



УКРАЇНА

(19) UA (11) 84831 (13) C2

(51) МПК (2006)

A01H 5/00

A01K 67/027

A61K 38/22

A61K 38/43

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

C12N 5/10

C12N 15/09

C12P 21/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ПОХІДНІ ФАКТОРА КОАГУЛЯЦІЇ VII

1

2

(21) 2003098661

(22) 21.03.2002

(24) 10.12.2008

(86) PCT/DK02/00189, 21.03.2002

(31) PA 2001 00477

(32) 22.03.2001

(33) DK

(46) 10.12.2008, Бюл.№ 23, 2008 р.

(72) ПЕРССОН ЕГОН, SE/DK

(73) НОВО НОРДІСК ХЕЛС КЕА АГ

(57) 1. Поліпептид фактора VII, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1 або її варіант, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраному з Q250, R396 або P406 SEQ ID NO: 1, була заміщена на цистеїн, або де цистеїн був доданий до С-кінця SEQ ID NO: 1.

2. Поліпептид фактора VII за п. 1, у якому амінокислота, що відповідає R396 SEQ ID NO: 1, була заміщена на цистеїн.

3. Поліпептид фактора VII за будь-яким з пп. 1-2, у якому амінокислота, що відповідає Q250 SEQ ID NO: 1, була заміщена на цистеїн.

4. Поліпептид фактора VII за будь-яким з пп. 1-3, у якому амінокислота, що відповідає P406 SEQ ID NO: 1, була заміщена на цистеїн.

5. Похідна фактора VII, що включає поліпептид фактора VII, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1 або її варіант, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраному з Q250, R396 або P406 SEQ ID NO: 1, була заміщена на цистеїн, або де цистеїн був доданий до С-кінця SEQ ID NO: 1, причому зазначений цистеїн кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну

масу зазначеного поліпептиду фактора VII на приблизно 300 дальтон - приблизно 100000 дальтон, і де зазначена похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIа дикого типу людини.

6. Похідна фактора VII за п. 5, у якій поліпептид фактора VII відповідає будь-якому з пп. 1-4.

7. Похідна фактора VII за будь-яким з пп. 5-6, у якій хімічна група є головним чином нейтральною.

8. Похідна фактора VII за будь-яким з пп. 5-7, у якій хімічна група збільшує справжню молекулярну масу похідної фактора VII на приблизно 1000 дальтон приблизно 80000 дальтон.

9. Похідна фактора VII за будь-яким з пп. 5-8, у якій хімічна група збільшує справжню молекулярну масу похідної фактора VII на приблизно 5000 дальтон -приблизно 60000 дальтон.

10. Похідна фактора VII за будь-яким з пп. 5-9, у якій хімічна група підвищує справжню молекулярну масу похідної фактора VII на приблизно 10000 дальтон -приблизно 40000 дальтон.

11. Похідна фактора VII за будь-яким з пп. 5-10, у якій хімічна група є поліетиленгліколем.

12. Похідна фактора VII за будь-яким з пп. 5-11, у якій хімічна група вибрана з 1-6 молекул поліетиленгліколю.

13. Похідна фактора VII за п. 12, у якій хімічна група являє собою одну молекулу поліетиленгліколю.

14. Похідна фактора VII за будь-яким з пп. 5-13, де хімічна група кон'югована з вільною сульфгідрильною групою, присутньою в амінокислоті, заміщений на амінокислоту, вставлену в або додану до поліпептиду.

(13) C2

(11) 84831

(19) UA

15. Похідна фактора VII за будь-яким з пп. 5-14, у якій хімічна група кон'югована з цистеїном.
16. Молекула виділеної або рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид фактора VII за будь-яким з пп. 1-4.
17. Вектор експресії еукаріотичних клітин, що включає молекулу за п. 16.
18. Еукаріотична клітина-хазяїн експресії поліпептиду фактора VII за будь-яким з пп. 1-4, де зазначена клітина-хазяїн включає молекулу виділеної або рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид фактора VII.
19. Еукаріотична клітина-хазяїн за п. 18, яка має походження від ссавців.
20. Еукаріотична клітина-хазяїн за п. 19, де зазначена клітина вибрана з групи, що складається з клітин СНО, клітин ВНК або клітин НЕК.

21. Спосіб одержання поліпептиду фактора VII за будь-яким з пп. 1-4, який включає культивування еукаріотичної клітини-хазяїна за будь-яким з пп. 18-20 в прийнятному середовищі для росту, за умов, що дозволяють синтез білка з зазначеного полінуклеотидного конструкту та виділення поліпептиду фактора VII з культурального середовища.
22. Спосіб одержання похідної фактора VII, що складається з етапів:
- a) продукування поліпептиду фактора VII відповідно до способу за п. 21;
 - b) кон'югації поліпептиду фактора VII з хімічною групою;
 - c) введення похідної фактора VII в катіонобмінну хроматографічну колонку або гел'фільтраційну колонку; і
 - d) елювання похідної фактора VII.

Цей винахід стосується нових похідних фактора коагуляції VII людини, поліпептидів фактора VII, а також полінуклеотидних конструктів, що кодують такі поліпептиди, векторів та клітин-хазяїв, що містять та експресують полінуклеотид, фармацевтичних композицій, що містять похідні фактора VII, використання та методів лікування.

Коагуляція крові - це процес, що складається зі складної взаємодії різних компонентів крові (або факторів), що зрештою викликає утворення фібринового згустку. Загалом, компоненти крові, які беруть участь у процесі, що має назву "каскад" коагуляції, є ферментативно неактивними білками (проферментами або зимогенами), що перетворюються на протеолітичні ферменти під дією активатора (який сам по собі є активованим фактором згортання). Фактори коагуляції, що зазнали такого перетворення, мають назву "активні фактори" та позначаються додаванням літери "а" до назви фактора коагуляції (наприклад, Фактор VIIa).

Початок гемостатичного процесу здійснюється формуванням комплексу між тканинним фактором, вивільненим внаслідок пошкодження стінки судини, і фактором VIIa. Цей комплекс потім перетворює фактори IX та X на їхні активні форми. Фактор Ха перетворює обмежену кількість протромбіну на тромбін на клітині, що несе тканинний фактор. Тромбін активує тромбоцити та фактори V та VIII на фактори Va та VIIIa, обидва кофактори в подальшому процесі, що приводить до повного вивільнення тромбіну. Цей процес включає утворення фактора Ха фактором IXa (в комплексі з фактором VIIIa) та відбувається на поверхні активованих тромбоцитів. Тромбін зрештою перетворює фібриноген на фібрин, що приводить до утворення фібринового згустку.

Фактор VII - це глікопротеїн плазми в слідovій кількості, що циркулює в крові як одноланцюговий зимоген. Зимогени є каталітично неактивними. Одноланцюговий фактор VII може бути перетворений на дволанцюговий фактор VIIa фактором Ха, фактором XIIa, фактором IXa, фактором VIIa або тромбіном *in vitro*. Фактор Ха вважається го-

ловним фізіологічним активатором фактора VII. Перетворення зимогену фактора VII на активовану дволанцюгову молекулу відбувається розщепленням внутрішнього Arg¹⁵²-Ile¹⁵³ пептидного зв'язку.

Часто бажано стимулювати або селективно блокувати коагуляційний каскад пацієнта. Фактор VIIa використовували для лікування хвороб згортання крові, що мають кілька причин, такі як дефіцит фактора згортання (наприклад, гемофілія A та B або дефіцит факторів коагуляції XI або VII) або інгібітори фактора згортання. Фактор VIIa також використовували для лікування надлишкових кровотеч, що мають місце в пацієнтів з нормально функціонуючим каскадом згортання крові (відсутній дефіцит фактора згортання або інгібіторів відносно будь-яких факторів коагуляції). Такі кровотечі можуть, наприклад, бути викликані дефектним функціонуванням тромбоцитів, тромбоцитопенією або псевдогемофілією. Кровотечі є також головною проблемою у зв'язку з операцією та іншими формами ушкодження тканини.

[Європейський патент №200421] (Зимогенетика) стосується нуклеотидної послідовності, що кодує фактор VII людини, і рекомбінантної експресії фактора VII в клітинах ссавців.

[Dickinson et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14379-14384, 1996)] описує поліпептиди фактора VII, де Lys¹⁵⁷, Val¹⁵⁸, Glu²⁹⁶, Met²⁹⁸, Asp³³⁴, Ser³³⁶ або Lys³³⁷ були поодинокі заміщені на Ala. Iwanaga et al. [Thromb. Haemost. (додаток, серпень 1999), 466, реферат 1474] описує варіанти фактора VIIa, де залишки 316-320 видалені, або залишки 311-322 заміщені на відповідні залишки трипсіну.

Антикоагулянти, такі як гепарин, кумарин, похідні кумарину, похідні індандіону або інші агенти, можуть бути використані для селективного блокування коагуляційного каскаду в пацієнта, наприклад, під час діалізу нирки, або для лікування глибоких тромбозів вен, розсіяної внутрішньосудинної коагуляції (РВК) та багатьох інших захворювань. Наприклад, лікування гепарином або зовнішнє застосування іону цитрату [патент США

№4500309] можуть бути використані в діалізі для запобігання коагуляції під час курсу лікування. Гепарин також використовується для запобігання глибоких тромбозів вен в пацієнтів під час операції.

Лікування гепарином та іншими антикоагулянтами може, проте, мати небажані побічні ефекти. Наявні антикоагулянти загалом діють по всьому організмі, а не специфічно в якомусь місці. Гепарин, наприклад, може викликати важкі кровотечі. Крім того, з напівжиттям приблизно 80 хвилин, гепарин швидко видаляється з крові, що потребує частого введення. Оскільки гепарин діє як кофактор для антитромбіну III (AT III), а AT III швидко зменшується за лікування PBC, часто важко підтримувати належне дозування гепарину, що потребує безперервного спостереження за вмістом AT III та гепарину. Гепарин є також неефективним, якщо AT III істотно знижується. Крім того, тривале використання гепарину може також підвищувати агрегацію тромбоцитів та зменшувати кількість тромбоцитів, а також брати участь у розвитку остеопорозу. Похідні індандіону можуть також мати токсичні побічні ефекти.

Окрім антикоагулянтів, що були коротко описані вище, були знайдені ще кілька природних білків, що мають антикоагулянтну активність. Наприклад, Reutelingsperger [патент США №4736018] виділив антикоагулянтні білки з аорти бика та артерій пуповини людини. Makі et al. [патент США №4732891] описує виділені з плаценти людини антикоагулянтні білки. Крім того, AT III був запропонований як терапевтичний антикоагулянт [Schipper et al., *Lancet* 1 (8069): 854-856 (1978); Jordan, патент США №4386025; Bock et al., патент США №4517294].

У приблизно 30% або більше пацієнтів, яких лікували ангіопластикою, ендартеректомією або обхідними трансплантатами, тромбоз та/або проліферація клітин гладеньких м'язів у внутрішньому шарі судин викликає перетискання судини і, як наслідок, зводить нанівець реконструктивну операцію. Це закриття судини як наслідок операції відоме як рестеноз. Вважається, що рестеноз є результатом комплексної взаємодії біологічних процесів, включаючи відкладання тромбоцитів та утворення тромбу, вивільнення хемотаксичних та мітогенних факторів, міграцію та проліферацію клітин гладеньких м'язів судин у внутрішній шар судин розширеного артеріального сегменту.

Інгібування накопичення тромбоцитів на місцях механічного ушкодження може обмежувати швидкість рестенозу людини. Тоді як накопичення тромбоцитів відбувається на місцях гострих судинних ушкоджень, утворення тромбіну на цих місцях може відповідати за активацію тромбоцитів та їх відповідне накопичення.

[Міжнародна заявка №WO 92/15686] стосується інактивованого фактора VIIa, поліуклеїнової кислоти та клітинних ліній ссавців для утворення інактивованого фактора VIIa та композицій, що містять інактивований фактор VIIa для інгібування згортання крові.

[Міжнародна заявка №WO 94/27631] стосується способів інгібування рестенозу судин, активності тканинного фактора та відкладання тромбоцитів.

[Міжнародна заявка №WO 96/12800] стосується способу лікування гострих закупорок коронарної артерії, а також окремої композиції, яка складається з інактивованого фактора VIIa разом з тканинним активатором плазміногену або стрептокіназою.

Більшість білків, що потрапляють у кровообіг, видаляються швидко зі ссавців з допомогою нирок. Ця проблема може бути частково вирішена введенням більшої кількості білка або через повторне введення. Проте, вищі дози білка можуть викликати антитіла, які можуть зв'язувати та інактивувати білок та/або полегшувати видалення білка з організму пацієнта. Повторне введення терапевтичного білка є значно неефективним та може бути небезпечним, оскільки воно може викликати алергічну реакцію.

До різних спроб вирішити проблеми, пов'язані з білковими терапіями, належать мікроенкапсуляція, системи доставки ліпосом, введення складених білків, а також хімічна модифікація. Найперспективнішими з них є модифікація терапевтичного білка ковалентним приєднанням полімерів поліалкіленоксиду, зокрема поліетиленгліколю (ПЕГ). Наприклад, [патент США №4179337] описує використання ПЕГ або поліпропіленгліколю, зв'язаного з білками для утворення фізіологічно активної неімунотенної водорозчинної поліпептидної композиції. [Nucci et al.] описують кілька білків, що були модифіковані додаванням ПЕГ, включаючи аденозіндезамідазу, L-аспарагіназу, інтерферон альфа 2b (IFN- α 2b), супероксиддисмутазу, стрептокіназу, тканинний активатор плазміногену (тАП), уроріназу, уріказу, гемоглобін, інтерлейкіни, інтерферони, TGF-бета, EGF та інші фактори росту [Nucci et al., 1991, *Adv. Drug Delivery Rev.* 4:133-151]. Ці спроби привели до подовження напівжиття білків та зменшення імуногенності білка.

Зазвичай, ПЕГіляція білків включає активацію ПЕГ функціональною групою, яка реагуватиме із залишками лізину на поверхні білка. Якщо модифікація білка відбувається до кінця, активність білка зазвичай втрачається. Модифікація процедури, яка дозволяє частково ПЕГілювати білок, зазвичай приводить до лише приблизно 50% втрати активності та значно підвищує напівжиття в сироватці так, що загальна ефективна доза білка є нижчою.

В останніх досягненнях у способах ПЕГіляції білка використовують активовані ПЕГ-реагенти, які реагують з тіловими групами білка, що приводить до ковалентного приєднання ПЕГ до цистеїну, залишку, що вставляють замість лізину білка. Shaw et al. [патент США №5166322] описують специфічні варіанти ІЛ-3, який містить цистеїн, вставлений в специфічні сайти природної послідовності амінокислот. Сульфгідрил-реактивні сполуки (наприклад, активованій поліетиленгліколь) потім приєднують до цих цистеїнових залишків реакцією з ІЛ-3 варіантом. Katre et al. [патент США №5206344] описують специфічні ІЛ-2 варіанти, які містять цистеїн, вставлений в специфічний сайт у межах природної послідовності амінокислот. ІЛ-2 варіант потім реагує з активованим поліетиленгліколем для приєднання цієї складової до цистеїну.

Незважаючи на це, існує потреба в покращенні поліпептидів фактора VII, що мав би тривалу про-

коагулянтну або антикоагулянтну активність. Зокрема, існує потреба в поліпептидах фактора VII, які мали би подовжене напівжиття в сироватці без небажаних побічних ефектів, таких як системна активація згортання крові та кровотеч, пов'язаних із загальноприйнятою терапією, і які можуть бути введені за відносно низьких доз для уникнення повторного введення більшої кількості білка.

Цей винахід стосується нових поліпептидів фактора коагуляції VII з такою самою або підвищеною активністю порівняно з фактором VIIa дикого типу та похідних фактора VII, що мають подовжене напівжиття в сироватках.

Були визначені зони в молекулі фактора VIIa, де можливі зміни первинної структури, а також інші модифікації без впливу або зменшення біологічної активності фактора VIIa. До зон у межах структури фактора VIIa, які були визначені як такі, що не беруть участі у зв'язуванні з тканинним фактором або фактором X, належать положення амінокислот з 247-260 та 393-406 послідовності №1. Зокрема амінокислоти в положенні Q250, R396, та P406 послідовності №1 були аналізовані на введення цистеїнових залишків (Cys). Введення залишків Cys супроводжувалось наступною кон'югацією з хімічною групою, наприклад, поліетиленгліколем (ПЕГ), для того, щоб подовжити напівжиття похідного фактора VII в кровообігові. Цистеїн також уводили в С-кінцеву послідовність послідовності №1 (означену як 407C), що супроводжувалось подальшою кон'югацією з ПЕГ. Також це додавання цистеїну в С-кінцеву послідовність послідовності №1 відбувається без зменшення протеолітичної активності поліпептидів фактора VIIa. Ці похідні фактора VII, наприклад, поліпептид фактора VII, кон'югований з молекулою ПЕГ, є терапевтично корисним за ситуацій, де пролонгований ефект поліпептидів фактора VII є бажаним, наприклад, за ситуацій, де повторне введення або введення більшої кількості поліпептиду фактора VII є незручним або проблематичним. Крім того, поліпептиди фактора VIIa цього винаходу з уведеними амінокислотами (наприклад, залишком Cys), здатними до кон'югації з хімічною групою в певних положеннях у молекулі фактора VIIa, які не впливають на протеолітичну активність, можуть бути використані для введення будь-якої функціональної групи кон'югата фактора VII.

