

(11) Número de Publicação: **PT 1644504 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/57 (2007.10) **C12N 9/64** (2007.10)
C07K 14/745 (2007.10) **A61K 38/36** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.06.18	(73) Titular(es): BAYER HEALTHCARE LLC 555 WHITE PLAINS ROAD TARRYTOWN, NY 10591 US
(30) Prioridade(s): 2003.06.19 US 479780 P 2004.06.15 DK 200400930	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.04.12	(72) Inventor(es): JESPER MORTENSEN HAANING DK KIM VILBOUR ANDERSEN DK CLAUS BORNAES DK
(45) Data e BPI da concessão: 2010.02.17 055/2010	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VARIANTES DO DOMÍNIO GLA DOS FACTORES VII OU VIIA**

(57) Resumo:

RESUMO**"VARIANTES DO DOMÍNIO GLA DOS FACTORES VII OU VIIa"**

Variantes do domínio Gla do factor VII humano ou do factor VIIa humano , que possuem 1 a 15 modificações de aminoácidos relativamente ao factor VII humano ou ao factor VIIa humano, em que foi introduzido um resíduo aminoácido hidrofóbico por substituição na posição 34, ou que possuem uma substituição de um aminoácido na posição 36, ou que possuem substituições de aminoácidos nas posições 10 e 32 e pelo menos mais uma substituição de um aminoácido numa posição seleccionada entre as posições 74, 77 e 166.

DESCRIÇÃO

"VARIANTES DO DOMÍNIO GLA DOS FACTORES VII OU VIIa "

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a novas variantes do domínio Gla dos polipeptidos Factor FVII (FVII) ou Factor VIIa (FVIIa) e também às variantes de tais polipeptidos para fins terapêuticos, em particular para o tratamento de diversas afecções relacionadas com a coagulação.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A coagulação do sangue é um processo que consiste numa interacção complexa dos diversos componentes (ou factores) do sangue, de que resulta, eventualmente, um coágulo de fibrina. De um modo geral, os componentes do sangue que participam naquilo que tem sido designado por "cascata de coagulação" são as proenzimas ou zimogénios, isto é, proteínas enzimaticamente inactivas que são convertidas numa forma activa por acção de um activador. Um destes factores de coagulação é o FVII.

O FVII é uma proteína do plasma dependente da vitamina K, sintetizada no fígado e segregada no sangue sob a forma de uma glicoproteína de cadeia simples com um peso molecular de 35 kDA (Broze & Majerus, *J. Biol. Chem.* 1980; 255: 1242-1247). O zimogénio FVII é convertido numa forma activada (FVIIa) por clivagem proteolítica num único local, R152-I153, daí resultando duas cadeias ligadas por uma única ponte dissulfureto. O FVIIa, formando um complexo com o factor tecidual (complexo FVIIa), é capaz de converter tanto o factor IX (FIX) como o factor X (FX) nas suas

formas activadas, seguindo-se reacções que conduzem a uma rápida produção de trombina e à formação de fibrina (Østerud & Rapport, *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5260-5264).

O FVII está sujeito a modificações pós-traducionais, incluindo a carboxilação dependente da vitamina K, daí resultando dez resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico na região do terminal N da molécula. Assim, os resíduos com os números 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 e 35, indicados na SEQ ID NO: 1, são os resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico no domínio Gla importante para a actividade do FVII. Outras modificações pós-traducionais são o acoplamento do grupo açúcar a dois locais de N-glicosilação, que ocorrem naturalmente nas posições 145 e 322, e a dois locais de O-glicosilação, que ocorrem naturalmente nas posições 52 e 60.

O gene que codifica o FVII humano (hFVII) foi mapeado para o cromossoma 13 em q34-qter 9 (de Grouchy *et al.*, *Hum Genet* 1984; 66: 230-233). Contém nove exões e abrange 12,8 Kb (O'Hara *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5158-5162). A organização do gene e a estrutura proteica do FVII são semelhantes às de outras proteínas pró-coagulantes, dependentes da vitamina K, com os exões 1a e 1b a codificarem a sequência sinal; o exão 2, o pró-péptido e o domínio Gla; o exão 3, uma região hidrofóbica curta; os exões 4 e 5, os domínios semelhantes ao factor de crescimento epidermal; e os exões desde 6 até 8, o domínio catalítico da protease de serina (Yoshitake *et al.*, *Biochemistry* 1985; 24: 3736-3750).

Há estudos publicados sobre as estruturas tridimensionais experimentais do hFVIIa (Pike *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 8925-30 e Kemball-Cook *et al.*, *J. Struct. Biol.*,

1999; 127: 213-223); do hFVIIa formando um complexo com um factor tecidual solúvel, em que foram utilizados métodos cristalográficos com raios X (Banner et al., *Nature*, 1996; 380:41 e Zhang et al., *J. Mol. Biol.*, 1999; 285:2089); e de fragmentos mais pequenos do hFVII (Muranyi et al., *Biochemistry*, 1998; 37:10605 e Kao et al., *Biochemistry*, 1999; 38:7097).

São relativamente poucas as variantes, já descritas, do FVII manipuladas com proteínas (Dickinson & Ruf, *J Biol Chem*, 1997; 272:19875-19879; Kemball-Cook et al., *J Biol Chem*, 1998; 273:8516-8521; Bharadwaj et al., *J Biol Chem*, 1996; 271:30685-30691; Ruf et al., *Biochemistry*, 1999; 38:1957-1966).

Há estudos publicados sobre a expressão do FVII em BHK ou noutras células de mamíferos (WO 92/15686, WO 91/11514 e WO 88/10295) e sobre a co-expressão do FVII e da endoprotease kex2 em células eucarióticas (WO 00/28065).

As preparações comerciais de FVIIa humano recombinante (rhFVIIa) estão no mercado com a marca registada NovoSeven®. O produto NovoSeven® é indicado para o tratamento de episódios hemorrágicos em pacientes que padeçam de hemofilia A ou B. O produto NovoSeven® é o único rhFVIIa presentemente existente no mercado para o tratamento eficaz e fiável de episódios hemorrágicos.

No documento WO 91/11514 está descrita uma forma inactiva de FVII em que são modificadas a arginina 152 e/ou a isoleucina 153. Estes aminoácidos estão localizados no local de activação. O documento WO 96/12800 descreve a inactivação do FVIIa por meio de um inibidor da proteinase da serina. A inactivação do FVIIa, por carbamilação no α -aminoácido 153 do grupo I, foi já descrita por Petersen et

al., *Eur J Biochem*, 1999; 261:124-129. A forma inactivada é capaz de competir, com os FVII ou FVIIa de tipo selvagem, pela ligação ao factor tecidual e pela inibição da actividade de coagulação. Foi já sugerido que a forma inactivada de FVIIa seja utilizada para o tratamento de pacientes em que ocorram estados de hipercoagulação, por exemplo, pacientes com sépsis ou em risco de enfarte do miocárdio ou de trombose.

