



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I666319 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：104126066

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 08 月 11 日

(51)Int. Cl. : C12N15/85 (2006.01)

C12N5/10 (2006.01)

C07K14/475 (2006.01)

(30)優先權：2014/08/12 美國

62/036,438

(71)申請人：美商巴克斯歐塔公司 (美國) BAXALTA INCORPORATED (US)

美國

瑞士商巴克斯歐塔有限公司 (瑞士) BAXALTA GMBH (CH)

瑞士

(72)發明人：伯瑞門 伊恩斯特 BOEHM, ERNST (AT)；侯恩林 法郎西斯卡 HORLING, FRANZISKA (AT)；寇瑞恩 家莊卡 KOEHN, JADRANKA (AT)；都可卡 麥克 DOCKAL, MICHAEL (AT)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

CN 103889454A

WO 2001094383A2

Preininger, Alexandra, et al. "Strategies for recombinant furin employment in a biotechnological process: complete target protein precursor cleavage." Cytotechnology 30.1-3 (1999): 1-16.

Himmelsbach, Michèle, et al. "Recombinant human factor X: high yield expression and the role of furin in proteolytic maturation in vivo and in vitro." Thrombosis research 97.2 (2000): 51-67.

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：9 共 52 頁

(54)名稱

在分泌 furin 之哺乳動物表現系統中生產經完全加工且具功能性之因子 X

PRODUCTION OF FULLY PROCESSED AND FUNCTIONAL FACTOR X IN A FURIN-SECRETING MAMMALIAN EXPRESSION SYSTEM

(57)摘要

本文揭示用於在生產每毫升培養物上清液 50U 與 300U 之間的受控量之 furin 之表現系統中生產經完全加工之成熟因子 X 之方法。亦揭示用於表現 furin 及因子 X 之轉形細胞、表現系統及表現載體。

Disclosed herein are methods for production of fully-processed mature Factor X in an expression system producing a controlled amount of furin between 50 U/mL and 300 U/mL of culture supernatant. Also disclosed are transformed cells, expression systems, and expression vectors for the expression of furin and Factor X.

指定代表圖：

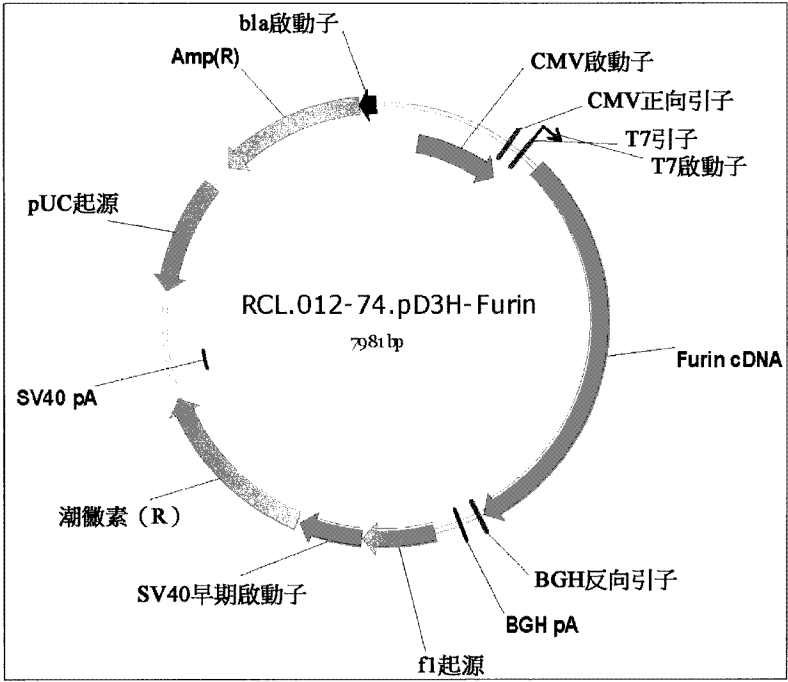


圖1A

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

在分泌 furin 之哺乳動物表現系統中生產經完全加工且具功能性之因子
X

PRODUCTION OF FULLY PROCESSED AND FUNCTIONAL FACTOR X
IN A FURIN-SECRETING MAMMALIAN EXPRESSION SYSTEM

【技術領域】

【0001】 本文揭示用於在 furin 存在下表現經完全加工且具活性之重組因子 X 之表現系統、轉形細胞及與其相關之方法。

【先前技術】

【0002】 人類凝血因子 X (FX)、活化 FX (FXa) 及其變異體用作包括 (但不限於) 血友病 (hemophilia) 及馮威里氏病 (von Willebrand disease) 之凝血障礙中之治療劑。維生素 K 依賴性絲胺酸蛋白酶 FX 合成為內質網中之單鏈前驅蛋白質，伴以高爾基器 (Golgi apparatus) 中之後續細胞內蛋白水解 furin 裂解，隨後藉由生產細胞分泌至血流中，或在重組表現之情況下分泌至培養基中。FX 中之三個 furin 裂解位點負責恰當 FX 蛋白分解加工。FX 之成熟形式為在前驅蛋白質之裂解之後形成的由重鏈及輕鏈組成之雙硫連接的雙鏈分子。分子之其他修飾包括輕鏈之 γ -羧化及附接到重鏈之活化肽之 N-及 O-連接糖基化。

【0003】 除 FX 以外，攜有一致性識別位點 Arg-X-Lys/Arg-Arg 之其他維生素 K 依賴性凝血因子為泛表現內切蛋白酶 furin，亦稱為成對鹼性胺基酸殘基裂解酶 (PACE) 之受質。凝血級聯之重組蛋白質之足夠蛋白水解加

工由於高產率表現下之細胞內加工限制而在細胞培養物表現系統中削弱。與在重組哺乳動物細胞中以高表現率展現不充分蛋白水解加工之馮威里氏因子及凝血因子 IX (FIX) 類似，低產量 CHO 細胞純系中之 FX 分泌藉由經完全加工之 FX 特性化，而高產量純系除包含經恰當加工之 FX 重鏈及輕鏈物質以外，亦包含未經加工之單鏈 FX 及多個未經加工形式之 FX 輕鏈。未經加工之 FX 輕鏈之類型及程度在個別細胞純系中及不同細胞培養條件，諸如細胞密度下變化。需要額外活體內 furin 共表現或細胞培養後試管內 furin 培育以支持內源性 furin 蛋白水解機制，促進完整蛋白質裂解。

【0004】 Furin 共表現對於高產率下之經完全加工之 FX 之表現必不可少。然而，迄今為止，未報導將確保細胞培養系統中高百分比之完整經加工之 FX 之 furin 之臨限量。高量之 furin 有毒性，因此，生產 FX 之哺乳動物表現系統之 furin 表現量必須在有毒性、但潛在地加工 100% FX 前驅蛋白質之量與太低、導致生產次最佳經加工之 FX 之健康細胞培養物之量之間平衡。

【發明內容】

【0005】 本文揭示一種在相同細胞系中表現 furin 及人類因子 X(FX) 且從而在培養物上清液中提供臨界 furin 濃度以產生經完全加工且完全具活性之 FX，同時維持培養物之活力的系統。

【0006】 因此，本文揭示一種轉形細胞，其包含編碼人類 furin 之核苷酸序列，使得轉形細胞表現及分泌功能性 furin 到培養物上清液中，其中功能性 furin 在培養約 36 小時與約 78 小時之間以後以約 50 U/mL 至約 300 U/mL 之濃度分泌於培養物上清液中。在一個具體實例中，轉形細胞另外包

含編碼可藉由 furin 裂解且展現 Arg-(Lys/Arg)-Arg 基序之蛋白質之核苷酸序列。在另一具體實例中，編碼人類 furin 之核苷酸序列及編碼蛋白質之核苷酸序列在不同表現載體上。在另一具體實例中，編碼人類 furin 之核苷酸序列及編碼蛋白質之核苷酸序列在相同表現載體上。

【0007】 亦提供一種真核蛋白質表現系統，其包含適合於表現哺乳動物蛋白質之細胞系；適於藉由細胞系表現人類 furin 之第一表現載體，其中第一表現載體包括編碼人類 furin 多肽之核苷酸序列；及適於藉由細胞系表現蛋白質之第二表現載體，其中第二表現載體包括編碼可藉由 furin 裂解且展現 Arg-(Lys/Arg)-Arg 基序之蛋白質之核苷酸序列，其中細胞系能夠在培養約 36 小時與約 78 小時之間以後以約 50 U/mL 至約 300 U/mL 之濃度分泌功能性 furin 至培養物上清液中。

【0008】 亦提供一種真核蛋白質表現系統，其包含適合於表現哺乳動物蛋白質之細胞系；適於藉由細胞系表現人類 furin 及可藉由 furin 裂解且展現 Arg-(Lys/Arg)-Arg 基序之蛋白質之第一表現載體，其中第一表現載體包括編碼人類 furin 多肽之核苷酸序列及編碼可藉由 furin 裂解之蛋白質之核苷酸序列，其中細胞系能夠在培養約 36 小時與約 78 小時之間以後以約 50 U/mL 至約 300 U/mL 之濃度分泌功能性 furin 至培養物上清液中。在一個具體實例中，編碼人類 furin 之核苷酸序列及編碼蛋白質之核苷酸序列在不同表現載體上。在另一具體實例中，編碼人類 furin 之核苷酸序列及編碼蛋白質之核苷酸序列在相同表現載體上。

