



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 393**

51 Int. Cl.:
C07K 14/745 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07111713 .9**
96 Fecha de presentación : **24.09.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1908782**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **Polipéptidos del factor de coagulación humano VII.**

30 Prioridad: **25.09.2002 DK 2002 01423**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2010

73 Titular/es: **Novo Nordisk Health Care AG.**
Andreasstrasse 15
8050 Zürich, CH

72 Inventor/es: **Persson, Egon y**
Olsen, Ole Hvilsted

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 339 393 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos del factor de coagulación humano VII.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos del factor VIIa de coagulación humana que tienen una actividad coagulante así como a constructos polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, vectores y células huéspedes comprendiendo y expresando el polinucleótido, composiciones farmacéuticas, usos y métodos de tratamiento.

10 **Antecedentes de la invención**

La coagulación sanguínea es un proceso que consiste en una interacción compleja de varios componentes de la sangre (o factores) que finalmente da lugar a un coágulo de fibrina. Generalmente, los componentes de sangre, que participan en lo que se ha referido como la “cascada” de coagulación, son proteínas inactivas enzimáticamente (proenzimas o zimógenos) que se convierten en enzimas proteolíticas por la acción de un activador (que en sí es un factor de coagulación activado). Factores de coagulación que han sufrido tal conversión son generalmente indicados como “factores activos”, y se designan por la adición de la letra “a” al nombre del factor de coagulación (p. ej. factor VIIa).

La iniciación del proceso hemostático es mediada por la formación de un complejo entre el factor tisular, expuesto debido a una lesión de la pared de los vasos, y el factor VIIa. Este complejo entonces convierte los factores IX y X en sus formas activas. El factor Xa convierte cantidades limitadas de protrombina en trombina en la célula de soporte del factor tisular. La trombina activa las plaquetas y los factores V y VIII en factores Va y VIIIa, ambos cofactores en el proceso adicional que conduce a la explosión completa de la trombina. Este proceso incluye la generación del factor Xa por el factor IXa (en un complejo con el factor VIIIa) y ocurre en la superficie de las plaquetas activadas. La trombina finalmente convierte el fibrinógeno en fibrina resultando en la formación de un coágulo de fibrina. En los últimos años, el factor VII y el factor tisular se han revelado ser los iniciadores principales de la coagulación sanguínea.

El factor VII es una glicoproteína plasmática de traza que circula en la sangre como un zimógeno monocatenario. El zimógeno es inactivo catalíticamente. El factor VII monocatenario puede ser convertido en el factor VIIa bicatenario por el factor Xa, el factor XIIIa, el factor IXa, el factor VIIa o la trombina *in vitro*. Se considera el factor Xa el mayor activador fisiológico del factor VII. Como otras varias proteínas plasmáticas implicadas en la hemostasis, el factor VII depende de la vitamina K para su actividad, que se requiere para la gamma-carboxilación de residuos múltiples de ácido glutámico que se agrupan cerca del amino-terminal de la proteína. Estos ácidos glutámicos gamma-carboxilados se requieren para la interacción inducida por iones metálicos del factor VII con fosfolípidos. La conversión del factor VII de zimógeno en la molécula bicatenaria activada se produce por la ruptura de un enlace peptídico interno Arg₁₅₂-Ile₁₅₃. En presencia del factor tisular, fosfolípidos y de un enlace peptídico interno Arg₁₅₂-Ile₁₅₃. En presencia del factor tisular, de fosfolípidos y de iones de calcio, el factor VIIa bicatenario activa rápidamente el factor X o el factor IX por proteólisis limitada.

Frecuentemente es deseable estimular o mejorar la cascada de coagulación en un sujeto. El factor VIIa ha sido utilizado para controlar los trastornos de sangrado que tienen varias causas tales como deficiencias de factor de coagulación (p. ej. hemofilia A y B o deficiencia de factores de coagulación XI o VII) o inhibidores de factor de coagulación. El factor VIIa ha sido usado también para controlar la hemorragia excesiva que se produce en sujetos con una cascada de coagulación de sangre que funciona normalmente (sin deficiencias de factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación). Este tipo de sangrado puede, por ejemplo, ser causado por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. El sangrado también es un problema importante en relación con la cirugía y otras formas de daños a tejidos.

La patente europea n°. 200,421 (ZymoGenetics) se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica el factor humano VII y la expresión recombinante del factor VII en células mamíferas.

Dickinson *et al.* (Proc. Nati. Acad. Sci. EEUU (1996) 93, 14379-14384) se refiere a una variante del factor VII donde Leu305 ha sido reemplazado por Ala (FVII(Ala305)).

Iwanaga *et al.* (Tromb. Haemost. (supplement August 1999), 466, abstract 1474) se refiere a variantes de factor VIIa donde se suprimen los residuos 316-320 o se reemplazan los residuos 311-322 por residuos correspondientes de tripsina.

Las solicitudes de patente internacionales WO 01/83725 y WO 02/22776 se refieren a variantes de factor VIIa con actividad aumentada.

Existe una necesidad de variantes de factor VIIa con una actividad coagulante, variantes de actividad alta que se pueden administrar en dosis relativamente bajas, y variantes que no producen los efectos secundarios indeseables como la activación sistémica del sistema de coagulación y del sangrado, respectivamente, asociados con terapias convencionales.

Descripción de la invención

Se ha descubierto ahora que las variantes de polipéptidos del factor VIIa de coagulación humana, donde los aminoácidos Phe374 Leu305 y Ser314, de la SEC ID NO:1 se sustituyen por diferentes aminoácidos, han aumentado la actividad coagulante en comparación con el factor VIIa de coagulación humana de tipo salvaje.

Los términos “un aminoácido diferente” como se utilizan en este caso definen un aminoácido que es diferente a ese aminoácido presente naturalmente en esta posición. Esto incluye pero no se limita a éstos, aminoácidos que pueden ser codificados por un polinucleótido. En una forma de realización el término “actividad” diferente como se utiliza en este caso define la capacidad de un polipéptido del factor VII para convertir su factor X de sustrato en el factor Xa activo. La actividad de un polipéptido del factor VII puede ser medida con el “*Ensayo de proteólisis in vitro*” (véase el Ejemplo 4).

Los términos “actividad inherente” también incluyen la capacidad para generar trombina en la superficie de plaquetas activadas en la ausencia del factor tisular.

El residuo Phe374 se sitúa en el extremo de un α -hélix a partir del residuo 307. Este α -hélix se encuentra en forma de complejo del factor VIIa. En el factor VIIa libre (factor VIIa no ligado al factor tisular) el hélix está distorsionado y en consecuencia es posiblemente inestable. Se cree que el hélix es importante para la actividad. Las variantes según la presente invención pueden conseguir la conformación activa, la cual normalmente tiene que ser inducida por el factor tisular.

La actividad aumentada puede ser debida a una estabilización del α -hélix a partir del residuo 307, una reorientación del hélix o cualquier otro cambio en la conformación. El reemplazo del residuo Phe374 situado en el extremo del hélix, inducirá una reorientación y/o estabilización del hélix.

Debido a la actividad inherente más alta de la variante del factor VIIa descrita en comparación con el factor VIIa nativo, una dosis inferior será adecuada para obtener una concentración adecuada funcionalmente en el sitio de acción y se podrá así administrar una dosis inferior al sujeto que sufre hemorragias o que necesita una mejora del sistema hemostático normal.

El Leu305 se sitúa en el otro extremo de este α -hélix presente en forma de complejo de factor tisular del factor VIIa, que se considera importante para la actividad. La sustitución del Leu305 también puede inducir una reorientación y/o estabilización del hélix.

Los aminoácidos comprendiendo Lys157, Ser314, Lys337, Asp334, Ser336, Val158, Glu296, y Met298 se sitúan en una área prevista para incidir en la inserción del amino terminal del dominio de proteasa y de este modo en la formación de la conformación activa catalíticamente del factor VIIa que depende de un puente salino entre el grupo amino terminal de Ile153 y la cadena lateral de Asp343. Los reemplazos pueden eliminar repulsiones electroestáticas, añadir enlaces de hidrógeno o por otra parte facilitar la inserción del amino terminal.

Debido a la actividad inherente más alta de las variantes de polipéptidos del factor VIIa descritas en comparación con el FVIIa nativo, una dosis inferior puede ser adecuada para obtener una concentración adecuada funcionalmente en el sitio de acción y por consiguiente será posible administrar una dosis inferior al sujeto que sufre episodios de sangrado o que necesita una mejora del sistema hemostático normal.

Los presentes inventores han descubierto que para sustituir el aminoácido PHe374 en combinación con uno o más Lys en la posición 157 y Lys en la posición 337 y Val en la posición 158 y Glu en la posición 296 y Met en la posición 298 y Asp en la posición 334 y Ser en la posición 336 y Leu en la posición 305 y Ser en la posición 314, el factor VIIa alcanzará espontáneamente una conformación más activa que tiene que ser inducida normalmente por el factor tisular. Tales variantes de polipéptidos del factor VIIa muestran una actividad inherente que puede ser útil terapéuticamente en situaciones donde la actividad procoagulante es independiente del factor tisular (generación de factor Xa en la superficie de plaqueta), como durante la administración de dosis altas, por ejemplo, NovoSeven[®].

En otra forma de realización, la sustitución adicional de aminoácidos en el dominio proteasa facilitan aún más la formación de la conformación activa de la molécula. Se considera, no obstante, que los efectos más prominentes se verán cuando se realicen las mutaciones mencionadas anteriormente en la proximidad (secuencial o tridimensional) de estos últimos siete aminoácidos.

La invención comprende además el reemplazo de algunos aminoácidos en el dominio Gla N-terminal (aminoácidos en posición correspondiente a 1-37 de la SEC ID NO:1) de factor VIIa puede proveer la proteína con una afinidad sustancialmente superior para los fosfolípidos de membrana, tales como fosfolípidos de membrana de células de soporte del factor tisular o de plaquetas, generando así variantes de polipéptidos del factor VII que tienen un efecto procoagulante mejorado.

En consecuencia, las variantes del polipéptido del factor VIIa mencionadas anteriormente pueden, además de la sustitución de aminoácidos ya realizada en la posición F374 en combinación con reemplazos en las posiciones L305; S314; K157; K337; D334; S336; V158; E296, y M298 y sustituciones de aminoácidos opcionales en otra parte del

ES 2 339 393 T3

dominio proteasa, tener también al menos un aminoácido reemplazado en el dominio Gla N-terminal, obteniendo así una proteína que tiene una actividad aumentada al igual que una afinidad aumentada para los fosfolípidos de membrana en comparación con el factor VII nativo. Preferiblemente los aminoácidos en posiciones 10 y 32 (en referencia a la SEC ID NO:1) del factor VII pueden ser reemplazados por un aminoácido diferente. Ejemplos de aminoácidos preferidos que deben ser incorporados en las posiciones mencionadas anteriormente son: el aminoácido Pro en posición 10 se sustituye por Gln, Arg, His, Gln, Asn o Lys; y/o el aminoácido Lys en posición 32 se sustituye por Glu, Gln o Asn.

Otros aminoácidos en el dominio Gla, basados en las diferentes afinidades de fosfolípidos y secuencias de las proteínas de plasma dependientes de la vitamina K, también pueden ser consideradas para la sustitución.

El término “dominio GLA N-terminal” significa la secuencia de aminoácidos 1-37 de factor VII.

La indicación de tres letras “GLA” significa ácido 4-carboxiglutámico (γ -carboxiglutamato).

El término “dominio proteasa” define la secuencia de aminoácidos 153-406 de factor VII (la cadena pesada del factor VIIa).

El término “polipéptido del factor VII” como se utiliza en este caso define cualquier proteína comprendiendo la secuencia de aminoácidos 1-406 del factor humano VII nativo (SEC ID NO: 1) o variantes de ésta. Lo cual incluye pero no se limita a esto, el factor VII humano, el factor VIIa humano y variantes de éstos.

El término “factor VII” como se utiliza en este caso se destina a incluir la molécula inactiva de monocatenaria del factor VII zimógeno así como la molécula activada bicatenaria del factor VII (factor VIIa). Esto incluye proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos 1-406 del factor humano VII nativo o.

El término “dominio proteasa” define la secuencia de aminoácidos 153-406 del factor VII (la cadena pesada del factor VIIa).

El término “polipéptido del factor VII” como se utiliza en este caso significa cualquier proteína que comprende la secuencia de aminoácidos 1-406 del factor humano VII nativo (SEC ID NO: 1) o variantes en esto. Esto incluye pero no se limita al factor humano VII, al factor humano VIIa y a las variantes en esto.

El término “factor VII” como se utiliza en este caso se destina a incluir la molécula inactiva de una cadena del factor VII zimógeno así como la molécula activada bicatenaria del factor VII (factor VIIa). Esto incluye proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos 1-406 del factor humano VII nativo o del factor VIIa. También incluye proteínas con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal modificado incluyendo deleciones de aminoácidos N-terminal o adiciones siempre que estas proteínas retengan sustancialmente la actividad del factor VIIa. El término “factor VIIa”, o “FVIIa” como se utiliza en este caso define un producto que consiste en la forma activada (factor VIIa). “Factor VII” o “factor VIIa” según la definición más arriba también incluye las variaciones alélicas naturales que pueden existir y ocurrir de un individuo a otro. Además, el grado y la ubicación de glicosilación u otras modificaciones postranslacionales pueden variar dependiendo de las células huéspedes seleccionadas y de la naturaleza del entorno celular huésped.