Associadamente ao tratamento de hemorragias descontroladas, como sucede nos traumatismos, admite-se que o FVIIa seja capaz de activar o FX, convertendo-o em FXa, sem ligação ao factor tecidual, e presume-se que esta reacção de activação ocorra, fundamentalmente, nas plaquetas sanguíneas activadas (Hedner *et al.* *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2000; 11; 107-111). No entanto, o hFVIIa ou o rhFVIIa têm uma actividade reduzida em relação ao FX na ausência do factor tecidual e, conseqüentemente, o tratamento de hemorragias descontroladas, por exemplo, em pacientes com traumatismos, necessita de doses relativamente elevadas e múltiplas de hFVIIa ou rhFVIIa. Assim, para tratar hemorragias descontroladas, mais eficientemente (para minimizar as perdas de sangue), é necessário dispor de moléculas de FVIIa melhores que possuam uma elevada actividade em relação ao FX, na ausência de factor tecidual. Tais moléculas de FVIIa melhores devem proporcionar um tempo de coagulação menor (actividade coagulante de acção mais rápida/maior), comparativamente com o rhFVIIa, quando administradas nos casos de hemorragias descontroladas.

As variantes do domínio Gla de FVII/FVIIa estão descritas nos documentos WO 99/20767, US 6 017 882 e WO 00/66753, tendo alguns resíduos, localizados no domínio

Gla, sido identificados como importantes para a ligação da membrana fosfolipídica e consequentemente para a activação do FX. Em particular, concluiu-se que os resíduos 10 e 32 eram críticos e que poderia ser conseguida uma maior afinidade de ligação da membrana fosfolipídica, e consequentemente uma maior activação do FX, realizando as mutações P10Q e K32E. Em particular, concluiu-se que havia um aumento da activação do FX, comparativamente com o rhFVIIa, em condições marginais de coagulação, por exemplo, em condições em que se encontra presente uma concentração diminuta de factor tecidual.

O documento WO01/58935 descreve uma nova estratégia para o desenvolvimento de moléculas FVII ou FVIIa que possuam, *inter alia*, um maior período de semi-vida, por meio de glicosilação directa ou por peguilação.

O documento WO03/093465 descreve variantes de FVII ou FVIIa que possuem determinadas modificações no domínio Gla e que possuem um ou vários locais de N-glicosilação introduzidos fora do domínio Gla.

O documento WO 2004/029091 descreve variantes de FVII ou FVIIa que possuem determinadas modificações no local de ligação do factor tecidual.

Os inventores da presente invenção identificaram agora outros resíduos no domínio Gla que aumentam ainda mais a afinidade de ligação da membrana fosfolipídica e, consequentemente, aumentam ainda mais a activação do FX. As variantes de FVII ou FVIIa da invenção também podem manifestar uma reduzida afinidade de ligação do factor tecidual.

A presente invenção tem por objectivo proporcionar melhores moléculas de FVII ou FVIIa (variantes FVII ou

FVIIa) capazes de activar o FX ou o FXa mais eficientemente do que os hFVIIa, rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa. Em particular, constitui um objectivo da presente invenção proporcionar melhores moléculas de FVII ou FVIIa (variantes de FVII ou FVIIa) capazes de activar os FX ou FXa mais eficientemente do que os hFVIIa, rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa na ausência de factor tecidual. Estes objectivos são realizados pelas variantes de FVII ou FVIIa aqui apresentadas.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DA INVENÇÃO

De acordo com um seu primeiro aspecto, a presente invenção diz respeito a uma variante polipeptídica do factor VII (FVII) ou do factor VIIa (FVIIa), que possui uma sequência de aminoácidos que difere em 1-15 resíduos aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do factor VII humano (rFVII) ou do factor VIIa humano (hFVIIa) identificada por SEQ ID NO: 1, em que foi introduzido um resíduo aminoácido com carga eléctrica negativa por substituição na posição 36.

De acordo com um segundo aspecto, a variante polipeptídica do factor VII (FVII) ou factor VIIa (FVIIa) compreende também uma substituição de um aminoácido na posição 34.

De acordo com um terceiro aspecto, a variante polipeptídica do factor VII (FVII) ou factor VIIa (FVIIa) compreende uma substituição de aminoácidos nas posições 10 e/ou 32.

Outros aspectos da invenção dizem respeito a uma sequência nucleotídica que codifica as variantes polipeptídicas da invenção, a um vector de expressão que

compreende a sequência nucleotídica e a uma célula hospedeira que compreende a sequência nucleotídica ou o vector de expressão.

Há ainda outros aspectos da invenção que dizem respeito a uma composição farmacêutica que compreende as variantes polipeptídicas da invenção, as variantes polipeptídicas da invenção ou a composição farmacêutica da invenção para utilização como medicamento e também para utilização em métodos de tratamento.

Outros aspectos da presente invenção tornar-se-ão evidentes a partir do texto subsequente e também a partir das reivindicações anexas.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DOS DESENHOS

A figura 1 é um gráfico que ilustra o tempo de coagulação em função da concentração para as variantes da invenção, quando experimentadas no "Ensaio com Sangue Total".

A figura 2 é um gráfico que traduz a taxa máxima de geração de trombina, dependente do factor tecidual, para as variantes da invenção, determinada no "Ensaio do Trombograma".

A figura 3 é um gráfico que traduz a taxa máxima de geração de trombina dependente dos fosfolípidos, para as variantes da invenção, determinada no "Ensaio do Trombograma".

DESCRIÇÃO MINUCIOSA DA INVENÇÃO

Definições

No contexto da presente invenção e das reivindicações são utilizadas as definições a seguir indicadas.

O termo "FVII" ou "polipéptido FVII" designa uma molécula de FVII apresentada numa forma de cadeia simples. Um exemplo de um polipéptido FVII é o FVII humano (hFVII) de tipo selvagem que possui a sequência de aminoácidos identificada por SEQ ID NO: 1. No entanto, faz-se observar que o termo "polipéptido FVII" também abrange as moléculas semelhantes ao hFVII, tais como os fragmentos ou variantes de SEQ ID NO: 1, em particular as variantes em que a sequência possua pelo menos uma, por exemplo, até 15 e de preferência até 10 modificações de aminoácidos comparativamente com a SEQ ID NO: 1.

O termo "FVIIa" ou "polipéptido FVIIa" designa uma molécula de FVIIa apresentada na sua forma de cadeia dupla activada. Quando se utiliza a sequência de aminoácidos identificada por SEQ ID NO: 1 para descrever a sequência de aminoácidos de FVIIa, faz-se observar que o péptido ligado entre R152 e I153 da forma de cadeia singular foi clivado e que uma das cadeias contém os resíduos aminoácidos 1-152 e a outra cadeia contém os resíduos aminoácidos 153-406.

Os termos "rFVII" e "rFVIIa" designam os polipeptidos FVII e FVIIa produzidos por técnicas recombinantes.

Os termos "hFVII" e "hFVIIa" referem-se, respectivamente, ao FVII e ao FVIIa humanos espontâneos típicos, que possuem a sequência de aminoácidos identificada por SEQ ID NO: 1.

Os termos "rhFVII" e "rhFVIIa" referem-se ao FVII e ao FVIIa humanos espontâneos típicos, que possuem a sequência de aminoácidos identificada por SEQ ID NO: 1, produzidos por meios recombinantes. Um exemplo do rhFVIIa é o NovoSeven®.

Quando aqui utilizado, o termo "domínio Gla" pretende abranger os resíduos aminoácidos 1 a 45 da SEQ ID NO: 1.