【0009】 亦提供一種轉形細胞，其包含編碼人類 furin 之第一核苷酸序列及編碼人類 FX 之第二核苷酸序列，使得轉形細胞表現及分泌功能性

furin 及 FX 至培養物上清液中，其中 furin 在培養約 36 小時與約 78 小時之間以後以約 50 U/mL 至約 300 U/mL 之濃度分泌於培養物上清液中且至少 85% 之 FX 經完全加工。在一個具體實例中，編碼人類 furin 之核苷酸序列及編碼 FX 之核苷酸序列在不同表現載體上。在另一具體實例中，編碼人類 furin 之核苷酸序列及編碼 FX 之核苷酸序列在相同表現載體上。

【0010】 亦提供一種真核蛋白質表現系統，其包含適合於表現哺乳動物蛋白質之細胞系；適於藉由細胞系表現人類 furin 之第一表現載體，其中第一表現載體包括編碼人類 furin 多肽之核苷酸序列；及適於藉由細胞系表現 FX 之第二表現載體，其中第二表現載體包括編碼 FX 之核苷酸序列，其中細胞系能夠在培養約 36 小時與約 78 小時之間以後以約 50 U/mL 至約 300 U/mL 之濃度分泌功能性 furin 至培養物上清液中。

【0011】 另外提供一種真核蛋白質表現系統，其包含適合於表現哺乳動物蛋白質之細胞系；適於表現人類 furin 及 FX 之第一表現載體，其中第一表現載體包括編碼人類 furin 多肽之核苷酸序列及編碼 FX 之核苷酸序列，其中細胞系能夠在培養約 36 小時與約 78 小時之間以後以約 50 U/mL 至約 300 U/mL 之濃度分泌功能性 furin 至培養物上清液中。

【0012】 亦提供一種製備重組蛋白質之方法，其包含用適於藉由細胞系表現人類 furin 之第一表現載體轉染適合於表現哺乳動物蛋白質之細胞系，其中第一表現載體包括編碼人類 furin 多肽之核苷酸序列；及用適於藉由細胞系表現蛋白質之第二表現載體轉染細胞系，其中第二表現載體包括編碼展現 Arg-(Lys/Arg)-Arg 基序之蛋白質的核苷酸序列；其中經第一及第二表現載體轉染之細胞系在培養約 40 小時與約 80 小時或約 36 小時與約 78

小時之間以後以約 50 U/mL 至約 300 U/mL 之濃度表現及分泌功能性人類 furin 於培養物上清液中。在一個具體實例中，細胞系實質上同時經第一表現載體及第二表現載體轉染。在另一具體實例中，細胞系經第一表現載體轉染且獲得分泌穩定量之 furin 之細胞，隨後經第二表現載體轉染細胞系。在另一具體實例中，細胞系經第二表現載體轉染且獲得分泌穩定量之蛋白質之細胞，隨後經第一表現載體轉染細胞系。

【0013】 在一個具體實例中，蛋白質為馮威里氏因子、因子 II、因子 IX、因子 X、蛋白質 C、蛋白質 S 或蛋白質 Z。在另一具體實例中，蛋白質為因子 X。

【0014】 亦提供一種製備重組蛋白質之方法，其包含用適於藉由細胞系表現人類 furin 之第一表現載體轉染適合於表現哺乳動物蛋白質之細胞系，其中第一表現載體包括編碼人類 furin 多肽之核苷酸序列；及用適於藉由細胞系表現 FX 之第二表現載體轉染細胞系，其中第二表現載體包括編碼 FX 多肽之核苷酸序列；其中經第一及第二表現載體轉染之細胞系在培養約 36 小時與約 78 小時之間以後以約 50 U/mL 至約 300 U/mL 之濃度表現及分泌功能性人類 furin 於培養物上清液中。在一個具體實例中，細胞系實質上同時經第一表現載體及第二表現載體轉染。在另一具體實例中，細胞系經第一表現載體轉染且獲得分泌穩定量之 furin 之細胞，隨後經第二表現載體轉染細胞系。在另一具體實例中，細胞系經第二表現載體轉染且獲得分泌穩定量之蛋白質之細胞，隨後經第一表現載體轉染細胞系。

【0015】 在另一具體實例中，細胞能夠在培養約 36 小時與約 78 小時之間以後以至少約 50 U/mL 至約 60 U/mL 之濃度分泌功能性 furin 至培養物

上清液中且其中至少 90% 之 FX 經完全加工。在另一具體實例中，細胞能夠在培養約 36 小時與約 78 小時之間以後以至少約 90 U/mL 至約 100 U/mL 之濃度分泌功能 furin 至培養物上清液中且其中至少 95% 之 FX 經完全加工。

【0016】 亦提供一種藉由本文揭示之轉形細胞生產之重組 FX。

【0017】 另外提供一種藉由本文揭示之表現系統生產之重組 FX。

【0018】 亦提供一種藉由本文揭示之方法生產之重組 FX。

【0019】 亦提供一種用於重組 FX 之表現系統，其適於在培養約 36 小時與約 78 小時之間以後以約 50 U/mL 與約 300 U/mL 之間的濃度分泌 furin 至培養物上清液中。

【0020】 亦提供一種生產成熟、經完全加工之 FX 之方法，其包含在培養約 36 小時與約 78 小時之間以後以約 50 U/mL 與約 300 U/mL 之間的濃度分泌 furin 至培養物上清液中的表現系統。

【圖式簡單說明】

【0021】 圖 1A 描繪 RCL.012-74.pD3H-Furin 表現載體且圖 1B 描繪載體之核苷酸序列。人類 furin 序列加下劃線且起始及終止密碼子加雙下劃線。

【0022】 圖 2 描繪人類 furin 之核苷酸序列 (SEQ ID NO: 1)。起始及終止密碼子加雙下劃線。

【0023】 圖 3 描繪人類 furin 之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 2)。

【0024】 圖 4 描繪培養物中之經完全加工之因子 X (FX) 之程度。進行還原條件下之 FX 西方墨點之密度計定量且藉由多株抗 FX 抗體染色。純系 (純系標識 42 到 52) 展現至多 4 種具有改變像素強度之 FX 之物質，包括未經加工 FX 單鏈 (框 1、5、9 等)、FX 重鏈 (框 2、6、10 等)、未經

加工含前肽 FX 輕鏈（框 3、7、11 等）及經加工之 FX 輕鏈（框 4、8、12 等）。測定框 45-48 之像素強度用於背景減除。

【0025】 圖 5 描繪培養物中之分泌 furin 濃度及經完全加工之 FX/總 FX 之百分比。在細胞培養物上清液中之分泌 furin 濃度（藉由 furin 活性檢定測定）與經完全加工之 FX/總 FX%（藉由西方墨點中之各別帶之密度計定量測定）之間存在劑量反應關係。

【0026】 圖 6 描繪 furin 劑量及經完全加工之 FX 之分析。資料（圓圈）與細胞特定值（深色線）及群體平均值（淺色線）藉由 $E_{\max}$ 模型預測經完全加工之 FX/總 FX（%）隨 furin 濃度而變。

【0027】 圖 7A-D 描繪 $E_{\max}$ 模型有效性測試。圖 7A 描繪反應殘餘相對於預測反應，其中資料點對稱地分散於零周圍，指示無系統性趨勢。圖 7B 描繪殘餘物之正態 Q-Q 圖，指示正態分佈誤差之假設成立，因為資料點分散於等值線周圍。圖 7C 描繪反應殘餘相對於細胞系，其中資料點對稱地分散於零周圍，指示無系統性趨勢。圖 7D 描繪相對於彼此標繪之觀測及預測值，指示資料之良好擬合，因為資料點對稱地分散於等值線周圍。

【0028】 圖 8 描繪測試 FX 加工之程度獨立於 furin 濃度之假定的空值模型。資料（圓圈）及具有截距之擬合空值模型僅假設經加工之 FX 獨立於 furin 濃度（細胞特定值及群體平均值分別擬合為深色線及淺色線）。

【0029】 圖 9 描繪產生 90% 及 95% 經加工之 FX 之劑量-反應曲線及計算之 furin 最小濃度。群體平均預測藉由擬合模型之數值最佳化獲得之隨 furin 濃度而變的經完全加工之 FX/總 FX（%）（黑線）連同得到 90% 及 95% 經完全加工之 FX/總 FX 之 furin 濃度。

【實施方式】

【0030】 本文提供用於生產重組蛋白質之轉形細胞、真核表現系統、方法及藉由該等方法製得之重組蛋白質，全部涉及在相同細胞系中表現 furin 及因子 X (FX) 且從而提供培養物上清液中之臨界 furin 濃度以產生經完全加工且成熟之 FX，同時維持培養物之活力。

【0031】 用於生產重組蛋白質之轉形細胞、真核表現系統及方法的共同之處為宿主細胞生產一致量之重組 furin 的能力。Furin 對於將某些哺乳動物蛋白質（包括 FX）自前驅蛋白質形式裂解為成熟、經完全加工之形式為所需的。表現系統之培養物上清液中之 furin 之低濃度導致蛋白質之含前肽及其他非加工或部分加工形式之積聚。過高之 furin 濃度導致宿主細胞之生長受損且最終導致細胞死亡。

【0032】 如本文所用，術語「furin」包括全長 furin 以及任何能夠裂解一致性識別位點 Arg-X-Lys/Arg-Arg 之 furin 片段。furin 之活性截短形式在此項技術中已知且適用於本發明，適合之 furin 片段之非限制性實例可發現於 U.S. 6,210,926 及 Preininger 等人(Cytotechnology 30:1-15, 1999)，其關於重組 furin 之截短形式之所有揭示內容均以引用的方式併入本文中。

