution wurde das Proteingemisch in mehrere Einzelproteine aufgetrennt. Wie im Elutionsprofil an der Absorption bei 280 nm (— Protein) erkennbar ist. Anschliessend wurden die einzelnen Fraktionen mit dem in Beispiel 2 beschriebenen Faktor Xa-Assay auf FX-aktivierende Enzymaktivität untersucht und es zeigte sich, dass ein Proteinpeak, der bei 49 ml Elutionsvolumen eluierte, und ein Proteinpeak, der zwischen 68 und 69 ml Elutionsvolumen eluierte, die höchste Faktor X-Aktivator-Aktivität (- -x- -) aufwies. Analog wurden die Fraktionen mit einem unspezifischen Proteasesubstrat auf Proteaseaktivität untersucht. Dazu wurde das chromogene Proteasesubstrat, Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid, welches unter den Bedingungen und nach der Methode von Eglund et al., Biochemistry 7: 163-175 (1968), in einem photometrischen Test eingesetzt wurde, verwendet. Wie aus Abbildung 5 zu erkennen war, konnte nennenswerte Proteaseaktivität (Δ) sowohl im Säulendurchlauf als auch in allen weiteren Fraktionen gefunden werden, wobei auch hier die Peaks bei Elutionsvolumen 49 ml und Elutionsvolumen 68-69 ml die stärksten Aktivitäten aufwiesen. Daneben wurden aber auch noch in den Proteinfractionen bei Elutionsvolumen 53 ml und

74-83 ml nennenswerte Proteaseaktivitäten festgestellt. Bemerkenswert war, dass in der Fraktion, die bei 68-69 ml von der Säule eluierte, die Faktor X-Aktivatoraktivität deutlich höher war als die unspezifische Proteaseaktivität, was auf eine Abtrennung des Faktor X-Aktivators aus dem rohen Pflanzenextrakt zurückzuführen war. Die Fraktion enthaltend die höchste Faktor X-Aktivatoraktivität in Bezug auf den Proteingehalt wurde anschliessend 15 Stunden bei 4 °C unter der Einwirkung von Luftsauerstoff inkubiert. Dadurch konnte die Faktor X-Aktivator-Aktivität im Verhältnis zur unspezifischen Proteaseaktivität weiter gesteigert werden.

BEISPIEL 7

Immobilisierung von pflanzlichem Faktor X-Aktivator

Kristallisiertes Ficin (Fa. Sigma) in Kristallsuspension wurde auf eine Konzentration von 2,5 mg/ml verdünnt und gegen einen Puffer enthaltend 20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 7,4, durch Gelfiltration über Sephadex[®] G50 (Pharmacia) umgepuffert. Ein voraktiviertes Gel, Actigel ALD Superflow (Sterogene Bioseparations, Arcadia, CA), wurde mit einem Puffer enthaltend 20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 7,4, gewaschen und anschliessend im Verhältnis 1 + 1 mit der zu immobilisierenden Ficin enthaltenden Lösung versetzt und mit $\frac{1}{15}$ des Volumens an Kopplungslösung (Sterogene Bioseparations, Arcadia, CA) 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde das Immobilisat auf einer Sinternutsche abgetrennt und durch exzessives Waschen abwechselnd mit einem 20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 7,4, Puffer und einem 20 mmol/l Tris-HCl, 2 mmol/l NaCl, pH 7,4, Puffer vom nicht gebundenem Ficin und den

Kopplungsreagenzien befreit. Das Ficinimmobilisat wurde nachfolgend zur Aktivierung von Faktor X wie folgt eingesetzt.

Hochgereinigter Faktor X aus Beispiel 1 wurde in einem Puffer enthaltend 20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 7,4, auf 2 E FX/ml eingestellt und mit 10 μ l/ml feuchtem Ficinimmobilisat versetzt. Anschliessend wurde 60 Minuten bei 37 °C unter ständiger Durchmischung inkubiert und danach die Faktor Xa-Aktivität wie in Beispiel 2 beschrieben, gemessen. Dabei konnte eine Faktor Xa-Aktivität von 4 E/ml festgestellt werden. Daraus kann abgeleitet werden, dass Ficin auch in an eine feste Phase gebundener Form die Faktor X-Aktivator-Aktivität behält und daher als Immobilisat zur Darstellung von Faktor Xa geeignet ist.

BEISPIEL 8

Eine technische Ficin-Präparation aus *Ficus glabrata* Latex wurde nach den Bedingungen und der Methode von Englund et al., Biochemistry 7:163-175 (1986) gereinigt, wobei jene Fraktionen gesammelt wurden, welche die höchste spezifische Faktor X-Aktivatoraktivität, verglichen mit der unspezifischen Proteaseaktivität gegen Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-hydrochlorid, aufwiesen. Die aus der chromatographischen Reinigung anfallende Präparation wurde einer 15-minütigen Aktivierung mit 10 mM Cystein bei 37°C unterworfen, und das Aktivierungsgemisch anschließend durch eine Gruppentrennung mittels Gelfiltration über Sephadex® G-25 Superfine vom überschüssigen Aktivator befreit. Die Aktivierung wurde in Inkubationsgemischen enthaltend 4 Einheiten/ml Faktor X und 3 μ g/ml der aktivierten Ficinpräparation in einem Puffersystem von 20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l Natriumchlorid, pH 7,4 in Ab- und

Anwesenheit von Calcium- und Manganionen durchgeführt. Die Ansätze enthielten entweder 2 mmol/l Calcium-Ionen, 1 mmol/l Mangan(II)-Ionen oder eine Kombination der beiden Metallionen. Nach 5 h Inkubation bei 37°C wurden die Ansätze mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf die Zusammensetzung der Aktivierungsprodukte untersucht. Das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung wurde nach der Silberfärbemethode sichtbar gemacht und die Intensität der aufgetrennten Banden densitometrisch ausgewertet. Das Ergebnis dieser Auswertung ist der nachstehenden Tabelle zu entnehmen.