Assim sendo, o termo "posição localizada fora do domínio Gla" abrange os resíduos aminoácidos 46-406 da SEQ ID NO: 1.

As abreviaturas "FX", "TF" e "TFPI" correspondem respectivamente a Factor X, Factor Tecidual e Inibidor das Vias do Factor Tecidual.

O termo "domínio de protease" é utilizado para referir os resíduos 153-406, contados a partir do terminal N.

O termo "local catalítico" é utilizado para qualificar a tríade catalítica constituída por S344, D242 e H193 da variante polipeptídica.

O termo "original" serve para indicar a molécula que irá ser modificada/melhorada de acordo com a presente invenção. Embora o polipéptido original que se pretende modificar pelos métodos da presente invenção possa ser qualquer polipéptido FVII ou FVIIa, sendo por isso proveniente de qualquer origem, *v.g.*, uma origem de mamífero não humano, é preferível que o polipéptido original seja o hFVII ou o hFVIIa.

Uma "variante" é um polipéptido que difere do seu polipéptido original em um ou em vários resíduos aminoácidos, normalmente em 1-15 resíduos aminoácidos (*v.g.*, em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 resíduos aminoácidos), por exemplo, em 1-10 resíduos aminoácidos, *v.g.*, em 1-8, 1-6, 1-5 ou 1-3 resíduos aminoácidos. Normalmente, o polipéptido original é o hFVII ou o hFVIIa.

O termo "conjugado" (ou, em alternativa, "polipéptido conjugado") designa uma molécula heterogénea (no sentido em que pode ser mista ou quimérica) formada pelo acoplamento covalente de um ou vários polipeptidos a um ou vários

radicais não polipeptídicos, tais como moléculas poliméricas, compostos lipofílicos, radicais açúcar ou agentes orgânicos modificadores. De preferência, o conjugado é solúvel em concentrações e condições relevantes, isto é, solúvel em fluidos fisiológicos tais como o sangue. Como exemplos de polipeptidos conjugados da presente invenção refere-se os polipeptidos glicosilados e/ou peguילים.

O termo "ligação covalente" ou "ligação de forma covalente" significa que a variante polipeptídica e o radical não polipeptídico ou estão directamente unidos um ao outro de forma covalente ou então estão indirectamente unidos um ao outro de forma covalente, através de um radical intermediário, pelo menos, tal como uma ponte, um separador ou um radical ligador.

O termo "radical não polipeptídico" serve para designar uma molécula, diferente de um polímero peptídico, constituída por monómeros aminoácidos ligados entre si por uniões peptídicas, em que a referida molécula é capaz de se conjugar com um grupo de acoplamento da variante polipeptídica da invenção. Como exemplos preferíveis de tais moléculas refere-se as moléculas poliméricas, os radicais açúcar, os compostos lipofílicos ou os agentes orgânicos modificadores. Quando utilizado no contexto de uma variante conjugada da presente invenção, faz-se observar que o radical não polipeptídico está ligado à parte polipeptídica da variante conjugada através de um grupo de acoplamento do polipeptido. Conforme se disse antes, o radical não polipeptídico pode estar directa ou indirectamente ligado ao grupo de acoplamento, de uma maneira covalente.

Uma "molécula polimérica" é uma molécula formada pela ligação covalente de dois ou mais monómeros, em que um dos monómeros é um resíduo aminoácido, com a excepção em que o polímero é a albumina humana ou uma outra proteína abundante no plasma. O termo "polímero" pode ser utilizado como alternativa ao termo "molécula polimérica". O termo pretende abranger também as moléculas de hidratos de carbono acopladas por glicosilação *in vitro*, isto é, uma glicosilação sintética efectuada *in vitro* e que consiste, normalmente, em ligar, de maneira covalente, uma molécula de um hidrato de carbono a um grupo de acoplamento da variante polipeptídica, utilizando, facultativamente, um agente de reticulação.

O termo "radical açúcar" serve para designar uma molécula que contém um hidrato de carbono, constituída por um ou vários resíduos monossacarídicos, a qual pode ser acoplada à variante polipeptídica (para proporcionar um conjugado da variante polipeptídica sob a forma de uma variante polipeptídica glicosilada) por meio de uma glicosilação *in vivo*. O termo "glicosilação *in vivo*" serve para designar qualquer acoplamento de um radical açúcar que ocorra *in vivo*, isto é, durante o processamento pós-traduccional numa célula de glicosilação utilizada para a expressão da variante polipeptídica, *v.g.*, por meio de uma glicosilação ligada a N e ligada a O. A estrutura oligossacarídica exacta depende, em grande medida, do organismo de glicosilação em questão.

Um "local de N-glicosilação" possui a sequência N-X-S/T/C, em que o símbolo X representa um resíduo aminoácido, com a excepção da prolina, o símbolo N representa asparagina e S/T/C representa serina, treonina ou cisteína, de preferência serina ou treonina e mais preferencialmente

treonina. De preferência, o resíduo aminoácido na posição +3 em relação ao resíduo asparagina não é um resíduo prolina.

Um "local de O-glicosilação" é o grupo OH de um resíduo serina ou treonina.

O termo "grupo de acoplamento" serve para designar um grupo funcional da variante polipeptídica, em particular de um seu resíduo aminoácido ou de um seu radical hidrato de carbono, capaz de se acoplar a um radical não polipeptídico, tal como uma molécula polimérica, uma molécula lipofílica, um radical açúcar ou um agente orgânico modificador. Os grupos de acoplamento úteis e seus radicais não polipeptídicos correspondentes são os que ressaltam do quadro subsequente.

Grupo de acoplamento	Aminoácido	Exemplos de radicais não polipeptídicos	Método de conjugação/PEG activado	Referência
-NH ₂	Terminal N, Lys	Polímero, v.g., PEG, com um grupo amida ou imina	mPEG-SPA mPEG tresilado	'Nektar Therapeutics' Delgado <i>et al.</i> , "Critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems" 9(3,4):249-304 (1992)
-COOH	Terminal C, Asp, Glu	Polímero, v.g. PEG, com um grupo éster ou amida Radical hidrato de carbono	mPEG-Hz acoplamento <i>in vitro</i>	'Nektar Therapeutics'

(continuação)

Grupo de acopla- -mento	Aminoácido	Exemplos de radicais não polipeptídicos	Método de conjugação/ PEG activado	Referência
-SH	Cys	Polímero, v.g. PEG, com um grupo dissulfureto, maleimida ou vinil-sulfona Radical hidrato de carbono	PEG-vinil-sulfona PEG-maleimida acoplamento <i>in vitro</i>	'Nektar Therapeutics' Delgado <i>et al.</i> , "Critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems" 9(3,4): 249-304 (1992)
-OH	Ser, Thr, Lys, OH-	radical açúcar PEG com éster, éter, carbamato, carbonato	O-glicosilação <i>in vivo</i>	
-CONH ₂	Asn como parte de um local de N-glicosilação	Radical açúcar Polímero, v.g., PEG	N-glicosilação <i>in vivo</i>	
Resíduo aromático	Phe, Tyr, Trp	Radical hidrato de carbono	Acoplamento <i>in vitro</i>	
-CONH ₂	Gln	Radical hidrato de carbono	Acoplamento <i>in vitro</i>	'Yan e Wold', "Biochemistry", 1984, Jul 31; 23(16): 3759-65
Aldeído cetona	Oligossacárido oxidado	Polímero, v.g., PEG, PEG-hidrazida	peguilação	'Andresz <i>et al.</i> , 1978, "Macromol. Chem.", 179:301, WO 92/16555, WO 00/23114