Los términos “variante” o “variantes”, como se utilizan en este caso, se destinan a designar el factor VII que tiene la secuencia de la SEC ID NO: 1, donde uno o más aminoácidos de la proteína progenitora han sido sustituidos por otro aminoácido y/o donde uno o más aminoácidos de la proteína progenitora han sido delecionados y/o donde uno o más aminoácidos han sido insertados en la proteína y/o donde uno o más aminoácidos han sido añadidos a la proteína progenitora. Tal adición puede tener lugar bien en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la proteína progenitora o en ambos. La “variante” o “variantes” según esta definición todavía tienen una actividad FVII en su forma activada. En una forma de realización una variante es 70% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO:1. En una forma de realización una variante es 80% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO:1. En otra forma de realización una variante es 90% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO:1. En otra forma de realización una variante es 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO:1.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido del factor VII con al menos tres sustituciones en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) el reemplazo de F374 por cualquier otro aminoácido (ii) el reemplazo de S314 por cualquier otro aminoácido y (iii) el reemplazo de L305 por cualquier otro aminoácido.

En otro aspecto, la invención se refiere a un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del factor VII comprendiendo al menos tres sustituciones en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1 donde dichas sustituciones son (i) el reemplazo de F374 por cualquier otro aminoácido, (ii) el reemplazo de S314 con cualquier otro aminoácido y (iii) el reemplazo de L305 por cualquier otro aminoácido.

El término “constructo” se destina a indicar un segmento polinucleótido que puede basarse en una secuencia de nucleótidos completa o parcial de origen natural que codifica el polipéptido de interés. El constructo puede contener opcionalmente otros segmentos de polinucleótidos. De manera similar, los términos “aminoácidos que pueden ser codificados por constructos polinucleótidos” definen los aminoácidos que pueden ser codificados por los constructos

ES 2 339 393 T3

polinucleótidos definidos más arriba, es decir, aminoácidos tales como Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

5 En otro aspecto, la invención provee un vector recombinante comprendiendo el constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del factor VII.

10 El término “vector”, como se utiliza en este caso, define cualquier entidad de ácido nucleico capaz de producir la amplificación en una célula huésped. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe en forma de entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser un vector que, cuando es introducido en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto all/a los cromosoma(s) en lo(s) que se ha integrado. La elección del vector dependerá frecuentemente de la célula huésped en la que se debe introducir. Los vectores incluyen, pero no se limitan a éstos, vectores plásmidos, vectores fágicos, virus o vectores cósmidos. Los vectores normalmente contienen un origen de la replicación y al menos un gen seleccionable, es decir, un gen que codifica un producto que es fácil de detectar o la presencia de lo que es esencial para el crecimiento celular.

20 En otro aspecto, la invención provee una célula huésped recombinante comprendiendo el constructo polinucleótido o el vector. En una forma de realización la célula huésped recombinante es una célula eucariótica. En otra forma de realización la célula huésped recombinante es de origen mamífero. En otra forma de realización la célula huésped recombinante se selecciona en el grupo que consiste en células CHO, células HEK y células BHK.

25 Los términos “una célula huésped”, como se utilizan en este caso, definen cualquier célula, incluyendo células híbridas, en las que el ADN heterólogo puede ser expresado. Las células huéspedes típicas incluyen, pero no se limitan a éstas, células de insectos, células de levadura, células mamíferas, incluyendo células humanas, tales como células BHK, CHO, HEK, y COS. En la práctica de la presente invención, las células huéspedes cultivadas son preferiblemente células mamíferas, más preferiblemente una línea celular de mamífero establecida, incluyendo, sin limitación, líneas celulares CHO (p. Ej., ATCC CCL 61), COS-1 (p. Ej., ATCC CRL 1650), riñón de bebé hámster (BHK) y HEK293 (p. Ej., ATCC CRL 1573; Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Una línea celular BHK preferida es la línea celular tk-ts13 BHK (Waechter y Baserga, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:1106-1110, 1982), de ahora en adelante referidas como células BHK 570. La línea celular BHK 570 es disponible en American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, con el número de acceso ATCC,CRL 10314. Una línea celular tk-ts13 BHK también es disponible a partir del número de acceso ATCC, CRL 1632. Otras líneas celulares adecuadas incluyen, sin limitación, Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) y células DUKX (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. US 77:4216-4220, 1980). Las células 3T3, las células Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células también son útiles.

40 En otro aspecto, la invención proporciona un animal no-humano transgénico que contiene y expresa el constructo polinucleótido.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir el polipéptido del factor VII de la invención, el método comprendiendo el cultivo de una célula comprendiendo el constructo polinucleótido en un medio de crecimiento apropiado en condiciones que permiten la expresión del constructo polinucleótido y la recuperación del polipéptido resultante del medio de cultivo.

Como se utiliza en este caso, el término “medio de crecimiento apropiado” define un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células y la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido del factor VII de la invención.

50 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir el polipéptido del factor VII, el método comprendiendo la recuperación del polipéptido de la leche producida por el animal transgénico.

55 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica comprendiendo un polipéptido del factor VII que comprende al menos tres sustituciones en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) el reemplazo de F374 por cualquier otro aminoácido, (ii) el reemplazo de S314 por cualquier otro aminoácido y (iii) el reemplazo de L305 por cualquier otro aminoácido.

60 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un polipéptido del factor VII comprendiendo al menos tres sustituciones en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) el reemplazo de F374 por cualquier otro aminoácido (ii) el reemplazo de S314 por cualquier otro aminoácido y (iii) el reemplazo de L305 por cualquier otro aminoácido para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de sangrado o episodios de sangrado o para la mejora del sistema hemostático normal. En una forma de realización el uso es para el tratamiento de la hemofilia A o B.

65 En el presente contexto, el término “tratamiento” está destinado a incluir ambas la prevención de un sangrado esperado, como en cirugía, y la regulación de un sangrado que se está produciendo, como en un traumatismo, con el propósito de inhibir o minimizar el sangrado. La administración profiláctica del polipéptido del factor VIIa según la invención se incluye así en el término “tratamiento”.

ES 2 339 393 T3

Los términos “episodios de sangrado” están destinados a incluir un sangrado descontrolado y excesivo. Los episodios de sangrado pueden ser un problema más importante tanto con respecto a la cirugía como a otras formas de daños a tejidos. El sangrado descontrolado y excesivo puede producirse en sujetos que tienen un sistema de coagulación normal y en sujetos que tienen trastornos de coagulación o de sangrado. Como se utiliza en este caso, los términos “trastorno de sangrado” reflejan cualquier defecto, congénito, adquirido o inducido, de origen celular o molecular que se manifiesta en sangrados. Unos ejemplos son las deficiencias del factor de coagulación (p. Ej. hemofilia A y B o deficiencia de factores de coagulación XI o VII), los inhibidores del factor de coagulación, la función plaquetaria defectuosa, la trombocitopenia o la enfermedad de von Willebrand.

Las hemorragias excesivas también se producen en sujetos que tienen una cascada de coagulación de sangre de funcionamiento normal (sin deficiencia del factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación) y pueden ser causadas por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. En casos de este tipo, los sangrados pueden ser comparados con los sangrados causados por la hemofilia, ya que el sistema hemostático, como en la hemofilia, carece de o tiene “compuestos” de coagulación esenciales anormales (tales como plaquetas o proteína de factor de von Willebrand) que producen hemorragias graves. En los sujetos que experimentan un daño de tejidos extensivo relacionado con la cirugía o un traumatismo importante, el mecanismo hemostático normal puede ser abrumado por la demanda de hemostasis inmediata y éstos pueden desarrollar un sangrado a pesar de un mecanismo hemostático normal. Se trata de una terapia para prevenir una enfermedad tromboembólica. Este tipo de terapia puede incluir heparina, otras formas de proteoglicanos, warfarina u otras formas de antagonistas de vitamina K así como aspirina y otros inhibidores de agregación plaquetaria.

En una forma de realización de la invención, el sangrado se asocia con la hemofilia. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con la hemofilia con inhibidores adquiridos. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con la trombocitopenia. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con la enfermedad de von Willebrand. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con un daño tisular severo. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con un traumatismo severo. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con la cirugía. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con la cirugía laparoscópica. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con la gastritis hemorrágica. En otra forma de realización, el sangrado es el sangrado uterino profuso. En otra forma de realización, el sangrado se produce en órganos con una posibilidad limitada de hemostasis mecánica. En otra forma de realización, el sangrado se produce en el cerebro, en la región de oreja interna o en los ojos. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con el proceso de toma de biopsias. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con una terapia anticoagulante.

El término “sujeto” como se utiliza en este caso se destina a designar cualquier animal, en particular mamíferos, tales como seres humanos, y, puede, donde sea apropiado, ser utilizado indistintamente con el término “paciente”.

El término “mejora del sistema hemostático normal” define una mejora de la capacidad para generar trombina.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento de trastornos de sangrado o episodios de sangrado en un sujeto o para la mejora del sistema hemostático normal, el método comprendiendo la administración de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un polipéptido del factor VII comprendiendo al menos dos sustituciones en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1, donde dichas sustituciones son (i) el reemplazo de F374 por cualquier otro aminoácido, y (ii) el reemplazo por cualquier otro aminoácido de uno o más aminoácidos seleccionados en el grupo que consiste en L305; S314; K157; K337; D334; S336; V158; E296, y M298; a un sujeto que necesite los mismos.

En otro aspecto, la invención se refiere al polipéptido del factor VII de la invención para su uso como medicamento.

En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde F374 se sustituye por cualquier otro aminoácido y L305 se sustituye por cualquier otro aminoácido.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde F374 se sustituye por cualquier otro aminoácido y S314 se sustituye por cualquier otro aminoácido.

Los términos “mejora del sistema hemostático normal” significa una mejora de la capacidad para generar trombina.

En otro aspecto, la invención se refiere al polipéptido del factor VII de la invención para un uso como medicamento.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde F374 se sustituye por cualquier otro aminoácido y L305 se sustituye por cualquier otro aminoácido y S314 se sustituye por cualquier otro aminoácido y K157 se sustituye por cualquier otro aminoácido.

En una forma de realización más de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde F374 se sustituye por cualquier otro aminoácido y L305 se sustituye por cualquier otro aminoácido y S314 se sustituye por cualquier otro aminoácido y K337 se sustituye por cualquier otro aminoácido.

ES 2 339 393 T3

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde F374 se sustituye por cualquier otro aminoácido y L305 se sustituye por cualquier otro aminoácido y S314 se sustituye por cualquier otro aminoácido y D334 se sustituye por cualquier otro aminoácido.

5 En una forma de realización más de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde F374 se sustituye por cualquier otro aminoácido y L305 se sustituye por cualquier otro aminoácido y S314 se sustituye por cualquier otro aminoácido y S336 se sustituye por cualquier otro aminoácido.

10 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde F374 se sustituye por cualquier otro aminoácido y L305 se sustituye por cualquier otro aminoácido y S314 se sustituye por cualquier otro aminoácido y V158 se sustituye por cualquier otro aminoácido.

15 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde F374 se sustituye por cualquier otro aminoácido y L305 se sustituye por cualquier otro aminoácido y S314 se sustituye por cualquier otro aminoácido y E296 se sustituye por cualquier otro aminoácido.

20 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde F374 se sustituye por cualquier otro aminoácido y L305 se sustituye por cualquier otro aminoácido y S314 se sustituye por cualquier otro aminoácido y M298 se sustituye por cualquier otro aminoácido.

25 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio proteasa ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido. En una forma de realización, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio proteasa ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido.

30 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos 20 aminoácidos adicionales en las posiciones restantes en el dominio proteasa han sido reemplazados por cualesquiera otros aminoácidos.

35 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 159-170 de la SEC ID NO:1 ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido.

40 En otra forma de realización más de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 290-304 de la SEC ID NO: 1 ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido.

45 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde R304 ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido. En una forma de realización, R304 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Tyr, Phe, Leu, y Met.

50 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 306-312 de la SEC ID NO:1 ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido.

55 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde M306 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Asp, y Asn.

60 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde D309 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Ser, y Thr.

65 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 330-339 de la SEC ID NO:1 ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho D334 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Gly, y Glu.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho S336 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho S336 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Gly, y Glu.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho V158 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Ala, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

ES 2 339 393 T3

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho V158 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.

5 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho E296 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

10 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho E296 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Arg, Lys, y Val.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho M298 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

15 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho M298 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Lys, Arg, Gln, y Asn.

20 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho L305 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Ala, Val, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho L305 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Val, Tyr y Ile.

25 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho L305 ha sido reemplazado por Val.

30 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho S314 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho S314 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Gly, Lys, Gln y Glu.

35 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho F374 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ile, Met, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

40 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho F374 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Pro y Tyr.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el aminoácido ha sido reemplazado por un aminoácido distinto que puede ser codificado por constructos polinucleótidos.

45 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho polipéptido del factor VII es el factor VII humano.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho polipéptido del factor VII es el factor VIIa humano.