У першому аспекті цей винахід стосується поліпептиду фактора VII, що містить послідовність амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота здатна до кон'югації з хімічною групою, і де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У другому аспекті винахід стосується поліпептиду фактора VII, що містить послідовність амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраного з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту. Зрозуміло, що будь-яка амінокислота в положенні, вибраному з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, може бути заміщена на іншу амінокислоту

без істотного зменшення активності поліпептиду фактора VII.

У третьому аспекті винахід стосується поліпептиду фактора VII, що містить послідовність амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті, вибраній з R396, Q250 або P406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту. Зрозуміло, що перша літера R396, Q250 та P406 представляє амінокислоту, що природно присутня в зазначеному положенні послідовності №1.

У подальшому аспекті винахід стосується поліпептиду фактора VII, що містить послідовність амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислоти, здатні до кон'югації з хімічною групою, були вставлені в межах послідовності №1 або її варіанта, у положення, де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини. Зрозуміло, що амінокислота може бути вставлена в межах послідовності №1 без заміщення будь-якої амінокислоти. Вставка амінокислоти може бути в тому самому положенні в межах послідовності №1, де амінокислота зазнає подальшого заміщення. Таким чином, у першому втіленні вставка амінокислоти супроводжується наступним заміщенням амінокислоти або навпаки.

У подальшому аспекті винахід стосується поліпептиду фактора VII, що містить послідовність амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислоти, здатні до кон'югації з хімічною групою, були додані до N- або С-кінцевої послідовності №1 або її варіанта.

Термін "амінокислота", що використовується в цьому винаході, означає одну або кілька амінокислот. Зрозуміло, що амінокислота, яка заміщує амінокислоту або вставлена в, або додана до поліпептиду фактора VII, здатна до кон'югації з будь-якою хімічною групою, що підвищуватиме справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII. До цієї кон'югації з хімічною групою належить, окрім іншого, ковалентне приєднання поліетиленгліколю (ПЕГ), монометоксиполіетиленгліколю, декстрану, полі-(N-вінілпіролідону) поліетиленгліколю, гомополімерів пропіленгліколю, кополімерів поліпропіленоксид/етиленоксиду, поліпропіленгліколю, поліоксидетильованих поліолів (наприклад, гліцеролу) та полівінілового спирту, колоїдних кислот або інших полімерів, оснований на вуглеводах, полімерів амінокислот та похідних біотину.

Краще, якщо хімічна група є біосумісним, нетоксичним, неімунотичним та водорозчинним полімером. Краще, якщо хімічна група є водорозчинною в усіх пропорціях.

Це заміщення амінокислоти, вставка або додавання та кон'югація з хімічною групою відбувається без істотного зменшення прокоагулянтної активності активованої форми похідної фактора VII порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

Термін "поліпептид фактора VII", що використовується в цьому винаході, означає будь-який білок, що містить послідовність амінокислот 1-406 природного фактора VII людини (послідовність №1) або його варіанти. Сюди належить, окрім ін-

шого, фактор VII людини, фактор VIIa людини та його варіанти.

Терміни "фактор VII", або "FVII", що використовуються в цьому винаході, означають продукт, що є неактивованою формою (фактор VII). Термін "фактор VIIa", або "FVIIa", що використовується в цьому винаході, означає продукт, що є активованою формою (фактор VIIa). До них належать білки, що мають послідовності амінокислот 1-406 природного фактора VII людини або фактора VIIa. До них також належать білки з тріхи модифікованою послідовністю амінокислот, наприклад, модифікований N-кінцевий, включаючи N-кінцеві видалення або додавання амінокислот настільки, наскільки такі білки істотно зберігають активність фактора VIIa. До "фактора VII" або "фактора VIIa", у межах означеного вище, також належать природні алельні варіації, що можуть існувати та відбуватися в різних суб'єктах. Також, ступінь та розташування глікозилювання або інших посттрансляційних модифікацій може змінюватись залежно від обраних клітин-хазяїв та природи внутрішньоклітинного середовища.

Терміни "варіант" або "варіанти", як використано в цьому винаході, означає фактор VII людини, що має послідовність послідовності №1, де одна або кілька амінокислот вихідного білка були заміщені на інші амінокислоти та/або, де одна або кілька амінокислот вихідного білка були видалені та/або, де одна або кілька амінокислот були вставлені в білок та/або, де одна або кілька амінокислот були додані до вихідного білка. Такі додавання можуть також мати місце або на N-кінці або на C-кінці вихідного білка або на обох.

Термін "істотно така сама активність або підвищена активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини", як використано в цьому винаході, означає активність більш, ніж 70% активності рекомбінантного фактора VIIa дикого типу людини. У першому втіленні активність є більш, ніж 80% активності рекомбінантного фактора VIIa дикого типу людини. В іншому втіленні активність є більш, ніж 90% активності рекомбінантного фактора VIIa дикого типу людини. У подальшому втіленні активність є більш, ніж 100% активності рекомбінантного фактора VIIa дикого типу людини. У подальшому втіленні активність є більш, ніж 120% активності рекомбінантного фактора VIIa дикого типу людини. У подальшому втіленні активність є більш, ніж 200% активності рекомбінантного фактора VIIa дикого типу людини. У подальшому втіленні активність є більш, ніж 400% активності рекомбінантного фактора VIIa дикого типу людини.

Термін "похідна фактора VII", що використовується в цьому винаході, означає поліпептид фактора VII, що має послідовність послідовності №1 або її варіанта, у котрій одна або кілька амінокислот вихідного пептиду були хімічно модифіковані, наприклад, алкілюванням, ПЕГілюванням, ацилюванням, естерифікацією або амідуюванням тощо. До цього належить, окрім іншого, ПЕГільований фактор VIIa людини, цистеїн-ПЕГільований фактор VIIa людини та його варіанти.

Термін "ПЕГільований фактор VIIa людини" означає фактор VIIa, що містить молекулу ПЕГ,

кон'юговану з амінокислотою поліпептиду фактора VIIa людини.

Термін "цистеїн-ПЕГільований фактор VIIa людини" означає фактор VIIa, що містить молекулу ПЕГ, кон'юговану з сульфгідрильною групою цистеїну, введenu у фактор VIIa людини.

Термін "інша амінокислота", що використовується в цьому винаході, означає одну або кілька амінокислот, що відрізняються від тієї амінокислоти, що природно присутня в цій позиції. До таких належать, окрім іншого, амінокислоти, що можуть бути кодовані полінуклеотидом. Краще, якщо інша амінокислота є в природній L-формі та може бути кодована полінуклеотидом. Особливим прикладом є L-цистеїн (Cys).

Термін "активність", що використовується в цьому винаході, означає здатність поліпептиду фактора VII перетворювати його субстрат - фактор X на активний фактор Ха. Активність поліпептиду фактора VII може бути виміряна з допомогою "Протеолізу In Vitro" (див. Приклад 6).

Термін "поліетиленгліколь" або "ПЕГ" означає сполуку поліетиленгліколь або її похідну з або без зв'язуючих агентів, зв'язуючих або активаційних складових (наприклад, з тіолом, трифлатом, трезилатом, азирдином, оксираном або краще, якщо з малеїмідом). Сполуки, такі як малеїмідометокси-ПЕГ є прикладом активованих ПЕГ-сполук винаходу.

У подальшому аспекті винахід стосується похідної фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що має послідовність амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

Термін "хімічна група", що використовується в цьому винаході, означає одну або кілька хімічних груп.

У подальшому аспекті винахід стосується похідної фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраному з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У подальшому аспекті винахід стосується похідної фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті, вибраній з R396, Q250 або P406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню

слоту, де інша амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини; та, за бажанням, фармацевтично прийнятний носій.

У подальшому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить похідну фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була вставлена в межах послідовності №1 або її варіанта, і де амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини; та, за бажанням, фармацевтично прийнятний носій.

У подальшому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить похідну фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислоти були додані до N- або C-кінцевої послідовності №1 або її варіанта, і де амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини; та, за бажанням, фармацевтично прийнятний носій.

У подальшому аспекті винахід стосується інактивованого поліпептиду фактора VII, де поліпептид фактора VII зазнає подальшої модифікації у своєму каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми. У першому втіленні інактивований поліпептид фактора VII зазнає модифікації в своєму каталітичному центрі інгібітором серинової протеази. У подальшому втіленні інактивований поліпептид фактора VII зазнає модифікації у своєму каталітичному центрі пептидгаломентилкетон, вибраним з групи, що складається з: Phe-Phe-Arg хлорметилкетону, Phe-Phe-Arg хлорметилкетону, D-Phe-Phe-Arg хлорметилкетону, D-Phe-Phe-Arg хлорметилкетону, Phe-Pro-Arg хлорметилкетону, D-Phe-Pro-Arg хлорметилкетону, Phe-Pro-Arg хлорметилкетону, D-Phe-Pro-Arg хлорметилкетону, L-Glu-Gly-Arg хлорметилкетону, Dansyl-Phe-Phe-Arg хлорметилкетону, Dansyl-Phe-Phe-Arg хлорметилкетону, Dansyl-D-Phe-Phe-Arg хлорметилкетону, Dansyl-D-Phe-Phe-Arg хлорметилкетону, Dansyl-Phe-Pro-Arg хлорметилкетону, Dansyl-D-Phe-Pro-Arg хлорметилкетону, Dansyl-Phe-Pro-Arg хлорметилкетону, Dansyl-D-Phe-Pro-Arg хлорметилкетону, Dansyl-L-Glu-Gly-Arg хлорметилкетону та Dansyl-D-Glu-Gly-Arg хлорметилкетону.

Термін "інактивований поліпептид фактора VII", що використовується в цьому винаході, озна-

чає поліпептид фактора VII, що не здатен активувати фактор X або IX плазми.

У подальшому аспекті винахід стосується інактивованої похідної фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон.

У подальшому аспекті винахід стосується інактивованої похідної фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота здатна до кон'югації з хімічною групою, і де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон.

У подальшому аспекті винахід стосується інактивованої похідної фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті у положенні, вибраного з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон.

У подальшому аспекті винахід стосується інактивованої похідної фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті, вибраної з R396, Q250 або P406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність фактора VII поліпептид активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон.

У подальшому аспекті винахід стосується інактивованої похідної фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була вставлена в межах послідовності №1 або її варіанта в положенні, де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з реко-

таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон; та, за бажанням, фармацевтично прийнятний носій.

У подальшому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить інактивовану похідну фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраного з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон; та, за бажанням, фармацевтично прийнятний носій.

У подальшому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить інактивовану похідну фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті, вибраної з R396, Q250 або P406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон; та, за бажанням, фармацевтично прийнятний носій.

У подальшому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить інактивовану похідну фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була вставлена в межах послідовності №1 або її варіанта в положенні, де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон; та, за бажанням, фармацевтично прийнятний носій.

У подальшому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить інактивовану похідну фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амі-

нокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була додана до N- або C-кінцевої послідовності №1 або її варіанта, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон; та, за бажанням, фармацевтично прийнятний носій.

У подальшому аспекті винахід стосується поліпептидного конструкту, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота здатна до кон'югації з хімічною групою, і де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У подальшому аспекті винахід стосується поліпептидного конструкту, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраного з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту.

У подальшому аспекті винахід стосується поліпептидного конструкту, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті, вибраної з R396, Q250 або P406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту.

У подальшому аспекті винахід стосується поліпептидного конструкту, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була вставлена в межах послідовності №1 або її варіанта в положенні, де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У подальшому аспекті винахід стосується поліпептидного конструкту, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була додана до N- або C-кінцевої послідовності №1 або її варіанта.

У першому втіленні поліпептидний конструкт є вектором.

Термін "поліпептид" означає одно- або дволанцюговий полімер дезоксирибонуклеотидних або рибонуклеотидних основ, що читаються з 5' до 3' кінця. До поліпептидів належать РНК та ДНК, що можуть бути виділені з природних джерел, синтезовані *in vitro* або одержані з комбінації природних та синтетичних молекул. Довжина поліпептидної молекули наведена в цьому винаході в термінах нуклеотидів (скорочено "нт") або пар основ (скорочено "п.о."). Термін "нуклеотиди" використовується для одно- та дволанцюгових молекул, де дозволяє контекст. Коли термін

застосовується до дволанцюгової молекули, він використовується для означення загальної довжини та відповідає терміну "пара основ". Фахівцю в галузі буде зрозуміло, що два ланцюги дволанцюгового полінуклеотиду можуть відрізнятися трохи в довжині, і що їх кінці можуть бути зміщені внаслідок ферментативного розщеплення; таким чином усі нуклеотиди в межах дволанцюгової молекули полінуклеотиду можуть бути непаровані. Такі непаровані кінці загалом не перебільшуватимуть 20нт в довжині.

Термін "вектор", як використано в цьому винаході, означає будь-яку нуклеїнову кислоту, здатну до ампліфікації в клітині-хазяї. Таким чином, вектор може бути автономним реплікаційним вектором, тобто вектором, який існує як екстрахромосомний об'єкт, реплікація якого незалежна від реплікації хромосоми, наприклад, плазміда. Як альтернатива, вектор може бути вектором, котрий за введення в клітину-хазяя інтегрується в геном клітини-хазяя та реплікується разом з хромосомою(мами), у котру він інтегрувався. Вибір вектора часто залежить від клітини-хазяя, у котру він має бути введений. До векторів належать, окрім іншого, плазмідні вектори, фагові вектори, віруси або космідні вектори. Вектори зазвичай містять початок реплікації та щонайменше один селективний ген, тобто, ген, який кодує продукт, котрий легко визначається або присутність якого є необхідною для росту клітин.

У подальшому аспекті винахід стосується еукаріотичної клітини-хазяя, що містить полінуклеотидний конструкт, що містить послідовність, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота здатна до кон'югації з хімічною групою, і де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У подальшому аспекті винахід стосується еукаріотичної клітини-хазяя, що містить полінуклеотидний конструкт, що містить послідовність, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраного з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту.

У подальшому аспекті винахід стосується еукаріотичної клітини-хазяя, що містить полінуклеотидний конструкт, що містить послідовність, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраного з R396, Q250 або P406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту.

У подальшому аспекті винахід стосується еукаріотичної клітини-хазяя, що містить полінуклеотидний конструкт, що містить послідовність, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була вставлена в межах послідовності №1 або її варіанта в положенні, де поліпеп-

тид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У подальшому аспекті винахід стосується еукаріотичної клітини-хазяя, що містить полінуклеотидний конструкт, що містить послідовність, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була додана до N- або C-кінцевої послідовності №1 або її варіанта.

Термін "еукаріотична клітина-хазяїн", як використано в цьому винаході, означає будь-яку клітину, включаючи гібридні клітини, у котрій чужорідна ДНК може бути експресована. До типових клітин-хазяїв належать, окрім іншого, клітини комах, клітини дріжджів, клітини ссавців, включаючи клітини людини, такі як BHK, CHO, HEK та COS. У втіленні цього винаходу краще, якщо клітини-хазяї, що піддаються культивуванню, це клітини ссавців, ще краще, якщо усталена клітинна лінія ссавців, включаючи, окрім іншого, клітинні лінії CHO (наприклад, ATCC CCL 61), COS-1 (наприклад, ATCC CRL 1650), клітини нирок молодих ховрахів (BHK) та HEK293 (наприклад, ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Viral. 36:59-72, 1977).

Кращою клітинною лінією BHK є клітинна лінія tk⁻ ts13 BHK (Waechter та Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982), у цьому винаході надалі означена як клітини BHK 570. Клітинна лінія BHK 570 знаходиться в American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, під ATCC номером доступу CRL 10314. Клітинна лінія tk⁻ ts13 BHK також знаходиться під ATCC номером доступу CRL 1632.

До інших придатних клітинних ліній належать, окрім іншого, Rat Hep I (репатома щура; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (репатома щура; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), Human lung (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) та клітини DUKX (Urlaub та Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980). Також корисними є 3T3 клітини, клітини Namalwa, мієломи та злиття мієлом з іншими клітинами. У першому втіленні еукаріотичні клітини-хазяї походять з клітин ссавців. У подальшому втіленні еукаріотична клітина-хазяїн вибрана з групи, що складається з клітин CHO, клітин BHK або клітин HEK.

У подальшому аспекті винахід стосується трансгенної тварини, що експресує полінуклеотидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота здатна до кон'югації з хімічною групою, і де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У подальшому аспекті винахід стосується трансгенної тварини, що експресує полінуклеотидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраного

виділення поліпептиду фактора VII з трансгенної рослини.

У подальшому аспекті винахід стосується способу одержання похідної фактора VII, що складається з етапів:

- а) створення поліпептиду фактора VII;
- б) кон'югації поліпептиду фактора VII з хімічною групою;
- в) очищення похідної фактора VII з допомогою катіонобмінної хроматографії або гельфільтрації; і
- г) елюювання похідної фактора VII.