【0033】 亦在本發明之範疇內的為本文揭示之 furin 及因子 X 蛋白質之變異體。舉例而言，可作出保守胺基酸變化，儘管其改變蛋白質或肽之一級序列，但通常不改變其功能。保守胺基酸取代通常包括在以下群組內之取代：甘胺酸、丙胺酸；纈胺酸、異白胺酸、白胺酸；天冬胺酸、麩胺酸；天冬醯胺、麩醯胺酸；絲胺酸、蘇胺酸；及離胺酸、精胺酸；苯丙胺酸、酪胺酸。

【0034】 亦包括融合蛋白或其他修飾或 FX，其在向個體投予之後具有增加之半衰期。此類之實例將為與免疫球蛋白 Fc 域、白蛋白域、伸展 (XTEN) 重組多肽 (參見 US 8,673,860，其關於 XTEN 多肽之所有揭示內容以引用的方式併入本文中)、聚 Glu 或聚 Asp 序列、運鐵蛋白或附接到 FX 序列之含 PAS (Pro Ala Ser) 多肽的融合物。

【0035】 修飾 (其通常不改變一級序列) 包括多肽之活體內或試管內化學衍生作用，例如乙醯化或羧化。亦包括醣基化之修飾，例如藉由在多肽之合成及加工期間或在其它加工步驟中修飾多肽之醣基化圖案製得之彼等；例如藉由將多肽暴露於影響醣基化之酶，例如哺乳動物醣基化或去醣基化酶。亦涵蓋具有磷酸化胺基酸殘基，例如磷酸酪胺酸、磷絲胺酸或磷酸蘇胺酸之序列。蛋白質亦可在藉由水可溶生物相容性聚合物，例如聚乙二醇、聚唾液酸或羥乙基澱粉純化之後經化學修飾。

【0036】 亦包括已使用一般分子生物技術修飾以提高其對蛋白水解降解之抗性或使可溶性特性最佳化之多肽。此類多肽之類似物包括含有除天然存在之 L-胺基酸，例如 D-胺基酸或非天然存在之合成胺基酸以外的殘基之彼等多肽類似物。本發明之肽不限於本文中所列之特定例示性方法中之任一者之產物。

【0037】 本文中的本發明總體上涉及用於生產至少一個藉由 furin 轉譯後加工之重組哺乳動物蛋白質 (重組需要 furin 之哺乳動物蛋白質) 之系統、轉形細胞、表現載體及方法。哺乳動物蛋白質為馮威里氏因子、因子 II、因子 IX、因子 X、蛋白質 C、蛋白質 S 或蛋白質 Z 中之一或多者。在另一具體實例中，蛋白質為 FX。

【0038】 培養物上清液中之 furin 之濃度定向在用於在定義培養時段之後生產成熟、經完全加工之蛋白質，同時維持培養物之活力的最優範圍內。因此，用於生產成熟、經完全加工之哺乳動物蛋白質的培養物上清液中之 furin 之適用濃度在約 50 U/mL 與約 400 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 350 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 300 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 250 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 200 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 175 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 150 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 125 U/mL 之間或在約 50 U/mL 與約 100 U/mL 之間。在一個具體實例中，培養物上清液中之 furin 之濃度不小於 50 U/mL。

【0039】 在其他具體實例中，用於在定義培養時段之後生產成熟、經完全加工之哺乳動物蛋白質的培養物上清液中之 furin 之適用濃度在約 50 U/mL 與約 60 U/mL 之間、在約 55 U/mL 與約 65 U/mL 之間、在約 60 U/mL 與約 70 U/mL 之間、在約 65 U/mL 與約 75 U/mL 之間、在約 70 U/mL 與約 80 U/mL 之間、在約 75 U/mL 與約 85 U/mL 之間、在約 80 U/mL 與約 90 U/mL 之間、在約 85 U/mL 與約 95 U/mL 之間、在約 90 U/mL 與約 95 U/mL 之間、在約 95 U/mL 與約 105 U/mL 之間、在約 100 U/mL 與約 110 U/mL 之間、在約 115 U/mL 與約 125 U/mL 之間、在約 120 U/mL 與約 130 U/mL 之間、在約 125 U/mL 與約 135 U/mL 之間、在約 130 U/mL 與約 140 U/mL 之間、在約 135 U/mL 與約 145 U/mL 之間、在約 140 U/mL 與約 150 U/mL 之間、在約 145 U/mL 與約 155 U/mL 之間、在約 150 U/mL 與約 160 U/mL 之間、在約 155 U/mL 與約 165 U/mL 之間、在約 160 U/mL 與約 170 U/mL 之間、在約 165 U/mL 與約 175 U/mL 之間、在約 170 U/mL 與約 180 U/mL 之間、在約 175 U/mL 與約 185

U/mL 之間、在約 180 U/mL 與約 190 U/mL 之間、在約 185 U/mL 與約 195 U/mL 之間或在約 190 U/mL 與約 200 U/mL 之間。在另一具體實例中，用於在定義培養時段之後生產成熟、經完全加工之哺乳動物蛋白質的培養物上清液中之 furin 之適用濃度在約 50 U/mL 與約 60 U/mL 之間，或約 57 U/mL。在另一具體實例中，用於生產成熟、經完全加工之哺乳動物蛋白質的培養物上清液中之 furin 之適用濃度在約 90 U/mL 與約 100 U/mL 之間，或約 96 U/mL。

【0040】 在其他具體實例中，用於在定義培養時段之後生產成熟、經完全加工之哺乳動物蛋白質的培養物上清液中之 furin 之適用濃度小於約 400 U/mL、小於約 375 U/mL、小於約 350 U/mL、小於約 325 U/mL、小於約 300 U/mL、小於約 275 U/mL、小於約 250 U/mL、小於約 225 U/mL、小於約 200 U/mL、小於約 175 U/mL、小於約 150 U/mL、小於約 125 U/mL 或小於約 100 U/mL。

【0041】 在其他具體實例中，用於在定義培養時段之後生產成熟、經完全加工之哺乳動物蛋白質的培養物上清液中之 furin 之適用濃度大於約 50 U/mL、大於約 60 U/mL、大於約 70 U/mL、大於約 80 U/mL、大於約 90 U/mL、大於約 100 U/mL、大於約 110 U/mL、大於約 120 U/mL、大於約 130 U/mL、大於約 140 U/mL、大於約 150 U/mL、大於約 160 U/mL、大於約 170 U/mL、大於約 180 U/mL、大於約 190 U/mL 或大於約 200 U/mL。

【0042】 出於本發明的目的，本文揭示之培養物上清液中之 furin 之量在距培養起始之後約 12 小時至約 96 小時的時段內（在培養約 12 小時至約 96 小時之後）產生且反映在該時段期間在培養物上清液中積聚之 furin 之量。在其他具體實例中，在培養起始之後約 18 小時至約 90 小時、約 24

小時至約 84 小時、約 30 小時至約 78 小時、約 36 小時至約 72 小時、約 40 小時至約 80 小時、約 42 小時至約 68 小時或約 48 小時至約 72 小時內，或在培養指定時段之後達到培養物上清液中之 furin 之所需量。

【0043】 或者，本文揭示之培養物上清液中之 furin 之量表示為每天每體積之培養物上清液之量的細胞所分泌之 furin 之濃度。在非限制性實例中，furin 之濃度表示為 $U/10^6$ 細胞/天。在其他具體實例中，用於生產成熟、經完全加工之哺乳動物蛋白質的培養物上清液中之 furin 之適用濃度在約 20 $U/10^6$ 細胞/天與約 75 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 25 $U/10^6$ 細胞/天與約 75 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 30 $U/10^6$ 細胞/天與約 75 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 35 $U/10^6$ 細胞/天與約 75 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 40 $U/10^6$ 細胞/天與約 75 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 45 $U/10^6$ 細胞/天與約 75 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 50 $U/10^6$ 細胞/天與約 75 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 55 $U/10^6$ 細胞/天與約 75 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 60 $U/10^6$ 細胞/天與約 75 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 20 $U/10^6$ 細胞/天與約 70 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 20 $U/10^6$ 細胞/天與約 65 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 20 $U/10^6$ 細胞/天與約 60 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 20 $U/10^6$ 細胞/天與約 55 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 25 $U/10^6$ 細胞/天與約 55 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 25 $U/10^6$ 細胞/天與約 50 $U/10^6$ 細胞/天之間、在約 25 $U/10^6$ 細胞/天與約 45 $U/10^6$ 細胞/天之間或在約 25 $U/10^6$ 細胞/天與約 40 $U/10^6$ 細胞/天之間。

【0044】 培養物上清液中之 furin 之濃度足以將至少約 75% 之哺乳動物前驅蛋白質加工為成熟、功能蛋白。蛋白質為任何至少部分藉由 furin 之作用轉譯為前驅蛋白質且加工為成熟形式的蛋白質。在一個具體實例中，蛋白質為 FX。在其他具體實例中，furin 濃度足以將至少約 80% 之哺乳動物

FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 82% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 84% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 86% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 88% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 90% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 92% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 93% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 94% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 95% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 96% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 97% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 98% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，將至少約 99% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質，或將 100% 之哺乳動物 FX 前驅蛋白質加工為成熟、功能 FX 蛋白質。

【0045】 如本文所用，術語「前驅蛋白質」係指非活性且藉由合成之後細胞中之裂解及視情況存在之其他轉譯後修飾變為活性形式的前驅蛋白質。

【0046】 因此，本文提供適於分泌 furin 及哺乳動物蛋白質（如 FX）兩者之轉形細胞。轉形細胞可為任何適合於分泌哺乳動物蛋白質之真核細胞，不管該等細胞是否生產內源性 furin。用於產生轉形細胞的適合之細胞系包括（但不限於）中國倉鼠卵巢（CHO）細胞、人胚腎細胞、靈長類動