(continuação)

Grupo de acoplamento	Aminoácido	Exemplos de radicais não polipeptídicos	Método de conjugação/PEG activado	Referência
Guanidino	Arg	Radical hidrato de carbono	Acoplamento <i>in vitro</i>	'Lundblad e Noyes', "Chemical Reagents for Protein Modification, CRC' Press Inc., Flórida, E.U.A.
Anel imidazol	His	Radical hidrato de carbono	Acoplamento <i>in vitro</i>	Tal como para a guanidina

Para a N-glicosilação *in vivo* utiliza-se o termo "grupo de acoplamento" de uma maneira não convencional para indicar os resíduos aminoácidos que constituem um local de N-glicosilação (com a sequência N-X-S/T/C, conforme indicado antes). Embora o resíduo asparagina do local de N-glicosilação seja aquele ao qual o radical açúcar é acoplado durante a glicosilação, tal acoplamento não pode ser conseguido a não ser que se encontrem presentes outros resíduos aminoácidos do local de N-glicosilação.

Assim sendo, quando o radical não polipeptídico é um radical açúcar e a conjugação é efectuada por N-glicosilação *in vivo*, o termo "resíduo aminoácido que compreende um grupo de acoplamento para um radical não polipeptídico", tal como é utilizado a propósito das alterações da sequência de aminoácidos do polipéptido, pretende significar que um ou vários resíduos aminoácidos, que constituem um local de N-glicosilação *in vivo*, irão ser alterados de tal maneira que seja introduzido um local de N-glicosilação funcional *in vivo* na sequência de aminoácidos.

Na presente memória descritiva, os nomes dos aminoácidos e os nomes dos átomos (v.g., CA, CB, CD, CG, SG, NZ, N, O, C, etc.) utilizados são os que estão definidos em 'Protein DataBank' (PDB) (www.pdb.org), com base na nomenclatura da IUPAC (IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (nomes de resíduos, nomes de átomos, etc), *Eur. J. Biochem.*, 138,9-37 (1984), conjuntamente com as suas correcções em *Eur. J. Biochem.*, 152, 1 (1985)).

O termo "resíduo aminoácido" pretende designar qualquer resíduo aminoácido natural ou sintético e pretende indicar, fundamentalmente, um resíduo aminoácido contido no conjunto constituído pelos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente, isto é, seleccionados entre o conjunto constituído pelos resíduos alanina (Ala ou A), cisteína (Cys ou C), ácido aspártico (Asp ou D), ácido glutâmico (Glu ou E), fenilalanina (Phe ou F), glicina (Gly ou G), histidina (His ou H), isoleucina (Ile ou I), lisina (Lys ou K), leucina (Leu ou L), metionina (Met ou M), asparagina (Asn ou N), prolina (Pro ou P), glutamina (Gln ou Q), arginina (Arg ou R), serina (Ser ou S), treonina (Thr ou T), valina (Val ou V), triptofano (Trp ou W) e tirosina (Tyr ou Y).

A terminologia utilizada para identificar as posições dos aminoácidos é a que se ilustra a seguir. G124 indica que a posição 124 está ocupada por um resíduo glicina na sequência de aminoácidos identificada por SEQ ID NO: 1. G124R indica que o resíduo glicina na posição 124 foi substituído por um resíduo arginina. As substituições alternativas estão indicadas pelo símbolo "/", v.g., N145S/T significa uma sequência de aminoácidos em que o resíduo asparagina na posição 145 está substituído quer com

serina quer com treonina. As substituições múltiplas estão indicadas pelo símbolo "+", v.g., K143N+N145S/T indica uma sequência de aminoácidos que compreende uma substituição do resíduo lisina na posição 143 por um resíduo asparagina e uma substituição do resíduo asparagina na posição 145 por um resíduo serina ou um resíduo treonina. A inserção de um resíduo aminoácido suplementar, v.g., a inserção de um resíduo alanina a seguir a G124 está indicada por G124GA. A inserção de dois resíduos alanina suplementares a seguir a G124 está indicada por G124GAA, etc.. Tal como aqui utilizado, o termo "inserido na posição X" ou "inserção na posição X" significa que o(s) resíduo(s) aminoácido(s) é(são) inserido(s) entre o resíduo aminoácido X e o X+1. Uma deleção de um resíduo aminoácido é indicada por um asterisco. Por exemplo, a deleção do resíduo glicina na posição 124 é indicada por G124*.

Salvo quando especificado de outro modo, a numeração dos resíduos aminoácidos feita no presente texto corresponde à sequência de aminoácidos do polipéptido hFVII/hFVIIa (SEQ ID NO: 1).

O termo "difere de ", tal como utilizado a propósito das mutações específicas, serve para indicar outras diferenças que estejam presentes para além da diferença especificada de aminoácidos. Por exemplo, para além das modificações efectuadas no domínio Gla, com o objectivo de se aumentar a activação do FX, o polipéptido pode conter outras modificações que não estejam necessariamente relacionadas com este efeito.

Assim, para além das modificações de aminoácidos aqui descritas, faz-se observar que a sequência de aminoácidos da variante polipeptídica da invenção pode conter, se

desejado, outras alterações, isto é, outras substituições, inserções ou deleções. Por exemplo, tais alterações podem compreender o truncamento do terminal N e/ou do terminal C em um ou vários resíduos aminoácidos (v.g., em 1-10 resíduos aminoácidos), ou a adição de um ou vários resíduos suplementares no terminal N e/ou no terminal C, v.g., a adição de um resíduo metionina no terminal N ou a introdução de um resíduo cisteína no terminal C ou próximo dele, e também as "substituições de aminoácidos conservadoras", isto é, as substituições efectuadas no seio de grupos de aminoácidos com características semelhantes, v.g., aminoácidos pequenos, aminoácidos ácidos, aminoácidos polares, aminoácidos básicos, aminoácidos hidrofóbicos e aminoácidos aromáticos.

Como exemplos de tais substituições conservadoras refere-se as que estão agrupadas no quadro seguinte.

1	Alanina (A)	Glicina (G)	Serina (S)	Treonina (T)
2	Ácido aspártico (D)	Ácido glutâmico (E)		
3	Asparagina (N)	Glutamina (Q)		
4	Arginina (R)	Histidina (H)	Lisina (K)	
5	Isoleucina (I)	Leucina (L)	Metionina (M)	Valina (V)
6	Fenilalanina (F)	Tirosina (Y)	Triptofano (W)	

Há ainda outros exemplos de modificações suplementares que estão explicitadas nas secções com os títulos "Modificações fora do domínio Gla" e "Outras modificações fora do domínio Gla".

O termo "sequência nucleotídica" pretende designar um segmento consecutivo de duas ou mais moléculas nucleotídicas. A sequência nucleotídica pode ser genómica, de ADNc, de

ARN, semi-sintética, de origem sintética ou qualquer sua combinação.