У подальшому аспекті винахід стосується способу одержання інактивованої похідної фактора VII, що складається з етапів:

- а) створення поліпептиду фактора VII;
- б) модифікації поліпептиду фактора VII в її каталітичному центрі інгібітором серинової протеази.
- в) кон'югації інактивованого поліпептиду фактора VII з хімічною групою;
- г) очищення інактивованої похідної фактора VII з допомогою катіонобмінної хроматографії або гельфільтрації; і
- д) елюювання інактивованої похідної фактора VII.

У першому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з культивування в придатному поживному середовищі еукаріотичної клітини-хазяя, що містить полінуклеотидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота здатна до кон'югації з хімічною групою, і де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини за умов, що дозволяють синтез білка з полінуклеотидного конструкту та виділення поліпептиду фактора VII з культурального середовища.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з культивування в придатному поживному середовищі еукаріотичної клітини-хазяя, що містить полінуклеотидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраного з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту за умов, що дозволяють синтез білка з полінуклеотидного конструкту та виділення поліпептиду фактора VII з культурального середовища.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з культивування в придатному поживному середовищі еукаріотичної клітини-хазяя, що містить полінуклеотидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті, вибраної з R396, Q250 або P4C6 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту за умов, що дозволяють синтез білка з полінуклеотидного конструкту

та виділення поліпептиду фактора VII з культурального середовища.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з культивування в придатному поживному середовищі еукаріотичної клітини-хазяя, що містить полінуклеотидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була вставлена в межах послідовності №1 або її варіанта в положенні, де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини за умов, що дозволяють синтез білка з полінуклеотидного конструкту та виділення поліпептиду фактора VII з культурального середовища.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з культивування в придатному поживному середовищі еукаріотичної клітини-хазяя, що містить полінуклеотидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була додана до N- або C-кінцевої послідовності №1 або її варіанта за умов, що дозволяють синтез білка з полінуклеотидного конструкту та виділення поліпептиду фактора VII з культурального середовища.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з виділення поліпептиду фактора VII з молока, утвореного трансгенною твариною, що експресує полінуклеотидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота здатна до кон'югації з хімічною групою, і де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з виділення поліпептиду фактора VII з молока, утвореного трансгенною твариною, що експресує полінуклеотидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраного з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з виділення поліпептиду фактора VII з молока, утвореного трансгенною твариною, що експресує полінуклеотидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті, вибраної з R396, Q250 або P406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з виділення поліпептиду фактора VII з молока, утвореного трансгенною твариною, що експресує поліпептидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була вставлена в межах послідовності №1 або її варіанта в положенні, де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з виділення поліпептиду фактора VII з молока, утвореного трансгенною твариною, що експресує поліпептидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була додана до N- або C-кінцевої послідовності №1 або її варіанта.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з культивування клітини трансгенної рослини, що експресує поліпептидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота здатна до кон'югації з хімічною групою, і де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини, та виділення поліпептиду фактора VII з трансгенної рослини.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з культивування клітини трансгенної рослини, що експресує поліпептидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраного з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, та виділення поліпептиду фактора VII з трансгенної рослини.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з культивування клітини трансгенної рослини, що експресує поліпептидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті, вибраної з R396, Q250 або P406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, та виділення поліпептиду фактора VII з трансгенної рослини.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з культивування клітини трансгенної рослини, що експресує поліпептидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була вставлена в межах

послідовності №1 або її варіанта в положенні, де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини, та виділення поліпептиду фактора VII з трансгенної рослини.

У подальшому втіленні винаходу спосіб одержання поліпептиду фактора VII складається з культивування клітини трансгенної рослини, що експресує поліпептидний конструкт, що кодує поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була додана до N- або C-кінцевої послідовності №1 або її варіанта, та виділення поліпептиду фактора VII з трансгенної рослини.

У подальшому аспекті винахід стосується використання похідної фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини для одержання ліків для лікування кровотеч або для підсилення нормальної гемостатичної системи.

Термін "лікування", як використано в цьому винаході, означає введення ефективної кількості терапевтично активної сполуки винаходу з метою запобігання будь-яких симптомів або захворювання, що тільки починаються, з метою лікування або полегшення таких симптомів, або захворювання, що вже розвинулись. Термін "лікування" таким чином означає профілактичне лікування.

Термін "підсилення нормальної гемостатичної системи" означає підсилення здатності утворювати тромбін.

Як використовується в цьому винаході, термін "хвороби згортання крові" означає будь-який дефект, успадкований, набутий або викликаний, що є клітинного або молекулярного походження, що виявляється в кровотечах. До прикладів належать: дефіцит фактора згортання (наприклад, гемофілія A і B або дефіцит факторів коагуляції XI або VII), інгібітори фактора згортання, порушене функціонування тромбоцитів, тромбоцитопенія або псевдогемофілія.

Термін "кровотеча" означає неконтрольовану й надлишкову кровотечу, яка є головною проблемою у зв'язку з операцією та іншими формами ушкодження тканини. Неконтрольована й надлишкова кровотеча може відбуватися у пацієнтів, що мають нормальну систему коагуляції та пацієнтів, що мають хвороби коагуляції або згортання крові. Дефіцит фактора згортання (гемофілія A і B, дефіцит факторів коагуляції XI або VII) або інгібітори фактора згортання можуть бути причиною хвороб згортання крові. Надлишкові кровотечі також відбуваються у пацієнтів з нормальним функціонуючим каскадом згортання крові (відсутній дефіцит фактора згортання або інгібітори будь-яких факторів коагуляції) і можуть бути викликані порушенням

функціонуванням тромбоцитів, тромбоцитопенією або псевдогемофілією. За таких випадків, кровотечі можуть бути такими самими, як і кровотечі, викликані гемофілією, оскільки в гемостатичній системі, як і в гемофілії, не вистачає або існує надлишок необхідних "сполук" згортання (таких як тромбоцити або білковий фактор Фон Віллебранда), що викликає більшість кровотеч. У пацієнтів, хто зазнав значного ушкодження тканини, пов'язаного з операцією або великою травмою, нормальний гемостатичний механізм може бути пригнічений потребою негайного гомеостазу й може початися кровотеча, незважаючи на нормальний гемостатичний механізм. Досягнення задовільного гомеостазу є також проблемою, коли кровотечі відбуваються в органах, таких як мозок, внутрішнє вухо та очі з обмеженою можливістю хірургічного гемостазу. Така сама проблема може виникнути в процесі відібрання біопсій з різних органів (печінка, легені, тканина пухлин, шлунково-кишковий тракт), а також за лапароскопічної операції. Спільним для всіх цих ситуацій є труднощі створення гомеостазу хірургічними способами (шви, затискувачі тощо), що також має місце, коли кровотечі є дифузними (геморагічний гастрит та надмірні маточні кровотечі). Гострі та надмірні кровотечі можуть також відбуватися у пацієнтів за антикоагулянтної терапії, в яких порушений гомеостаз був викликаний застосованою терапією. Такі пацієнти можуть потребувати хірургічного втручання у випадку, коли антикоагулянтному ефектові потрібно швидко протидіяти. Радикальну ретролобкову простатоектомію зазвичай виконують для пацієнтів з місцевим раком простати. Операція часто ускладнюється значними та іноді великими втратами крові. Значні втрати крові під час простатоектомії головним чином стосуються ускладненої анатомічної ситуації з різноманітними щільно судинізованими сайтами, до яких немає легкого доступу для хірургічного гомеостазу, і який може призводити до дифузної кровотечі з великою площею. До інших ситуацій, що можуть викликати проблеми у випадку незадовільного гомеостазу, належать такі, коли пацієнтам з нормальним гемостатичним механізмом призначають антикоагулянтну терапію для запобігання тромбоемболії. До таких терапій може належати введення гепарину, інших форм протеолітиків, варфарину або інших форм антагоністів вітаміну К, а також аспірину та інших інгібіторів агрегації тромбоцитів.

У подальшому аспекті винахід стосується використання похідної фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраного з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини для одержання ліків для лікування кровотеч або для підсилення нормальної гемостатичної системи.

У подальшому аспекті винахід стосується використання похідної фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті, вибраної з R396, Q250 або P406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини для одержання ліків для лікування кровотеч або для підсилення нормальної гемостатичної системи.

У подальшому аспекті винахід стосується використання похідної фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була вставлена в межах послідовності №1 або її варіанта, і де амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини для одержання ліків для лікування кровотеч або для підсилення нормальної гемостатичної системи.

У подальшому аспекті винахід стосується використання похідної фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислоти були додані до N- або C-кінцевої послідовності №1 або її варіанта, і де амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини для одержання ліків для лікування кровотеч або для підсилення нормальної гемостатичної системи.

У першому втіленні винаходу кровотечі пов'язані з гемофілією A або B. В іншому втіленні кровотечі пов'язані з гемофілією з набутими інгібіторами. В іншому втіленні кровотечі пов'язані з тромбоцитопенією. В іншому втіленні кровотечі пов'язані з псевдогемофілією. В іншому втіленні кровотечі пов'язані з сильними ушкодженнями тканин. В іншому втіленні кровотечі пов'язані з сильними травмами. В іншому втіленні кровотечі пов'язані з операцією. В іншому втіленні кровотечі пов'язані з лапароскопічною операцією. В іншому втіленні кровотечі пов'язані з геморагічним гастритом. В іншому втіленні кровотечі є надмірними маточними кровотечами. В іншому втіленні кровотечі відбуваються в органах з обмеженою можливістю для механічного гомеостазу. В іншому втіленні кровотечі відбуваються в мозку, внутрішньому вухі або очах. В іншому втіленні кровотечі пов'язані з процесом відібрання біопсій.

для підсилення нормальної гемостатичної системи.

У подальшому аспекті винахід стосується використання похідної фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислоти були додані до N- або С-кінцевої послідовності №1 або її варіанта, і де амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини для одержання ліків для лікування кровотеч або для підсилення нормальної гемостатичної системи.

У подальшому аспекті винахід стосується способу лікування кровотеч, хвороб згортання крові пацієнта або для підсилення нормальної гемостатичної системи, способ, що складається з уведення суб'єктові за потреби терапевтично або профілактично ефективної кількості похідної фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У подальшому аспекті винахід стосується способу лікування кровотеч, хвороб згортання крові пацієнта або для підсилення нормальної гемостатичної системи, способ, що складається з уведення суб'єктові за потреби терапевтично або профілактично ефективної кількості похідної фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраного з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У подальшому аспекті винахід стосується способу лікування кровотеч, хвороб згортання крові пацієнта або для підсилення нормальної гемостатичної системи, спосіб, що складається з введення суб'єктові за потреби терапевтично або профілактично ефективної кількості похідної фактора VII, що є поліпептидом фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті, вибраної з R396, Q250 або P406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота кон'югована з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон, і де похідна фактора VII

приблизно 100000 дальтон для одержання ліків для інгібування утворення тромбу в пацієнта.

У подальшому аспекті винахід стосується способу інгібування утворення тромбу в пацієнта, що складається із застосування місцево на частину судини, сприйнятливої до утворення тромбу в пацієнта, терапевтично ефективної дози композиції, що містить інактивовану похідну фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон.

У подальшому аспекті винахід стосується способу інгібування утворення тромбу в пацієнта, що складається із застосування місцево на частину судини, сприйнятливої до утворення тромбу в пацієнта, терапевтично ефективної дози композиції, що містить інактивовану похідну фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота була заміщена на іншу амінокислоту, де інша амінокислота здатна до кон'югації з хімічною групою, і де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон.

У подальшому аспекті винахід стосується способу інгібування утворення тромбу в пацієнта, що складається із застосування місцево на частину судини, сприйнятливої до утворення тромбу в пацієнта, терапевтично ефективної дози композиції, що містить інактивовану похідну фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відповідає амінокислоті в положенні, вибраного з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон.

У подальшому аспекті винахід стосується способу інгібування утворення тромбу в пацієнта, що складається із застосування місцево на частину судини, сприйнятливої до утворення тромбу в пацієнта, терапевтично ефективної дози композиції, що містить інактивовану похідну фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, що відпові-

дає амінокислоті, вибраної з R396, Q250 або P406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон.

У подальшому аспекті винахід стосується способу інгібування утворення тромбу в пацієнта, що складається із застосування місцево на частину судини, сприйнятливої до утворення тромбу в пацієнта, терапевтично ефективної дози композиції, що містить інактивовану похідну фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була вставлена в межах послідовності №1 або її варіанта в положенні, де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон.

У подальшому аспекті винахід стосується способу інгібування утворення тромбу в пацієнта, що складається із застосування місцево на частину судини, сприйнятливої до утворення тромбу в пацієнта, терапевтично ефективної дози композиції, що містить інактивовану похідну фактора VII, де інактивований поліпептид фактора VII, що складається з послідовності амінокислот послідовності №1 або її варіанта, де амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була додана до N- або C-кінцевої послідовності №1 або її варіанта, і що містить модифікацію в її каталітичному центрі, де модифікація інгібує здатність поліпептиду фактора VII активувати фактор X або IX плазми, надалі кон'югований з хімічною групою, що збільшує справжню молекулярну масу інактивованого поліпептиду фактора VII з приблизно 300 дальтон до приблизно 100000 дальтон.

У першому втіленні винаходу хімічна група є обов'язково нейтральною.

Термін "нейтральний", що використовується в цьому винаході, стосується хімічної групи, що є біосумісною, що означає, що вона є нетоксичною, неімунотоксичною та водорозчинною. До хімічних груп, що є обов'язково нейтральними, належать, окрім іншого, поліетиленгліколь (ПЕГ), монометоксиполіетиленгліколь, декстран, полі-(N-вінілпіролідон) поліетиленгліколь, гомополімери пропіленгліколю, кополімери поліпропіленоксиду/етиленоксиду, поліпропіленгліколь, поліоксидетиловані поліолі (наприклад, гліцерол) та полівініловий спирт, коломінова кислота або інші полімери, основані на вуглеводах, полімери амінокислот та похідні біотину.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група є водорозчинною.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група має молекулярну масу від приблизно 1000 дальтон до приблизно 80000 дальтон.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група має молекулярну масу від приблизно 5000 дальтон до приблизно 60000 дальтон.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група має молекулярну масу від приблизно 10000 дальтон до приблизно 40000 дальтон.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група має молекулярну масу від приблизно 500 дальтон до приблизно 20000 дальтон.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група має молекулярну масу від приблизно 500 дальтон до приблизно 5000 дальтон.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група має молекулярну масу від приблизно 750 дальтон до приблизно 5000 дальтон.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це поліетиленгліколь.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група вибрана з 1-6 молекул поліетиленгліколю.

У кращому втіленні винаходу хімічна група - це одна молекула поліетиленгліколю.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це монометоксиполіетиленгліколь.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це декстран.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це полі-(N-вінілпіролідон) поліетиленгліколь.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це гомополімери пропіленгліколю.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це поліпропіленоксид.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це поліпропіленгліколь.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це поліоксietильований поліол.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це полівініловий спирт.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це коломінова кислота.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це полімер, оснований на вуглеводі.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це полімер амінокислоти.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група - це похідна біотину.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група кон'югована з вільною сульфгідрильною групою, присутньою в амінокислоті, заміщеній на амінокислоту в поліпептиді, вставлений в або доданий до поліпептиду.

У подальшому втіленні винаходу хімічна група кон'югована з цистеїном.

У першому втіленні винаходу, заміщена, вставлена або додана амінокислота здатна до кон'югації з хімічною групою.

У подальшому втіленні винаходу амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, - це амінокислота з вільною сульфгідрильною групою.

У подальшому втіленні винаходу амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, - це цистеїн.

У подальшому втіленні винаходу заміщена, вставлена або додана амінокислота - це сульфгідрилвмісна амінокислота, така як цистеїн.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота була вставлена в положення, вибране з 247-260, 393-405 або 406 послідовності №1.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII, амінокислота, що відповідає R396 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII, амінокислота, що відповідає Q250 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII, амінокислота, що відповідає P406 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII додаткова амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була вставлена в межах послідовності №1 або її варіанта в положенні, де поліпептид фактора VII має майже таку саму активність або підвищену активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII наступна амінокислота, здатна до кон'югації з хімічною групою, була додана до N- або C-кінцевої послідовності №1 або її варіанта.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислоти були додані до C-кінцевої послідовності №1.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислоти були додані до N-кінцевої послідовності №1.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII був доданий цистеїн.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII був вставлений цистеїн.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, вибрана з групи, що складається з K157, V158, E296, M298, L305, D334, S336, K337 та F374 послідовності №1, була заміщена на іншу амінокислоту, яка підвищує активність порівняно з рекомбінантним фактором VIIa дикого типу людини.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає K157 послідовності №1, була заміщена на амінокислоту, незалежно вибрану з G, V, S, T, N, Q, D та E.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає V158 послідовності №1, була заміщена на амінокислоту, незалежно вибрану з S, T, N, Q, D та E.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає V158 послідовності №1, була заміщена на амінокислоту, незалежно вибрану з T та D.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає E296 послідовності №1, була заміщена на амінокислоту, незалежно вибрану з R, K та V.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає E296 послідовності №1, була заміщена на V.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає M298 послідовно-

сті №1, була заміщена на амінокислоту, незалежно вибрану з R, K, Q та N.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає M298 послідовності №1, була заміщена на Q.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає L305 послідовності №1, була заміщена на амінокислоту, незалежно вибрану з A, V, L, I, M, F, W, P, G, S, T, C, Y, N, E, K, R, H, D та Q.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає L305 послідовності №1, була заміщена на V.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає D334 послідовності №1, була заміщена на E.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає S336 послідовності №1, була заміщена на G.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає K337 послідовності №1, була заміщена на амінокислоту, незалежно вибрану з A, G, V, S, T, N, Q, D та E.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає K337 послідовності №1, була заміщена на A.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає F374 послідовності №1, була заміщена на амінокислоту, незалежно вибрану з A, V, L, I, M, F, W, P, G, S, T, C, Y, N, E, K, R, H, D та Q.