物腎細胞（例如 COS 細胞、HEK293）、纖維母細胞（例如鼠類纖維母細胞）及小鼠骨髓瘤細胞（例如 NSO-GS）。適合之細胞系能夠高水準表現哺乳動物蛋白質且能夠轉譯後修飾，例如醣基化、形成雙硫鍵、磷酸化及 γ -羧化。選擇及培養宿主細胞及誘導宿主細胞以表現多肽之方法一般為熟習此項技術者已知。

【0047】 本文亦揭示包含適合於生產哺乳動物蛋白質之細胞及至少一個適於表現至少一種哺乳動物蛋白質之表現載體的表現系統。真核表現載體一般可用於哺乳動物細胞中之表現，以使得 furin 及哺乳動物蛋白質，諸如 FX 能夠根據本文揭示之方法表現，編碼蛋白質之核苷酸序列藉助於經表現載體之轉染、轉形或感染引入至真核細胞中，藉此表現多肽。furin 及/或哺乳動物蛋白質之表現可為暫時或穩定的。furin 及哺乳動物核苷酸序列呈現為質體，或病毒或非病毒表現載體的一部分。尤其適合之病毒載體包括（但不限於）桿狀病毒、牛痘病毒、腺病毒、巨細胞病毒、腺相關病毒、複製能力慢病毒（RCL）及疱疹病毒。病毒真核表現載體之非限制性實例包括 Rc/CMV、Rc/RSV、RCL 及 SV40 載體。例示性非病毒真核表現載體包括（但不限於）病毒顆粒、脂質體、陽離子脂質、質粒及聚離胺酸共軛 DNA。例示性質體表現載體包括（但不限於）pSLX、pcDNA 及一般熟習此項技術者已知之其他者。

【0048】 在另一具體實例中，本文揭示包含編碼 furin 之核苷酸序列、編碼哺乳動物蛋白質之核苷酸序列，諸如編碼 FX 之核苷酸序列或其組合之表現載體。在一個具體實例中，furin 及蛋白質序列均表現自單一表現載體。在另一具體實例中，furin 序列及蛋白質序列表現自不同表現載體。

在一個具體實例中，若 furin 及蛋白質核苷酸序列表現自相同表現載體，則其視情況藉由內部核糖體進入位點（IRES）分離。基因可表現自一或多個啟動子。此外，編碼各蛋白質之核苷酸序列可以質體上之相對方向定向或以相同方向定向。如一般熟習此項技術者所理解，表現載體另外包含可選擇元件及其他調節序列以有效生產哺乳動物蛋白質。

【0049】 本文亦揭示允許藉由使用重組酶介導之卡匣交換表現 furin 及其他哺乳動物蛋白質之表現載體。

【0050】 若 furin 及哺乳動物蛋白質表現自不同表現載體，則表現載體將具有不同選擇標記以使得可選擇藉由載體轉形之細胞。此類選擇之細胞可接著經分離且生長為單株培養物

【0051】 准許真核細胞中之組成性、可調節、組織特異性、細胞類型特異性、細胞循環特異性或代謝特異性表現之啟動子適合於例如哺乳動物細胞中之表現。可調節元件為啟動子、活化子序列、增強子、靜止子及/或抑制因子序列。准許真核生物中之組成性表現之可調節元件之實例為藉由 RNA 聚合酶 III 識別之啟動子或病毒啟動子、巨細胞病毒（CMV）增強子、CMV 啟動子、SV40 啟動子或長末端重複序列（LTR）啟動子，例如衍生自 MMTV（小鼠乳房腫瘤病毒）及其他病毒啟動子及活化子序列，其衍生自例如 B 型肝炎病毒（HBV）、C 型肝炎病毒（HCV）、單純疱疹病毒（HSV）、人類乳頭狀瘤病毒（HPV）、埃-巴二氏病毒（Epstein-Barr virus；EBV）、熱休克啟動子或人類免疫缺乏病毒（HIV）。准許真核生物症狀誘導表現之可調節元件之實例為與適當抑制因子組合之四環素操縱子。furin 及哺乳動物蛋白質核苷酸序列之表現亦可發生於組織特異性或蛋白質特異性啟動子之

控制下。蛋白質特異性啟動子之非限制性實例為 FX 基因啟動子或 furin 基因啟動子。

【0052】 在某些具體實例中，細胞藉由除 furin 及哺乳動物蛋白質以外之另一蛋白質轉形。在一個具體實例中，額外蛋白質為維生素 K 環氧化物還原酶（VKOR）。在某些具體實例中，額外蛋白質表現自與 furin 及哺乳動物蛋白質中之一者或兩者相同的表現載體，或額外蛋白質表現自不同表現載體。

【0053】 本文亦揭示包含宿主細胞及一或多個適於表現 furin 及至少一個額外哺乳動物蛋白質，例如 FX 之表現載體的表現系統。

【0054】 本文亦揭示生產經完全加工之重組需要 furin 之哺乳動物蛋白質，諸如 FX 的方法。在一個具體實例中，穩定、重組生產 furin 之細胞系經生產且隨後經含有至少一個需要 furin 之哺乳動物蛋白質之核苷酸序列的表現載體轉染。可建立及儲存穩定、重組生產 furin 之細胞系以按需要經含有至少一個需要 furin 之哺乳動物蛋白質之核苷酸序列的表現載體轉染。或者，furin 及需要 furin 之哺乳動物蛋白質，諸如 FX 之表現載體可在約 30 分鐘、約 60 分鐘、約 2 小時、約 6 小時、約 12 小時或約 24 小時內轉染至彼此之宿主細胞中。在另一具體實例中，兩個或兩個以上表現載體實質上同時轉染至宿主細胞中。出於本發明的目的，實質上同時係指任何小於或等於 1 小時之時段。

【0055】 轉形細胞係根據存在於表現載體中之選擇標記選擇以生產穩定的轉形細胞池，接著該等池視情況選殖以產生穩定純系。穩定純系在培養起始之後約 36 小時至約 78 小時、約 36 小時至約 72 小時、約 40 小時

至約 78 小時、約 42 小時至約 68 小時或約 48 小時至約 72 小時之後，或在培養指定時段之後於培養物上清液中生產在約 50 U/mL 與約 300 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 400 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 350 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 300 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 250 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 200 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 175 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 150 U/mL 之間、在約 50 U/mL 與約 125 U/mL 之間或在約 50 U/mL 與約 100 U/mL 之間的 furin。此外，穩定純系產生藉由轉形細胞生產之所有重組蛋白質，諸如 FX 之大於 80% 經完全加工且具活性之重組哺乳動物蛋白質，諸如 FX。

【0056】 本文亦揭示一種用於重組 furin 及重組 FX 之表現系統，其在培養約 36 小時至約 78 小時之後以約 50 U/mL 與約 300 U/mL 之間的累積濃度分泌 furin 至培養物上清液中。

【0057】 本文亦揭示一種生產成熟、經完全加工之 FX 之方法，其包含使用在培養約 36 小時至約 78 小時之後以約 50 U/mL 與約 300 U/mL 之間的累積濃度分泌 furin 至培養物上清液中的表現系統。

【0058】 本文亦包含藉由主張之方法生產之重組哺乳動物蛋白質及任何經完全加工之哺乳動物重組 FX。

實施例

實施例 1. 藉由定義量之 furin 生產經完全加工且完全具活性之重組因子 X

【0059】 對於 FX 表現，使用含有人類密碼子最佳化 FX 或藉由內部核糖體進入位點 (IRES) 分離之人類密碼子最佳化 FX 與人類密碼子最佳化

維生素 K 環氧化物還原酶 (FX/VKOR) 兩者之哺乳動物表現質體 pSLX。中國倉鼠卵巢 (CHO) -S 及 CHO-DG44 表現系統之構築體分別包括遺傳黴素選擇及二氫葉酸還原酶 (dhfr) 選擇。對於 furin 表現，使用含有與作為選擇標記之潮黴素組合之人類全長 furin 之哺乳動物表現質體 pcDNA3.1 (圖 1A)。

【0060】 起初，CHO 衍生之細胞系 (CHO-S 及 CHO DG44) 經 FX 或 FX/VKOR 構築體轉染以產生穩定池，且隨後池經受次選殖以產生穩定純系。在第二輪轉染及次選殖中，選擇數目之 FX-或 FX/VKOR 表現純系各自經 furin 超轉染，產生表現 FX/furin 或 FX/VKOR/furin 之穩定池及穩定純系。

【0061】 穩定重組生產 FX 之 CHO-S 及 CHO-DG44 細胞系在振盪器燒瓶中之無動物組分培養基中且在補充有 4 mM 麩醯胺酸、500 μ g/mL 遺傳黴素、500 μ g/mL 潮黴素及 5 μ g/mL 維生素 K1 之 PowerCHO®-CD 培養基 (Lonza BioWhittaker) 中維持每毫升 CHO-S 細胞 0.3×10^6 或 0.5×10^6 個細胞的起始細胞數目的情況下生長約 42 小時至約 72 小時。CHO-DG44 細胞維持於補充有 6 mM 麩醯胺酸、500 nM 甲胺喋呤 (MTX) 及 5 μ g/mL 維生素 K1 之 OptiCHO™-CD 培養基 (Life Technologies) 中。

【0062】 收穫之細胞培養物上清液藉由西方墨點法在還原條件下分析以使用多株山羊抗人類 FX 或多株綿羊抗人類 FX (Affinity Biologicals) 測定重組人類 FX 之品質。西方墨點之密度計分析使得能夠定量不同經恰當加工之 FX 物質，稱為重鏈 FX (HC) 及輕鏈 FX (LC)，及不充分裂解之 FX 物質，稱為單鏈 FX (SC) 及含前肽輕鏈 FX (PP-LC)。