50 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 1,25. En una forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 2,0. En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 4,0.

60 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 1,25 cuando se evalúa en un ensayo de actividad del factor VIIa. En una forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 2,0 cuando se evalúa en un ensayo de actividad del factor VIIa. En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 4,0 cuando se evalúa en un ensayo de actividad del factor VIIa. La actividad del factor VIIa puede ser medida por los ensayos descritos en los ejemplos 3 o 4.

ES 2 339 393 T3

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 1,25 cuando se evalúa en el “ensayo de hidrólisis *in vitro*”. En una forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 2,0 cuando se evalúa en el “ensayo de hidrólisis *in vitro*”. En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 4,0 cuando se evalúa en el “ensayo de hidrólisis *in vitro*”.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 1,25 cuando se evalúa en el “ensayo de proteolisis *in vitro*”. En una forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 2,0 cuando se evalúa en el “ensayo de proteolisis *in vitro*”. En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 4,0 cuando se evalúa en el “ensayo de proteolisis *in vitro*”. En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 8,0 cuando se evalúa en el “ensayo de proteolisis *in vitro*”.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es FVII humano con al menos dos sustituciones en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) F374Y y (ii) uno o más aminoácidos seleccionados en el grupo que consiste en K157X¹, K337A, D334X², S336X³, V158X⁴, E296V, M298Q, L305V, S314E, donde X¹ es Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, o Glu; X² es Gly o Glu; X³ es Gly o Glu; X⁴ es Thr o Asp.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/K337A-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/V158D-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/E296V-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/M298Q-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/V158T-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V-FVII. La proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 4,0 cuando se evalúa en el “ensayo de proteolisis *in vitro*”. En una forma de realización más, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 8,0 cuando se evalúa en el “ensayo de proteolisis *in vitro*”.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es FVII humano con al menos cuatro sustituciones con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) F374Y (ii) S314E, (iii) L305V y (iv) uno o más aminoácidos seleccionados en el grupo que consiste en K157X¹, K337A, D334X², S336X³, V158X⁴, E296V, M298Q, donde X¹ es Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, o Glu; X² es Gly o Glu; X³ es Gly o Glu; X⁴ es Thr o Asp.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII.

ES 2 339 393 T3

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII.

5 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/N158T/K337A/S314E-FVII.

10 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII.

15 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII.

20 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII.

25 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII.

30 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII.

35 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII.

40 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es FVII humano con

(i) las sustituciones de aminoácidos F374Y, L305V y S314E en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y

45 (ii) una sustitución de aminoácidos independientemente seleccionada a partir de cualquier combinación según la tabla 1.

50 En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es FVII humano con

(i) las sustituciones de aminoácidos, F374Y, L305V y S314V en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y

55 (ii) dos sustituciones de aminoácidos independientemente seleccionadas a partir de cualquier combinación según la tabla 1.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es FVII humano con

60 (i) las sustituciones de aminoácidos, F374Y, L305V y S314V en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y

65 (ii) tres sustituciones de aminoácidos seleccionadas independientemente a partir de cualquier combinación según la tabla 1.

ES 2 339 393 T3

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es FVII humano con

- (i) las sustituciones de aminoácidos, F374Y, L305V y S314V en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y
- (ii) cuatro sustituciones de aminoácidos seleccionadas independientemente a partir de cualquier combinación según la tabla 1.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es FVII humano con

- (i) las sustituciones de aminoácidos, F374Y, L305V y S314V en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y
- (ii) cinco sustituciones de aminoácidos seleccionadas independientemente a partir de cualquier combinación según la tabla 1.

En una forma de realización más de la invención, el polipéptido del factor VII es FVII humano con

- (i) las sustituciones de aminoácidos, F374Y, L305V y S314V en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y
- (ii) seis sustituciones de aminoácidos seleccionadas independientemente a partir de cualquier combinación según la tabla 1.

En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es FVII humano con

- (i) las sustituciones de aminoácidos, F374Y, L305V y S314V en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1, y
- (ii) siete sustituciones de aminoácidos seleccionadas independientemente a partir de cualquier combinación según la tabla 1.

Tabla 1

especificidad de sustrato. En otro aspecto de la invención, la unión de las variantes de polipéptidos al factor tisular no debería ser deteriorada y las variantes de polipéptidos deberían tener al menos la actividad del factor VIIa de tipo salvaje cuando se unen al factor tisular.

La terminología para sustituciones de aminoácidos usada en esta descripción es tal como se menciona a continuación. La primera letra representa el aminoácido presente naturalmente en una posición de la SEC ID NO:1. El número siguiente representa la posición en la SEC ID NO: 1. La segunda letra representa el aminoácido diferente de sustitución del aminoácido natural. Un ejemplo es L305V/K337A-FVII, la leucina en la posición 305 de la SEC ID NO:1 se sustituye por una valina y la lisina en la posición 337 de la SEC ID NO:1 se sustituye por una alanina, ambas mutaciones en la misma variante del polipéptido del factor VII.

En el contexto presente las indicaciones de tres letras o de una letra de los aminoácidos han sido usadas en su significado convencional como indicado en la tabla 2. A menos que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionados aquí son L-aminoácidos. Además, en los extremos de izquierda y derecha de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, los N- y C-terminales a menos que se especifique lo contrario.

ES 2 339 393 T3

TABLA 2

Abreviaturas para los aminoácidos

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Glicina	Gly	G
Prolina	Pro	P
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Tirosina	Tyr	Y
Triptófano	Trp	W
Histidina	His	H
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Glutamina	Gln	Q
Asparagina	Asn	N
Ácido Glutámico	Glu	E
Ácido Aspártico	Asp	D
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T

Preparación de las variantes de polipéptidos del factor VII

La invención también se refiere a un método para preparar variantes de polipéptidos del factor VII humano como se ha mencionado anteriormente. Las variantes de polipéptidos del factor VII descritas aquí pueden ser producidas por medio de técnicas de ácido nucleico recombinante. En general, una secuencia clonada de ácido nucleico del factor VII de tipo salvaje se modifica para codificar la proteína deseada. Esta secuencia modificada se inserta entonces en un vector de expresión, el cual sucesivamente es transformado o transfectado en células huéspedes. Las células eucarióticas superiores, en particular las células mamíferas cultivadas, son preferidas como células huéspedes. Las secuencias completas de nucleótidos y de aminoácidos para el factor VII humano son conocidas (véase US 4,784,950, donde se describe la clonación y la expresión del factor VII humano recombinante). La secuencia del factor VII bovino se describe en Takeya *et al.*, J. Biol. Chem. 263:14868-14872 (1988)).

Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos pueden ser realizadas por una variedad de técnicas. La modificación de la secuencia de ácido nucleico puede ser por mutagénesis específica de sitio. Las técnicas de mutagénesis específica de sitio son muy conocidas en la técnica y se describen en, por ejemplo, Zoller and Smith (DNA 3:479-488, 1984) o "Splicing by extensión overlap", Horton *et al.*, Gene 77, 1989, páginas. 61-68. Por lo que, a través del uso de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del factor VII, se puede introducir alteración(es) de elección. Asimismo, los procedimientos para preparar un constructo de ADN usando la reacción en cadena de polimerasa con el uso de cebadores específicos son conocidos por los expertos en la técnica (véase PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, EEUU).

El constructo de ácido nucleico que codifica la variante del polipéptido del factor VII de la invención puede ser de forma apropiada de origen genómico o de ADNc, por ejemplo obtenido a través de la preparación de una genoteca genómica o de ADNc y la detección de secuencias de ADN que codifican todo o parte del polipéptido por hibridación usando sondas de oligonucleótidos sintéticas conformemente a técnicas estándares (véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

El constructo de ácido nucleico que codifica la variante del polipéptido del factor VII puede también ser preparado sintéticamente por métodos estándares establecidos, p. Ej. el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. Según el método de fosfoamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, p. ej. en un sintetizador automático de ADN, purificado, recocido, ligado y clonado en vectores adecuados. Las secuencias de ADN que codifican las variantes del polipéptido del factor humano VII también pueden ser preparadas por reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en US 4,683,202, Saiki *et al.*, Science 239 (1988), 487 - 491, o Sambrook *et al.*, *supra*.

Además, el constructo de ácido nucleico puede ser de origen sintético y genómico mezclado, sintético y ADNc mezclado o genómico y ADNc mezclado, preparado por ligar fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (como apropiado), los fragmentos correspondientes a varias partes del constructo entero de ácidos nucleicos, conformemente a técnicas estándares.

El constructo de ácido nucleico es preferiblemente un constructo de ADN. Las secuencias de ADN para el uso en la producción de variantes de polipéptidos del factor VII según la presente invención codificarán típicamente un polipéptido pre-pro en el amino-terminal del factor VII para obtener el proceso postranslacional adecuado (p. ej. gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico) y secreción de la célula huésped. El polipéptido pre-pro puede ser el del factor VII u otra proteína de plasma dependiente de vitamina K, tal como el factor IX, factor X, protrombina, proteína C o proteína S. Como podrán apreciar los expertos en la técnica, unas modificaciones adicionales pueden ser hechas en la secuencia de aminoácidos de las variantes de polipéptidos del factor VII donde estas modificaciones no perjudican significativamente la capacidad de la proteína para actuar como coagulante. Por ejemplo, las variantes de polipéptidos del factor VII pueden ser modificadas también en el sitio de corte de activación para inhibir la conversión del factor VII zimógeno en su forma bicatenaria activada, como se describe generalmente en US 5,288,629, incorporado aquí como referencia.

Las secuencias de ADN que codifican las variantes de polipéptidos del factor humano VII normalmente se insertan en un vector recombinante que puede ser cualquier vector, que convenientemente puede ser sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que debe ser introducido. Por lo que, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe en forma de entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser un vector, el cual, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto al/a los cromosoma(s) en el, lo(s) cual se ha integrado.

El vector es preferiblemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica las variantes de polipéptidos del factor VII humano está unido operativamente a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN. En general, el vector de expresión deriva del ADN plásmido o vírico, o puede contener elementos de ambos. Los términos "ligados operativamente" indica que los segmentos están dispuestos de modo que funcionen de forma concertada para conseguir sus objetivos, p. ej. la transcripción se inicia en un promotor y continúa a través de la secuencia de ADN codificante del polipéptido.

ES 2 339 393 T3

Los vectores de expresión para el uso en la expresión de las variantes de polipéptidos del factor VIIa comprenderán un promotor capaz de dirigir la transcripción de un gen clonado o ADNc. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestra una actividad transcripcional en la célula huésped seleccionada y puede derivar de los genes que codifican proteínas homologas o heterólogas a la célula huésped.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica la variante del polipéptido del factor humano VII en células mamíferas son el promotor SV40 (Subramani *et al.*, Mol. Cell Biol. 1 (1981), 854-864), el promotor MT-1 (gen de metalotioneína) (Palmiter *et al.*, Science 222 (1983), 809 - 814), el promotor CMV (Boshart *et al.*, Cell 41:521-530, 1985) o el promotor tardío mayor de adenovirus 2 (Kaufman y Sharp, Mol. Cell. Biol., 2:1304-1319, 1982).

Un ejemplo de promotor adecuado para el uso en células de insectos es el promotor de polihedrina (US 4,745,051; Vasuvedan *et al.*, FEBS Lett. 311, (1992) 7 - 11), el promotor P10 (J.M. Vlak *et al.*, J. Gen. Virology 69, 1988, Págs. 765-776), el promotor de proteína básica del virus de polihedrosis *Autographa californica* (EP 397 485), el promotor de gen 1 inmediato-precoz de baculovirus (US 5,155,037; US 5,162,222), o el promotor precoz-retrasado del gen baculovirus 39K (US 5,155,037; US 5,162,222).

Ejemplos de promotores adecuados para el uso en células huéspedes de levadura incluyen promotores de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255 (1980), 12073 - 12080; Alber y Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419 - 434) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young *et al.*, en Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender *et al.*, eds.) Plenum Press, Nueva York, 1982), o los promotores TPI1 (US 4,599,311) o ADH2-4c (Russell *et al.*, Nature 304 (1983), 652 - 654).

Ejemplos de promotores adecuados para el uso en células huéspedes de hongos filamentosos son, por ejemplo, el promotor ADH3 (McKnight *et al.*, The EMBO J. 4 (1985), 2093 - 2099) o el promotor *tpiA*. Ejemplos de otros promotores útiles son aquellos derivados del gen que codifica la amilasa de *A. oryzae* TAKA, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la α -amilasa neutral de *A. niger*, la α -amilasa estable en ácido de *A. niger*, la glucoamilasa de *A. niger* o de *A. awamori* (*gluA*), la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *A. oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o la acetamidasa de *A. nidulans*. Se prefiere los promotores de TAKA-amilasa y de *gluA*. Los promotores adecuados están mencionados en, p. ej. EP 238 023 y EP 383 779.