У подальшому втіленні поліпептиду фактора VII амінокислота, що відповідає F374 послідовності №1, була заміщена на P.

У подальшому втіленні винаходу поліпептид фактора VII - це фактор VII людини.

У подальшому втіленні винаходу поліпептид фактора VII - це фактор VIIa людини.

У цьому описі амінокислоти наведено з використанням аббревіатур, які наведені в таблиці, ухваленій IUPAC-IUB Комісією з біохімічної номенклатури (CBN). Амінокислоти та подібні сполуки, що мають ізомери, представлені на ім'я або наступною аббревіатурою, знаходяться в природній L-формі, якщо тільки не вказано іншим чином. Крім того, ліві та праві кінці послідовності амінокислот пептиду є, відповідно, N- та C-кінцями, якщо тільки не вказано інакше.

Таблиця

Абревіатури амінокислот

Амінокислота	Трилітерний код	Однолітерний код
Гліцин	Gly	G
Пролін	Pro	P
Аланін	Ala	A
Валін	Val	V
Лейцин	Leu	L
Ізолейцин	Ile	I
Метіонін	Met	M
Цистеїн	Cys	C
Фенілаланін	Phe	F
Тирозин	Tyr	Y
Триптофан	Trp	W

Гістидин	His	H
Лізин	Lys	K
Аргінін	Arg	R
Глутамін	Gln	Q
Аспарагін	Asn	N
Глутамінова кислота	Glu	E
Аспарагінова кислота	Asp	D
Серин	Ser	S
Треонін	Thr	T

Винахід також стосується способу одержання поліпептидів фактора VII людини, як було згадано вище. Краще, якщо поліпептиди фактора VII людини одержують способами рекомбінантної ДНК. У такому разі послідовності ДНК, що кодують фактор VII людини, можуть бути виділені одержанням геномної або кДНК бібліотеки та скринінгом послідовності ДНК, що кодує усю або частину білка, гібридизацією, використовуючи синтетичні олігонуклеотидні зонди згідно зі стандартними способами [див. Sambrook et al., Molecular Cloning: Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989]. У цьому винаході послідовність ДНК, що кодує білок, краще, якщо людського походження, тобто походить з геномної ДНК людини або бібліотеки кДНК.

Послідовності ДНК, що кодують поліпептиди фактора VII людини, можуть також бути одержані синтетично з допомогою стандартних способів, наприклад, у фосфоамідитний спосіб, описаний [Beaucage та Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859-1869], або у спосіб, описаний [Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801-805]. Згідно з фосфоамідитним способом синтезуються олігонуклеотиди, наприклад, в автоматичному ДНК синтезаторі, очищені, гібридизовані, лігвані та клоновані в придатні вектори.

Послідовності ДНК може також бути одержані полімеразною ланцюговою реакцією, використовуючи специфічні праймери, наприклад, як описано в [патенті США 4683202, Saiki et al., Science 239 (1988), 487-491, або Sambrook et al., згаданий вище].

Послідовності ДНК, що кодують поліпептиди фактора VII людини, зазвичай вставлені в рекомбінантний вектор, який може бути будь-яким вектором, який може загальноприйнято бути підданий процедурам рекомбінантної ДНК, де вибір вектора часто залежатиме від клітини-хазяя, в котру він був уведений. Таким чином, вектор може бути автономним реплікаційним вектором, тобто вектором, який існує як екстрахромосомне утворення, реплікація котрого незалежна від реплікації хромосоми, наприклад, плазміда. Як альтернатива, вектор може бути таким, щоб, коли був уведений в клітину-хазяя, інтегрувався в геном клітини-хазяя та реплікувався разом з хромосомою(мами), у котру він інтегрувався.

Краще, якщо вектором є експресійний вектор, у якому послідовність ДНК, що кодує поліпептиди фактора VII людини, функціонально з'єднана з додатковими сегментами, потрібними для транскрипції ДНК. Загалом, експресійний вектор одер-

жують з плазмідної або вірусної ДНК, або він може містити елементи обох. Термін, "функціонально з'єднаний" означає, що сегменти розташовані так, що вони функціонують разом з однією метою, наприклад, транскрипція починається в промоторі та продовжується через ДНК послідовність, що кодує поліпептид.

Промотором може бути будь-яка послідовність ДНК, яка виявляє транскрипційну активність у вибраній клітині-хазяїні та може походити з генів, що кодують свої білки або чужорідні білки стосовно клітини-хазяя.

До прикладів придатних промоторів для спрямування транскрипції ДНК, що кодує поліпептид фактора VII людини в клітинах ссавців, належить SV40 промотор [Subramani et al., Mol. Cell Biol. 1 (1981), 854-864], MT-1 (ген металотіонеїну) промотор [Palmiter et al., Science 222 (1983), 809-814], CMV промотор [Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985] або головний пізній промотор аденовірусу 2 [Kaufman та Sharp, Mol. Cell. Biol. 2:1304-1319, 1982].

До прикладів придатних промоторів для використання в клітинах комах належать полігедринові промотори [патент США 4745051; Vasuvedan et al., FEBS Lett. 311, (1992)7-11], P10 промотор [J.M. Vlak et al., J. Gen. Virology 69, 1988, pp. 765-776], промотор основного білка вірусу поліпідрозу *Autographa californica* [Європейський патент 397485], промотор раннього гена 1 бакуловірусу [патент США 5155037; патент США 5162222] або промотор раннього гена, що експресується із затримкою, бакуловірусу 39K [патент США 5155037; патент США 5162222].

До прикладів придатних промоторів для використання в клітинах дріжджів-хазяїв належать промотори з генів гліколізу дріжджів [Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255 (1980), 12073-12080; Alber та Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419-434] або гени алкогольдегідрогенази [Young et al., in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender et al., eds.), Plenum Press, New York, 1982)], TPI1 [патент США 4599311] або ADH2-4c [Russell et al., Nature 304 (1983), 652-654] промотори.

До прикладів придатних промоторів для використання в ниткоподібних грибах клітин-хазяїв належать, наприклад, ADH3 промотор [McKnight et al., EMBO J. 4 (1985), 2093-2099] або *trpA* промотор. До прикладів інших корисних промоторів належать ті, що походять з гена, що кодує *A. oryzae* ТАКА амілазу, *Rhizomucor miehei* аспартатпротеїназу, *A. niger* нейтральну α -амілазу, *A. niger* кислотостійку α -амілазу, *A. niger* або *A. awamori* глюкоамілазу (*gluA*), *Rhizomucor miehei* ліпазу, *A. oryzae* лужну протеазу, *A. oryzae* триозофосфатізомеразу або *A. nidulans* ацетамідазу. Кращими є промотори ТАКА-амілази та *gluA*. Придатні промотори наведені в, наприклад, [Європейському патенті 238023 та Європейському патенті 383779].

Послідовності ДНК, що кодують поліпептиди фактора VII людини можуть також, за необхідності, бути функціонально з'єднаними з придатними термінаторами, такими як термінатори гормону росту людини [Palmiter et al., Science 222, 1983, pp. 809-814], TPI1 [Alber та Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1,

1982, pp. 419-434] або ADH3 [McKnight et al., EMBO J. 4, 1985, pp. 2093-2099] термінаторами. Вектор може також містити набір сайтів сплайсингу РНК, розташованих нижче від промотору та вище від сайту вставки для самої послідовності фактора VII. Кращі сайти сплайсингу РНК можуть бути одержані з аденовірусу та/або генів імуноглобулінів. Також в експресійних векторах знаходиться сигнал поліаденілювання, розташований нижче від сайту вставки. Зокрема до кращих сигналів поліаденілювання належать ранні або пізні сигнали поліаденілювання з SV40 [Kaufman та Sharp, там само], сигнал поліаденілювання з ділянки E1b аденовірусу 5, термінатори гена гормону росту людини [DeNoto et al. Nuc. Acid Res. 9:3719-3730, 1981] або сигнал поліаденілювання з гена фактора VII людини або гена фактора VII бика. До експресійних векторів може також належати некодуюча лідерна послідовність вірусів, така як потрійна лідерна послідовність аденовірусу 2, розташована між промотором і сайтами сплайсингу РНК; та енхансерні послідовності, такі як SV40 енхансер.

Рекомбінантний вектор може, крім того, містити послідовність ДНК, що дозволяє вектору реплікуватися в клітині-хазяїні. Прикладом такої послідовності (коли клітина-хазяїн є клітиною ссавців) є початок реплікації SV40.

Коли клітиною-хазяїном є клітина дріжджів, придатними послідовностями, що дозволяють векторові реплікуватися, є гени реплікації REP 1-3 плазмиди 2 μ дріжджів та початок реплікації.

Вектор може також містити селективний маркер, наприклад, ген, продукт якого доповнює дефект у клітині-хазяї, такий як ген, що кодує дегідрофлатредуктазу (DHFR), ген TPI *Schizosaccharomyces pombe* [описаний P.R. Russell, Gene 40, 1985, pp. 125-130] або ген, що надає резистентності до ліків, наприклад, ампіцилін, канаміцин, тетрациклін, хлорамфенікол, неомицин, піроміцин або метотрексат. Для ниткоподібних грибів, селективними маркерами є *amdS*, *pyrG*, *argB*, *niaD* або *sC*.

Для того, щоб спрямувати поліпептиди фактора VII людини цього винаходу на секреторний шлях клітини-хазяя, секреторна сигнальна послідовність (також відома як лідерна послідовність, препослідовність або препослідовність) може бути введена в рекомбінантний вектор. Секреторна сигнальна послідовність приєднується до послідовностей ДНК, що кодує поліпептиди фактора VII людини у вірній рамці зчитування. Секреторні сигнальні послідовності зазвичай розташовані 5' до послідовності ДНК, що кодує пептид. Секреторна сигнальна послідовність може бути від цього ж білка або може бути з гена, що кодує інший секретований білок.

Для секреції з клітин дріжджів секреторна сигнальна послідовність може кодувати будь-який сигнальний пептид, який забезпечує ефективне спрямування експресованих поліпептидів фактора VII людини на секреторний шлях клітини. Сигнальний пептид може бути природним сигнальним пептидом або його функціональною частиною, або це може бути синтетичний пептид. Придатними сигнальними пептидами є α -фактор сигнальний пептид [див. патент США 4870008], сигнальний пептид

амілази слинних залоз миші [див. O. Hagenbuchle et al., *Nature* 289, 1981, pp. 643-646], модифікований сигнальний пептид карбоксипептидази [див. L.A. Vails et al., *Cell* 48, 1987, pp. 887-897], сигнальний пептид BAR1 дріжджів [див. WO 87/02670] або сигнальний пептид аспарагінової протеази 3 (YAP3) дріжджів [див. M. Egel-Mitani et al., *Ves* 6, 1990, pp. 127-137].

Для ефективної секреції в дріжджах послідовність, що кодує лідерний пептид, може також бути вставлена нижче від сигнальної послідовності та вище від послідовності ДНК, що кодує поліпептиди фактора VII людини. Функціонування лідерного пептиду складається в тому, що експресований пептид спрямовується з ендоплазматичного ретикулу до апарату Гольджі та, крім того, до секреторних везикул для секреції в культуральне середовище (тобто експорту поліпептидів фактора VII людини через клітинну стінку або щонайменше через клітинну мембрану у периплазматичний простір дріжджової клітини). Лідерний пептид може бути лідерною послідовністю альфа-фактора дріжджів [використання якого описано, наприклад, в патенті США 4546082, патенті США 4870008, Європейському патенті 16201, Європейському патенті 123294, Європейському патенті 123544 та Європейському патенті 163529]. Як альтернатива, лідерним пептидом може бути синтетичний лідерний пептид, який є лідерним пептидом, котрого не існує в природі. Синтетичні лідерні пептиди можуть, наприклад, бути створені, як описано в [WO 89/02463 або WO 92/11378].

Для використання в ниткоподібних грибах сигнальний пептид може загальноприйнято бути одержаним з гена, що кодує амілазу або глюкоамілазу *Aspergillus* sp., гена, що кодує ліпазу або протеазу *Rhizomucor miehei* або ліпазу *Humicola lanuginosa*. Краще, якщо сигнальний пептид походить з гена, що кодує ТАКА амілазу *A. oryzae*, нейтральну α -амілазу *A. niger*, кислотостійку амілазу *A. niger* або глюкоамілазу *A. niger*. Придатні сигнальні пептиди описані в, наприклад, [Європейському патенті 238023 та Європейському патенті 215594].

Для використання в клітинах комах, сигнальний пептид може загальноприйнято бути одержаним з гена комах [див. WO 90/05783], такого як попередник сигнального пептиду адипокінетичного гормону лускокрилого *Manduca sexta* [див. патент США 5023328].

Процедури, що використовуються для з'єднання послідовностей ДНК, що кодують поліпептиди фактора VII людини, з промотором та за бажанням термінаторами та/або секреторною сигнальною послідовністю, відповідно, і для вставлення їх у придатні вектори, що містять інформацію, необхідну для реплікації, є добре відомими фахівцям у галузі [див., наприклад, Sambrook et al., *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1989].

Способи трансфекції клітин ссавців та експресії послідовностей ДНК, введених у клітини, описані в, наприклад, [Kaufman та Sharp, *J. Mol. Biol.* 159 (1982), 601-621; Southern та 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 та Pearson, *Somatic Cell*

Genetics 7 (1981), 603, Graham та van der Eb, *Virology* 52 (1973), 456; та Neumann et al., *EMBO J.* 1(1982), 841-845].

Селективні маркери можуть бути введені в клітину в окремій плазміді одночасно з потрібним геном або вони можуть бути введені в одну плазмиду. Якщо в одній плазміді, селективний маркер та потрібний ген можуть бути під контролем різних промоторів або одного промотору, останнє розташування веде до утворення дицистронної матриці. Конструкти цього типу відомі в галузі [наприклад, Levinson та Simonsen, патент США №4713339]. Додавання додаткової ДНК може також бути перевагою, відомою як "ДНК-носій," до суміші, що вводиться в клітини.

Після того, як клітини прийняли ДНК, вони вирощуються в прийнятному середовищі для зростання, типово 1-2 дні, для початку експресії потрібного гена. Як використано в цьому винаході, термін "прийнятне середовище для зростання" означає середовище, що містить поживні речовини та інші компоненти, потрібні для росту клітин та експресії потрібних поліпептидів фактора VII людини. Середовища загалом містять джерело вуглецю, джерело азоту, незамінні амінокислоти, незамінні цукри, вітаміни, солі, фосфоліпіди, білки та фактори росту. Для утворення γ -карбоксильованих білків краще, якщо середовище містить вітамін K за концентрації від приблизно 0,1мкг/мл до приблизно 5мкг/мл. Селекцію з допомогою ліків потім застосовують для селекції на ріст клітин, що постійно експресують селективний маркер. Для клітин, що були трансфіковані селективним маркером, здатним до ампліфікації, концентрація ліків може бути підвищена для селекції на збільшену кількість копій клонованих послідовностей, таким чином підвищуючи рівень експресії. Клоні стабільно трансфікованих клітин потім піддають скринінгові на експресію потрібного поліпептиду фактора VII людини.

Клітина-хазяїн, в котру вводять послідовності ДНК, що кодують поліпептиди фактора VII людини, може бути будь-якою клітиною, яка здатна до утворення посттрансляційно модифікованих поліпептидів фактора VII людини, і включає дріжджі, гриби та вищі еукаріотичні клітини.

До прикладів клітинних ліній ссавців для використання в цьому винаході належать: COS-1 (ATCC CRL 1650), клітини нирок молодих ховрахів (BHK) та 293 (ATCC CRL 1573; [Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977]). Кращою BHK клітиною лінією є tk⁻ ts13 BHK [Waechter та Baserga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1106-1110, 1982, включений в цей винахід шляхом посилання], означена надалі у цьому винаході як BHK 570 клітини. BHK 570 клітинна лінія була депонована в Американському типовому зібранні культур, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852, під ATCC номером доступу CRL 10314. Клітинна лінія tk⁻ ts13 BHK є також доступною під ATCC номером доступу CRL 1632. Крім того, кілька інших клітинних ліній можуть бути використані в межах цього винаходу, включаючи Rat Hep I (гепатома щура; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (гепатома щура; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), легенів людини (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC

CCL 61) та клітини DUKX [Urlaub та Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980].