【0063】 對於 FX 定量，細胞培養物上清液藉由 ELISA 分析以測定

FX 濃度且藉由使用魯塞爾蝰蛇蛇毒 (Russell's viper venom ; RW) 作為活化劑之 FXa 發色檢定分析以測定活性 FX 之濃度。此等檢定使用血漿衍生 FX (Hyphen Biomed) 校準。比活性藉由活性 FX 之濃度除以總 FX 之濃度乘以 100 以 % 給出。對於 furin 定量, 活性 furin 在相對於 furin 參考材料 (New England Biolabs) 校準之 furin 螢光檢定中測定。

【0064】 對於統計分析, 經完全加工之 FX/總 FX (%) 使用關於 CHO-DG44 轉染池 (A)、CHO-S 轉染池 (B) 及 CHO-S 單細胞衍生純系 (C) 之 $E_{\max}$ 模型隨 furin 濃度而變地模型化。此模型用於劑量反應研究之統計評估。 $E_{\max}$ 模型使用四個參數 (E_0 、 $E_{\max}$ 、 ED_{50} 及 n) 以如下隨 furin 而變地對 FX 模型化:

$$y = E_0 + (x^n \cdot E_{\max}) / (ED_{50}^n + x^n)$$

其中 y 係指經完全加工之 FX/總 FX 且 x 係指 furin 濃度。參數 E_0 係指對應於 furin 濃度為零時之反應之基礎效應, $E_{\max}$ 係指可歸因於 furin 濃度之最大效應, ED_{50} 係指產生 $E_{\max}$ 之一半的 furin 濃度, 且參數 n 表示決定曲線陡度之斜率 (希爾係數 (Hill factor))。

【0065】 為了說明若 furin 接近無限大濃度, 則經完全加工之 FX/總 FX 接近 100%, $E_{\max}$ 模型如下地經修改成具有三個待評估之參數的函數:

$$y = E_0 + (x^n \cdot (100 - E_0)) / (ED_{50}^n + x^n)$$

【0066】 此模型藉由允許參數 E_0 及 n 在不同細胞系之間變化, 亦藉由將此兩個參數模型化為隨機效應而擬合至使用非線性混合效應模型將三種不同細胞系之間的變異性考慮在內的資料。

【0067】 進行模型診斷以驗證應用之模型。進行使用似然比測試之擬

合 $E_{\max}$ 模型與空值模型 (null model) 之比較以確定 $E_{\max}$ 模型取決於 furin 濃度估計總 FX 中之經完全加工之 FX 之百分比的統計證據。

【0068】 結果

【0069】 包含 CHO-DG44 轉染池 (A)、CHO-S 轉染池 (B) 及 CHO-S 單細胞衍生純系 (C) 之用於人類 FX 之基於 CHO 之異源表現系統用作研究 furin 表現對遵循不同轉染策略之人類 FX 加工之效應的基礎。轉染池以及純系另外表現對研究無影響之 VKOR。

【0070】 在二至三培養天之培育期之後，細胞培養物上清液經受一系列分析，包括還原條件下之西方墨點分析、furin 活性檢定、ELISA 及 RW 檢定 (表 1)。平均起來，生產 FX 之 CHO 池及純系顯示超過 50%，部分達到 100% 之 FX 比活性 (表 1)。西方墨點分析顯示重組 FX 不充分地加工至不同程度，如藉由除經完全加工、無前肽 FX 輕鏈及 FX 重鏈以外的兩個不完全加工形式之 FX (亦即含前肽 FX 輕鏈及 FX 單鏈) 所示 (圖 4)。藉助於 FX 之此四種物質之密度計分析，細胞培養物上清液中經完全加工之 FX，亦即 FX 輕鏈加上 FX 重鏈相對於總 FX 之百分比在 30% 與接近 100% 之間 (表 1，圖 4)。此外，未觀測到預活化，其將在重鏈帶藉由缺失活化肽之尺寸縮短時可見。亦藉由繪製此兩個參數評估分泌 furin 之濃度是否對經加工之 FX 之程度具有影響 (圖 5)。如圖 5 中所示，僅 FX 之部分加工在分泌 furin 之低濃度 (<20 U/mL) 下可行，而較高量之分泌 furin 與較佳加工之 FX 相關。

【0071】 為了理解 furin 對 FX 加工之影響及提供資料之統計支持，總 FX 中之經完全加工之 FX (%) 使用關於細胞系 A、B 及 C 之 $E_{\max}$ 模型隨 furin 濃度而變地模型化 (圖 6)。指示模型與資料之良好擬合的四種模型診斷曲

線提供於圖 7A-D 中。使用似然比測試之擬合 $E_{\max}$ 模型與空值模型之比較產生 <0.0001 之 p 值，為總 FX 中之經完全加工之 FX 之較高百分比取決於較高 furin 濃度（圖 8）提供統計證據，再次證明資料之有效性。基於統計分析，導致總 FX 中之等於或高於 90% 及等於或高於 95% 經完全加工之 FX 的如細胞培養基連同 FX 中偵測之生產細胞系生產之估計 furin 濃度分別為至少 57 U/mL 及至少 96 U/mL（圖 9）。

【0072】 總體而言，資料提供足夠 FX 加工（等於或高於 90% 及等於或高於 95%）所需的細胞培養物上清液中之分泌 furin 之定義最小量（至少 57 U/mL 及至少 96 U/mL）。

【0073】 在表現高量之重組蛋白質之生物技術製程中，furin 過度表現可用於獲得經完全加工之酶原。藉由吾人之本發明，吾人首次提供保證高 FX 加工之分泌 furin 之定義最小值（ ≥ 57 U/mL 以達成至少 90% 經完全加工之 FX 及 ≥ 96 U/mL furin 以達成至少 95% 經完全加工之 FX）。此發現對表現來自人類及動物物種之重組 FX、FXa 及變異體之醱酵製程尤其有益，其中 furin 量可用作 FX 前驅蛋白質之足夠加工的指標及用作細胞系及製程開發之目標。

表 1：FX 及 furin 共表現細胞系之資料概述：顯示對於各細胞系量測之 FX 產率、furin 產率及滴度，以及經完全加工之 FX/總 FX 之百分比。

純系/池 標識	表現之重組蛋 白質	細胞系(池或純 系)	Furin 濃 度 (U/mL)	最終細胞 密度[10 ⁶ 細胞/mL]	Furin 比 產率 [U/10 ⁶ 細 胞/天]	FX 比 活性 [%]	經完全 加工之 FX/總FX (%)
1	FX	CHO-DG44 池	8.03	2.015	2.22	5.64	30.34
2	FX/Furin	CHO-DG44 池	8.05	1.155	3.45	7.58	45.69
3	FX/VKOR	CHO-DG44 池	7.88	1.436	2.86	6.44	31.05
4	FX/VKOR/Furin	CHO-DG44 池	7.88	1.029	3.68	11.16	40.08
5	FX	CHO-DG44 池	2.74	1.518	0.95	9.04	41.42
6	FX/Furin	CHO-DG44 池	11.59	0.952	5.71	14.12	71.78
7	FX/VKOR	CHO-DG44 池	2.38	1.152	1.02	15.14	36.92
8	FX/VKOR/Furin	CHO-DG44 池	2.82	0.795	1.58	29.37	57.17
9	FX	CHO-DG44 池	5.36	2.438	1.26	9.23	34.46
10	FX/Furin	CHO-DG44 池	9.94	1.503	3.48	12.23	59.30
11	FX/VKOR	CHO-DG44 池	4.88	2.162	1.27	14.57	33.12
12	FX/VKOR/Furin	CHO-DG44 池	4.78	1.372	1.80	20.48	46.98
13	FX	CHO-DG44 池	8.07	2.005	2.24	47.68	40.93
14	FX/Furin	CHO-DG44 池	8.83	1.851	2.62	64.80	60.54
15	FX/VKOR	CHO-DG44 池	8.42	1.843	2.50	45.48	33.98
16	FX/VKOR/Furin	CHO-DG44 池	6.72	2.220	1.71	58.04	47.46
17	FX	CHO-DG44 池	2.59	1.246	1.05	78.72	46.40
18	FX/ Furin	CHO-DG44 池	55.91	1.396	20.75	98.49	73.47
19	FX/VKOR	CHO-DG44 池	2.59	1.207	1.07	70.43	47.61
20	FX/VKOR/ Furin	CHO-DG44 池	3.48	1.431	1.27	93.42	60.04
21	FX	CHO-DG44 池	5.96	2.035	1.63	71.19	37.77
22	FX/Furin	CHO-DG44 池	27.57	2.226	7.00	104.40	71.85
23	FX/VKOR	CHO-DG44 池	4.40	1.827	1.32	69.50	42.84
24	FX/VKOR/Furin	CHO-DG44 池	5.20	2.283	1.29	75.60	49.19
25	FX/VKOR	CHO-S 池	0.00	2.224	0.00	90.59	63.96
26	FX/VKOR/Furin	CHO-S 池	51.34	1.828	25.20	99.57	88.97
27	FX/VKOR	CHO-S 池	0.00	2.851	0.00	49.99	57.75
28	FX/VKOR/Furin	CHO-S 池	62.84	2.248	26.13	48.73	87.78
29	FX/VKOR	CHO-S 池	0.00	3.584	0.00	81.39	68.02
30	FX/VKOR/Furin	CHO-S 池	66.98	2.362	26.75	66.57	89.64
31	FX/VKOR	CHO-S 池	0.00	2.870	0.00	69.04	67.02
32	FX/VKOR/Furin	CHO-S 池	55.08	2.295	22.52	52.91	89.99
33	FX/VKOR	CHO-S 池	0.00	2.645	0.00	59.62	71.13
34	FX/Furin	CHO-S 池	116.89	2.083	50.52	51.40	86.56
35	FX	CHO-S 池	0.00	2.230	0.00	67.49	62.65
36	FX/Furin	CHO-S 池	46.62	1.846	22.18	19.29	82.99
37	FX	CHO-S 池	0.00	2.049	0.00	11.47	51.69