Las secuencias de ADN que codifican las variantes de polipéptidos del factor humano VII pueden también, si es necesario, estar conectadas operativamente a un terminador adecuado, tal como el terminador de la hormona de crecimiento humano (Palmiter *et al.*, Science 222, 1983, páginas. 809-814) o los terminadores TPI1 (Alber y Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1, 1982, Págs. 419-434) o ADH3 (McKnight *et al.*, The EMBO J. 4, 1985, Págs. 2093-2099). Los vectores de expresión también pueden comprender un conjunto de sitios de unión de ARN situados hacia abajo del promotor y hacia arriba a partir del sitio de inserción de la misma secuencia del factor VII. Sitios de empalme de ARN preferidos pueden ser obtenidos a partir de genes de adenovirus y/o de inmunoglobulina. También está contenida en los vectores de expresión una señal de poliadenilación situada hacia abajo del sitio de la inserción. Las señales de poliadenilación particularmente preferidas incluyen la señal de poliadenilación precoz o tardía de SV40 (Kaufman y Sharp, *ibid.*), la señal de poliadenilación de la región de adenovirus 5 Elb, el terminador de gen de hormona de crecimiento humano (DeNoto *et al.* Nucí. Acids Res. 9:3719-3730, 1981) o la señal de poliadenilación del gen de factor VII humano o del gen de factor VII bovino. Los vectores de expresión también pueden incluir una secuencia líder viral no codificante, tal como el líder tripartito de adenovirus 2, situada entre el promotor y los sitios de unión de ARN; y las secuencias potenciadoras, tal como el potenciador SV40.

Para dirigir las variantes de polipéptidos del factor humano VII de la presente invención en la vía secretora de las células huéspedes, una secuencia señal secretora (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) puede ser provista en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a las secuencias de ADN que codifican las variantes de polipéptidos del factor humano VII en el marco de lectura adecuado. Las secuencias señal secretoras normalmente tienen una posición 5' con respecto a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser que, normalmente asociada con la proteína o puede proceder de un gen que codifica otra proteína segregada.

Para segregar células de levadura, la secuencia señal secretora puede codificar cualquier péptido señal, que asegura la dirección eficiente de las variantes expresadas de polipéptidos del factor humano VII en la vía secretora de la célula. El péptido señal puede ser un péptido señal producido de forma natural, o una parte funcional de éste, o puede ser un péptido sintético. Los péptidos señal adecuados se revelaron ser el péptido señal *de α* -factor (véase US 4,870,008), el péptido señal de amilasa salival de ratón (véase O. Hagenbuchle *et al.*, Nature 289, 1981, Págs. 643-646), un péptido señal de carboxipeptidasa modificada (véase L.A. Valls *et al.*, Cell 48, 1987, Págs. 887-897), el péptido señal BAR1 de levadura (véase WO 87/02670), o el péptido señal de proteasa aspártica de levadura 3 (YAP3) (véase M. Egel-Mitani *et al.*, Yeast 6, 1990, Págs. 127-137).

Para una secreción eficiente en levadura, una secuencia de codificación de un péptido líder también puede ser insertada hacia abajo de la secuencia señal y hacia arriba de la secuencia de ADN de codificación de las variantes de polipéptidos del factor humano VII. La función del péptido líder es permitir que el péptido expresado sea dirigido desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi y después hacia una vesícula secretora para la secreción dentro del medio de cultivo (es decir, exportación de las variantes de polipéptidos del factor humano VII a través de

ES 2 339 393 T3

la pared celular o al menos a través de la membrana celular dentro del espacio periplásmico de la célula de levadura). El péptido líder puede ser el líder alfa-factor de levadura (cuyo uso se describe en p. ej. US 4,546,082, US 4,870,008, EP 16 201, EP 123 294, EP 123 544 y EP 163 529). Alternativamente, el péptido líder puede ser un péptido líder sintético, es decir, un péptido líder no presente en la naturaleza. Los péptidos líder sintéticos pueden, por ejemplo, ser
5 construidos tal como se describe en WO 89/02463 o WO 92/11378.

Para un uso en hongos filamentosos, el péptido señal puede derivar convenientemente de un gen de codificación de una amilasa o glucoamilasa de *Aspergillus* sp., un gen de codificación de una lipasa de *Rhizomucor miehei* o una proteasa o lipasa de *Humicola ianuginosa*. El péptido señal preferiblemente deriva de un gen que codifica una amilasa
10 TAKA de *A. oryzae*, una α -amilasa neutral de *A. niger*, una amilasa estable al ácido de *A. Niger*, o una glucoamilasa de *A. niger*. Los péptidos señal adecuados se divulgan en, p. ej. EP 238 023 y EP 215 594.

Para un uso en células de insecto, el péptido señal puede derivar convenientemente de un gen de insectos (véase WO 90/05783), tal como el péptido señal precursor de hormona adipocinética *Manduca sexta* de lepidóptero (véase
15 US 5,023,328).

Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN codificantes de las variantes del polipéptido del factor humano VII, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, y para su inserción en vectores adecuados comprendiendo la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por
20 los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Los métodos de transfección de células mamíferas y de expresión de secuencias de ADN introducidas en las células se describen en p. ej. Kaufman y Sharp, J. Mol. Biol. 159 (1982), 601 - 621; Southern y Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 327 - 341; Loyter *et al.*, Proc. Nati. Acad. Sci. EEUU 79 (1982), 422 - 426; Wigler *et al.*, Cell 14 (1978), 725; Corsaro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7 (1981), 603, Graham y van der Eb, Virology 52 (1973), 456; y Neumann *et al.*, EMBO J. 1 (1982), 841 - 845.

Las secuencias de ADN clonadas se introducen en células mamíferas cultivadas, por ejemplo, por transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler *et al.*, Cell 14:725-732, 1978; Corsaro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603-616, 1981; Graham y van der Eb, Virology 52d:456-467, 1973) o la electroporación (Neumann *et al.*, EMBO J. 1:841-845, 1982). Para identificar y seleccionar células que expresan el ADN exógeno, un gen que confiere un fenotipo seleccionable (un marcador seleccionable) generalmente se introduce en células junto con el gen o el ADNc de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen genes que confieren resistencia a fármacos tales como neomicina, higromicina, y metotrexato. El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Un marcador seleccionable amplificable preferido es una secuencia de dihidrofolato reductasa (DHFR). Los marcadores seleccionables son revisados por Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA, incorporados aquí como referencia). El experto en la técnica podrá elegir fácilmente marcadores seleccionables adecuados.

Los marcadores seleccionables pueden ser introducidos en la célula en un plásmido separado al mismo tiempo que el gen de interés, o pueden ser introducidos en el mismo plásmido. Si, en el mismo plásmido, el marcador seleccionable y el gen de interés pueden estar bajo el control de diferentes promotores o del mismo promotor, esta última disposición produciendo un mensaje dicistrónico. Tales constructos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Levinson y Simonsen, US 4,713,339). También puede ser ventajoso añadir ADN adicional, conocido como "ADN portador,"
45 a la mezcla que se introduce en las células.

Después de que las células hayan asimilado el ADN, éstas crecen en un medio de crecimiento apropiado, típicamente de 1-2 días, para iniciar la expresión del gen de interés. Como se utiliza en este caso los términos "medio de crecimiento apropiado" indican un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión de las variantes de polipéptidos del factor humano VII de interés. Los medios generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, azúcares esenciales, vitaminas, sales, fosfolípidos, proteínas y factores de crecimiento. Para la producción de proteínas gamma-carboxiladas, el medio comprenderá vitamina K, preferiblemente en una concentración de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$. La selección de fármacos se aplica entonces para seleccionar el crecimiento de células que están expresando el marcador seleccionable de forma estable. Para células que han sido transfectadas con un marcador seleccionable amplificable, la concentración del fármaco puede ser aumentada para seleccionar un número de copias en aumento de las secuencias clonadas, aumentando de este modo los niveles de expresión. Los clones de células transfectadas de manera estable son seleccionados entonces para la expresión de la variante de polipéptido del factor humano VII de interés.

La célula huésped en la que se introducen las secuencias de ADN de codificación de las variantes de polipéptidos del factor humano VII puede ser cualquier célula, que sea capaz de producir las variantes de polipéptidos del factor humano VII postranslacionales modificadas e incluya levadura, hongos y células eucarióticas superiores.

Ejemplos de líneas celulares mamíferas para un uso en la presente invención son las líneas celulares de COS-1 (ATCC CRL 1650), de riñón de bebé hámster (BHK) y 293 (ATCC CRL 1573; Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Una línea celular BHK preferida es la línea celular BHK tk-ts13 (Waechter y Baserga, Proc. Nati. Acad. Sci. US 79:1106-1110, 1982, incorporada aquí como referencia), referida a continuación como células BHK 570. La

ES 2 339 393 T3

línea celular BHK 570 ha sido depositada con la colección American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852, bajo el número de acceso de ATCC CRL 10314. Una línea celular BHK tk⁺ ts13 también está disponible bajo el número de acceso de ATCC CRL 1632. Además, una serie de otras líneas celulares puede ser usada en la presente invención, incluyendo células de Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), de pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 61) y DUKX (Urlaub y Chasin, Proc. Nati. Acad. Sci. US 77:4216-4220, 1980).

Ejemplos de células de levadura adecuadas incluyen células de *Saccharomyces* spp. o *Schizosaccharomyces* spp., en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces kluyveri*. Métodos para transformar células de levadura con ADN heterólogo y para producir polipéptidos heterólogos de éstas se describen, p. ej. en US 4,599,311, US 4,931,373, US 4,870,008, 5,037,743, y US 4,845,075, lo cual en conjunto se incorpora en la presente como referencia. Las células transformadas son seleccionadas por un fenotipo determinado por un marcador seleccionable, comúnmente resistente a los fármacos o que es capaz de crecer en ausencia de un nutriente particular, p. ej. leucina. Un vector preferido para el uso en la levadura es el vector POT1 descrito en US 4,931,373. Las secuencias de ADN de codificación de las variantes de polipéptidos del factor humano VII pueden ser precedidas por una secuencia señal y opcionalmente una secuencia líder, p. ej. como descrito anteriormente. Otros ejemplos de células de levadura adecuadas son cepas de *Kluyveromyces*, tales como *K. lactis*, *Hansenula*, p. ej. *H. polymorpha*, o *Pichia*, p. ej. *P. pastoris* (véase Gleeson *et al.*, J. Gen. Microbiol. 132, 1986, páginas 3459-3465; US 4,882,279).

Ejemplos de otras células de hongos son células de hongos filamentosos, p. ej. *Aspergillus* spp., *Neurospora* spp., *Fusarium* spp. o *Trichoderma* spp., en particular cepas de *A. oryzae*, *A. nidulans* o *A. Niger*. El uso de *Aspergillus* spp. para la expresión de proteínas se describe, p. ej. en EP 272 277, EP 238 023, EP 184 438. La transformación de *F. oxysporum*, por ejemplo, puede realizarse como descrito por Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156. La transformación de *Trichoderma* spp. puede ser realizada por ejemplo como se describe en EP 244 234.

Cuando se utiliza un hongo filamentosos como célula huésped, éste puede ser transformado con el constructo de ADN de la invención, convenientemente por integración del constructo de ADN en el cromosoma huésped para obtener una célula huésped recombinante. Esta integración se considera generalmente como una ventaja, ya que la secuencia de ADN tiene más probabilidad a ser mantenida de manera estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped puede ser realizada según los métodos convencionales, p. ej. por recombinación homóloga o heteróloga.

La transformación de células de insecto y asimismo producción de polipéptidos heterólogos pueden ser realizadas tal como se describe en US 4,745,051; US 4,879,236; US 5,155,037, 5,162,222; EP 397,485) todos incorporados aquí como referencia. La línea celular de insecto usada como el huésped adecuadamente puede ser una línea celular de Lepidoptera, tal como células de *Spodoptera frugiperda* o células de *Trichoplusia ni* (véase US 5,077,214). Las condiciones de cultivo adecuadamente pueden ser tal y como se describen en, por ejemplo, WO 89/01029 o WO 89/01028, o cualquiera de las referencias mencionadas anteriormente.

La célula huésped transformada o transfectada descrita anteriormente entonces se cultiva en un medio nutritivo adecuado en condiciones que permiten la expresión de la variante de polipéptido del factor humano VII después de la cual, todo o parte del péptido resultante puede ser recuperado del cultivo. El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para disponer las células huéspedes en crecimiento, tal como unos medios mínimos o complejos comprendiendo suplementos apropiados. Los medios adecuados son disponibles a través de proveedores comerciales o pueden ser preparados según fórmulas publicadas (p. ej. en catálogos de American Type Culture Collection). La variante del polipéptido del factor humano VII producida por las células entonces puede ser recuperada a partir del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo la separación de las células huéspedes del medio por centrifugación o filtración, precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado mediante una sal, p. ej. sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, p. ej. cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de gel filtración, cromatografía de afinidad, o similares, dependiendo del tipo de polipéptido en cuestión.

La tecnología de animales transgénicos puede ser empleada para producir las variantes de polipéptidos del factor VII de la invención. Se prefiere producir las proteínas dentro de las glándulas mamarias de un mamífero hembra huésped. La expresión en la glándula mamaria y la secreción posterior de la proteína de interés en leche supera muchas dificultades presentes en el aislamiento de proteínas de otras fuentes. La leche es recogida fácilmente, está disponible fácilmente en grandes cantidades, y está bien caracterizada bioquímicamente. Además, las principales proteínas de la leche están presentes en la leche en altas concentraciones (típicamente de aproximadamente 1 a 15 g/l).