O termo "vector" designa um plasmídeo, ou outras sequências nucleotídicas, com possibilidade de replicação dentro de uma célula hospedeira ou que possa ser integrado no genoma da célula hospedeira, sendo por esse motivo útil para desempenhar diferentes funções em conjunto com as células hospedeiras compatíveis (um sistema vector-hospedeiro) para facilitar a clonagem da sequência nucleotídica, isto é, para a produção de quantidades úteis da sequência, para comandar a expressão do produto génico codificado pela sequência e para integrar a sequência nucleotídica no genoma da célula hospedeira. O vector irá conter diferentes componentes, dependendo disso da função que irá desempenhar.

Os termos "célula", "célula hospedeira", "linhagem celular" e "cultura celular" são aqui utilizados indiferentemente, subentendendo-se desde já que esses termos abrangem a progenia resultante do desenvolvimento de uma célula ou da sua criação em cultura.

Os termos "transformação" e "transfecção" são utilizados, indiferentemente, para designar o processo de introdução de ADN numa célula.

O termo "funcionalmente ligado" refere-se à união covalente de duas ou mais sequências nucleotídicas, por meio de uma ligação enzimática ou de qualquer outra forma, numa configuração relativa entre elas, de tal modo que a função normal das sequências possa ser realizada. De um modo geral, o termo "funcionalmente ligado" significa que as sequências nucleotídicas que irão ser ligadas são contíguas e, no caso de uma sequência líder secretória, são

contíguas e estão em fase de leitura. O encadeamento é efectuado por ligação em locais de restrição convenientes. Se tais locais não existirem, então são utilizados adaptadores ou ligadores de oligonucleótidos sintéticos, em conjunto com métodos convencionais do ADN recombinante.

No contexto da presente invenção, o termo "modificação" ou "modificação de aminoácidos" serve para designar a substituição de uma cadeia lateral de aminoácidos, a substituição de um resíduo aminoácido, a deleção de um resíduo aminoácido ou a inserção de um resíduo aminoácido.

O termo "introduzir" refere-se à introdução de um resíduo aminoácido, em particular por substituição de um resíduo aminoácido existente ou, em alternativa, por inserção de um resíduo aminoácido suplementar.

O termo "remover" refere-se à remoção de um resíduo aminoácido, em particular por substituição do resíduo aminoácido, que se pretende remover, por um outro resíduo aminoácido ou, em alternativa, por deleção (sem substituição) do resíduo aminoácido que se pretende remover.

No contexto da presente invenção, o termo "actividade" deve ser entendido como sendo a actividade relevante associada ao ensaio em que a actividade é realmente medida.

Assim, o termo "actividade amidolítica" serve para designar a actividade medida no "ensaio amidolítico" aqui descrito. Para manifestar "actividade amidolítica", uma variante da invenção, na sua forma activada, deve ter pelo menos 10% da actividade amidolítica do rhFVIIa, quando testada no "ensaio amidolítico" aqui descrito. De acordo com uma forma de realização preferencial da invenção, na sua forma activada, a variante possui pelo menos 20% da

actividade amidolítica do rhFVIIa, por exemplo, pelo menos 30%, v.g., pelo menos 40%, mais preferencialmente pelo menos 50%, por exemplo, pelo menos 60%, v.g., pelo menos 70%, ainda mais preferencialmente pelo menos 80%, por exemplo, pelo menos 90% da actividade amidolítica do rhFVIIa, quando testada no "ensaio amidolítico" aqui descrito. De acordo com uma forma de realização interessante, na sua forma activada, a variante possui praticamente a mesma actividade amidolítica do rhFVIIa, por exemplo, uma actividade amidolítica compreendida entre 75-125% da actividade amidolítica do rhFVIIa.

O termo "actividade coagulante" designa a actividade medida no "Ensaio com Sangue Total" aqui descrita, isto é, o tempo necessário para se obter a formação de um coágulo. Assim, um tempo de coagulação menor corresponde a uma actividade coagulante maior.

O termo "actividade coagulante maior" serve para indicar que o tempo de coagulação da variante polipeptídica diminui significativamente, em termos estatísticos, em relação ao observado com o rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa, conforme determinado em condições comparáveis e quando a medição é feita nos termos do "Ensaio com Sangue Total" aqui descrita.

No contexto da presente invenção, o termo "actividade" também é utilizado a propósito da capacidade das variantes para activarem o FX convertendo-o em FXa. Esta actividade também é designada por "actividade de activação do FX" ou "actividade de geração do FXa" e pode ser determinada no "Ensaio de Activação do Factor X Independente do TF" aqui descrito.

O termo "maior actividade de activação do FX" ou "maior actividade de geração de FXa" serve para indicar que uma

variante da invenção, na sua forma activada, tem uma capacidade significativamente maior, em termos estatísticos, para activar o FX convertendo-o em FXa, comparativamente com uma molécula de referência, tal como rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa. O aumento da maior actividade de activação do FX produzido por uma variante da invenção (na sua forma activada) pode ser determinado, convenientemente, no "Ensaio de Activação do Factor X Independente de TF" aqui descrito.

O termo "imunogenicidade", quando utilizado a propósito de uma determinada substância, tem por objecto indicar a aptidão dessa substância para induzir uma resposta do sistema imunitário. A resposta imunitária pode ser uma resposta mediada por uma célula ou por um anticorpo (ver, v.g., Roitt: Essential Immunology (10^a Edição, Blackwell) para se saber a definição de imunogenicidade). Normalmente, uma reduzida actividade de anticorpos irá ser um indicador de uma imunogenicidade reduzida. A imunogenicidade pode ser determinada mediante a utilização de qualquer processo adequado, conhecido na especialidade, v.g., *in vivo* ou *in vitro*.

O termo "semi-vida funcional *in vivo*" é utilizado com a sua significação normal, isto é, o período durante o qual 50% da actividade biológica do polipéptido se encontra ainda presente no corpo/órgão visado, ou o período ao fim do qual a actividade do polipéptido é 50% do seu valor inicial.

Como alternativa à determinação da semi-vida funcional *in vivo*, é possível determinar a "semi-vida no soro", isto é, o período ao fim do qual 50% do polipéptido circula no plasma ou na corrente sanguínea antes de ser depurado. A determinação da

semi-vida no soro é, normalmente, mais simples do que a determinação da semi-vida funcional *in vivo*, sendo normalmente a magnitude da semi-vida no soro um bom indicador da magnitude da semi-vida funcional *in vivo*. Os termos alternativos a semi-vida no soro são "semi-vida no plasma", "semi-vida na circulação", "depuração sérica", "depuração plásmica" e "semi-vida de depuração". O polipéptido é depurado pela acção de um ou vários sistemas reticuloendoteliais (RES), rim, baço ou fígado, pelo factor tecidual, mediante eliminação mediada pelo receptor SEC ou por outro receptor, ou por proteólise específica ou não específica. Normalmente, a depuração depende do tamanho (relativamente ao valor crítico da filtração glomerular), carga eléctrica, cadeias de hidratos de carbono acopladas e da presença de receptores celulares para proteína. A funcionalidade que deve ser retida é seleccionada, normalmente, entre as actividades pró-coagulante, proteolítica ou de ligação ao receptor. A semi-vida funcional *in vivo* e a semi-vida no soro podem ser determinadas por meio de quaisquer métodos convenientes conhecidos na especialidade.