До прикладів придатних клітин дріжджів належать клітини *Saccharomyces* spp. або *Schizosaccharomyces* spp., зокрема штам *Saccharomyces cerevisiae* або *Saccharomyces kluyveri*. Способи трансформації клітин дріжджів чужорідною ДНК та одержання чужорідних поліпептидів описані, наприклад, у [патенті США 4599311, патенті США 4931373, патенті США 4870008, 5037743, та патенті США 4845075, усі включені сюди шляхом посилання]. Трансформовані клітини вибираються по фенотипу, що визначається по селективному маркеру, зазвичай резистентністю до ліків або здатністю рости за відсутності певної поживної речовини, наприклад, лейцину. Кращим вектором для використання в дріжджах є вектор POUT1, описаний в [патенті США 4931373]. Послідовностям ДНК, що кодують поліпептиди фактора VII людини, можуть передувати сигнальна послідовність та, за бажанням, лідерна послідовність, наприклад, як описано вище. Крім того, до прикладів придатних клітин дріжджів належать штам *Kluyveromyces*, такі як *K. lactis*, *Hansenula*, наприклад, *H. polymorpha* або *Pichia*, наприклад, *P. pastoris* [див. Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132:1986, pp. 3459-3465; патент США 4882279].

До прикладів інших клітин грибів належать клітини ниткоподібних грибів, наприклад, *Aspergillus* spp., *Neurospora* spp., *Fusarium* spp. або *Trichoderma* spp., зокрема штам *A. oryzae*, *A. nidulans* або *A. niger*. Використання *Aspergillus* spp. для експресії білків описане в, наприклад, [Європейському патенті 272277, Європейському патенті 238023, Європейському патенті 184438]. Трансформація *F. oxysporum* може, наприклад, бути виконана, як описано в [Malardier et al., 1989, Gene 78:147-156]. Трансформація *Trichoderma* spp. може бути виконана, наприклад, як описано в [Європейському патенті 244234].

Коли ниткоподібні гриби використовуються як клітини-хазяї, вони можуть бути трансформовані конструктом ДНК винаходу загальноприйнятою інтеграцією конструкту ДНК в хромосому хазяїна, щоб одержати рекомбінантну клітину-хазяя. Ця інтеграція загалом вважається переважною, оскільки більш імовірно, що послідовність ДНК стабільно підтримується в клітині. Інтеграція конструктів ДНК в хромосому-хазяїна може бути виконана згідно із загальноприйнятими способами, наприклад, гомологічною або гетерологічною рекомбінацією.

Трансформація клітин комах та одержання чужорідних поліпептидів у цьому винаході може бути виконана, як описано в [патенті США 4745051; патенті США 4879236; патенті США 5155037; 5162222; Європейському патенті 397485, включені в цей винахід шляхом посилання]. Клітинна лінія комах, що використовуються як хазяїн, може бути клітинна лінія *Lepidoptera*, така як клітини *Spodoptere frugiperda* або *Trichoplusia ni* [див. патент США 5077214]. Умови культивування можуть бути, як описано в, наприклад, [WO 89/01029 або WO 89/01028, або в будь-яких з вищезгаданих посилань].

Трансформовані або трансфіковані клітини-хазяї, описані вище, потім культивують у придатному поживному середовищі за умов, що дозволяють експресію поліпептиду фактора VII людини, після чого усі або частина пептиду, що утворився, може бути виділена з культури. Середовище, що використовується для культивування клітин, може бути будь-яким загальноприйнятим середовищем, придатним для вирощування клітин-хазяїв, таким як мінімальні або комплексні середовища, що містять прийнятні добавки. Придатні середовища, доступні від комерційних постачальників, можуть бути одержані згідно з опублікованими рецептами (наприклад, у каталогах Американського типового зібрання культур). Поліпептид фактора VII людини, утворений клітинами, може потім бути одержаний з культурального середовища загальноприйнятими процедурами, включаючи виділення клітин-хазяїв з середовища центрифугуванням або фільтруванням, осадженням білково-водних компонентів супернатанту або фільтрату з допомогою солі, наприклад, сульфату амонію, очищення чисельними хроматографічними процедурами, наприклад, іонообмінною хроматографією, гельфільтрацією, хроматографією за спорідненістю тощо, залежно від типу поліпептиду, що потрібно виділяти.

Для одержання рекомбінантних поліпептидів фактора VII людини використовується клонувана послідовність ДНК фактора VII дикого типу. Ця послідовність може бути модифікована так, щоб кодувати бажаний варіант фактора VII. Повні нуклеотидні та послідовності амінокислот фактора VII людини є відомими. Дивіться [патент США №4784950, який включений в цей винахід шляхом посилання], де описано клонування та експресія рекомбінантного фактора VII людини. Послідовність фактора VII бика, описана в [Takeya et al., J. Biol. Chem, 263:14868-14372 (1988), який включений в цей винахід шляхом посилання].

Зміни послідовностей амінокислот можуть бути досягнуті чисельними способами. Модифікація послідовності ДНК може бути здійснена сайт-специфічним мутагенезом. Способи сайт-специфічного мутагенезу є добре відомими в галузі та описані, наприклад, в Zoller та Smith [DNA 3:479-488, 1984]. Таким чином, використовуючи нуклеотидні та амінокислотні послідовності фактора VII, можна впроваджувати будь-які зміни.

Послідовності ДНК для використання в межах цього винаходу типово кодують пре-про пептид на аміно-кінці білкового фактора VII, щоб одержати належний посттрансляційний процесинг (наприклад, γ -карбоксилювання залишків глутамінової кислоти) та секрецію з клітини-хазяя. Пре-про пептид може бути фактором VII або іншим вітамін К-залежним білком плазми, таким як фактор IX, фактор X, протромбін, білок С або білок S. Як буде оцінено фахівцем у галузі, додаткові модифікації можуть бути зроблені в послідовності амінокислот фактора VII, де ці модифікації незначно порушують здатність білка діяти, як фактор коагуляції. Наприклад, фактор VII в каталітичній тріаді може також бути модифікований в активаційному сайті розщеплення для інгібування перетворення зимогену фактора VII на його активовану дволанцюгову

форму, що загалом описано в [патенті США №5288629, включеному в цей винахід шляхом посилання].

У межах цього винаходу трансгенна тваринна технологія може бути використана для одержання поліпептиду фактора VII людини. Краще, якщо одержувати білки в молочних залозах самиці ссавця. Експресія в молочній залозі та наступна секреція потрібного білка в молоко дозволяє подолати багато складнощів, з котрими стикаються за виділення білка з інших джерел. Молоко легко збирати, доступне у великій кількості та добре описано біохімічно. Крім того, головні білки молока присутні в молоці за високих концентрацій (типово з приблизно 1 до 15г/л). З комерційної точки зору абсолютно краще використовувати як хазяї види, що мають великий вихід молока. У той час, як менші тварини, такі як миші та щури, можуть використовуватись (і є кращими, як принциповий доказ) у межах цього винаходу, краще використовувати стадних ссавців, включаючи, окрім іншого, свиней, кіз, овець та крупний рогатий скот. Вівці є, зокрема, кращими завдяки таким факторам, як попередня історія трансгенезу цих видів, вихід молока, вартість та наявність обладнання для збирання молока. Дивіться [WIPO публікацію WO 88/00239] для порівняння факторів, що впливають на вибір виду хазяїна. Загалом бажано вибирати породу тварини-хазяїна, що була виведена для молочного використання, така як вівці East Friesland, або для створення молочного стада виведенням трансгенної лінії пізніше. У будь-якому разі мають використовуватись тварини, відомі гарним здоров'ям.

Щоб одержати експресію в молочній залозі, використовується транскрипція промотору з гена білка молока. Гени білка молока містять ті гени, що кодують казеїни [дивіться патент США №5304489, включений в цей винахід шляхом посилання], β -лактоглобулін, α -лактальбумін та сироватковий кислотний білок. Промотор β -лактоглобуліну (BLG) є кращим. У випадку гена β -лактоглобуліну вівці загалом використовуються проксимальна ділянка щонайменше 406п.о. 5'-граничної послідовності гена, хоча більші ділянки 5'-граничної послідовності до приблизно 5т.п.о. є кращими, такі як приблизно 4,25т.п.о. сегмент ДНК, що вміщує 5'-граничний промотор та некодуючу ділянку гена β -лактоглобуліну. Дивіться [Whitelaw et al., Biochem J. 286: 31-39 (1992)]. Є також придатними подібні фрагменти промотору ДНК з інших видів.

Інші ділянки гена β -лактоглобуліну можуть також бути включені в конструкти, як і геномні ділянки гена, що має бути експресованим. Загалом у галузі прийнято, що конструкти, яким бракує інтронів, наприклад, експресуються погано порівняно з тими, що містять такі послідовності ДНК [дивіться 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., Transgene Res. 1:3-13 (1991); WO 89/01343; та WO 91/02318, кожний з котрих включений в цей винахід шляхом посилання]. У цьому разі, загалом краще, де можливо, використовувати геномні послідовності, що містять усі або кілька природних інтронів гена, що кодує потрібний білок або поліпептид, таким чи-

ном, окрім іншого, є кращим включення щонайменше кількох інтронів з, наприклад, гена β -лактоглобуліну. Однією такою ділянкою є сегмент ДНК, який передбачає сплайсинг інтронів та поліаденілювання РНК з 3'-некодуючої ділянки гена β -лактоглобуліну вівці. Цей сегмент β -лактоглобуліну вівці, коли заміщений на природну 3'-некодуючу послідовність гена, може як підсилювати, так і стабілізувати експресію потрібного білка або поліпептиду. У межах інших втілень ділянка, що оточує початок ATG-послідовності, що кодує поліпептид фактора VII людини, заміщена на відповідні послідовності з молекоспецифічного гена білка. Таке заміщення сприяє тканинспецифічним умовам ініціації для підсилення експресії. Є зручним заміщувати повністю пре-про послідовність поліпептиду фактора VII людини та 5'-некодуючі послідовності на такі, як наприклад, з гена BLG, хоча можуть бути заміщені й менші ділянки.

Для експресії поліпептиду фактора VII людини в трансгенних тваринах сегмент ДНК, що кодує поліпептид фактора VII людини, є функціонально з'єднаним з додатковими сегментами ДНК, потрібними для його експресії для одержання експресійних одиниць. Такі додаткові сегменти містять вищезгаданий промотор, а також послідовності, які передбачають термінацію транскрипції та поліаденілювання мРНК. Експресійні одиниці, крім того, містять сегмент ДНК, що кодує секреторну сигнальну послідовність, функціонально з'єднану з сегментом, що кодує поліпептид фактора VII людини. Секреторна сигнальна послідовність може бути природною секреторною сигнальною послідовністю поліпептиду фактора VII людини або може бути від іншого білка, такого як білок молока. Дивіться, наприклад, [von Heinje, Nuc. Acid Res. 14: 4683-4690 (1986); та Meade et al., патент США №4873316, який включений в цей винахід шляхом посилання].

Створення експресійних одиниць для використання в трансгенних тваринах загальноприйнято виконується вставленням послідовності, що кодує поліпептид фактора VII людини, у плазмідну або фаговий вектор, що містять додаткові сегменти ДНК, хоча експресійна одиниця може бути створена зі з'єднань головним чином будь-яких послідовностей. Зокрема є зручним створення вектора, що містить сегмент ДНК, що кодує білок молока, та заміщувати кодуючу послідовність білка молока на поліпептид фактора VII людини, таким чином створюючи складений ген, що включає експресійні контрольні послідовності гена білка молока. У будь-якому разі клонування експресійних одиниць в плазміді або інші вектори полегшує ампліфікацію поліпептиду фактора VII людини. Ампліфікація загальноприйнято виконується в бактеріальній (наприклад, *E. coli*) клітині-хазяї, таким чином вектори типово містять початок реплікації та селективний маркер, функціональний в бактеріальній клітині-хазяї.

Експресійну одиницю потім уводять у запліднені яйця (включаючи ембріони на ранніх стадіях) обраного виду хазяїна. Уведення чужорідної ДНК може бути досягнуте одним з кількох шляхів, включаючи мікроін'єкцію [наприклад, патент США №4873191], ретровірусну інфекцію [Jaenisch,

Science 240:1468-1474 (1988)] або сайт-спрямовану інтеграцію, використовуючи ембріонні стоволові клітини (ES) [в огляді Bradley et al., Bio/Technology 10: 534-539 (1992)]. Яйця потім імплантують в яйцеводи або матку псевдовагітних самиць та залишають для дозрівання. Нашадки, що несуть уведену ДНК в їх зародкові клітини, можуть передавати ДНК своїм нащадкам нормальним чином, за Менделем, що дозволяє розвиток трансгенних стад.

Загальні процедури одержання трансгенних тварин відомі в галузі. Дивіться, наприклад, [Hogan et al., Manipulating Mouse Embryo: 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: 835-838 (1991); Krimpenfort et al., Bio/Technology 9: 844-847 (1991); Wall et al., J. Cell. Biochem. 49:113-120 (1992); патенти США №4873191 та 4873316; WIPO публікації WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; та GB 87/00458, які включені в цей винахід шляхом посилання]. Способи введення чужорідної послідовності ДНК у ссавців та їх зародкові клітини були розроблені спочатку в миші. Дивіться, наприклад, [Gordon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384 (1980); Gordon та Ruddle, Science 214:1244-1246 (1981); Palmiter та Brinster, Cell 41: 343-345 (1985); та Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442 (1985)]. Ці способи потім пристосували для використання в більших тварин, включаючи стадні види [дивіться, наприклад, WIPO публікації WO 88/00239, WO 90/05188, та WO 92/11757; та Simons et al., Bio/Technology 6: 179-183 (1988)]. У підсумок, у більшості ефективних шляхів, що використовуються сьогодні в створенні трансгенних мишей або стадних тварин, кілька сотень лінійних молекул ДНК потрібно ввести в одне з проядер заплідненого яйця згідно зі встановленими способами. Ін'єкція ДНК у цитоплазму зиготи може також бути використана. Одержання трансгенних рослин може також бути використане. Експресія може бути загальна або спрямована в певний орган, такий як бульба. Дивіться, [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); та Європейський патент 255378].

Фактор VII, одержаний згідно з цим винаходом, може бути очищений хроматографією за спорідненістю на колонці з анти-Фактор VII антитілом. Краще, якщо імуноадсорбційна колонка містить високоспецифічне моноклональне антитіло. Використання кальційзалежного моноклонального антитіла, як описано [Wakabayashi et al., J. Biol. Chem. 261:11097-11108, (1986) та Thim et al. Biochem. 27: 7785-7793, (1988), включені у цей винахід шляхом посилання], є особливо кращим. Додаткове очищення може бути досягнуте засобами загальноприйнятого хімічного очищення, такого як рідинна хроматографія високої роздільної здатності. Інші способи очищення, включаючи обробку цитратом барію, відомі в галузі та можуть бути застосовані для очищення фактора VII, описаного в цьому винаході [дивіться, загалом,

Scopes, R. Protein Purification. Springer-Verlag, N.Y., 1982]. Краще, якщо фактор VII має щонайменше приблизно 90-95% гомогенності, та 98-99% або більше гомогенності ще краще для фармацевтичних використання. Після того, як фактор VII, очищений частково або до гомогенності, що бажано, може потім використовуватись терапевтично.

Перетворення однокланового фактора VII на активний двоклановий фактор VIIa може бути досягнуте, використовуючи фактор XIIa, як описано Hedner and Kisel [1983, J. Clin. Invest. 71:1836-1841], або інші протеази, що мають трипсинподібну специфічність [Kisel та Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73: 29-42, 1983]. Як альтернатива, фактор VII може бути автоактивований пропусканням його через іонообмінну хроматографічну колонку, таку як моно Q.RTM. (Pharmacia Fire Chemicals) або подібну [Bjoern et al., 1986, Research Dislosures 269:564-565]. Молекула фактора VII цього винаходу та їх фармацевтична композиція є зокрема корисною для введення людині для лікування різноманітних станів, включаючи внутрішньосудинну коагуляцію.

У винаході також запропоновано придатні способи селекції кращих поліпептидів фактора VIIa та похідних фактора VIIa згідно з винаходом. Ці способи можуть бути виконані як простий попередній тест *in vitro*.

Таким чином, у Прикладі 5 цього винаходу описано простий тест (названий "Гідроліз *in vitro*") на активність поліпептидів фактора VIIa винаходу. Згідно з тестом поліпептиди фактора VIIa, які складають певний інтерес, це такі поліпептиди, де відношення між активністю варіанта та активністю природного фактора VII людини, показаного в Фіг.1, є приблизно 1,0 або вище, коли здійснено за "Гідроліз *in vitro*", описаний в цьому винаході.