38	FX/Furin	CHO-S 池	48.41	1.457	27.61	<25.33	77.46
39	FX	CHO-S 池	0.00	2.265	0.00	95.04	45.87
40	FX/Furin	CHO-S 池	60.72	1.566	32.80	27.69	84.27
41	FX	CHO-S 池	0.00	2.018	0.00	35.63	49.28
42	FX/VKOR/Furin	CHO-S 純系	113.45	3.704	26.99	90.30	95.91
43	FX/VKOR/Furin	CHO-S 純系	63.41	3.133	17.45	92.26	96.23
44	FX/VKOR/Furin	CHO-S 純系	92.86	2.893	27.37	98.55	98.12
45	FX/VKOR/Furin	CHO-S 純系	173.37	3.430	44.11	79.46	98.42
46	FX/VKOR/Furin	CHO-S 純系	23.54	2.816	7.10	86.31	91.69
47	FX/VKOR/Furin	CHO-S 純系	105.42	2.918	30.84	78.63	95.14
48	FX/VKOR/Furin	CHO-S 純系	33.77	3.542	8.35	80.02	92.21
49	FX/VKOR/Furin	CHO-S 純系	135.62	2.777	41.39	94.46	95.18
50	FX/VKOR/Furin	CHO-S 純系	82.03	2.193	30.46	48.80	93.75
51	FX/VKOR/Furin	CHO-S 純系	8.06	2.280	2.90	67.11	52.38
52	FX/VKOR/Furin	CHO-S 純系	81.02	2.889	23.91	85.37	95.61

【0074】 除非另外指明，否則本說明書及申請專利範圍中所使用之表示成分量、特性（諸如分子量、反應條件等）之所有數字應理解為在所有情況下均由術語「約」修飾。如本文所用，術語「約」及「大致」意謂在10%至15%內，較佳在5%至10%內。因此，除非相反指示，否則本說明書及所附申請專利範圍中所闡述之數值參數為近似值，其可取決於本發明設法獲得之所要特性而變化。至少，且不試圖將等效原則之應用限制於申請專利範圍之範疇，各數值參數至少應根據所報告之有效數位之個數且藉由應用一般捨入技術來解釋。儘管闡述本發明之廣泛範疇的數值範圍及參數為近似值，但特定實施例中所闡述之數值應儘可能精確地報導。然而，任何數值均固有地含有某些必然由其各別測試量測值中所存在之標準差造成的誤差。

【0075】 除非本文另外指示或明顯與內容相矛盾，否則在描述本發明之上下文中（尤其在以下申請專利範圍之上下文中）所使用的術語「一」及「該」及類似指示物應解釋為涵蓋單數與複數個兩者。本文中值的範圍

之敘述僅意欲充當個別地提及屬於該範圍內之各單獨值的簡寫方法。除非本文中另外指示，否則各個別值併入至本說明書中，如同其在本文中個別地敘述一般。除非本文另外指明或上下文另外明顯矛盾，否則本文所述之所有方法可以任何適合順序進行。使用本文中提供之任何及所有實施例或例示性語言（例如「諸如」）僅意欲更好地闡明本發明且不對另外主張的本發明之範疇造成限制。本說明書中之語言不應理解為指示任何未主張之要素對於實踐本發明必不可少。

【0076】 本文中所揭示的本發明之替代性要素或具體實例的分組不應理解為限制。可個別地或以與群組之其他成員或本文中所發現的其他要素的任何組合來參考及主張各群組成員。預期群組中之一或多個成員可出於便利性及/或專利性原因而包括於群組中或自群組刪除。當任何此包括或刪除發生時，本說明書被認為如所修改地含有群組，因此滿足附加之申請專利範圍中所使用之所有馬庫什群組（Markush group）的書面描述。

【0077】 本文中描述本發明之某些具體實例，包括本發明人已知之進行本發明的最佳模式。當然，此等所描述具體實例之變化在一般技術者閱讀前述描述後將變得顯而易見。本發明人期望熟習此項技術者適當時採用此等變化，且本發明人意欲以不同於本文中特定描述之方式來實踐本發明。因此，本發明包括如由適用法律所准許之隨附在此之申請專利範圍中所敘述之標的物的所有修改及等效物。此外，除非本文另外指明或另外與上下文明顯矛盾，否則本發明涵蓋上述要素在其所有可能變化中之任何組合。

【0078】 本文揭示之特定具體實例可在申請專利範圍中使用由……

組成或主要由……組成語言來進一步限制。當用於申請專利範圍中時，不論如所提交抑或根據修改添加，過渡術語「由……組成」排除申請專利範圍中未指定之任何要素、步驟或成分。過渡術語「主要由……組成」將申請專利範圍之範疇限制於指定材料或步驟及不實質上影響基本及新穎特徵之材料或步驟。如此主張之本發明之具體實例固有地或明確地描述並實現於本文中。

【0079】 此外，已在本說明書通篇中大量參考專利及印刷出版物。上文所引用之參考文獻及印刷出版物中之每一者個別地以全文引用的方式併入本文中。

【0080】 最後，應理解本文中所揭示之本發明之具體實例說明本發明之原理。可採用之其他修改在本發明之範疇內。因此，作為實例而非限制，可根據本文中之教示利用本發明之替代性組態。因此，本發明不限於如所精確展示及描述的內容。

【符號說明】

無

補充序列表

- <110> 巴克斯歐塔有限公司
巴克斯歐塔公司
- <120> 在分泌furin之哺乳動物表現系統中生產經完全加工且具功能性之因子 X
- <140> 104126066
- <141> 2015-08-11
- <150> US62/036,438
- <151> 2014-08-12
- <160> 4
- <170> PatentIn 3.5版
- <210> 1
- <211> 7981
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> RCL.012-74.pD3H-Furin表現載體

<400> 1	
gacggatcgg gagatctccc gatccccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtgt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgag atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agcccatata	300
tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca ctgggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca	600
tcgtattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtgtg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca	840
ctgcttactg gcctatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc	900
gtttaaactt aagcttggta ccgagctcgg atccactagt ccagtgtgtt ggaattctgc	960
agatattccag cacagtggcg gccgcatgga gctgaggccc tggttgctat gggtaggtagc	1020
agcaacagga accttgggtc tgctagcagc tgatgtcag ggccagaagg tcttcaccaa	1080
cacgtgggct gtgcgcatcc ctggaggccc agcgggtggc aacagtgtgg cacggaagca	1140
tgggttcctc aacctgggcc agatcttcgg ggactattac cacttcggc atcgaggagt	1200
gacgaagcgg tccctgtcgc ctaccgccc gcggcacagc cggctgcaga gggagcctca	1260
agtacagtgg ctggaacagc aggtggcaaa gcgacggact aaacgggacg tgtaccagga	1320

gcccacagac cccaagtffc ctcagcagtg gtacctgtct ggtgtcactc agcgggacct	1380
gaatgtgaag gcggcctggg cgcagggcta cacagggcac ggcaattgtg tctccattct	1440
ggacgatggc atcgagaaga accacccgga cttggcaggc aattatgata ctggggccag	1500
ttttgatgtc aatgaccagg acctgaccc ccagcctcgg tacacacaga tgaatgaaa	1560
caggcacggc acacgggtgt cgggggaagt ggctgcggtg gccacaacg gtgtctgtgg	1620
tgtagggtgt gcctacaacg cccgcattgg aggggtgcgc atgttgatg gcgaggtagc	1680
agatgcagtg gaggcacgct cgctgggcct gaaccccaac cacatccaca tctacagtgc	1740
cagctggggc cccgaggatg acggcaagac agtggatggg ccagcccgcc tcgccgagga	1800
ggcctctctc cgtgggggta gccaggggcg aggggggctg ggctccatct ttgtctgggc	1860
ctcggggaac gggggccggg aacatgacag ctgcaactgc gacggctaca ccaacagtat	1920
ctacacgtg tccatcagca gcgccacgca gtttggcaac gtgccgtggt acagcgaggc	1980
ctgctcgtcc aacttgccca cgacctacag cagtggcaac cagaatgaga agcagatcgt	2040
gacgactgac ttgcggcaga agtgcacgga gtctcacacg ggcacctcag cctctgcccc	2100
cttagcagcc ggcatcattg ctctcacctt ggaggccaat aagaacctca catggcggga	2160
catgcaacac ctggtgggtac agacctcgaa gccagccac ctcaatgcca acgactgggc	2220
caccaatggt gtgggccgga aagttagcca ctcatatggc tacgggcttt tggacgcagg	2280
cgccatggtg gccctggccc agaattggac cacagtggcc cccagcgga agtgcacat	2340
cgacatctc accgagccca aagacatcgg gaaacggctc gaggtgcgga agaccgtgac	2400
cgcgtgcctg ggcgagccca accacatcac tcggctggag cagctcagg cgcggctcac	2460
cctgtcctat aatcgccgtg gcgacctggc catccacctg gtcagcccca tgggcacccg	2520
ctccacctg ctggcagcca ggccacatga ctactccgca gatgggttta atgactgggc	2580
cttcatgaca actcattcct gggatgagga tccctctggc gagtgggtcc tagagattga	2640
aaacaccagc gaagccaaca actatgggac gctgaccaag ttcacctcg tactctatgg	2700
caccgcccc ctgagggtgc ccgtacctc agaaagcagt ggctgcaaga ccctcacgtc	2760
cagtcaggcc tgttgtgtgt gcgaggaagg ctctctccct caccagaaga gctgtgtcca	2820
gcactgccct ccaggcttcg cccccaagt cctcgatacg cactatagca ccgagaatga	2880
cgtggagacc atccgggcca gcgtctgcgc cccctgccac gcctcatgtg ccacatgcca	2940
ggggccggcc ctgacagact gcctcagctg cccagccac gcctccttgg accctgtgga	3000
gcagacttgc tcccggcaaa gccagagcag ccgagagtcc ccgccacagc agcagccacc	3060
tcggctgccc ccgaggttg aggcggggca acggctgcgg gcagggtgc tgcctcaca	3120
cctgcctgag gtggtggccg gcctcagctg cgccttcac gtgtgtgtct tcgtcactgt	3180
cttcttggtc ctgcagctgc gctctggctt tagttttcgg ggggtgaagg tgtacacat	3240
ggaccgtggc ctcatctcct acaaggggct gccccctgaa gcctggcagg aggagtgcc	3300
gtctgactca gaagaggacg agggccgggg cgagaggacc gccittatca aagaccagag	3360