O termo "maior", tal como utilizado a propósito da semi-vida funcional *in vivo* ou da semi-vida no soro, serve para indicar que a semi-vida relevante da variante polipeptídica é significativamente aumentada, em termos estatísticos, relativamente à da molécula de referência, tal como rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa, conforme determinado em condições comparáveis (determinada tipicamente num animal experimental, por exemplo, ratos, coelhos, cobaias ou macacos).

O termo "AUC_{iv}" ou "área sob a curva quando administrado por via intravenosa" é utilizado com a sua significação normal, ou seja, é a área sob a curva de actividade no soro em função do tempo, em que a variante

polipeptídica foi administrada por via intravenosa, em particular quando administrada aos ratos por via intravenosa. Tipicamente, a actividade medida é a "actividade coagulante", conforme definido antes. Uma vez determinados os pontos experimentais da actividade em função do tempo, é possível calcular, convenientemente, a AUC_{iv} por meio de um programa informático, tal como o 'GraphPad Prism 3.01'.

Para se fazer uma comparação directa entre os valores de AUC_{iv} para diferentes moléculas (v.g., entre as variante das invenção e uma molécula de referência, tal como rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa), faz-se observar que deve ser administrada a mesma quantidade de actividade. Em consequência, os valores de AUC_{iv} são, tipicamente, normalizados (isto é, corrigidos em termos das diferenças nas doses injectadas) e expressos sob a forma de $AUC_{iv}/dose$ administrada.

O termo "sensibilidade reduzida à degradação proteolítica" pretende significar, essencialmente, que a variante polipeptídica tem uma sensibilidade reduzida à degradação proteolítica em comparação com hFVIIa, rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa, conforme determinado em condições comparáveis. De preferência, a degradação proteolítica é reduzida pelo menos em 10% (v.g., é reduzida em 10-25% ou em 10-50%, por exemplo, pelo menos 25%, v.g., é reduzida em 25-50%, em 25-75% ou em 25-100%), mais preferencialmente é reduzida pelo menos em 35%, por exemplo, pelo menos em 50% (v.g., é reduzida em 50-75% ou em 50-100%), ainda mais preferencialmente é reduzida pelo menos em 60%, por exemplo, pelo menos em 75% (v.g., é reduzida em 75-100%) ou até mesmo pelo menos 90%.

O termo "depuração renal" é utilizado com a sua significação normal para indicar qualquer depuração que resulte da acção dos rins, v.g., por filtração glomerular, por excreção tubular ou por degradação nas células tubulares. A depuração renal depende das características físicas do polipéptido, incluindo o tamanho (diâmetro), o volume hidrodinâmico, a simetria, a forma/rigidez e a carga eléctrica. Normalmente, considera-se que um peso molecular de cerca de 67 kDa é um valor crítico para a depuração renal. A depuração renal pode ser determinada por meio de qualquer ensaio conveniente, v.g., um ensaio *in vivo* consagrado. De uma forma típica, determina-se a depuração renal administrando um polipéptido marcado (v.g., marcado com um radioisótopo ou com fluorescência) a um paciente e medindo a actividade do identificador na urina recolhida desse paciente. Determina-se a depuração renal reduzida, relativamente a um correspondente polipéptido de referência, v.g., rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa, em condições comparáveis. De preferência, a velocidade de depuração renal da variante polipeptídica é reduzida pelo menos em 50%, de preferência, pelo menos em 75% e mais preferencialmente pelo menos em 90%, comparativamente com rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa.

Os termos "local de ligação do factor tecidual", "região do local activo" e "crista da fissura de ligação do local activo" são definidos tomando como referência o Exemplo 1.

O termo "resíduo aminoácido hidrofóbico" compreende os seguintes resíduos aminoácidos: isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V), fenilalanina (F), tirosina (Y) e triptofano (W).

O termo "resíduo aminoácido com carga negativa" compreende os seguintes resíduos aminoácidos: ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E).

O termo "resíduo aminoácido com carga positiva" compreende os seguintes resíduos aminoácidos: lisina (K), arginina (R) e histidina (H).

Variantes da Invenção

As modificações efectuadas no domínio Gla do polipeptídeo original permitem obter, preferencialmente, a molécula resultante com uma maior afinidade de ligação à membrana fosfolipídica, uma melhor aptidão para activar o FX, convertendo-o em FXa, e/ou uma maior actividade coagulante. As variantes da invenção também podem ter uma reduzida afinidade de ligação do factor tecidual e uma reduzida actividade ao ligarem-se ao factor tecidual.

Sem se pretender definir qualquer limitação imposta por qualquer teoria particular, admite-se presentemente que a maior afinidade de ligação à membrana fosfolipídica tem como resultado uma maior concentração local das variantes polipeptídicas activadas que estejam muito próximas dos outros factores de coagulação, particularmente o FX. Assim, a taxa de activação do FX, convertendo-o em FXa, irá ser superior, simplesmente devido a uma maior razão molar entre a variante FVII activada e o FX. Da maior taxa de activação do FX resulta, então, uma maior quantidade de trombina activa e consequentemente uma taxa maior de reticulação da fibrina.

Em consequência, antevê-se que o tratamento médico com uma variante polipeptídica de acordo com a invenção possa proporcionar vantagens comparativamente com o composto

rhFVIIa presentemente disponível (NovoSeven®), tais como uma dose menor, uma eficácia maior e/ou uma acção mais rápida.

Além disso, admite-se que as variantes independentes do factor tecidual, isto é, as variantes que tenham uma actividade reduzida quando ligadas ao factor tecidual, comparativamente com o factor VIIa humano de tipo selvagem, possam proporcionar determinadas vantagens de segurança em termos de um risco reduzido de formação indesejada de coágulos sanguíneos (v.g., trombose ou tromboembolia), em particular quando utilizadas para tratar fenómenos hemorrágicos descontrolados agudos, tais como os traumáticos.

Assim, de acordo com uma forma de realização da invenção muitíssimo preferencial, a variante polipeptídica, na sua forma activada e quando comparada com uma molécula de referência, tal como o rhFVIIa ou o [P10Q+K32E]rhFVIIa, tem uma maior actividade de activação do FX, em particular quando experimentada num ensaio independente do factor tecidual, tal como o "Ensaio de Activação do Factor X Independente do TF" aqui descrito. Mais particularmente, é preferível que a razão entre a actividade de activação do FX da variante polipeptídica, na sua forma activada, e a actividade de activação do FX de uma molécula de referência seja pelo menos igual a 1,25 quando experimentada no "Ensaio de Activação do Factor X Independente do TF", aqui descrito. Mais preferencialmente, esta razão é pelo menos igual a 1,5, por exemplo, pelo menos 1,75, v.g., pelo menos 2, ainda mais preferencialmente é pelo menos 3, por exemplo, pelo menos 4, e mais preferencialmente é pelo menos 5.