Активність поліпептидів може також бути виміряна, використовуючи фізіологічний субстрат, такий як фактор X ("Протеоліз *in vitro*") (див. Приклад 6), придатний за концентрації 100-1000nM, де утворений фактор Ха визначається після додавання придатного хромогенного субстрату (наприклад, S-2765). Крім того, аналіз на активність може бути виконаний за фізіологічної температури.

Прокоагулянтна здатність поліпептидів фактора VIIa утворювати тромбін може також бути виміряна в тесті, що містить усі відповідні фактори коагуляції та інгібітори за фізіологічних концентрацій (мінус фактор VIII за умов відтворення стану гемофілії), а також активовані тромбоцити [як описано на стор. 543 в Monroe et al. (1997) Brit J. Haematol. 99, 542-547, включений сюди шляхом посилання].

Прокоагулянтні похідні фактора VII згідно з цим винаходом можуть бути використані для лікування хвороб згортання крові, які мають кілька причин, такі як дефіцит фактора згортання (наприклад, гемофілія А та В або дефіцит факторів коагуляції XI або VII) або інгібітори фактора згортання, або вони можуть бути використані для лікування надлишкових кровотеч, що відбуваються у пацієнтів з нормальним функціонуючим каскадом згортання крові (немає дефіциту фактора згортання або інгібіторів будь-якого з факторів коагуляції). Кровотечі можуть бути викликані дефектним фун-

кціюванням тромбоцитів, тромбоцитопенією або псевдогемофілією. Вони можуть також спостерігатися в пацієнтів, у котрих підвищена фібринолітична активність була викликана різними стимулами.

У пацієнтів, які зазнали значного ушкодження тканин, пов'язаного з операцією або загальною травмою, гемостатичний механізм може бути пригнічений потребою в швидкому гомеостазі й у них можуть виникнути кровотечі, незважаючи на нормальний гемостатичний механізм. Досягнення задовільного гомеостазу є також проблемою, коли кровотечі відбуваються в органах, таких як мозок, внутрішнє вухо та очі й може також бути проблемою у випадках дифузних кровотеч (геморагічний гастрит та надмірні маточні кровотечі), коли складно визначити джерело. Така сама проблема може виникнути в процесі відібрання біопсій з різних органів (печінка, легені, пухлина тканин, шлунково-кишковий тракт), а також у лапароскопічній операції. Спільним за цих ситуацій є труднощі забезпечення гомеостазу хірургічними способами (шви, затискачі тощо). Гострі та надмірні кровотечі можуть також відбуватися у пацієнтів за антикоагулянтної терапії, у котрих порушений гомеостаз був викликаний впровадженою терапією. Такі пацієнти можуть потребувати хірургічного втручання у випадку, якщо антикоагулянтному ефектові потрібно швидко протидіяти. До інших ситуацій, коли можуть викликати проблеми у випадку незадовільного гомеостазу, належать такі, коли пацієнтам з нормальним гемостатичним механізмом назначають антикоагулянтну терапію для запобігання тромбоемболічним захворювань. До таких терапій належать гепарин, інші форми протеогліканів, варфарин або інші форми вітамінів К-антагоністів, а також аспірин та інші інгібітори агрегації тромбоцитів.

Системна активація каскаду коагуляції може приводити до розсіяної внутрішньосудинної коагуляції (РВК). Проте, такі ускладнення не спостерігалися в пацієнтів, яким вводили високі дози рекомбінантного фактора VIIa, завдяки локалізованому гемостатичному процесові, викликаному комплексом, утвореним між фактором VIIa та TF на місці ушкодження стінки судини. Прокоагулянтні похідні фактора VII згідно з винаходом можуть, таким чином, також використовуватись в їх активованій формі для лікування таких надлишкових кровотеч, пов'язаних з нормальним гемостатичним механізмом.

Для лікування у зв'язку зі заздалегідь планованими втручаннями прокоагулянтні похідні фактора VII винаходу типово вводять у межах приблизно 24 години перед виконанням втручання та протягом 7 днів або більше після того. Уведення, як коагулянта, може бути виконано багатьма шляхами, як описано в цьому винаході.

Доза похідних фактора VII становить у межах від приблизно 0,05мг до 500мг/день краще, якщо з приблизно 1мг до 200мг/день, та ще краще, якщо з приблизно 10мг до приблизно 175мг/день на 70кг пацієнта як перша та підтримуюча доза залежно від складності стану.

Фармацевтична композиція у першу чергу призначена для парентерального введення для профілактичного та/або терапевтичного лікування.

Краще, якщо фармацевтична композиція вводиться парентерально, тобто, внутрішньовенно, підшкірно або внутрішньом'язово, або вона може бути введена як безперервна або ударна інфузія. Композиції для парентерального введення містять похідну фактора VII винаходу в комбінації з краще, якщо розчиненим фармацевтично прийнятним носієм, краще, якщо водному носії. Можуть бути використані чисельні водні носії такі, як вода, буферна вода, 0,4% сольовий розчин, 0,3% гліцин тощо. Похідні фактора VII винаходу можуть також бути складені на ліпосомальних препаратах для доставки або спрямування до сайтів ушкодження. Ліпосомні препарати загалом описані в, наприклад, [патентах США 4837028, 4501728 та 4975282]. Композиції можуть бути стерилізовані загальноприйнятими, добре відомими способами стерилізації. Водні розчини можуть бути спакзовані для використання або фільтровані за асептичних умов та ліофілізовані, ліофілізований препарат з'єднують зі стерильним водним розчином перед введенням. Композиції можуть містити фармацевтично прийнятні додаткові речовини, потрібні для відтворення фізіологічних умов, таких як нормалізуючі рН та буферуючі агенти, агенти, що модулюють тонус, тощо, наприклад, ацетат натрію, лактат натрію, хлорид натрію, хлорид калію, хлорид кальцію тощо.

Концентрація похідної фактора VII в цих композиціях може змінюватись у широких межах, тобто, з менш, ніж приблизно 0,5% за масою, зазвичай або щонайменше приблизно 1% за масою до 15 або 20% за масою та вибиратиметься в першу чергу за об'ємом рідини, в'язкістю тощо, згідно з певним обраним шляхом введення.

Таким чином, типова фармацевтична композиція для внутрішньовенної інфузії може бути складена так, щоб містити 250мл стерильного розчину Рингера та 10мг поліпептиду фактора VII. Справжні способи одержання парентеральної композиції відомі або очевидні фахівцям у галузі та описані більш детально в, наприклад, [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990)].

Композиції, що містять похідні фактора VII цього винаходу, можуть бути введені для профілактичного та/або терапевтичного лікування. За терапевтичного застосування композиція вводиться пацієнтові, що вже страждає на захворювання, як описано вище, у кількості, достатній для лікування, полегшення або часткової зупинки захворювання та його ускладнення. Кількість, достатня для здійснення цієї мети, описана як "терапевтична ефективна кількість". Як буде зрозуміло фахівцю у галузі, кількість, ефективна для цієї мети, залежатиме від важкості захворювання або ушкодження, а також маси та загального стану пацієнта. Загалом, проте, ефективна кількість становитиме від приблизно 0,05мг до приблизно 500мг похідної фактора VII на день для 70кг пацієнта, де більше за все використовуються дози від приблизно 1,0мг до приблизно 200мг похідної фактора VII на день.

Потрібно враховувати, що матеріали цього винаходу можуть загалом використовуватися за серйозних захворювань або ушкоджень, що загрожу-

ють життю або є потенційно такими. За таких випадків з метою зменшення чужорідних речовин та загального браку імуногенності похідних фактора VII людини є можливим та може бути бажаним введення спеціалізованим лікарем істотного надлишку цих композицій фактора VII.

За профілактичного застосування композиції, що містять похідну фактора VII винаходу, вводяться пацієнтові, схильному або піддатному до ризику захворювання або uszkodження, для підсилення власної коагулятивної спроможності пацієнта. Така кількість описана як "профілактично ефективна доза". За профілактичного застосування точна кількість знову ж таки залежить від стану здоров'я пацієнта та маси, але доза загалом у межах від приблизно 0,05мг до приблизно 500мг на день для 70-кілограмового пацієнта, більше звичайно від приблизно 1,0мг до приблизно 200мг на день для 70-кілограмового пацієнта.

Одиночне або чисельне введення композиції можуть виконуватися за доз та схем, обраних спеціалізованим лікарем. Для амбулаторних пацієнтів, що потребують підтримання дози цілу добу, похідні фактора VII можуть бути введені безперервною інфузією, використовуючи, наприклад, портативну систему подачі.

Локальне доставляння похідної фактора VII цього винаходу, таке як, наприклад, місцеве застосування, може виконуватися, наприклад, з допомогою спрею, перфузії, подвійних балонних катетерів, стентів, вставлених у судинні трансплантати або стенти, гідрогелі, що використовуються для покриття балонних катетерів, або інші загальноприйнятні способи. У будь-якому разі фармацевтична композиція має нести кількість похідної фактора VII, достатньої для ефективного лікування пацієнта.

Інактивовані поліпептиди фактора VII цього винаходу здатні зв'язуватися з тканинним фактором на поверхні клітини. Наприклад, DEGR-Фактор VIIa зв'язує тканинний фактор на поверхні клітині з еквівалентною або вищою спорідненістю, ніж фактор VIIa дикого типу. DEGR-Фактор VIIa немає ферментативної активності, проте, він зв'язує тканинний фактор та діє як конкурентний антагоніст для фактора VIIa дикого типу, таким чином інгібуючі наступні шляхи в зовнішньому шляху коагуляції, що приводить до утворення тромбіну.

Інактивовані похідні фактора VII є зокрема корисними для введення людині для лікування різноманітних станів, включаючи внутрішньосудинну коагуляцію. Наприклад, хоча глибокий тромбоз вен та легенева емболія можуть лікуватися загальноприйнятими антикоагулянтами, інактивовані похідні фактора VII, описані в цьому винаході, можуть бути використані для запобігання тромбоемболічних ускладнень у пацієнтів з визначеним високим ризиком, таких як ті, що зазнали операції або з постійною серцевою недостатністю. Крім того, інактивовані похідні фактора VII можуть діяти як антагоністи для опосередкованої тканинним фактором індукції коагуляції, таким чином блокуючі утворення тромбіну та наступне відкладання фібрину. Таким чином, інактивовані похідні фактора VII можуть бути корисними для інгібування активності тканинного фактора, що призводить до, на-

приклад, інгібування згортання крові, тромбозу або відкладання тромбоцитів.

Інактивовані похідні фактора VII можуть бути зокрема корисними за лікування гіперплазії внутрішнього шару судин, рестенозу завдяки гострим uszkodженням судин, глибокого тромбозу вен, артеріального тромбозу, постхірургічного тромбозу, обхідного трансплантату коронарних артерій (CABG), кризьшкірної коронарної ангіопластії (PTCA), інсульту, раку, метастазу пухлин, ангіогенезу, ішемії/реперфузії, ревматоїдного артриту, тромболізу, артеріосклерозу та рестенозу після ангіопластії, гострим та хронічним показанням, таким як запалення, септичний шок, септицемія, гіпотонія, синдром дихального виснаження дорослих (ARDS), розсіяна внутрішньосудинна коагулопатія (PBK), легенева емболія, відкладання тромбоцитів, інфаркт міокарду або профілактичне лікування ссавців з атеросклеротичними судинами, що мають ризик тромбозу. Гострі судинні uszkodження є ті, що відбуваються швидко (тобто від днів до місяців), на відміну від хронічних судинних uszkodжень (наприклад, атеросклероз), які з'являються протягом життя. Гострі судинні uszkodження часто виникають після хірургічних втручань, таких як судинні перетворення, де використовують способи ангіопластії, ендартеректомії, атеректомії, вставлення судинного трансплантату тощо. Гіперплазія може також відбуватися як уповільнена реакція на, наприклад, вставлення трансплантату або трансплантацію органів. Оскільки інактивовані похідні фактора VII є більше селективними, ніж гепарин, що зазвичай зв'язує лише тканинний фактор на місцях uszkodження, і оскільки інактивовані похідні фактора VII не руйнують інші коагуляційні білки, вони є більш ефективними та менш імовірно, що вони можуть викликати ускладнення в кровотечах, ніж гепарин, коли використовуються профілактично для запобігання глибоких тромбозів вен.

Інактивовані похідні фактора VII, які утримують тканинний фактор зв'язаним інгібують накопичення тромбоцитів на місцях uszkodження судин, блокуючи утворення тромбіну та наступне відкладання фібрину.

Завдяки здатності DEGR-Фактора VII блокувати утворення тромбіну та обмежувати відкладання тромбоцитів на місцях гострих uszkodжень судин, інактивовані похідні фактора VII, які утримують тканинний фактор зв'язаним, але не мають ферментативної активності фактора VIIa, можуть бути використані для інгібування рестенозу судин.

Композиції, що містять інактивовані похідні фактора VII є зокрема корисними в способах лікування пацієнтів, коли складені у фармацевтичну композицію, де вони можуть вводитися пацієнтам, що страждають на різноманітні захворювання для лікування коагуляція-споріднених станів. Такі інактивовані похідні фактора VII, здатні до зв'язування тканинного фактора, але з істотним зменшенням здатності каталізувати активацію іншого фактора в каскаді згортання крові, можуть мати довше напівжиття в плазмі та, таким чином, відповідно довший період антикоагулятивної активності порівняно з іншими антикоагулянтами. Серед медичних показань для пацієнтів є такі, котрим потрібно вводити

антикоагулянти, такі як, наприклад, глибокий тромбоз вен, легенева емболія, інсульт, розсіяна внутрішньосудинна коагуляція (DIC), відкладання фібрину в легенях та нирках, пов'язане з грамнегативною ендотоксемією, та інфаркт міокарду. Композиція може використовуватись для інгібування рестенозу судин, який відбувається після механічного ушкодження судин, такого як ушкодження, викликані балонною ангіопластикою, ендартеректомією, редуктивною атеректомією, встановлення стенту, лазерною терапією або ротабляцією, або такі, що є вторинними до трансплантатів судин, стентів, обхідних трансплантатів або трансплантатів органів. Композиція може, таким чином, використовуватись для інгібування відкладання тромбоцитів та пов'язаних захворювань. Таким чином, спосіб інгібування коагуляції, рестенозу судин або відкладання тромбоцитів, наприклад, складається з введення пацієнтові композиції, що містить інактивовані похідні фактора VII, такі, які мають щонайменше одне заміщення амінокислоти в каталітичній тріаді Ser344, Asp242 та His193, у кількості, достатній для ефективного інгібування коагуляції, рестенозу судин або відкладання тромбоцитів. Способи також мають використання в лікуванні гострого закриття коронарної артерії в пацієнта (наприклад, гострий інфаркт міокарду), який складається з введення інактивованих похідних фактора VII, які включають DEGR-Фактор VII та FFR-Фактор VII, разом з тканинним активатором плазміногену або стрептокіназою, та можуть підвищувати ТАП викликаний тромболіз. Інактивовані похідні фактора VII даються перед, разом з, або незадовго після введення тромболітичного агента, такого як тканинний активатор плазміногену.

Композиція інактивованих похідних фактора VII також матиме значне використання в запобіганні кардіогенної емболії та в лікуванні тромботичних інсультів. Завдяки його низькому потенціалу для викликання ускладнення за кровотеч та його селективність, похідні фактора VII можуть бути назначені жертвам інсульту та можуть запобігати поширенню тромбу артерій. Кількість уведених похідних фактора VII змінюватиметься з кожним пацієнтом залежно від природи та важкості інсульту, але дози загалом знаходитимуться в діапазоні, що наведено нижче.

Інактивовані похідні фактора VII та їх композиція можуть також використовуватись для інгібування шкідливих процесів, пов'язаних з ішемічною реперфузією. Сильна ішемія тканин, органів або кінцівки може відбуватися завдяки зменшенню потоку крові та може бути пов'язана з травмою, хірургічною операцією або зниженням тиском крові. Одним з ускладнень, пов'язаним з сильною ішемією є збільшення синтезу тканинного фактора в артеріальній системі. Це підвищення експресії тканинного фактора вважається, що стимулює прокоагулянтну реакцію, у першу чергу в капілярному руслі. З наступною реперфузією ішемічної тканини може утворюватися тромб, який може або закупорювати, або не закупорювати судини. Утворення тромбів в артеріальному руслі та відкладання тромбоцитів вздовж тромбу призводить до вторинного утворення - ішемії тканин. Утворення

тромбів та присутність тромбоцитів може потім викликати утворення та вивільнення чисельних біоактивних факторів, включаючи ті, що утворюються в шляхах коагуляції, таких як тромбін та фактор X, а також факторів, що вивільнюються з активованих тромбоцитів. У свою чергу ці фактори можуть викликати утворення додаткових факторів з ендотеліальних клітин, клітин гладеньких м'язів або з моноцитів, таких як TNF- α та IL-1. Ці фактори, у свою чергу, можуть потім активувати ендотеліальні клітини, що приводить до збільшення синтезу різних адгезивних молекул, пов'язаних зі зв'язуванням моноцитів та нейтрофілів. Зв'язування та міграція моноцитів та нейтрофілів, вивільнення біоактивних сполук цими клітинами, включаючи утворення реактивних кисневих радикалів, можуть загострювати активацію та ушкодження ендотеліальних клітин. Зрештою, якщо каскад процесів стає неконтрольованим, це може привести до системних ускладнень та потенційно стимулювати недостатність багатьох органів. Блокування тканинного фактора згідно з цим винаходом уведенням специфічного інгібітору для тканинного фактора/зв'язування фактора VII (наприклад, FFR-FVIIa), і таким чином, блокуючи початок зовнішнього шляху коагуляції, початку каскаду процесів можна запобігти, таким чином уникаючи або мінімізуючи шкідливі процеси, пов'язані з ішемією/реперфузією.