cgccctctga tctagagggc cgttttaaac ccgctgatca gcctcgactg tgccttctag	3420
ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccctcc ttgacctgg aaggtgccac	3480
tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca	3540
ttctattctg ggggggtggg tggggcagga cagcaagggg gaggatggg aagacaatag	3600
caggcatgct ggggatgcgg tgggtcttat ggcttctgag gcgaaagaa ccagctgggg	3660
ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag cggcgcatia agcgcggcgg gtgtgggtgt	3720
tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tgcctttctt	3780
cccttcttt ctcgccacgt tgcgggctt tccccgtcaa gctctaaatc ggggcatccc	3840
tttaggggtc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga	3900
tgggtcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgcccttga cgttggagtc	3960
cacgttcttt aatagtggac tctgttcca aactggaaca aactcaacc ctatctcgtt	4020
ctattctttt gatttataag ggattttggg gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct	4080
gatttaacaa aaatttaacg cgaatttaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtga	4140
aagtccccag gctccccagg caggcagaag tatgcaaagc atgcacatca attagtcagc	4200
aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaa gcatgcacat	4260
caattagtca gcaaccatag tcccggccct aactccgcc atcccggccc taactccgcc	4320
cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt ttattttatg cagaggccga	4380
ggccgcctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggctttttt gaggcctagg	4440
cttttgcaaa aagctcccg gagcttgtat atccattttt ggatctgac agcacgtgat	4500
gaaaaagcct gaactcaccg cgacgtctgt cgagaagttt ctgatcgaaa agttcgacag	4560
cgtctccgac ctgatgcagc tctcggagg cgaagaatct cgtgctttca gcttcgatgt	4620
aggaggcggt ggatatgtcc tgcgggtaaa tagctgcgcc gatggtttct acaaagatcg	4680
ttatgtttat cggcaccttt catcggccgc gctcccgatt ccggaagtgc ttgacattgg	4740
ggaattcagc gagagcctga cctattgcat ctcccgcgt gcacagggtg tcacgttgca	4800
agacctgcct gaaaccgaac tgcgcgtgt tctgcagcg gtcgcggagg ccatggatgc	4860
gatcgctgcg gccgatctta gccagacgag cgggttcggc ccattcggac cgcaaggaa	4920
cggtaatac actacatggc gtgatttcatt atgcgcgatt gctgatcccc atgtgtatca	4980
ctggcaaaact gtgatggacg acaccgtcag tgcgtccgtc gcgcaggctc tcgatgagct	5040
gatgcttttg gccgaggact gcccgaagt ccggcacctc gtgcacgcgg atttcggctc	5100
caacaatgic ctgacggaca atggccgcat aacacgggtc attgactgga gcgaggcgat	5160
gttcggggat tcccaatacg aggtcgccaa catcttcttc tggaggccgt ggttggcttg	5220
tatggagcag cagacgcgct acttcgagcg gaggcattcc gagcttgag gatcgccgcg	5280
gctccgggcg tatatgtctc gcatgtgtct tgaccaactc tatcagagct tggttgacgg	5340
caatttcgat gatgcagctt gggcgaggg tcgatgcgac gcaatcgtcc gatccggagc	5400
cgggactgic gggcgtacac aaatcggccg cagaagcgcg gccgtctgga ccgatggctg	5460

tgtagaagta ctgcgcgata gtggaaaccg acgccccagc actcgtccga gggcaaagga	5520
atagcacgtg ctacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg	5580
aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt	5640
cttcgcccac cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat	5700
cacaaatttc acaataaag catTTTTTt actgcattct agttgtggtt tgtccaaact	5760
calcaatgia tcttatcatg tctgtatacc gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc	5820
atggtcatag ctgtttctcg tglgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg	5880
agccggaagc ataaagtga aagcctgggg tgcctaata gtagagtaac tcacattaat	5940
tgcgttgccg tcaactgccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg	6000
aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg ctccctcgct	6060
cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc	6120
ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg	6180
ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc gcggttgctg gcgtttttcc ataggctccg	6240
ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg	6300
actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac	6360
cctgccgctt accggatacc tglccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca	6420
atgctcacgc tftaggatc tcagttcggg ftagggtcgt cgctccaagc tgggctgtgt	6480
gcacgaacct cccgttcagc ccgaccgtg gcctttatcc ggtaactatc gtcttgagtc	6540
caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag	6600
agcgaggtaa gtaggcggtg ctacagagtt ctgaagtgg tggcctaact acggctacac	6660
tagaaggaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt	6720
tggtagctct tgaatccgca acaaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa	6780
gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg	6840
gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggtt ttggtcatga gattatcaaa	6900
aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat	6960
atatgagtaa acttggctcg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc	7020
gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtctgttaga taactacgat	7080
acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc	7140
ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgtcc	7200
tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag	7260
ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg	7320
ctcgtcgttt ggtatggctt catcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg	7380
atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttccggt cctccgatcg ttgtcagaag	7440
taagtggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt	7500

catgccatcc gtaagatgct ttctctgtac tggtaggtac tcaaccaagt cattctgaga	7560
atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta atacgggata ataccgcgc	7620
acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc	7680
aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgac	7740
ttcagcatct ttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaatgc	7800
cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata ctcatctct tccttttca	7860
atattattga agcatttacc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgat	7920
ttagaaaaat aaacaatatg gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cactgacgt	7980
c	7981

<210> 2
 <211> 2385
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 2	
atggagctga ggccctggtt gctatgggtg gtagcagcaa caggaaacctt ggtcctgcta	60
gcagctgatg ctacaggcca gaaggcttc accaacacgt gggctgtgcg catccctgga	120
ggcccagcgg tggccaacag tgtggcacgg aagcatgggt tcctcaacct gggccagatc	180
ttcggggact attaccactt ctggcatcga ggagtgcga agcggtcctt gtcgcctcac	240
cgcccgcggc acagccggct gcagaggag cctcaagtac agtggctgga acagcagggtg	300
gcaaagcgac ggactaaacg ggacgtgtac caggagccca cagaccccaa gtctcctcag	360
cagtgggtacc tgtctggtgt cactcagcgg gacctgaatg tgaaggcggc ctgggcgcag	420
ggctacacag ggcacggcat tgtggtctcc attctggacg atggcatcga gaagaaccac	480
ccggacttgg caggcaatta tgatcctggg gccagttttg atgtcaatga ccaggacctt	540
gacccccagc ctcggtacac acagatgaat gacaacaggc acggcacacg gtgtgcgggg	600
gaagtggctg cgggtggcca caacgggtgc tgtggtgtag gtgtggccta caacggccgc	660
attggagggg tgcgcatgct ggatggcgag gtgacagatg cagtggaggc acgtcgcgtg	720
ggcctgaacc ccaaccacat ccacatctac agtgccagct gggggccgga ggatgacggc	780
aagacagtgg atgggccagc ccgcctcgcg gaggaggcct tcttccgtgg ggttagccag	840
ggccgagggg ggctgggctc catctttgtc tgggcctcgg ggaacggggg ccgggaacat	900
gacagctgca actgcgacgg ctacaccaac agtatctaca cgctgtccat cagcagcgcc	960
acgcagtttg gcaacgtgcc gtggtacagc gaggcctgct cgtccacact ggccacgacc	1020
tacagcagtg gcaaccagaa tgagaagcag atcgtgacga ctgacttgcg gcagaagtgc	1080
acggagtctc acacgggcac ctacagctct gcccccttag cagccggcat cattgtctctc	1140
accttgaggg ccaataagaa cctcacatgg cgggacatgc aacacctggt ggtacagacc	1200
tcgaagccag ccacacctaa tgccaacgac tgggccacca atggtgtggg ccggaaagtg	1260
agccactcat atggctacgg gcttttggac gcaggcgcca tgggtggcct ggcccagaat	1320