Desde un punto de vista comercial, se prefiere claramente el uso como huésped de una especie que tenga un gran rendimiento de leche. Mientras que los animales más pequeños como ratones y ratas pueden ser usados (y son los preferidos en la prueba de la etapa de principio), se prefiere el uso de mamíferos de ganado incluyendo, pero sin limitarse a éstos, cerdos, cabras, ovejas y ganado vacuno. Las ovejas son particularmente preferidas debido a factores tales como los de la historia precedente de transgénesis en esta especie, rendimiento de la leche, coste y disponibilidad preparada de equipamiento para la recogida de leche de oveja (véase, por ejemplo, WO 88/00239 para una comparación de factores que influyen en la selección de especies huéspedes). Generalmente es deseable seleccionar una raza de animales huéspedes criados para el uso de la leche, como las ovejas Frisia Oriental, o para

ES 2 339 393 T3

introducir ganado lechero por crianza de la línea transgénica en una fecha tardía. En cualquier caso, se usará animales en buen estado de salud conocido.

5 Para obtener la expresión en la glándula mamaria, se utiliza un promotor de transcripción de un gen de proteína de leche. Los genes de proteína de leche incluyen esos genes de codificación de caseínas (véase US 5,304,489), beta-lactoglobulina, a-lactoalbúmina, y proteína de suero de leche ácida. Se prefiere el promotor de beta-lactoglobulina (BLG). En el caso del gen ovino de beta-lactoglobulina, se usará generalmente una región de al menos el proximal de 406 pb de secuencia flanqueadora 5' del gen, aunque se prefieren porciones mayores de secuencia flanqueadora 5', hasta aproximadamente 5kpb, tal como un segmento de ADN de ~4.25 kpb que incluye el promotor flanqueante 10 5' y la porción no codificante del gen de beta-lactoglobulina (véase Whitelaw *et al.*, Biochem. J. 286: 31-39 (1992)). Fragmentos similares de ADN promotor de otras especies también son adecuados.

Otras regiones del gen de beta-lactoglobulina también pueden ser incorporadas en los constructos, como las regiones genómicas del gen que debe ser expresado. Es generalmente aceptado en la técnica que los constructos que carecen de intrones, por ejemplo, se expresen poco en comparación con los que contienen tales secuencias de ADN (véase Brinster *et al.*, Proc. Nati. Acad. Sci. US 85: 836-840 (1988); Palmiter *et al.*, Proc. Nati. Acad. Sci. US 88: 478-482 (1991); Whitelaw *et al.*, Transgenic Res. 1: 3-13 (1991); WO 89/01343; y WO 91/02318, cada uno de éstos incorporado aquí como referencia). A este respecto, generalmente se prefiere, donde sea posible, usar secuencias genómicas comprendiendo todos o algunos de los intrones nativos de un gen de codificación de la proteína o polipéptido de interés, por lo que se prefiere otra inclusión de al menos algunos intrones de, p. ej., el gen de beta-lactoglobulina. Esta región es un segmento de ADN que provee la eliminación de intrones y la poliadenilación de ARN de la región no codificante 3' del gen de beta-lactoglobulina de ovino. Cuando se sustituye por secuencias no codificantes naturales 3' de un gen, este segmento de beta-lactoglobulina de ovino puede al mismo tiempo mejorar y estabilizar los niveles de expresión de la proteína o del polipéptido de interés. En otras formas de realización, la región alrededor de la iniciación ATG de la secuencia del factor VII variante es sustituida por secuencias correspondientes de un gen de proteína específica de la leche. Tal sustitución provee un entorno de iniciación específica putativa al tejido para mejorar la expresión. Es conveniente reemplazar el factor VII entero de variante pre-pro y las secuencias no codificadas 5' por las de, por ejemplo, el gen BLG, aunque las regiones más pequeñas pueden ser reemplazadas.

30 Para la expresión de variantes de polipéptidos del factor VII en animales transgénicos, un segmento de ADN de codificación de la variante del factor VII se une operativamente a segmentos de ADN adicionales requeridos para su expresión para producir unidades de expresión. Estos segmentos adicionales incluyen el promotor mencionado anteriormente, así como secuencias que proveen la terminación de la transcripción y la poliadenilación de ARNm. Las unidades de expresión incluyen también un segmento de ADN de codificación de una secuencia señal secretora unida 35 operativamente al segmento de codificación del factor VII modificado. La secuencia señal secretora puede ser una secuencia señal secretora del factor VII nativo o puede ser la de otra proteína, tal como una proteína de leche (véase, por ejemplo, von Heijne, Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986); y Meade *et al.*, US 4,873,316, que se incorporan aquí como referencia).

40 La construcción de unidades de expresión para su uso en animales transgénicos se realiza convenientemente por inserción de una secuencia variante del factor VII en un plásmido o vector de fago comprendiendo los segmentos de ADN adicionales, aunque la unidad de expresión puede ser construida por esencialmente cualquier secuencia de ligaduras. Es particularmente conveniente proveer un vector comprendiendo un segmento de ADN que codifica una proteína de leche y reemplazar la secuencia codificante para la proteína de leche por la secuencia de una variante del Factor VII; creando de este modo una fusión de genes que incluye las secuencias de control de la expresión del gen de proteína de leche. En cualquier caso, la clonación de las unidades de expresión en plásmidos u otros vectores facilita la amplificación de la secuencia del factor VII variante. La amplificación se realiza convenientemente en células huéspedes bacterianas (p. ej. *E. coli*), por lo que los vectores incluirán típicamente un origen de replicación y un marcador seleccionable funcional en células huéspedes bacterianas. La unidad de expresión se introduce entonces en huevos fertilizados (incluyendo embriones de fase inicial) de las especies huéspedes elegidas. Se puede conseguir la introducción de ADN heterólogo a través de una de varias vías, incluyendo la microinyección (p. ej. patente EEUU n°. 4,873,191), la infección retroviral (Jaenisch, Science 240: 1468-1474 (1988)) o la integración dirigida al sitio usando células madre embrionarias (ES) (revisada por Bradley *et al.*, Bio/Technology 10: 534-539 (1992)). Los huevos se implantan después en los oviductos o úteros de mujeres pseudogestantes y dispuestos para desarrollarse a largo plazo. 55 La descendencia que lleva el ADN introducido en su línea de germen puede pasar el ADN a su progenie en una forma mendeliana normal, permitiendo el desarrollo de rebaños transgénicos. Procedimientos generales para producir animales transgénicos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simons *et al.*, Bio/Technology 6: 179-183 (1988); Wall *et al.*, Biol. Reprod. 32: 645-651 (1985); Buhler *et al.*, Bio/Technology 8: 140-143 (1990); Ebert *et al.*, Bio/Technology 9: 835-838 (1991); Krimpenfort *et al.*, Bio/Technology 9: 844-847 (1991); Wall *et al.*, J. Cell. Biochem. 49: 113-120 (1992); US 4,873,191; US 4,873,316; WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; y GB 87/00458). Técnicas para introducir secuencias de ADN extranjeras en mamíferos y sus células germinales fueron desarrolladas originalmente en el ratón (véase, p. ej., Gordon *et al.*, Proc. Nati. Acad. Sci. US 77: 7380-7384 (1980); Gordon y Ruddle, Science 214: 1244-1246 (1981); Palmiter y Brinster, Cell 41: 343-345 (1985); Brinster *et al.*, Proc. Nati. Acad. Sci. US 82: 4438-4442 (1985); y Hogan *et al.* (*ibid.*)). Estas técnicas fueron adaptadas posteriormente para su uso con animales más grandes, incluyendo especies de ganadería (véase, p. ej., WO 88/00239, WO 90/05188, y WO 92/11757; y Simons *et al.*, Bio/Technology 6: 179-183 (1988)). Para resumir, en la vía más eficiente usada hasta la fecha en la generación de ratones transgénicos o ganado, se inyectan varios centenares de moléculas lineales del ADN de interés en uno de

los pro-núcleos de un huevo fertilizado según las técnicas establecidas. La inyección de ADN en el citoplasma de un cigoto también puede ser empleada.

La producción en plantas transgénicas también puede ser empleada. La expresión puede ser generalizada o dirigida a un órgano particular, tal como un tubérculo (véase, 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); y EP 0 255 378).

Las variantes de polipéptidos del factor VII de la invención se recuperan a partir del medio de cultivo celular o de la leche. Las variantes de polipéptidos del factor VII de la presente invención pueden ser purificadas por medio de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a éstos, la cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatoenfoco, y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparativo (IEF), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato de amonio), o extracción (véase, p. ej., *Protein Purification*, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989). Preferiblemente, pueden ser purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpos del anti-factor VII. Se prefiere particularmente el uso de anticuerpos monoclonales dependientes del calcio, como descrito por Wakabayashi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261:11097-11108; (1986) y Thim *et al.*, *Biochemistry* 27: 7785-7793; (1988). La purificación adicional puede ser conseguida por medios convencionales de purificación química, como la cromatografía líquida de alto rendimiento. Otros métodos de purificación, incluyendo la precipitación con citrato de bario, se conocen en la técnica, y se puede aplicar a la purificación de las nuevas variantes de polipéptidos del factor VII descritas aquí (véase, por ejemplo, Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982).

Con fines terapéuticos se prefiere que las variantes de polipéptidos del factor VII de la invención sean sustancialmente puras. Así, en una forma de realización preferida de la invención, se purifica las variantes de polipéptidos del factor VII de la invención en al menos aproximadamente el 90 al 95% de homogeneidad, preferiblemente al menos aproximadamente el 98% de homogeneidad. La pureza puede ser evaluada p. ej. por electroforesis en gel y secuenciación de aminoácidos amino-terminal.

La variante del Factor VII se divide en su sitio de activación para convertirla en su forma bicatenaria. La activación se puede realizar según los procedimientos conocidos en la técnica, como los que describen Osterud, *et al.*, *Biochemistry* 11:2853-2857 (1972); Thomas, patente US n.º. 4,456,591; Hedner y Kisiel, *J. Clin. Invest.* 71:1836-1841 (1983); o Kisiel y Fujikawa, *Behring Inst. Mitt.* 73:29-42 (1983). Alternativamente, como describen Bjoem *et al.* (*Research Disclosure*, 269 septiembre de 1986, Págs. 564-565), el factor VII puede ser activado a través del paso por una columna de cromatografía de intercambio iónico, tal como Mono Q[®] (Pharmacia fine Chemicals) o similares. La variante activada del factor VII resultante entonces puede ser formulada y administrada tal como se describe más abajo.

Ensayos

La invención también provee ensayos adecuados para seleccionar las variantes preferidas del factor VIIa según la invención. Estos ensayos pueden ser realizados como una prueba preliminar simple *in vitro*.

Así, el ejemplo 3 aquí divulga una prueba simple (titulada “ensayo de hidrólisis *in vitro*”) para la actividad de las variantes del factor VIIa de la invención. En base a esto, las variantes del factor VIIa que son de interés particular son aquellas variantes donde la proporción entre la actividad de la variante y la actividad del factor VII nativo mostrada en la Fig. 1 es superior a 1,0, p. ej. al menos aproximadamente 1,25, preferiblemente al menos aproximadamente 2,0, tal como al menos aproximadamente 3,0 o, aún más preferiblemente, al menos aproximadamente 4,0 cuando se evalúa en el “ensayo de hidrólisis *in vitro*”.

La actividad de las variantes también se puede medir utilizando un sustrato fisiológico tal como el factor X (“ensayo de proteólisis *in vitro*”) (véase el Ejemplo 4), adecuadamente en una concentración de 100-1000 nm, donde se mide el factor Xa generado después de la adición de un sustrato cromogénico adecuado (por ejemplo S-2765). Además, se puede realizar el ensayo de actividad a temperatura fisiológica.

La capacidad de las variantes del factor VIIa para generar trombina también se puede medir en un ensayo que comprende todos los factores de coagulación e inhibidores pertinentes en concentraciones fisiológicas - sus células germinales fueron desarrolladas originalmente en el ratón (véase, p. ej., Gordon *et al.*, *Proc. Nati. Acad. Sci. US* 77: 7380-7384 (1980); Gordon y Ruddle, *Science* 214: 1244-1246 (1981); Palmiter y Brinster, *Cell* 41: 343-345 (1985); Brinster *et al.*, *Proc. Nati. Acad. Sci. US* 82: 4438-4442 (1985); y Hogan *et al.* (*ibid.*)). Estas técnicas fueron posteriormente adaptadas para un uso con animales más grandes, incluyendo las especies de ganadería (véase, p. ej., WO 88/00239, WO 90/05188, y WO 92/11757; y Simons *et al.*, *Bio/Technology* 6: 179-183 (1988)). En resumen, en la vía más eficiente utilizada hasta la fecha para la generación de ratones transgénicos o de ganadería, varios centenares de moléculas lineales del ADN de interés se inyectan en uno de los pro-núcleos de un huevo fertilizado según las técnicas establecidas. La inyección de ADN en el citoplasma de un cigoto también puede ser empleada.