Доза інактивованих похідних фактора VII для запобігання глибоких тромбозів вен становить від приблизно 50мкг до 500мг/день, більш типово від 1мг до 200мг/день, і ще краще, якщо від 10 до приблизно 175мг/день для 70кг пацієнта, де введення має початись за щонайменше приблизно 6 години перед операцією та тривати щонайменше доки пацієнт не стане амбулаторним. Доза інактивованих похідних фактора VII за лікування рестенозу змінюватиметься з кожним пацієнтом але загалом становитиме дози, запропоновані вище.

Композиції, що містять інактивовані похідні фактора VII типово уводять у межах приблизно 24 годин перед виконанням втручання, і протягом 7 днів або більше після того. Уведення може здійснюватися багатьма шляхами, які далі описано в цьому винаході. Композиції, що містять інактивовані похідні фактора VII, можуть також бути введені системно або місцево для вставлення судинних трансплантатів (наприклад, покриттям синтетичних або модифікованих природних артеріальних судинних трансплантатів) на місцях анастомозу, хірургічної ендартеректомії (типово ендартеректомії сонної артерії), обхідних трансплантатів тощо.

У лікуванні розвинутих глибоких тромбозів вен та/або легеневої емболії, доза похідних фактора VII в межах від приблизно 50мкг до 500мг/день, більш типово від 1мг до 200мг/день, та ще краще, якщо від 10мг до приблизно 175мг/день для 70кг пацієнта як перша та підтримуюча дози залежно від маси пацієнта та складності стану. Завдяки нижчій імовірності ускладнення за кровотеч від інфузій інактивованих похідних фактора VII, інактивовані похідні фактора VII можуть замінити або знизити дозу гепарину під час або після операції у випадку тромбоектомії або емболектомії.

За випадків гострої бактеріємії, ендотоксемії або РВК, пацієнту дають першу дозу похідної фактора VII щонайменше від приблизно 50мкг до 500мг/день, більш типово від 1мг до 200мг/день, і ще краще, якщо від 10мг до приблизно 175мг/день для 70кг пацієнта, з підтримуючою дозою після того в діапазоні від 50мкг до 500мг/день, типово від 1мг до 200мг/день для 70кг пацієнта.

Краще, якщо похідна фактора VII має напівжиття ($t_{1/2}$), яке збільшено відносно напівжиття некон'югованого фактора VII з якого він походить. Краще, якщо напівжиття похідної фактора VII збільшено на щонайменше 1,5-2 рази, ще краще, якщо на приблизно 2-3 рази, навіть ще краще, якщо на приблизно 5-10 разів, оптимально приблизно на 100 разів, зазвичай приблизно на 6 разів відносно напівжиття немодифікованого вихідного фактора VII.

Загальні способи приєднання поліетиленгліколю білків описані в [патенті США №4179337, виданого 18 грудня, 1979 (включений в цей винахід шляхом посилання для описання способів приєднання поліетиленгліколю до білків)]. Крім того, інші способи приєднання поліетиленгліколю описані в [патенті США №5122614, виданому 16 червня, 1992, що також включений в цей винахід шляхом посилання для описання способів приєднання поліетиленгліколю до білків]. Малеймід-ПЕГ є можливо більш корисним реагентом для цистеїн-ПЕГіляції, але інші реактиви також доступні для специфічної модифікації цистеїну.

Цей винахід надалі описано в прикладах з посиланням на графічні матеріали, що додаються, де:

Фіг.1 Структура процесованого належним чином фактора коагуляції VII людини, амінокислоти 1-406, з γ -карбоксілованим Glu-залишком (γ) та глікозилуванням (*). Стрілка на залишкові амінокислоти 152 показує на сайт, де одноланцюговий фактор VII розщеплюється для перетворення на активований дволанцюговий фактор VII (FVIIa).

Фіг.2 Створення плазмід для експресії поліпептидів рекомбінантного фактора VII людини. Плазміда рLN174 експресує фактор VII людини з приєднаним пролепептидом, природно пов'язаним з фактором VII.

Цей винахід окрім іншого проілюстрований наступними прикладами, які, проте, наведені як такі, що не обмежують об'єм захисту. Деталі, описані в наступному описові та прикладах можуть бути окремо й в будь-якій їх комбінації матеріалом для втілення винаходу в його різноманітних форм.

Приклади

Термінологія для заміщень амінокислот, що використовується в наступних прикладах, така: перша літера представляє амінокислоту, що природно присутня в положенні послідовності №1; наступне число представляє положення в послідовності №1; друга літера представляє іншу амінокислоту, що заміщує природну амінокислоту, наприклад, R396C, де аргінін у положенні 396 послідовності №1 заміщений на цистеїн. В іншому прикладі, V158T/M298Q, валін в положенні 158 послідовності №1 заміщений на треонін, а метіонін в положенні 298 послідовності №1 заміщений на глутамін в тому самому поліпептиді фактора VII.

Приклад 1

Створення ДНК, що кодує FVII-(R396C), FVII-(Q250C), FVII-(P406C), FVII-(407C), FVII-(V158T/M298Q), FVII-(L305V/M306D/D309S), FVII-(K337A), FVII-(L305V) та FVII-(F374P):

ДНК конструкти, що кодують FVII-(R396C), FVII-(Q250C), FVII-(P406C), FVII-(407C) (один додатковий С-кінцевий Cys), FVII-(M298Q), FVII-(L305V/M306D/D309S), FVII-(K337A), FVII-(L305V) та FVII-(F374P), одержували сайт-спрямованим мутагенезом, використовуючи суперспіралізований дволанцюговий ДНК вектор зі вставкою FVII людини (рLN174) та два синтетичні праймери, що містять бажану мутацію. Використовували наступні праймери: Для FVII-(R396C):

5'-GCG CTC AGA GCC ATG CCC AGG AGT CCT CC-3' (послідовність №3)

5'-GGA GGA CTC CTG GGC ATG GCT CTG AGC GC-3' (послідовність №4)

Для FVII-(Q250C):

5'-GCT CCG CCT GCA CTG TCC CGT GGT CCT CAC TGA CC-3' (послідовність №5)

5'-GGT CAG TGA GGA CCA CGG GAC AGT GCA GGC GGA GC-3' (послідовність №6)

Для FVII-(P406C):

5'-GCG AGC CCC ATT TTG CTA GAC TAG AGG ATC TGG G-3' (послідовність №7)

5'-CCC AGA TCC TCT AGT CTA GCA AAA TGG GGC TCG C-3' (послідовність №8)

Для FVII-(407C):

5'-CCT GCG AGC CCC ATT TCC CTG TTA GAC TAG AGG ATC TGG G-3' (послідовність №9)

5'-CCC AGA TCC TCT AGT CTA ACA GGG AAA TGG GGC TCG CAG G-3' (послідовність №10)

Для FVII-(M298Q):

5'-GCC CTG GAG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3' (послідовність №11)

5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CTC CAG GGC-3' (послідовність №12)

Для FVII-(L305V):

5'-CGT GCC CCG GGT GAT GAC CCA GGA C-3' (послідовність №13)

5'-GTC CTG GGT CAT CAC CCG GGG CAC G-3' (послідовність №14)

Для FVII-(M306D/D309S):

5'-TCT AGA TAC CCA GTC TTG CCT GCA GCA GTC ACG GAA-3' (послідовність №15)

5'-TTC CGT GAC TGC TGC AGG CAA GAC TGG GTA TCT AGA-3' (послідовність №16)

Для FVII-(K337A):

5'-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3' (послідовність №17)

5'-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3' (послідовність №18)

Для FVII-(F374P):

5'-CCG TGG GCC ACC CTG GGG TGT ACA CC-3' (послідовність №19)

5'-GGT GTA CAC CCC AGG GTG GCC CAC GG-3' (послідовність №20)

Олігонуклеотидні праймери, кожний комплементарний протилежному ланцюгові вставки вектора, нарощувались під час температурних циклів з допомогою Pfu ДНК-полімерази. Після вставлення праймерів, створювали мутовану плазмиду, що містить зміщені "ніки". Після температурних циклів, продукт обробляли DpnI, який є специфічним для

метильованої та геміметильованої ДНК, для розщеплення вихідної ДНК матриці та для селекції на мутаційвмісну синтезовану ДНК.

Процедури одержання ДНК конструкту, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію зі специфічними праймерами, є добре відомими фахівцям у галузі [див. PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, USA].

Приклад 2

Одержання FVII-(R396C).

ВНК клітини трансфікували головним чином, як попередньо описано [Thim et al. (1988) *Biochemistry* 27, 7785-7793; Persson та Nielsen (1996) *FEBS Lett.* 385, 241-243], щоб одержати експресію варіанта FVII-(R396C). Поліпептид фактора VII очищували наступним чином:

Досліджуване середовище завантажували на 25-мл колонку з Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) після додавання 5мМ EDTA, 0,1% Triton X-100 та 10мМ Tris, доведення рН до 8,0 та доведення провідності до 10-11мСм/см додаванням води. Елюції білка досягали градієнтом з 10мМ Tris, 50мМ NaCl, 0,1% Triton X-100, рН 8,0; до 10мМ Tris, 50мМ NaCl, 25мМ CaCl₂, 0,1% Triton X-100, рН 7,5. Фракції, що містили FVII-(R396C), збирали та застосовували на 25-мл колонку, що містить моноклональне антитіло F1A2 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark), зв'язане з CNBr-активованою Sepharose 4B (Pharmacia Biotech). Колонку врівноважували 50мМ Hepes, рН 7,5, що містить 10мМ CaCl₂, 100мМ NaCl та 0,02% Triton X-100. Після промивання з врівноваженим буфером та врівноваженим буфером, що містить 2М NaCl, зв'язаний матеріал елюювали врівноваженим буфером, що містить 10мМ EDTA замість CaCl₂. Перед використанням або зберіганням, додавали надлишок CaCl₂ над EDTA або FVII-(R396C) переносили до Ca²⁺-вмісного буфера. Вихід кожного етапу супроводжувався визначеннями фактора VII ELISA та очищений білок аналізували з допомогою SDS-PAGE.

Приклад 3

Одержання FVII-(M298Q).

ВНК клітини трансфікували головним чином, як попередньо описано [Thim et al. (1988) *Biochemistry* 27, 7785-7793; Persson та Nielsen (1996) *FEBS Lett.* 385, 241-243], щоб одержати експресію варіанта FVII-(M298Q). Поліпептид фактора VII очищували наступним чином:

Досліджуване середовище завантажували на 25-мл колонку з Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) після додавання 5мМ EDTA, 0,1% Triton X-100 та 10мМ Tris, доведення рН до 8,0 та доведення провідності до 10-11мСм/см додаванням води. Елюції білка досягали градієнтом з 10мМ Tris, 50мМ NaCl, 0,1% Triton X-100, рН 8,0; до 10мМ Tris, 50мМ NaCl, 25мМ CaCl₂, 0,1% Triton X-100, рН 7,5. Фракції, що містили FVII-(R396C), збирали та застосовували на 25-мл колонку, що містить моноклональне антитіло F1A2 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark), зв'язане з CNBr-активованою Sepharose 4B (Pharmacia Biotech). Колонку врівноважували 50мМ Hepes, рН 7,5, що містить 10мМ CaCl₂, 100мМ NaCl та 0,02% Triton X-100. Після промивання з врівноваженим буфером та врівноваженим буфером, що містить 2М NaCl,

зв'язаний матеріал елюювали врівноваженим буфером, що містить 10мМ EDTA замість CaCl₂. Перед використанням або зберіганням, додавали надлишок CaCl₂ над EDTA або FVII-(R396C) переносили до Ca²⁺-вмісного буфера. Вихід кожного етапу супроводжувався визначеннями фактора VII ELISA та очищений білок аналізували з допомогою SDS-PAGE.

Приклад 4

Одержання FVII-(L305V/M306D/D309S).

ВНК клітини трансфікували головним чином, як попередньо описано [Thim et al. (1988) *Biochemistry* 27, 7785-7793; Persson та Nielsen (1996) *FEBS Lett.* 385, 241-243], щоб одержати експресію варіанта FVII-(L305V/M306D/D309S). Поліпептид фактора VII очищували наступним чином:

Досліджуване середовище завантажували на 25-мл колонку з Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) після додавання 5мМ EDTA, 0,1% Triton X-100 та 10мМ Tris, доведення рН до 8,0 та доведення провідності до 10-11мСм/см додаванням води. Елюції білка досягали градієнтом з 10мМ Tris, 50мМ NaCl, 0,1% Triton X-100, рН 8,0; до 10мМ Tris, 50мМ NaCl, 25мМ CaCl₂, 0,1% Triton X-100, рН 7,5. Фракції, що містили FVII-(R396C), збирали та застосовували на 25-мл колонку, що містить моноклональне антитіло F1A2 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark), зв'язане з CNBr-активованою Sepharose 4B (Pharmacia Biotech). Колонку врівноважували 50мМ Hepes, рН 7,5, що містить 10мМ CaCl₂, 100мМ NaCl та 0,02% Triton X-100. Після промивання з врівноваженим буфером та врівноваженим буфером, що містить 2М NaCl, зв'язаний матеріал елюювали врівноваженим буфером, що містить 10мМ EDTA замість CaCl₂. Перед використанням або зберіганням, додавали надлишок CaCl₂ над EDTA або FVII-(R396C) переносили до Ca²⁺-вмісного буфера. Вихід кожного етапу супроводжувався визначеннями фактора VII ELISA та очищений білок аналізували з допомогою SDS-PAGE.

Приклад 5

Гідроліз in vitro

Природні (дикого типу) варіанти фактора VIIa та фактора VIIa (обидва означені як "Фактор VIIa") перевіряли паралельно для прямого порівняння їх специфічної активності. Тест виконували в мікрититрувальному планшеті (Maxisorp, Nunc, Denmark). Хромогенний субстрат D-Ile-Pro-Arg-п-нітроанілід (S-2288, Chromogenix, Sweden), кінцева концентрація 1мМ, додавали до фактора VIIa (кінцева концентрація 100нМ) в 50мМ Hepes, рН 7,4, що містить 0,1М NaCl, 5мМ CaCl₂ та 1мг/мл альбуміну сироватки бика. Поглинання за 405нМ визначалося безперервно в SpectraMax™ 340 планшетному читувачеві (Molecular Devices, USA). Поглинання, розвинуте протягом 20-хвилинної інкубації після вирахування поглинання в пустій лунці, що не містить ферменту, використовували для підрахування відношення між активністю варіанта та фактора VIIa дикого типу:

Відношення = (A_{405 нМ} варіанта фактора VIIa) / (A_{405 нМ} фактора VIIa дикого типу).

Приклад 6

Протеоліз in vitro

Природні (дикого типу) варіанти фактора VIIa та фактора VIIa (обидва означені як "Фактор VIIa") перевіряли паралельно для прямого порівняння їх специфічної активності. Тест виконували в мікротитрувальному планшеті (Maxisorp, Nunc, Denmark). Фактор VIIa (10нМ) та фактор X (0,8мкМ) в 100мкл 50мМ Hepes, pH 7,4, що містить 0,1М NaCl, 5мМ CaCl₂ та 1мг/мл альбуміну сироватки бика, інкубували протягом 15хв. Розщеплення фактора X потім зупиняли додаванням 50мкл 50мМ Hepes, pH 7,4, що містить 0,1М NaCl, 20мМ EDTA та 1мг/мл альбуміну сироватки бика. Кількість утвореного фактора Ха визначали додаванням хромогенного субстрату Z-D-Arg-Gly-Arg-p-нітроаніліду (S-2765, Chromogenix, Sweden), кінце-

ва концентрація 0,5мМ. Поглинання за 405нМ визначалося безперервно в SpectraMax™ 340 планшетному зчитувачеві (Molecular Devices, USA). Поглинання, розвинуте протягом 10-хвилинної інкубації після вирахування поглинання в пустій лунці, що не містить FVIIa, використовували для підрахування відношення між активністю варіанта та фактора VIIa дикого типу:

Відношення = $(A_{405 \text{ нМ}} \text{ варіанта фактора VIIa}) / (A_{405 \text{ нМ}} \text{ фактора VIIa дикого типу})$.