Quando a molécula de referência é rhFVIIa, a razão entre a actividade da variante polipeptídica, na sua forma

activada, para activação do FX e a actividade do rhFVIIa para activação do FX é, preferencialmente, pelo menos cerca de 5 e, tipicamente, é pelo menos cerca de 10, quando experimentada no "Ensaio de Activação do Factor X Independente do TF" aqui descrito, podendo ser, por exemplo, pelo menos cerca de 15 ou 20.

De acordo com uma outra forma de realização da invenção muitíssimo preferencial, as variantes da invenção possuem uma maior actividade coagulante (isto é, um período de coagulação reduzido), comparativamente com o rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa. De acordo com uma forma de realização preferível da invenção, a razão entre o tempo para se alcançar a formação de coágulo com a variante (t_{variant}) e o tempo para se alcançar a formação de coágulo com rhFVIIa (t_{wt}) ou [P10Q+K32E]rhFVIIa ($t_{\text{P10Q+K32E}}$) é, no máximo, 0,9 quando experimentadas no "Ensaio com Sangue Total" aqui descrito.

Mais preferencialmente, esta razão é, quando muito, 0,75, por exemplo, 0,7, ainda mais preferencialmente essa razão é, no máximo, 0,6 e muito mais preferencialmente essa razão é, no máximo, 0,5).

É possível conseguir uma ou várias dessas propriedades supramencionadas mediante as modificações aqui descritas.

Variantes da invenção que têm um resíduo aminoácido hidrofóbico na posição 34

Conforme se disse antes, a presente invenção diz respeito a um aspecto da variante polipeptídica de FVII ou FVIIa que possui uma sequência de aminoácidos que difere em 1-15 resíduos aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos de hFVII ou hFVIIa (SEQ ID NO:1), em que foi

introduzido um resíduo aminoácido hidrofóbico por substituição na posição 34.

O resíduo aminoácido hidrofóbico a introduzir na posição 34 pode ser seleccionado entre o conjunto constituído por I, L, M, V, F, Y e W, de preferência I, L e V e em particular L.

De acordo com uma forma de realização preferencial, a variante compreende também uma substituição de um aminoácido na posição 10, em particular P10Q, e/ou uma substituição de um aminoácido na posição 32, em particular K32E. De acordo com uma forma de realização particularmente preferencial da invenção, a variante compreende substituições em ambas as posições 10 e 32, por exemplo, P10Q+K32E.

Assim sendo, de acordo com uma forma de realização interessante da invenção, a variante compreende as substituições P10Q+K32E+A34L.

De acordo com uma forma de realização particular interessante da invenção, a variante compreende também uma inserção em que se introduz pelo menos um (tipicamente um) resíduo aminoácido entre as posições 3 e 4. É preferível que o resíduo aminoácido inserido seja um resíduo aminoácido hidrofóbico. Mais preferencialmente, a inserção é A3AY. Assim sendo, de acordo com uma forma de realização particular interessante da invenção, a variante compreende as modificações A3AY+P10Q+K32E+A34L.

Para além de quaisquer das modificações supramencionadas, a variante pode compreender uma outra substituição na posição 33. De preferência, introduz-se um resíduo aminoácido hidrofóbico por substituição na posição 33, em particular D33F.

O domínio Gla também pode conter modificações noutras posições, em particular nas posições 8, 11 e 28, por exemplo R28F ou R28E. Por outro lado, faz-se observar que o domínio Gla não deve ser demasiadamente modificado para que as propriedades de ligação à membrana não fiquem comprometidas. Deste modo, é preferível não fazer nenhuma modificação nos resíduos que fiquem γ -carboxilados, ou seja, é preferível não fazer nenhuma modificação nos resíduos 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 e 35. De uma maneira idêntica, em geral, é preferível que não sejam introduzidos radicais não polipeptídicos, tais como os radicais açúcar e/ou grupos PEG, no domínio Gla. Em consequência, é preferível não fazer nenhuma modificação no domínio Gla que criem um local de N-glicosilação *in vivo*.

Finalmente, faz-se observar que as modificações feitas no domínio Gla, descritas nesta secção, podem ser combinadas, vantajosamente, com uma ou várias modificações em posições localizadas fora do domínio Gla (ver a secção subsequente como o título "Modificações fora do domínio Gla" e na secção subsequente "Outras modificações fora do domínio Gla").

Variantes da invenção que compreendem uma substituição de um aminoácido na posição 36

Conforme se disse antes, a invenção diz respeito a uma variante polipeptídica de FVII ou FVIIa que possui uma sequência de aminoácidos que difere em 1-15 resíduos aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do hFVII ou hFVIIa (SEQ ID NO:1) em que um resíduo aminoácido

com carga eléctrica negativa foi introduzido por substituição na posição 36.

De preferência, o resíduo aminoácido a introduzir por substituição na posição 36 é um resíduo aminoácido com carga eléctrica negativa, *v.g.*, R36E ou R36D, em particular R36E.

De acordo com uma forma de realização preferencial, a variante compreende também uma substituição de um resíduo aminoácido na posição 10, em particular P10Q, e/ou uma substituição de um resíduo aminoácido na posição 32, em particular K32E. De acordo com uma forma de realização da invenção particularmente preferível, a variante compreende substituições em ambas as posições 10 e 32, por exemplo, P10Q+K32E.

A variante da invenção ainda pode conter uma substituição na posição 38. É preferível introduzir um resíduo aminoácido com carga eléctrica negativa por substituição na posição 38, *v.g.*, K38E ou K38D, em particular K38E.

Assim sendo, as variantes interessantes são aquelas que compreendem as substituições seguintes: P10Q+K32E+R36E ou P10Q+K32E+R36E+K38E.

De acordo com uma forma de realização particularmente interessante, a variante compreende também uma substituição de um resíduo aminoácido na posição 34 (isto é, a variante resultante apresenta substituições nos resíduos seguintes 10+32+34+36 ou 10+32+34+36+38). De preferência, introduz-se um resíduo aminoácido com carga eléctrica negativa por substituição na posição 34, *v.g.*, A34E ou A34D.

Como exemplos específicos de variantes preferíveis refere-se aqueles que compreendem as substituições seguintes: P10Q+K32E+A34E+R36E OU P10Q+K32E+A34D+R36E+K38E.

De acordo com uma forma de realização particular interessante da invenção, a variante compreende também uma inserção em que se insere pelo menos um (tipicamente um) resíduo aminoácido entre as posições 3 e 4. É preferível que o resíduo aminoácido inserido seja um resíduo aminoácido hidrofóbico. Mais preferencialmente, a inserção é A3AY.

Para além de quaisquer das modificações supramencionadas, a variante pode compreender uma outra substituição na posição 33. De preferência, introduz-se um resíduo aminoácido hidrofóbico por substituição na posição 33, em particular D33F.

O domínio Gla também pode conter modificações noutras posições, em particular nas posições 8, 11 e 28, por exemplo R28F ou R28E. Por outro lado, faz-se observar que o domínio Gla não deve ser demasiadamente modificado para que as propriedades de ligação à membrana não fiquem comprometidas. Deste modo, é preferível não fazer nenhuma modificação nos resíduos que fiquem γ -carboxilados, ou seja, é preferível não fazer nenhuma modificação nos resíduos 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 e 35. De uma maneira idêntica, em geral, é preferível que não sejam introduzidos radicais não polipeptídicos, tais como os radicais açúcar e/ou grupos PEG, no domínio Gla. Em consequência, é preferível não fazer nenhuma modificação no domínio Gla que criem um local de N-glicosilação *in vivo*.