Las variantes de polipéptidos del factor VII de la invención se recuperan en el medio de cultivo celular o de la leche. Las variantes de polipéptidos del factor VII de la presente invención pueden ser purificadas por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a éstos, la cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatoenfoco, y de exclusión de tamaño), los procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparativo (IEF), la solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato de amonio), o

ES 2 339 393 T3

la extracción (véase, p. ej., *Protein Purification*, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, New York, 1989). Preferiblemente, pueden ser purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpos anti-factor VII. Se prefiere particularmente el uso de anticuerpos monoclonales dependientes del calcio, tal como describen Wakabayashi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261:11097-11108; (1986) y Thim *et al.*, *Biochemistry* 27: 7785-7793; (1988). La purificación adicional puede obtenerse por medios convencionales de purificación química, tal como la cromatografía líquida de alto rendimiento. Otros métodos de purificación, incluyendo la precipitación con citrato de bario, se conocen en la técnica, y pueden ser aplicados para la purificación de nuevas variantes de polipéptidos del factor VII descritas aquí (véase, por ejemplo, Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982).

Con fines terapéuticos se prefiere que las variantes de polipéptidos del factor VII de la invención sean sustancialmente puras. Así, en una forma de realización preferida de la invención las variantes de polipéptidos del factor VII de la invención se purifican en al menos aproximadamente el 90 al 95% de homogeneidad, preferiblemente al menos aproximadamente el 98% de homogeneidad. La pureza puede ser evaluada p. ej. por electroforesis en gel y secuenciación de aminoácidos amino-terminal.

Para el tratamiento en relación con intervenciones deliberadas, las variantes de polipéptidos del factor VII de la invención típicamente serán administradas en aproximadamente 24 horas antes de realizar la intervención, y durante un máximo de 7 días o más sucesivamente. La administración en forma de coagulante puede realizarse a través de una variedad de vías como se describe aquí.

La dosis de las variantes de polipéptidos del factor VII varía de aproximadamente 0,05 mg a 500 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 1 mg a 200 mg/día, y más preferiblemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 175 mg/día para un sujeto de 70 kg como dosis de carga y mantenimiento, dependiendo del peso del sujeto y de la gravedad de la condición.

Las composiciones farmacéuticas están destinadas principalmente a la administración parenteral para un tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, es decir, por vía intravenosa, subcutáneamente, o intramuscularmente, o pueden administrarse por infusión continua o pulsátil. Las composiciones para la administración parenteral comprenden la variante del factor VII de la invención en combinación con, preferiblemente disueltos en, un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Una variedad de portadores acuosos puede ser utilizada, tal como el agua, agua tamponada, 0,4% de salina, 0,3% glicina y similares. Las variantes de polipéptidos del factor VII de la invención también se pueden formular en preparaciones de liposomas para la entrega o destino a los sitios de lesión. Las preparaciones de liposomas generalmente se describen en, p. ej., US 4,837,028, US 4,501,728, y US 4,975,282. Las composiciones pueden ser esterilizadas por técnicas de esterilización convencionales y bien conocidas. Las soluciones acuosas resultantes pueden ser envasadas para su uso o filtradas en condiciones asépticas y liofilizadas, la preparación liofilizada siendo combinada con una solución acuosa estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como requeridas para aproximarse a condiciones fisiológicas, como agentes reguladores de pH y amortiguadores, agentes reguladores de tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc.

La concentración de variante del Factor VII en estas formulaciones puede variar mucho, es decir, desde menos de aproximadamente 0,5% en peso, normalmente en o en al menos aproximadamente el 1% en peso hasta un máximo de 15 o 20% en peso y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluidos, viscosidades, etc., según el modo particular de administración seleccionada.

Así, una composición farmacéutica típica para una infusión intravenosa puede ser efectuada hasta contener 250 ml de solución estéril de Ringer y 10 mg de la variante del Factor VII. Los métodos reales para preparar composiciones parenteralmente administrables serán conocidos o aparentes para los expertos en la técnica y se describen en más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990).

Las composiciones que contienen las variantes del polipéptido del factor VII de la presente invención pueden ser administradas para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un sujeto que ya está sufriendo una enfermedad, tal y como se describe anteriormente, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguirlo se define como "cantidad terapéuticamente eficaz". Como lo entenderá el experto en la técnica, cantidades efectivas para este propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o de la lesión así como del peso y estado general del sujeto. En general, no obstante, la cantidad efectiva variará de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 500 mg de variante del Factor VII al día para un sujeto de 70 kg, con dosis de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 200 mg de variante del factor VII al día utilizadas más comúnmente.

Los polipéptidos FVIIa de la presente invención generalmente pueden ser empleados para enfermedades serias o estados de lesiones, es decir, situaciones de peligro para la vida o de peligro potencial para la vida. En casos de este tipo, en vista a la minimización de sustancias extrañas y a la falta general de inmunogenicidad de variantes de polipéptidos del factor humano VII en seres humanos, el médico en servicio puede estimar conveniente administrar un exceso sustancial de estas composiciones de variantes del factor VII.

ES 2 339 393 T3

En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen la variante del Factor VII de la invención se administran a un sujeto susceptible de sufrir o bien expuesto a un estado de enfermedad o de lesión para mejorar la capacidad coagulante propia del sujeto. Tal cantidad se define como una “dosis profilácticamente efectiva”. En aplicaciones profilácticas, las cantidades exactas otra vez dependen del estado de salud del sujeto y del peso, pero la dosis generalmente varía de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 500 mg al día para un sujeto de 70 kilogramos, más comúnmente de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 200 mg al día para un sujeto de 70 kilogramos.

Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones pueden realizarse con niveles de dosis y modelos seleccionados por el médico en servicio. Para los sujetos ambulatorios que necesitan niveles de cuidados diarios, las variantes de polipéptidos del factor VII pueden ser administradas por infusión continua utilizando p. ej. un sistema de bombeo portátil.

La entrega local de la variante del factor VII de la presente invención, tal como, por ejemplo, la aplicación tópica puede realizarse, por ejemplo, mediante pulverización, perfusión, catéteres de doble balón, cánula, incorporada en injertos o cánulas vasculares, hidrogeles usados para cubrir los catéteres de balón, u otros métodos bien establecidos. En cualquier caso, las composiciones farmacéuticas deberían proporcionar una cantidad suficiente de variante del Factor VII para tratar eficazmente al sujeto.

La presente invención se ilustra con más detalle por los ejemplos siguientes los cuales, no obstante, no deben ser interpretados como un límite del alcance de la protección. Las características divulgadas en la descripción precedente y en los ejemplos siguientes pueden ser, tanto de forma separada como en cualquier combinación de éstas, esenciales para realizar la invención en sus formas diversas.

25 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos completa del factor de coagulación humano nativo VII (de tipo salvaje) (SEC ID NO:1).

30 Ejemplos

La terminología para sustituciones de aminoácidos usada en los ejemplos a continuación es la siguiente. La primera letra representa el aminoácido presente naturalmente en una posición de la SEC ID NO:1. El número siguiente representa la posición en la SEC ID NO:1. La segunda letra representa el aminoácido diferente que sustituye al aminoácido natural. Un ejemplo es L305V/F374Y-FVII, la leucina en la posición 305 de la SEC ID NO:1 se sustituye por una valina y la fenilalanina en la posición 374 de la SEC ID NO:1 se sustituye por una tirosina, ambas mutaciones en la misma variante del Factor VII.

40 Ejemplo 1

ADN de codificación de L305V/S314E/F374Y-FVII, L305V/K337A/F374Y-FVII, L305V/S314E/K337A/F374Y-FVII, y V158D/E296V/M298Q/L305V/S314E/K337A/F374Y-FVII.

Los constructos de ADN que codifican L305V/S314E/F374Y-FVII, L305V/K337A/F374Y-FVII, L305V/S314E/K337A/F374Y-FVII, y V158D/E296V/M298Q/L305V/S314E/K337A/F374Y-FVII fueron preparados por mutagénesis dirigida al sitio usando un vector de ADN superenrollado, bicatenario, con un inserto de interés y dos cebadores sintéticos comprendiendo la mutación deseada. Los cebadores siguientes se usaron (en reacciones de PCR posteriores en caso de necesidad para obtener la variante de FVII deseada):

Para L305V-FVII:

5'-CGT GCC CCG GGT GAT GAC CCA GGA C-3' (SEC ID NO:2)

5-GTC CTG GGT CAT CAC CCG GGG CAC G-3' (SEC ID NO:3)

60 Para K337A-FVII:

5-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3' (SEC ID NO:4)

65 5'-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3' (SEC ID NO:5)

ES 2 339 393 T3

Para V158D-FVII:

5'-GTG GGG GGC AAG GAC TGC CCC AAA GGG G-3' (SEC ID NO:6)

5'-CCC CTT TGG GGC AGT CCT TGC CCC CCA C-3' (SEC ID NO:7)

Para E296V/M298Q-FVII:

5'-GCC ACG GCC CTG GTG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3' (SEC ID NO:8)

5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CAC CAG GGC CGT GGC-3' (SEC ID NO:9)

Para S314E-FVII:

5'-GCC TGC AGC AGG AAC GGA AGG TGG GAG ACT CC-3' (SEC ID NO:10)

5'-GGA GTC TCC CAC CTT CCG TTC CTG CTG CAG GC-3' (SEC ID NO:11)

Para F374Y-FVII:

5'-CGC AAC CGT GGG CCA CTA TGG GGT GTA CAC C-3' (SEC ID NO:12)

5'-GGT GTA CAC CCC ATA GTG GCC CAC GGT TGC G-3' (SEC ID NO: 13)

Los cebadores oligonucleótidos, cada uno complementario a cadenas opuestas del vector, se extendieron durante ciclos de temperatura por medio de la Pfu ADN polimerasa. Con la incorporación de los cebadores, se generó un plásmido mutado comprendiendo cortes en bisel. Después de los ciclos de temperatura, el producto fue tratado con DpnI específico para el ADN metilado y hemimetilado para digerir el molde de ADN parental y seleccionar el ADN sintetizado que contiene la mutación.

Los procedimientos para preparar un constructo de ADN para todas las variantes del FVII según la presente invención mediante el uso de una reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos para conseguir la variante del FVII deseada son conocidos por los expertos en la técnica (véase PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, EEUU).

Ejemplo 2

Preparación de L305V/S314E/F374Y-FVII, L305V/K337A/F374Y-FVII, y L305V/S314E/K337A/F374Y-FVII

Las células BHK fueron transfectadas esencialmente tal como descrito anteriormente (Thim *et al.* (1988) *Biochemistry* 27, 7785-7793; Persson y Nielsen (1996) *FEBS Lett.* 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante específica del FVII. La variante del factor VII fue purificada de la siguiente manera:

El medio acondicionado fue cargado sobre una columna de 25-ml de Q Sefarosa de flujo rápido (Pharmacia Biotech) después de la adición de 5 mM de EDTA, 0,1% de Tritón X-100 y 10 mM de Tris, del ajuste de pH a 8,0 y del ajuste de la conductividad a 10-11 mS/cm mediante la adición de agua.

La elución de la proteína se realizó paso a paso a partir de 10 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 0,1% de Tritón X-100, pH 8,0 a 10 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 25 mM de CaCl₂, 0,1% de Tritón X-100, pH 8,0. Las fracciones comprendiendo la variante específica del FVII se agruparon y se aplicaron a una columna de 25 ml comprendiendo el anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) junto con la sefarosa activada CNBr- Sefarosa 4B activada (Pharmacia Biotech).

La columna fue equilibrada con 50 mM de HEPES, pH 7,5, conteniendo 10 mM de CaCl₂, 100 mM de NaCl y 0,02% de Tritón X-100. Después del lavado con el tampón de equilibrio y el tampón de equilibrio conteniendo 2 M de NaCl, el material ligado fue eluido con el tampón de equilibrio conteniendo 10 mM de EDTA en vez de CaCl₂. Antes del uso o del almacenamiento, el exceso de CaCl₂ en EDTA fue añadido o la variante del FVII específica fue transferida a un amortiguador conteniendo Ca²⁺. El rendimiento de cada fase fue seguido por mediciones ELISA del factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE. Otras variantes del FVII, variantes según el Ejemplo 1 y todas las otras variantes según la presente invención pueden ser preparadas por el mismo método.