Приклад 7

Відносна активність поліпептидів FVIIa, виміряна способами, описаними в прикладах 5 та 6

Варіант	Відношення в прикладі 5	Відношення в прикладі 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
PVIIa-(R396C)	1,0	1,0
FVIIa-(Q250C)	1,0	1,5
FVIIa-(P406C)	0,8	1,0
FVIIa-(407C)	1,1	1,4
wt-FVIIa	1,0	1,0

Приклад 8

Кон'югація з ПЕГ FVII-(R396C), FVII-(Q250C), FVII-(P406C) та FVII-(407C)

Варіанти фактора VIIa, як описано в прикладі 1, з вільною тіоловою групою, вставленою в будь-яке з вищезгаданих положень (250, 396, 406 або 407 (останнє С-кінцеве нарощене)), реагують з 5 разовим молярним надлишком ПЕГ-вінілсульфону або ПЕГ-малеїміду (як альтернатива, можуть бути використані будь-які інші сульфідрил-реактивні похідні ПЕГ) у водному буфері протягом 3 годин для доведення реакції майже до завершення. Молекулярна маса ПЕГ-похідних становить щонайменше 10000. ПЕГ-FVIIa, що утворився, перевіряли на амідолітичну та протеолітичну активність, як

описано в прикладах 5 та 6, і має зберегти активність FVIIa дикого типу людини або, якщо Cys був уведений в FVIIa варіант з підвищеною активністю, активність після реакції з ПЕГ-похідною має лишитись вищою, ніж активність дикого типу людини FVIIa. ПЕГ-кон'югований FVIIa відокремлюють з варіантом FVIIa, що не вступив у реакцію, та вільною ПЕГ-похідною з допомогою хроматографії, такої як гел'фільтрування на колонці Superdex-200 або подібній.

ПЕГ-кон'югація білків на Cys-залишках відома фахівцеві в галузі та описана в кількох публікаціях, включаючи [Goodson, R. J. & Katre, N. V. (1990) Bio/Technology 8, 343 та Kogan, T. P. (1992) Synthetic Comm. 22, 2417].

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Novo Nordisk A/S

<120> ПОХІДНІ ФАКТОРА КОАГУЛЯЦІЇ VII

<130> 6286-WO

<150> DK PA 2001 00477

<151> 2001-03-22

<160> 20

<170> Patentin version 3.1

<210> 1

<211> 406

<212> PRT

<213> Людський

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(406)

<223> Xaa означає 4-карбоксиглутамінову кислоту (гамма-карбоксиглутамат)

<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

65	84831	66
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
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
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
His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp		
245	250	255

67	84831	68	
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> ДНК

<213> Синтетична послідовність

<220>

<223> Плазмідна ДНК рLNI74

<400> 2

ttcgagctct gcactccgcc cgaagaagtc gctcggctct gccaaaggacg cggggcgct 60
 gactatgcgt gggctggagc aaccgcctgc tgggtgcaa cccttgccg ccggactcgt 120
 ccaacgacta taaagagggc aggtgtcct ctaagcgtca cccgggatcc atggtctccc 180
 aggccctcag gctcctctgc ctctgctg ggcttcagg ctgctggct gcagtctcg 240
 taaccagga ggaagcccaa ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac gcgttctgg 300
 aggagctcg gccgggctcc ctggagagg agtgaagga ggagcagtc tcctcgagg 360
 agggccggga gatctcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt tcttacagt 420
 atggggacca gtgtcctca agtccatgcc agaattgggg ctctgcaag gaccagctcc 480
 agtctatat ctgctctgc ctccctgct tcgagggccg gaactgtgag acgcacaagg 540
 atgaccagct gatctgtgt aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc agtgaccaca 600
 cgggcaccaa gcgtcctgt cgggtccacg aggggtactc tctgctggca gacgggggtg 660
 cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa aaaagaaatg 720
 ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaagggtgt ccccaaaggg gagtgtccat 780
 ggcaggctct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtg ggggaccctg atcaacacca 840
 tctgggtggt ctccgcggcc cactgttctg acaaaatcaa gaactggagg aacctgatcg 900
 cgggtcggg cgagcacgac ctacgcgagc acgacgggga tgagcagagc cggcgggtg 960
 cgcaggctcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac atcgcgctgc 1020
 tccgcctgca ccagcccggt gtctcactg accatgtggt gccctctgc ctgccgaac 1080
 ggacgtctc tgagaggacg ctggcctcg tgcgttctc attggtcagc ggctggggcc 1140
 agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg ccccggtga 1200
 tgaccagga ctgctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctcccaa atcacggagt 1260
 -
 acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg gacagtggag 1320
 gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc agctggggcc 1380
 agggctgcgc aaccgtgggc cacttggggg tgtacaccag ggtctccag tacatcgagt 1440

71	84831	72	
ggctgcaaaa gctcatgctg tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga gccccatttc			1500
cctagactag aggatctggg gtggcatccc tgtgaccct cccagtgcc tctcctggcc			1560
ctggaagttg cactccagt gccaccagc ctgtcctaa taaaattaag ttgcatcatt			1620
ttgtctgact aggtgtcctt ctataatatt atgggggtga ggggggtggt atggagcaag			1680
gggcaagttg ggaagacaac ctgtagggcc tgcggggctt attggaacc aagctggagt			1740
gcagtgccac aatcttggct cactgcaatc tccgcctct ggggtcaagc gattctcctg			1800
cctcagcctc ccgagttgtt gggattccag gcatgcatga ccaggctcag ctaattttg			1860
ttttttggt agagacgggg ttaccata ttggccaggc tggctccaa ctctaattct			1920
cagggtatct acccaccttg gcctccaaa ttgctgggat tacaggcgtg aaccactgct			1980
ccctccctg tcttctgat tttaaataa ctataccagc aggaggacgt ccagacacag			2040
cataggctac ctggccatgc ccaaccggtg ggacattga gttgcttct tggcactgtc			2100
ctctcatgct ttgggtccac tcagtagatg cctgtgaat tcgagctcgc ccgggctcta			2160
gctagagtcg acctgcaggc atgcaagctt tggcactggc cgtcgttta caacgtcgtg			2220
actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atgccttgc agcacatccc ctttcgcca			2280
gctggcgtaa tagcgaagag gcccgacccg atgccttc ccaacagttg cgcagcctga			2340
atggcgaatg ggcctgatg cgttatttc ttcttacgc atctgtcgg tatttcacac			2400
cgcataatgt gactctcag tacaatctgc tctgatgcc catagttaag ccagccccga			2460
cacccgcaa cacccgtga cgcgccga cgggctgtc tgctccggc atccgcttac			2520
agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggtttcacc gtcacaccg			2580
aaacgcgca gacgaaagg cctcgtgata cgcctattt tataggtaa tgtcatgata			2640
ataatggtt ctagacgtc aggtggcact ttccgggaa atgtgcgcg aaccctatt			2700
tgttatttt tctaaataa ttcaaatag tatccgtca tgagacaata accctgataa			2750
atgctcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtatc aacattccg tgcgccctt			2820
attcccttt ttgcggcatt ttgccttct gttttgctc accagaaac gctggtgaaa			2880
gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggt acatcgaact ggatctcaac			2940
agcggtaaga tcctgagag ttccgccc gaagaacgtt ttcaatgat gagcactttt			3000

73	84831	74
aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcgg		3060
cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat		3120
cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgcg ccataacat gagtgataac		3180
actgcggcca acttactct gacaacgac ggaggaccga aggagctaac cgctttttg		3240
cacaacatgg gggatcatgt aactgcctt gatcgggtg gaaccggagc tgaatgaagc		3300
cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaaca cgttgcgcaa		3360
actattaact ggcgaactac ttacttagc tccccggcaa caattaatag actggatgga		3420
ggcggataaa gttgcaggac cactctgcg ctcgccctt ccggctggct ggtttattgc		3480
tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga		3540
tgtaagccc tccgtagc tagttatcta cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga		3600
acgaaataga cagatcgtg agatagggtc ctactgatt aagcattgt aactgtcaga		3660
ccaagttac tcatatatac tttagattga tttaaaact cattttta ttaaaggat		3720
ctagggaag atccttttg ataactcat gacaaaatc cctaacgtg agtttcgtt		3780
ccactgagcg tcagacccc tagaaaagat caaaggatct tctgagatc ctttttct		3840
gcgcgtaatc tgctgctgc aaacaaaaa ccaccgtac cagcgggtg ttgtttccg		3900
gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca		3960
aatactgtcc ttctagtga gccgtagta ggccaccact tcaagaactc ttagcaccg		4020
cctacatacc tcgctctgct aatcctgta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg		4080
tgtcttaccg ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga		4140
acgggggggt cgtgcacaca gccagctg gagcgaacga cctacaccga actgagatac		4200
ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg ctcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat		4260
ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgagg agcttcagg gggaaacgcc		4320
tggtatctt atagtctgt cgggttcgc cacctctgac ttgagcgtc attttgtga		4380
tgctgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcgccctt ttacgggtc		4440
ctggccttt gctggcctt tgctcacatg ttcttctg cgttatccc tgattctgtg		4500
gataaccgta ttaccgctt tgagttagct gataccgct gccgcagccg aacgaccgag		4560

75	84831	76
cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggaa gagcgccaa tacgcaaacc gcctctcccc	4620	
gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cagcagaggt tccccgactg gaaagcgggc	4680	
agtgagcga acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt aggcacccca ggctttacac	4740	
tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga	4800	
aacagctatg accatgatta cgaattcatc gatattctaga tccagacatg ataagataca	4860	
ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaat aaaatgcttt atttgtgaaa	4920	
tttgtgatgc tattgcttta ttgttaacca ttataagctg caataaaca gttacaaca	4980	
acaattgcat tcattttatg ttcaggctc agggggaggt gtgggaggtt tttaaagca	5040	
agtaaacct ctacaaatgt ggtatggctg attatgatct aaagccagca aaagtcccat	5100	
ggctttataa aaatgcatag ctttaggagg ggagcagaga acttgaaagc atcttctgt	5160	
tagtcttct tctcgtagac ttcaactta tacttgatgc cttttctc ctggacctca	5220	
gagaggacgc ctgggtattc tgggagaagt ttattttcc ccaaatcaat ttctgggaaa	5280	
aacgtgtcac ttcaaattc ctgcatgac ctgtcaca agagtctgag gtggcctgt	5340	
tgattcatgg ctctctgga aacagaactg cctccgacta tccaaacct gtctactta	5400	
cttgccaatt ccggtgttc aataagtct aaggcatcat ccaaacttt ggcaagaaaa	5460	
tgagctctc gtgggtgttc ttgagttct ctactgagaa ctatattaat tctgtcttt	5520	
aaaggtcgt tcttctcagg aatggagaac caggtttcc taccataat caccagattc	5580	
tgtttacct cactgaaga ggtgtgtgc attcttga agtactgaa ctcttctg	5640	
agcggaggcc agggtaggtc tccgttctg ccaatccca tttttgga cacggcgacg	5700	
atgcagttca atggtcgaac catgatggca cggatctga gctcgcgaaa gcttttgca	5760	
aaagcctagg cctcaaaaa agcctctca ctactctg aatagctcag aggccgaggc	5820	
ggcctcggc tctgcataa taataaaaa tagtcagcca tggggcggag aatgggcgga	5880	
actgggcgga gttaggggcg ggatgggcg agttagggc gggactatg ttgctgacta	5940	
attgagatgc atgcttgca tacttctgc tctggggag cctggggact ttccacacct	6000	
ggttgctgac taattgagat gcatgcttg catactctg cctgctggg agcctgggga	6060	
cttccacac cctaactgac acacattcca caggggaa	6098	

77	84831	78
<210>	3	
<211>	29	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	3	
	gcgctcagag ccatgcccag gagtcctcc	29
<210>	4	
<211>	29	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	4	
	ggaggactcc tgggcatggc tctgagcgc	29
<210>	5	
<211>	35	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	5	

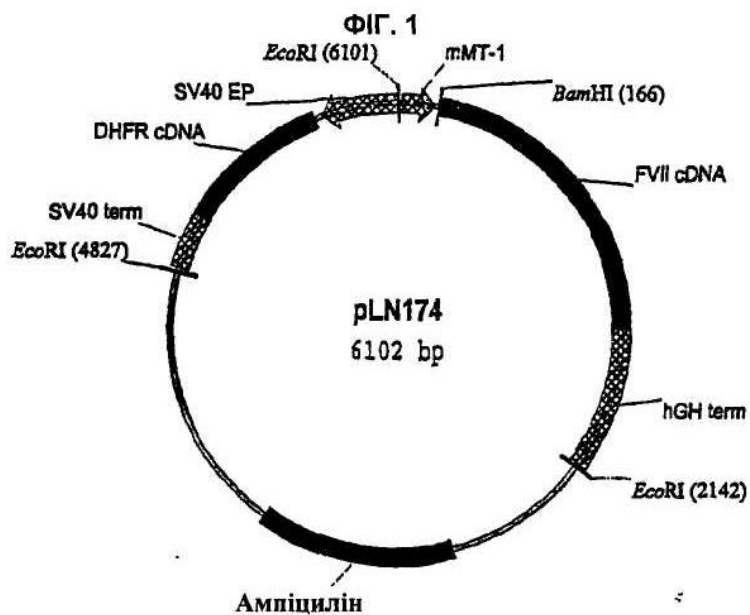
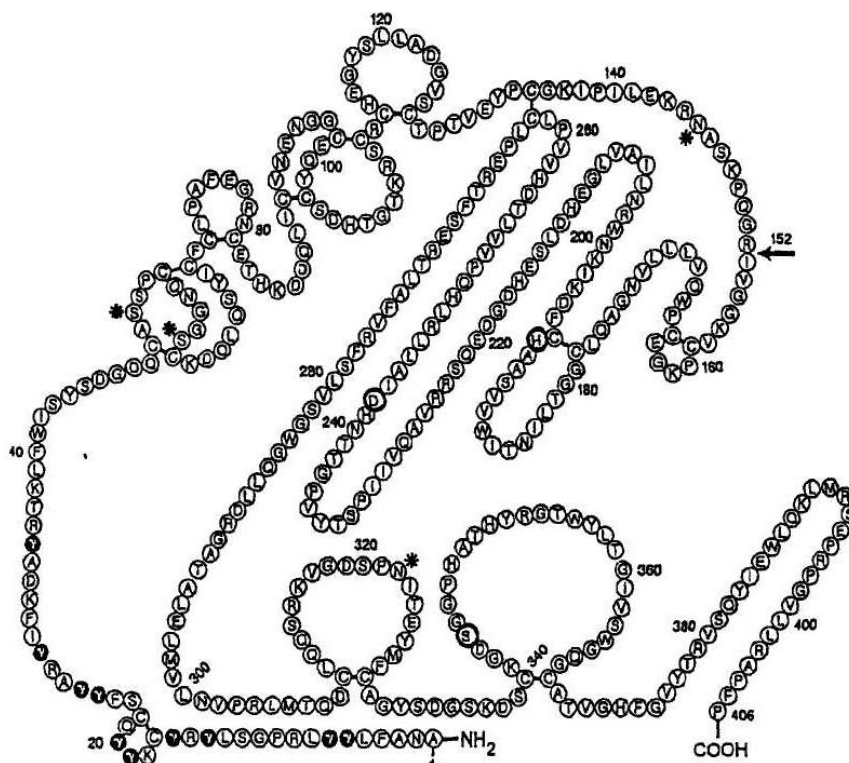
79	84831	80
gctccgcctg cactgtcccg tggctctcac tgacc		
		35
<210>	6	
<211>	35	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	6	
ggtcagtgag gaccacggga cagtgcaggc ggagc		35
<210>	7	
<211>	34	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	7	
gcgagcccca ttttgctaga ctagaggatc tggg		34
<210>	8	
<211>	34	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	8	

81	84831	82
cccagatcct ctagtctagc aaaatggggc tcgc		34
<210>	9	
<211>	40	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	9	
cctgcgagcc ccatttcct gtagactag aggatctggg		40
<210>	10	
<211>	40	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	10	
cccagatcct ctagtctaac agggaaatgg ggctcgagg		40
<210>	11	
<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	

83	84831	84
<400> 11		
gccctggagc tccaggtcct caacgtgccc		30
<210> 12		
<211> 30		
<212> ДНК		
<213> Синтетична послідовність		
<220>		
<223> Нуклеотидний праймер		
<400> 12		
gggcacgttg aggacctgga gctccagggc		30
<210> 13		
<211> 25		
<212> ДНК		
<213> Синтетична послідовність		
<220>		
<223> Нуклеотидний праймер		
<400> 13		
cgtgccccgg gtgatgaccc aggac		25
<210> 14		
<211> 25		
<212> ДНК		
<213> Синтетична послідовність		
<220>		

85	84831	86
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	14	
gtcctgggtc atcaccggg gcacg		25
<210>	15	
<211>	36	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	15	
tctagatacc cagtctgcc tgcagcagtc acgga		36
<210>	16	
<211>	36	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	16	
ttccgtgact gctgcaggca agactgggta tctaga		36
<210>	17	
<211>	28	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	

87	84831	88
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	17	
cggatggcag cgcggaactcc tgcaaggg		28
<210>	18	
<211>	28	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	18	
cccttcgagg agtcgcgcgt gccatccg		28
<210>	19	
<211>	26	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	19	
ccgtgggcca ccctggggtg tacacc		26
<210>	20	
<211>	26	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична послідовність	
<220>		
<223>	Нуклеотидний праймер	
<400>	20	
ggtgtacacc ccagggtggc ccacgg		26



ФІГ. 2