Aktivierungsansatz	Anteil Faktor Xa	Anteil Spaltprodukte
	densitometrisch	
	(%)	(%)
Puffer	15,3	84,7
2 mM Ca ²⁺	44,4	55,6
1 mM Mn ²⁺	30,3	69,7
2 mM Ca ²⁺ + 1 mM Mn ²⁺	65,5	34,5

Es zeigte sich, daß die Aktivierung durch die gereinigte, aktivierte Ficinpräparation ohne Zusatz der beiden Metallionen zu einem verstärkten Abbau des gebildeten Faktor Xa führt. Der Zusatz von wahlweise Ca²⁺- bzw. Mn²⁺-Ionen verringert die Entstehung von verschiedenen Spaltprodukten, während die Kombination beider Ionen das Verhältnis zwischen aktiviertem Faktor X und dessen Degradationsprodukten nahezu umkehrte.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung unter Zusatz von Ca²⁺ und Mn²⁺-Ionen einen aktivierten Faktor X ergibt, der nach dem Aktivierungsvorgang keinem weiteren Degradationsprozeß unterworfen ist. Um diesen Nachweis zu erbringen, wurde ein Aktivierungsansatz analog zu den zuvor angeführten Bedingungen unter Zusatz von 2 mmol/l Calciumionen und 1 mmol/l Mangan(II)-Ionen durchgeführt, bei dem zu

bestimmten Zeitpunkten aus dem Inkubationsgemisch Proben gezogen wurden, um die Aktivierungskinetik zu erfassen. Es wurden die Aktivität von Faktor Xa gemäß Beispiel 2 bestimmt sowie der Anteil degradiertes Spaltprodukte von Faktor Xa ermittelt, analog zu der oben beschriebenen Methodik. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Probenahme nach	Faktor Xa-Aktivität	Anteil Faktor Xa	Anteil Spaltprodukte
	amidolytisch (Einheiten/ml)	densitometrisch (%)	densitometrisch (%)
1 h	18,5	84,4	15,6
3 h	30,0	65,1	34,9
5 h	34,0	65,4	34,5
26 h	33,6	64,1	35,9

Die weitere Reinigung des gewonnenen Faktor Xa kann nun gemäß Beispiel 5 erfolgen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Aktivierung eines Vitamin K-abhängigen Blutfaktors durch Behandlung mit einer Protease, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease von Pflanzen, Pilzen oder Prokaryonten abgeleitet ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Blutfaktor aus der Gruppe der humanen Faktoren II, VII, IX, X und Protein C ausgewählt ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass nach Aktivierung von humanem Faktor X der Faktor Xa- β gewonnen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease ausgewählt ist aus der Gruppe Ficin, Bromelain, Papain, Thermolysin und Clostripain.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung unter Bedingungen durchgeführt wird, die für die Protease suboptimal sind.
6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease eine oxidierte Cysteinprotease ist.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease chromatographisch gereinigt ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease eine mindestens 2-fach erhöhte spezifische Blutfaktor-Aktivierungsaktivität gegenüber dem Rohextrakt aus Pflanzen oder Zellkulturen aufweist.

23

9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Aktivierung in Gegenwart von Defektoren durchgeführt wird.
10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Aktivierung in Gegenwart von Schwermetallionen oder Erdalkaliionen durchgeführt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Aktivierung in Gegenwart von Calciumionen erfolgt.
12. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease an einem festen Träger immobilisiert ist.
13. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease durch rekombinante DNA-Technologie hergestellt ist.
14. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinanter Blutfaktor aktiviert wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß ein Blutfaktor-Analog mit einer proteolytischen Schnittstelle spezifisch für die Protease aktiviert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die proteolytische Schnittstelle modifiziert ist und die Aktivierung mit der Protease vorgenommen wird, welche nicht dem physiologischen Aktivierungsmechanismus entspricht.
17. Pharmazeutische Präparation enthaltend einen Blutfaktor und eine für den Blufaktor spezifische Protease,

vorzugsweise eine von Pflanzen, Pilzen oder Prokaryonten abgeleitete Protease.

18. Pharmazeutische Präparaton nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass der Blutfaktor ein Plasmaprotein, vorzugsweise ein Vitamin K-abhängiges Protein, insbesondere ein aktiviertes Vitamin K-abhängiges Protein ist.
19. Pharmazeutische Präparation, enthaltend eine für einen Blutfaktor spezifische Protease, insbesondere eine gereinigte Protease, dadurch gekennzeichnet, dass sie zur topischen Anwendung formuliert ist und die Protease vorzugsweise von Pflanzen, Pilzen oder Prokaryonten abgeleitet ist.
20. Set zur medizinischen Anwendung, enthaltend
 - a) ein proteolytisches Enzym, insbesondere ein von Pflanzen, Pilzen oder Prokaryonten abgeleitetes Enzym, mit einer Spezifität für eine Proform eines Proteins, und
 - b) die Proform eines Proteins.
21. Aktivierter Vitamin K-abhängiger Blutfaktor, dadurch gekennzeichnet, dass er gemäss dem Verfahren der Ansprüche 1 bis 16 gewonnen wurde.