ES 2 339 393 T3

Ejemplo 3

Ensayo de hidrólisis in vitro

5 El factor VIIa nativo (de tipo salvaje) y la variante del factor VIIa (a continuación ambos referidos como “factor VIIa”) se evalúan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se realiza en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida (S-2288, Chromogenix, Suecia), concentración final de 1 mM, se añade al factor VIIa (concentración final de 100 nm) en 50 mM de Hepes, pH 7,4, conteniendo 0,1 M de NaCl, 5 mM de CaCl₂ y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La absorbencia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EEUU).
10 La absorbencia desarrollada durante una incubación de 20 minutos, después de una sustracción de la absorbencia en un pocilio en blanco sin contenido de enzima, se usa para calcular la proporción entre las actividades de la variante y del factor VIIa de tipo salvaje:

$$15 \quad \text{Proporción} = (A_{405\text{nm}} \text{ variante de Factor VIIa}) / (A_{405\text{nm}} \text{ Factor VIIa de tipo salvaje})$$

Ejemplo 4

Ensayo de proteólisis in vitro

20 El factor VIIa nativo (de tipo salvaje) y la variante del factor VIIa (a continuación ambos referidos como “factor VIIa”) se evalúan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se realiza en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El factor VIIa (10 nm) y el factor X (0,8 microM) en 100 microL 50 mM de Hepes, pH 7,4, conteniendo 0,1 M de NaCl, 5 mM de CaCl₂ y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, se incuban durante 15 min. La división del factor X se detiene entonces por la adición de 50 microL 50 mM de Hepes, pH 7,4, conteniendo 0,1 M de NaCl, 20 mM de EDTA y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La cantidad de Factor Xa generada se mide por adición del sustrato cromogénico Z-D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Suecia), concentración final de 0,5 mM. La absorbencia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EEUU). La absorbencia desarrollada durante 10 minutos, después de la sustracción de la absorbencia en un pocilio en blanco sin contenido de FVIIa, se utiliza para calcular la proporción entre las actividades proteolíticas de la variante del factor VIIa y del factor VIIa de tipo salvaje:

$$35 \quad \text{Proporción} = (A_{405\text{nm}} \text{ variante de Factor VIIa}) / (A_{405\text{nm}} \text{ Factor VIIa de tipo salvaje})$$

Ejemplo 5

Actividades relativas de variantes del FVIIA medidas en los ensayos descritos en los ejemplos 3 y 4

Variante	Proporción en ejemplo 3	Proporción en ejemplo 4
L305V/S314E/F374Y-FVIIa	3	3
L305V/K337A/F374Y-FVIIa	12	8
L305V/S314E/K337A/F374Y-FVIIa	23	11
wt-FVIIa	1,0	1,0

ES 2 339 393 T3

Referencias citadas en la descripción

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad por eventuales errores u omisiones.*

Documentos de patente citados en la descripción

- 10 • EP200421 A [0006]
- WO 0183725 A [0009]
- W0222776 A [0009]
- 15 • US4784950 A [0136]
- US4683202 A [0139]
- US5288629 A [0141]
- 20 • US4745051 A [0146] [0165]
- EP 397485 A [0146] [0165]
- 25 • US 5155037 A [0146] [0165]
- US 5162222 A [0146] [0165]
- US 4599311 A [0147] [0162]
- 30 • EP 238023 A [0148] [0153] [0163]
- EP 383779 A [0148]
- 35 • US 4870008 A [0151] [0152] [0162]
- WO 8702670 A [0151]
- US 4546082 A [0152]
- 40 • EP 16201 A [0152]
- EP 123294 A [0152]
- 45 • EP 123544 A [0152]
- EP 163529 A [0152]
- WO 8902463 [0152]
- 50 • WO 9211378 A [0152]
- EP 215594 A [0153]
- 55 • WO 9005783 A [0154]
- US 5023328 A [0154]
- US 4713339 A, Levinson y Simonsen [0158]
- 60 • US 4931373 A [0162]
- US 5037743 A [0162]
- US 4845075 A [0162]
- US 4882279 A [0162]
- EP 272277 A [0163]
- EP 184438 A [0163]
- EP 244234 A [0163]
- US 4879236 A [0165]
- US 5077214 A [0165]
- WO 8901029 A [0165]
- WO 8901028 A [0165]
- WO 8800239 A [0168] [0172] [0180]
- US 5304489 A [0169]
- WO 8901343 A [0170]
- WO 9102318 A [0170]
- US 4873316 A, Meade [0171] [0172]
- US 4873191 A [0172]
- WO 9005188 A [0172] [0180]
- WO 9211757 A [0172] [0180]
- GB 8700458 A [0172]
- EP 0255378 A [0173]
- US 4456591 A, Thomas [0176]
- US 4837028 A [0185]
- US 4501728 A [0185]
- US 4975282 A [0185]
- EP 6544215 A [0207]
- EP 03798087 A [0207]
- EP 200201423 A [0207]

Literatura de patentes no citada en la descripción

- 65 • **Dickinson** *et al. Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 14379-14384 [0007]
- **Iwanaga** *et al. Thromb. Haemost.*, August 1999, 466 [0008]

ES 2 339 393 T3

- **Graham et al.** *J. Gen. Virol.*, 1977, vol. 36, 59-72 [0140] [0161]
- **Waechter; Baserga.** *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 1106-1110 [0040]
- 5 • **Urlaub; Chasin.** *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216-4220 [0040] [0161]
- **Takeya et al.** *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 14868-14872 [0136]
- **Zoller; Smith.** *DNA*, 1984, vol. 3, 479-488 [0137]
- 10 • **Horton et al.** Splicing by extensión overlap. *Gene*, 1989, vol. 77, 61-68 [0137]
- PCR Protocols. *Academic Press*, 1990 [0137] [0199]
- 15 • **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0138]
- **Beaucage; Caruthers.** *Tetrahedron Letters*, 1981, vol. 22, 1859-1869 [0139]
- **Matthes et al.** *EMBO Journal*, 1984, vol. 3, 801-805 [0139]
- 20 • **Saiki et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 487-491 [0139]
- **Subramani et al.** *Mol. Cell Biol.*, 1981, vol. 1, 854-864 [0145]
- 25 • **Palmiter et al.** *Science*, 1983, vol. 222, 809-814 [0145]
- **Boshart et al.** *Cell*, 1985, vol. 41, 521-530 [0145]
- **Kaufman; Sharp.** *Mol. Cell Biol.* 1982, vol. 2, 1304-1319 [0145]
- 30 • **Vasuvedan et al.** *FEBS Lett.*, 1992, vol. 311,7-11 [0146]
- **J. M. Vlak et al.** *J. Gen. Virology*, 1988, vol. 69, 765-776 [0146]
- 35 • **Hitzeman et al.** *J. Biol. Chem.* 1980, vol. 255, 12073-12080 [0147]
- **Alber Kawasaki** *J. Mol. Appl. Gen.*, 1982, vol. 1, 419-434 [0147]
- **Young et al.** *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals* Plenum Press 1982. [0147]
- 40 • **Russell et al.** *Nature*, 1983, vol. 304, 652-654 [0147]
- **McKnight et al.** *The EMBO J.*, 1985, vol. 4, 2093-2099 [0148]
- 45 • **Palmiter et al.** *Science*, 1983, vol. 222, 809-814 [0149]
- **Alber Kawasaki** *J. Mol. Appl. Gen.*, 1982, vol. 1, 419-434 [0149]
- **McKnight et al.** *The EMBO J.*, 1985, vol. 4, 2093-2099 [0149]
- 50 • **DeNoto et al.** *Nuci. Acids Res.*, 1981, vol. 9, 3719-3730 [0149]
- **O. Hagenbuchle et al.** *Nature*, 1981, vol. 289, 643-646 [0151]
- 55 • **L.A. Valls et al.** *Cell*, 1987, vol. 48, 887-897 [0151]
- **M. Egel-Mitani et al.** *Yeast*, 1990, vol. 6, 127-137 [0151]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor 1989. [0155]
- 60 • **Kaufman Sharp** *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 159, 601-621 [0156]
- **Southern Berg** *J. Mol. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 327-341 [0156]
- 65 • **Loyter et al.** *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 422-426 [0156]
- **Wigler et al.** *Cell*, 1978, vol. 14, 725 [0156]

ES 2 339 393 T3

- **Corsaro Pearson** *Somatic Cell Genetics*, 1981, vol. 7, 603 [0156]
- **Graham van der Eb** *Virology*, 1973, vol. 52, 456 [0156]
- 5 • **Neumann et al.** *EMBO J.*, 1982, vol. 1, 841-845 [0156]
- **Wigler et al.** *Cell*, 1978, vol. 14, 725-732 [0157]
- **Corsaro Pearson** *Somatic Cell Genetics*, 1981, vol. 7, 603-616 [0157]
- 10 • **Graham Van der Eb** *Virology*, 1973, vol. 52d, 456-467 [0157]
- **Neumann et al.** *EMBO J.*, 1982, vol. 1, 841-845 [0157]
- 15 • **Waechter Baserga** *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 1106-1110 [0161]
- **Gleeson et al.** *J. Gen. Microbiol.*, 1986, vol. 132, 3459-3465 [0162]
- **Malardier et al.** *Gene*, 1989, vol. 78, 147-156 [0163]
- 20 • **Whitelaw et al.** *Biochem. J.*, 1992, vol. 286, 31-39 [0169]
- **Brinster et al.** *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 836-840 [0170]
- 25 • **Palmiter et al.** *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 478-482 [0170]
- **Whitelaw et al.** *Transgenic Res.*, 1991, vol. 1,3-13 [0170]
- **Heijne Nuci. Acids Res., 1986, vol. 14, 4683-4690 [0171]**
- 30 • **Jaenisch Science, 1988, vol. 240, 1468-1474 [0172]**
- **Bradley et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 534-539 [0172]
- 35 • **Hogan et al.** *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory* 1986.
[0172]
- **Simons et al.** *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 179-183 [0172] [0172] [0180]
- 40 • **Wall et al.** *Biol. Reprod.*, 1985, vol. 32, 645-651 [0172]
- **Buhler et al.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 140-143 [0172]
- **Ebert et al.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 835-838 [0172]
- 45 • **Krimpenfort et al.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 844-847 [0172]
- **Wall et al.** *J. Cell. Biochem.*, 1992, vol. 49, 113-120 [0172]
- 50 • **Gordon et al.** *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 7380-7384 [0172] [0180]
- **Gordon Ruddle** *Science*, 1981, vol. 214, 1244-1246 [0172] [0180]
- **Palmiter Brinster** *Cell*, 1985, vol. 41, 343-345 [0172] [0180]
- 55 • **Brinster et al.** *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 4438-4442 [0172] [0180]
- **Hogan et al.** *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA*, [0172] [0180]
- 60 • **Hiatt** *Nature*, 1990, vol. 344, 469-479 [0173]
- **Edelbaum et al.** *J. Interferon Res.*, 1992, vol. 12, 449-453 [0173]
- **Sijmons et al.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 217-221 [0173]
- 65 • Protein Purification VCH Publishers 1989. [0174] [0181]
- **Wakabayashi et al.** *J. Biol. Chem.*, 1986, vol. 261, 11097-11108 [0174] [0181]

ES 2 339 393 T3

- **Thim et al.** *Biochemistry*, 1988, vol. 27, 7785-7793 [0174] [0181] [0201]
- **Scopes, R.** *Protein Purification* Springer-Verlag 1982. [0174] [0181]
- 5 • **Osterud et al.** *Biochemistry*, 1972, vol. 11, 2853-2857 [0176]
- **Hedner Kisiel** *J. Clin. Invest.*, 1983, vol. 71, 1836-1841 [0176]
- 10 • **Kisiel Fujikawa** *Behring Inst. Mitt.*, 1983, vol. 73, 29-42 [0176]
- Remington's Pharmaceutical Sciences Mack Publishing Company 1990. [0187]
- **Persson Nielsen** *FEBS Lett.*, 1996, vol. 385, 241-243 [0201]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 339 393 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido del factor VII comprendiendo al menos tres sustituciones en relación con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO.1, donde dichas sustituciones son (i) el reemplazo de F374 con cualquier otro aminoácido, (ii) reemplazo de S314 con cualquier otro aminoácido y (iii) reemplazo de L305 con cualquier otro aminoácido.
2. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 1, donde K157 se reemplaza por cualquier otro aminoácido.
- 10 3. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde D334 se reemplaza por cualquier otro aminoácido.
4. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde S336 se reemplaza por cualquier otro aminoácido.
- 15 5. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde V158 se reemplaza por cualquier otro aminoácido.
6. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde E296 se reemplaza por cualquier otro aminoácido.
- 20 7. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde M298 se reemplaza por cualquier otro aminoácido.
- 25 8. Polipéptido del factor FVII según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde K337 se reemplaza por cualquier otro aminoácido.
9. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde al menos un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio proteasa ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido.
- 30 10. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 9, donde un máximo de 20 aminoácidos adicionales en las posiciones restantes en el dominio proteasa han sido reemplazados por cualesquiera otros aminoácidos.
- 35 11. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 159-170 de SEC ID NO:1 ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido.
- 40 12. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 290-304 de SEC ID NO:1 ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido.
13. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 12, donde R304 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Tyr, Phe, Leu y Met.
- 45 14. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 9-13, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada entre 306 y 312 de SEC ID NO:1 ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido.
- 50 15. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 14, donde M306 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Asp y Asn.
16. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 14, donde D309 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Ser y Thr.
- 55 17. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 9-16, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada entre 330y 339 de la SEC ID NO:1 ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido.
18. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 9-17, donde A274 ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido.
- 60 19. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 18, donde dicho A274 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Met, Leu, Lys y Arg.
- 65 20. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicho K157 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.