tggaccacag tggccccca gcggaagtgc atcatcgaca tcctcaccga gcccaaagac 1380
atcgggaaac ggctcgaggt gcggaagacc gtgaccgcgt gcctgggcga gcccaaccac 1440
atcactcggc tggagcacgc tcaggcgcgg ctacacctgt cctataatcg ccgtggcgac 1500
ctggccatcc acctggtcag ccccatgggc acccgctcca ccctgctggc agccaggcca 1560
catgactact ccgcagatgg gtttaatgac tgggccttca tgacaactca ttcctgggat 1620
gaggatccct ctggcgagtg ggtcctagag attgaaaaca ccagcgaagc caacaactat 1680
gggacgciga ccaagttcac cctcgtactc tatggcaccg cccctgaggg gctgcccgta 1740
cctccagaaa gcagtggctg caagaccctc acgtccagtc aggccttgtt ggtgtgcgag 1800
gaaggcttct ccttgcacca gaagagctgt gtccagcact gccctccagg cttcgcccc 1860
caagtccctg atacgcacta tagcaccgag aatgacgtgg agaccatccg ggccagcgtc 1920
tgcgccccct gccacgcctc atgtgccaca tgccaggggc cggccctgac agactgcctc 1980
agctgccccca gccacgcctc ctggaccctt gtggagcaga ctgtctcccg gcaaagccag 2040
agcagccgag agtccccgcc acagcagcag ccacctcggc tgcccccgga ggtggaggcg 2100
gggcaacggc tgcgggcagg gctgctgccc tcacacctgc ctgagggtgtt ggccggcctc 2160
agctgcgcct tcacgtgtct ggtcttcgtc actgtcttcc tggctctgca gctgcgtctt 2220
ggcttttagtt ttccgggggt gaagggttac accatggacc gtggcctcat ctctacaag 2280
gggctgcccc ctgaagcctg gcaggaggag tgcccgctg actcagaaga ggacgagggc 2340
cggggcgaga ggaccgcctt tatcaaagac cagagcgccc tctga 2385

<210> 3
<211> 794
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3
Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr
1 5 10 15
Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn
20 25 30
Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val
35 40 45
Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
50 55 60
Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
65 70 75 80
Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
85 90 95
Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu

100	105	110
Pro Thr Asp 115	Pro Lys Phe Pro Gln 120	Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr 125
Gln Arg Asp 130	Leu Asn Val Lys Ala 135	Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly 140
His Gly Ile Val Val 145	Ser Ile Leu Asp Asp 150	Gly Ile Glu Lys Asn His 155 160
Pro Asp Leu Ala 165	Gly Asn Tyr Asp Pro 170	Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn 175
Asp Gln Asp 180	Pro Asp Pro Gln Pro 185	Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn 190
Arg His Gly 195	Thr Arg Cys Ala Gly 200	Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn 205
Gly Val Cys Gly Val 210	Gly Val Ala Tyr Asn Ala 215	Arg Ile Gly Gly Val 220
Arg Met Leu 225	Asp Gly Glu Val Thr 230	Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu 235 240
Gly Leu Asn Pro 245	Asn His Ile His Ile 250	Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro 255
Glu Asp Asp 260	Gly Lys Thr Val Asp 265	Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu 270
Ala Phe Phe 275	Arg Gly Val Ser Gln 280	Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile 285
Phe Val Trp Ala 290	Ser Gly Asn Gly Gly 295	Arg Glu His Asp Ser Cys Asn 300
Cys Asp Gly Tyr Thr 305	Asn Ser Ile Tyr Thr 310	Leu Ser Ile Ser Ser Ala 315 320
Thr Gln Phe Gly 325	Asn Val Pro Trp Tyr 330	Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr 335
Leu Ala Thr 340	Thr Tyr Ser Ser Gly 345	Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val 350
Thr Thr Asp 355	Leu Arg Gln Lys Cys 360	Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser 365
Ala Ser Ala Pro Leu Ala 370	Ala Gly Ile Ile Ala 375	Leu Thr Leu Glu Ala 380

Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
385 390 395 400

Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
405 410 415

Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
420 425 430

Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
435 440 445

Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
450 455 460

Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
465 470 475 480

Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
485 490 495

Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
500 505 510

Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
515 520 525

Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
530 535 540

Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
545 550 555 560

Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
565 570 575

Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser
580 585 590

Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys
595 600 605

Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp
610 615 620

Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val
625 630 635 640

Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu
645 650 655

Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu
660 665 670

Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln
675 680 685

Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu
690 695 700

Arg Ala Gly Leu Leu Pro Ser His Leu Pro Glu Val Val Ala Gly Leu
705 710 715 720

Ser Cys Ala Phe Ile Val Leu Val Phe Val Thr Val Phe Leu Val Leu
725 730 735

Gln Leu Arg Ser Gly Phe Ser Phe Arg Gly Val Lys Val Tyr Thr Met
740 745 750

Asp Arg Gly Leu Ile Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Pro Glu Ala Trp Gln
755 760 765

Glu Glu Cys Pro Ser Asp Ser Glu Glu Asp Glu Gly Arg Gly Glu Arg
770 775 780

Thr Ala Phe Ile Lys Asp Gln Ser Ala Leu
785 790

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Furin一致性識別位點

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> X為任何胺基酸，或沒有胺基酸

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> X為離胺酸或精胺酸

<400> 4

Arg Xaa Xaa Arg
1

I666319

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

在分泌 furin 之哺乳動物表現系統中生產經完全加工且具功能性之因子
X

PRODUCTION OF FULLY PROCESSED AND FUNCTIONAL FACTOR X
IN A FURIN-SECRETING MAMMALIAN EXPRESSION SYSTEM

【中文】

本文揭示用於在生產每毫升培養物上清液 50 U 與 300 U 之間的受控量之 furin 之表現系統中生產經完全加工之成熟因子 X 之方法。亦揭示用於表現 furin 及因子 X 之轉形細胞、表現系統及表現載體。

【英文】

Disclosed herein are methods for production of fully-processed mature Factor X in an expression system producing a controlled amount of furin between 50 U/mL and 300 U/mL of culture supernatant. Also disclosed are transformed cells, expression systems, and expression vectors for the expression of furin and Factor X.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1A ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種轉形細胞，其包含：
編碼人類 furin 之第一核苷酸序列，使得該轉形細胞表現及分泌能夠在 Arg-(Lys/Arg)-Arg 基序(motif)處進行裂解之功能性 furin 至培養物上清液中，其中該功能性 furin 在培養 36 小時至 78 小時之後以 50 U/mL 至 300 U/mL 之濃度分泌於該培養物上清液中，以及
編碼因子 X 之第二核苷酸序列。
2. 如申請專利範圍第 1 項之轉形細胞，其中該編碼人類 furin 之第一核苷酸序列及該編碼因子 X 之第二核苷酸序列在不同表現載體上或在相同表現載體上。
3. 如申請專利範圍第 2 項之轉形細胞，其中該表現載體是病毒載體或非病毒載體。
4. 如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之轉形細胞，其中該功能性 furin 以至少 50 U/mL 至 60 U/mL 之濃度分泌於該培養物上清液中。
5. 如申請專利範圍第 4 項之轉形細胞，其中至少 90%之藉由該轉形細胞生產之因子 X 經完全加工。
6. 如申請專利範圍第 1-3 項中任一項之轉形細胞，其中該功能性 furin 以至少 90 U/mL 至 100 U/mL 之濃度分泌於該培養物上清液中。
7. 如申請專利範圍第 6 項之轉形細胞，其中至少 95%之藉由該轉形細胞生產之因子 X 經完全加工。
8. 一種生產轉形細胞之方法，該方法包含：
對適合表現哺乳動物蛋白質的細胞系用以下者轉染：適於藉由該細胞系

表現能夠在 Arg-(Lys/Arg)-Arg 基序處進行裂解之人類 furin 之第一表現載體以及適於藉由該細胞系表現因子 X 的第二表現載體，其中該第二表現載體包括編碼因子 X 的核苷酸序列；以及

選擇經該第一表現載體及該第二表現載體轉染之細胞，其在培養 36 小時至 78 小時之後表現功能性人類 furin 並以 50 U/mL 至 300 U/mL 之濃度分泌功能性人類 furin 於培養物上清液中。

9. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該表現載體是病毒載體或非病毒載體。
10. 如申請專利範圍第 8 或 9 項之方法，其中該選擇步驟係藉由以下方式進行：選擇經該第一表現載體及該第二表現載體轉染之細胞，其在培養 42 小時至 72 小時之後表現功能性人類 furin 並以 300 U/mL 之濃度分泌功能性人類 furin 於培養物上清液中。
11. 如申請專利範圍第 8 或 9 項之方法，其中該細胞系實質上同時經該第一表現載體及該第二表現載體轉染。
12. 如申請專利範圍第 8 或 9 項之方法，其中該細胞系經該第一表現載體轉染且獲得分泌穩定量之 furin 之細胞，隨後該細胞系經該第二表現載體轉染，或以相反順序進行。
13. 一種經完全加工的重組因子 X，其係藉由根據申請專利範圍第 1-7 項中任一項的轉形細胞生產。
14. 一種生產成熟、經完全加工的因子 X (FX) 的方法，該方法包含培養根據申請專利範圍第 1-7 項中任一項的轉形細胞以產生成熟、經完全加工的 FX，並將該 FX 從培養物上清液中分離。

15. 一種生產根據申請專利範圍第 1 項之轉形細胞的方法，該方法包含：
- 用表現載體轉染適合於表現哺乳動物蛋白質的細胞系，該表現載體包括編碼能夠在 Arg-(Lys/Arg)-Arg 基序處進行裂解之人類 furin 多肽之核苷酸序列以及用包括編碼因子 X 之核苷酸序列的第二表現載體轉染；及
- 選擇具有以下特徵的轉形細胞：在培養 36 小時至 78 小時之後表現功能性人類 furin 並以 50 U/mL 至 300 U/mL 之濃度分泌功能性人類 furin 於培養物上清液中，較佳在培養 42 小時至 72 小時之後表現功能性人類 furin 並以 300 U/mL 之濃度分泌功能性人類 furin 於培養物上清液中。