ES 2 339 393 T3

21. Polipéptido del factor VII según bien una u otra de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho D334 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Gly y Glu.
- 5 22. Polipéptido del factor VII según una u otra de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho S336 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Gly y Glu.
23. Polipéptido del factor VII según una u otra de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho V158 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Ser, Thr, Asn, Gin, Asp y Glu.
- 10 24. Polipéptido del factor VII según una u otra de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho E296 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Arg, Lys, Ile, Leu y Val.
25. Polipéptido del factor VII según una u otra de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicho M298 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Lys, Arg, Gin y Asn.
- 15 26. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 1, donde dicho L305 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Val, Tyr y Ile.
27. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-26, donde dicho S314 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Gly, Lys, Gln y Glu.
- 20 28. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, donde dicho F374 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Pro y Tyr.
- 25 29. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 28, donde dicho F374 ha sido reemplazado por Tyr.
30. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 8, donde dicho K337 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en Ala, Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.
- 30 31. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, donde cada aminoácido reemplazado ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido que puede ser codificado por constructos polinucleótidos.
32. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, donde dicho polipéptido del factor VII es el factor VII humano.
- 35 33. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, donde dicho polipéptido del factor VII es el factor humano VIIa.
34. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es de al menos aproximadamente 1,25.
35. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 34, donde dicha proporción es de al menos aproximadamente 2,0, preferiblemente al menos aproximadamente 4,0.
- 45 36. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 1, que es F374Y/L305V/S314E-FVIIa.
37. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1,8 o 30, que es L305V/S314E/K337A/F374Y-FVIIa.
- 50 38. Constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-37.
39. Constructo polinucleótido según la reivindicación 38, que es un vector.
- 55 40. Célula huésped comprendiendo el constructo polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 39.
41. Célula huésped según la reivindicación 40, que es una célula eucariótica.
- 60 42. Célula huésped según la reivindicación 41, que es de origen mamífero.
43. Célula huésped según la reivindicación 42, donde la célula se selecciona en el grupo que consiste en células CHO, células HEK y células BHK.
- 65 44. Animal transgénico no humano conteniendo y expresando el constructo polinucleótido tal como se define en la reivindicación 38.

ES 2 339 393 T3

45. Método para la producción del polipéptido del factor VII definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, el método comprendiendo el cultivo de una célula tal como definida en cualquiera de las reivindicaciones 40 a 43 en un medio de crecimiento apropiado en condiciones que permiten la expresión del constructo polinucleótido y la recuperación del polipéptido resultante a partir del medio de cultivo.

5

46. Composición farmacéutica comprendiendo un polipéptido del factor VII comprendiendo al menos dos sustituciones en relación con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) el reemplazo de F374 por cualquier otro aminoácido, (ii) reemplazo de S314 por cualquier otro aminoácido y (iii) reemplazo de L305 por cualquier otro aminoácido; y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

10

47. Composición farmacéutica comprendiendo un polipéptido del factor VII tal como definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

48. Uso de un polipéptido del factor VII comprendiendo al menos dos sustituciones en relación con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:1, donde dichas sustituciones son (i) el reemplazo de F374 por cualquier otro aminoácido, (ii) reemplazo de S314 por cualquier otro aminoácido y (iii) reemplazo de L305 por cualquier otro aminoácido; para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de sangrados o episodios de sangrados o para la mejora del sistema hemostático normal.

49. Uso de un polipéptido del factor VII tal como definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de sangrado o episodios de sangrado o para la mejora del sistema hemostático normal.

50. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 48 a 49 para el tratamiento de la hemofilia A o B.

25

51. Polipéptido del factor VII tal como definido en cualquiera de las reivindicaciones 1a 37 para un uso en forma de medicamento.

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 2

SEC ID NO:2 (cebador de ADN para la preparación de L305V-FVII):

5'CGT GCC CCG GGT GAT GAC CCA GGA C-3';

SEC ID NO:3 (cebador de ADN para la preparación de L305V-FVII):

5'-GTC CTG GGT CAT CAC CCG GGG CAC G-3';

SEC ID NO:4 (cebador de ADN para la preparación de K337A-FVII):

5'-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3';

SEC ID NO:5 (cebador de ADN para la preparación de K337A-FVII):

5'-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3';

SEC ID NO:6 (cebador de ADN para la preparación de V158D-FVII):

5'-GTG GGG GGC AAG GAC TGC CCC AAA GGG G-3';

SEC ID NO:7 (cebador de ADN para la preparación de V158D-FVII):

5'CCC CTT TGG GGC AGT CCT TGC CCC CCA C-3';

SEC ID NO:8 (cebador de ADN para la preparación de E296V/M298Q-FVII):

5'-GCC ACG GCC CTG GTC CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3'

SEC ID NO:9 (cebador de ADN para la preparación de E296V/M298Q-FVII):

5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CAC CAG GGC CGT GGC-3';

SEC ID NO:10 (cebador de ADN para la preparación de S314E-FVII):

5'-GCC TGC AGC AGG AAC GGA AGG TGG GAG ACT CC-3';

SEC ID NO:11 (cebador de ADN para la preparación de S314E-FVII):

5'-GGA GTC TCC CAC CTT CCG TTC CTG CTG CAG GC-3';

SEC ID NO:12 (cebador de ADN para la preparación de F374Y-FVII):

5'-CGC AAC CGT GGG CCA CTA TGG GGT GTA CAC C-3';

SEC ID NO:13 (cebador de ADN para la preparación de F374Y-FVII):

5'-GGT GTA CAC CCC ATA GTG GCC CAC GGT TGC G-3'.

ES 2 339 393 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NOVO NORDISKA/S

5 <120> POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR HUMANO VII DE COAGULACIÓN

<130> 6544.215-EP

10 <140> Divisional de 03798087.7

<141> 2003-09-24

15 <150> PA 2002 01423

<151> 2002-09-25

<160> 13

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

25 <211> 406

<212> PRT

<213> Factor humano VII de coagulación

30 <400> 1

	Ala	Ala	Ala	Ser	Asn	Ala	Ala	His	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Arg
	1				5					10					15	
35	Gly	Tyr	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Ala	Ala	Cys	Tyr	Ser	Tyr	Ser
				20					25					30		
40	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Cys	Tyr	Ser	Ser	Arg	His	Ala	Ala	Ala	Ala
			35					40					45			
45	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Ala	Ala	His	Tyr	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala
	50						55					60				
50	Ala	Arg	Gly	Thr	His	Arg	Tyr	Ser	His	Thr	Arg	Ser	Arg	Thr	Tyr	Arg
	65					70					75					80
55	Ser	Arg	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ser	Gly	Asn	Cys	Tyr	Ser	Ala	Ala	Ser
					85					90					95	
60	Arg	Ser	Arg	Arg	Cys	Tyr	Ser	Gly	Asn	Ala	Ser	Asn	Gly	Tyr	Gly	Tyr
			100						105					110		
65	Ser	Arg	Cys	Tyr	Ser	Tyr	Ser	Ala	Ser	Gly	Asn	Gly	Asn	Ser	Arg	Thr
		115						120					125			
70	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Ser	His	Cys	Tyr	Ser	Arg	Ala	Ala	His	Gly	Gly	Tyr
	130						135					140				
75	Ala	Arg	Gly	Ala	Ser	Asn	Cys	Tyr	Ser	Gly	Thr	His	Arg	His	Ser	Tyr
	145					150					155					160
80	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Gly	Asn	Cys	Tyr	Ser	Val	Ala	Ala	Ser	Asn	Gly
					165					170					175	

ES 2 339 393 T3

Ala Ser Asn Gly Tyr Gly Tyr Cys Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Arg
180 185 190

5 Cys Tyr Ser Ser Arg Ala Ser His Ser Thr His Arg Gly Tyr Thr His
195 200 205

Arg Tyr Ser Ala Arg Gly Ser Arg Cys Tyr Ser Ala Arg Gly Cys Tyr
210 215 220

10 Ser His Ser Gly Gly Tyr Thr Tyr Arg Ser Arg Ala Ala Ala Ser Gly
225 230 235 240

Tyr Val Ala Ser Arg Cys Tyr Ser Thr His Arg Arg Thr His Arg Val
245 250 255

Ala Gly Thr Tyr Arg Arg Cys Tyr Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Gly Tyr
260 265 270

20 Ser Ala Arg Gly Ala Ser Asn Ala Ala Ser Arg Tyr Ser Arg Gly Asn
275 280 285

Gly Tyr Ala Arg Gly Val Ala Gly Tyr Gly Tyr Tyr Ser Val Ala Cys
290 295 300

30 Tyr Ser Arg Tyr Ser Gly Tyr Gly Cys Tyr Ser Arg Thr Arg Gly Asn
305 310 315 320

Val Ala Val Ala Ala Ser Asn Gly Tyr Ala Ala Gly Asn Cys Tyr Ser
325 330 335

35 Gly Tyr Gly Tyr Thr His Arg Ala Ser Asn Thr His Arg Thr Arg Val
340 345 350

Ala Val Ala Ser Arg Ala Ala Ala Ala His Ser Cys Tyr Ser His Ala
355 360 365

40 Ser Tyr Ser Tyr Ser Ala Ser Asn Thr Arg Ala Arg Gly Ala Ser Asn
370 375 380

Ala Ala Val Ala Gly Tyr Gly His Ser Ala Ser Ser Arg Gly His Ser
385 390 395 400

Ala Ser Gly Tyr Ala Ser Gly Gly Asn Ser Arg Ala Arg Gly Ala Arg
405 410 415

50 Gly Val Ala Ala Ala Gly Asn Val Ala Arg Ser Arg Thr His Arg Thr
420 425 430

Tyr Arg Val Ala Arg Gly Tyr Thr His Arg Thr His Arg Ala Ser Asn
435 440 445

55 His Ser Ala Ser Ala Ala Ala Arg Gly His Ser Gly Asn Arg Val Ala
450 455 460

60 Val Ala Thr His Arg Ala Ser His Ser Val Ala Val Ala Arg Cys Tyr
465 470 475 480

65

ES 2 339 393 T3

5 Ser Arg Gly Ala Arg Gly Thr His Arg His Ser Arg Gly Ala Arg Gly
 485 490 495
 Thr His Arg Ala Ala His Val Ala Ala Arg Gly His Ser Arg Val Ala
 500 505 510
 10 Ser Arg Gly Tyr Thr Arg Gly Tyr Gly Asn Ala Ser Ala Arg Gly Gly
 515 520 525
 Tyr Ala Ala Thr His Arg Ala Ala Gly Met Thr Val Ala Ala Ser Asn
 530 535 540
 15 Val Ala Arg Ala Arg Gly Met Thr Thr His Arg Gly Asn Ala Ser Cys
 545 550 555 560
 Tyr Ser Gly Asn Gly Asn Ser Arg Ala Arg Gly Tyr Ser Val Ala Gly
 565 570 575
 20 Tyr Ala Ser Ser Arg Arg Ala Ser Asn Thr His Arg Gly Thr Tyr Arg
 580 585 590
 25 Met Thr His Cys Tyr Ser Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Arg Ser Arg Ala
 595 600 605
 Ser Gly Tyr Ser Arg Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Cys Tyr Ser Tyr Ser
 610 615 620
 30 Gly Tyr Ala Ser Ser Arg Gly Tyr Gly Tyr Arg His Ser Ala Ala Thr
 625 630 635 640
 35 His Arg His Ser Thr Tyr Arg Ala Arg Gly Gly Tyr Thr His Arg Thr
 645 650 655
 Arg Thr Tyr Arg Thr His Arg Gly Tyr Val Ala Ser Arg Thr Arg Gly
 660 665 670
 40 Tyr Gly Asn Gly Tyr Cys Tyr Ser Ala Ala Thr His Arg Val Ala Gly
 675 680 685
 45 Tyr His Ser His Gly Tyr Val Ala Thr Tyr Arg Thr His Arg Ala Arg
 690 695 700
 Gly Val Ala Ser Arg Gly Asn Thr Tyr Arg Gly Thr Arg Gly Asn Tyr
 705 710 715 720
 50 Ser Met Thr Ala Arg Gly Ser Arg Gly Arg Ala Arg Gly Arg Gly Tyr
 725 730 735
 55 Val Ala Ala Arg Gly Ala Ala Arg His Arg
 740 745

<210>2

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:Secuencia artificial

ES 2 339 393 T3

<400>2
cgtgccccgg gtgatgacctt aggac 25
5
<210> 3
<211> 25
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial:secuencia artificial
15
<400> 3
gtcctgggtc atcacccggg gcacg 25
20
<210> 4
<211> 28
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial:secuencia artificial
30
<400> 4
cggatggcag cgcggactcc tgcaaggg 28
35
<210> 5
<211> 28
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial:Secuencia artificial
45
<400> 5
cccttgacag agtccgcgct gccatccg 28
50
<210> 6
<211> 28
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial:Secuencia artificial
60
<400> 6
gtggggggca aggactgccc caaagggg 28
65
<210> 7
<211> 28

ES 2 339 393 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial:Secuencia artificial	
	<400> 7	
10	cccccttggg gcagtccttg cccccac	28
	<210> 8	
15	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial:Secuencia artificial	
	<400>8	
25	gccacggccc tggctcca ggtcctcaac gtgecc	36
	<210> 9	
30	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial:Secuencia artificial	
	<400> 9	
40	gggcacgttg aggacctga gcaccagggc cgtggc	36
	<210> 10	
45	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial:Secuencia artificial	
	<400> 10	
55	gcctgcagca ggaacggaag gtgggagact cc	32
	<210> 11	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de secuencia artificial:Secuencia artificial	

ES 2 339 393 T3

<400> 11

<210> 12

5 <211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial:Secuencia artificial

<400> 12

15
cgcaaccgtg ggccactatg ggggttacac c 31

<210> 13

20 <211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial:Secuencia artificial

<400> 13

30
gggttacacc ccatagtggc ccacggttgc g 31

35

40

45

50

55

60

65