Finalmente, faz-se observar que as modificações feitas no domínio Gla, descritas nesta secção, podem ser combinadas, vantajosamente, com uma ou várias modificações em posições localizadas fora do domínio Gla (ver a secção subsequente como o título "Modificações fora do domínio Gla" e na secção subsequente "Outras modificações fora do domínio Gla").

Variantes da invenção que compreendem substituições de aminoácidos nas posições 74, 77 ou 116

Conforme se disse antes, de acordo com um seu terceiro aspecto, a presente invenção diz respeito a uma variante polipeptídica de FVII ou FVIIa que possui uma sequência de aminoácidos que compreende as modificações de 3-15 aminoácidos relativamente a hFVII ou hFVIIa (SEQ ID NO:1), em que a referida sequência de aminoácidos compreende substituições de aminoácidos nas posições 10, 32 e pelo menos uma outra substituição de um aminoácido numa posição seleccionada entre o conjunto constituído pelas posições 74, 77 ou 116.

De acordo com uma forma de realização preferencial, a substituição de um aminoácido na posição 10 é P10Q e a substituição de um aminoácido na posição 32 é K32E.

Também é preferível que a substituição nas posições 74, 77 ou 116 seja seleccionada entre o conjunto constituído por P74S, E77A e E116D.

De acordo uma forma de realização interessante, a variante compreende também uma substituição de um aminoácido na posição 34. De preferência, introduz-se um resíduo aminoácido com carga eléctrica negativa por

substituição na posição 34, v.g., A34E ou A34D, em particular A34E.

De acordo com uma outra forma de realização interessante da invenção, a variante compreende também uma inserção em que se insere pelo menos um (tipicamente um) resíduo aminoácido entre as posições 3 e 4. É preferível que o resíduo aminoácido inserido seja um resíduo aminoácido hidrofóbico. Mais preferencialmente, a inserção é A3AY.

Assim, como exemplos específicos de variantes interessantes refere-se as variantes que compreendem as modificações seguintes: A3AY+P10Q+K32E+E116D, A3AY+P10Q+K32E+E77A e P10Q+K32E+A34D+P74S.

Para além de quaisquer das modificações supramencionadas, a variante pode compreender uma outra substituição na posição 33. De preferência, introduz-se um resíduo aminoácido hidrofóbico por substituição na posição 33, em particular D33F.

O domínio Gla também pode conter modificações noutras posições, em particular nas posições 8, 11 e 28, por exemplo R28F ou R28E. Conforme se disse antes, o domínio Gla não deve ser excessivamente modificado para que as propriedades de ligação à membrana não fiquem comprometidas, isto é, de preferência não devem ser feitas nenhuma modificações nos resíduos 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 e 35 e é preferível que não seja criado nenhum local de N-glicosilação *in vivo* no domínio Gla.

Finalmente, faz-se observar que as modificações feitas no domínio Gla, descritas nesta secção, podem ser vantajosamente combinadas com uma ou várias modificações em posições localizadas fora do domínio Gla (ver a secção

subsequente como o título "Modificações fora do domínio Gla" e na secção subsequente "Outras modificações fora do domínio Gla).

Modificações fora do domínio Gla

Foi já divulgado um período de semi-vida de 2,3 horas para o rhFVIIa na circulação, na publicação "Summary Basis for Approval for NovoSeven®", com o número de referência 96-0597 do FDA. São necessárias doses relativamente elevadas e administrações frequentes para se alcançar e manter o efeito profilático ou terapêutico desejado. Em consequência, é difícil conseguir uma regulação adequada das doses e a necessidade de uma administração intravenosa frequente impõe restrições à qualidade de vida do paciente.

Um molécula que tivesse uma semi-vida maior na circulação e/ou uma maior biodisponibilidade (por exemplo, uma maior área sob a curva, comparativamente com o rhFVIIa, quando administrada por via intravenosa), iria diminuir a o número de administrações necessárias. Dada a necessidade actual de injecções frequentes e o potencial para se obter níveis terapêuticos de FVIIa mais optimizados, com o concomitante efeito terapêutico melhorado, torna-se evidente que são necessárias melhores moléculas de tipo FVII ou de tipo FVIIa.

Assim sendo, um outro objectivo da presente invenção consiste em proporcionar melhores moléculas de FVII ou de FVIIa (variantes FVII ou FVIIa) com uma maior biodisponibilidade (por exemplo, uma maior área sob a curva, comparativamente com uma molécula de referência, por exemplo, o rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa, quando administrada por via intravenosa) e que seja capaz de

activar o factor X ou o factor Xa (sem se ligar ao factor tecidual) mais eficientemente do que uma molécula de referência, por exemplo, o rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa (sendo, por isso, capaz de tratar mais eficientemente hemorragias descontrolada, tais como a resultantes de traumas, ou patologias crónicas, tais como a hemofilia).

Assim, as variantes interessantes da invenção são aquelas que geram, nas suas formas activadas e quando comparadas com uma molécula de referência, por exemplo, o rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa, uma maior área sob a curva quando administradas por via intravenosa (AUC_{iv}). Isto pode ser determinado, convenientemente, mediante administração intravenosa aos ratos. Mais particularmente, as variantes interessantes da presente invenção são aquelas em que a razão entre o valor AUC_{iv} da referida variante, na sua forma activada, e o valor AUC_{iv} de uma molécula de referência, tal como o rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa, seja pelo menos igual a 1,25, por exemplo, pelo menos 1,5, v.g., pelo menos 1,75, mais preferencialmente pelo menos 2, por exemplo, pelo menos 3, ainda mais preferencialmente pelo menos 4, por exemplo, pelo menos 5, em particular quando administradas (por via intravenosa) aos ratos.

Este efeito irá corresponder normalmente a um maior período de semi-vida funcional *in vivo* e/ou a um maior período de semi-vida no soro, comparativamente com uma molécula de referência, por exemplo, o rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa. Assim sendo, de acordo com uma outra forma de realização interessante da invenção, a razão entre a semi-vida funcional *in vivo* ou a semi-vida no soro para a variante, na sua forma activada, e a semi-vida funcional *in vivo* ou a semi-vida no soro para uma molécula de

referência, tal como o rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa, é pelo menos igual a 1,25. Mais preferencialmente, a razão entre a semi-vida relevante para a variante, na sua forma activada, e a semi-vida relevante para a molécula de referência, tal como o rhFVIIa ou [P10Q+K32E]rhFVIIa, é pelo menos igual a 1,5, por exemplo, pelo menos 1,75, v.g., pelo menos 2, ainda mais preferencialmente é pelo menos 3, por exemplo, pelo menos 4, v.g., pelo menos 5.

Uma maneira de se aumentar o período de semi-vida de uma proteína na circulação consiste em reduzir a depuração renal da proteína. Isto pode ser conseguido conjugando a proteína com um radical químico que seja capaz de conferir à proteína uma depuração renal reduzida, v.g., o polietileno-glicol (PEG).

Além disso, o acoplamento de um radical químico à proteína ou a substituição de aminoácidos expostos à proteólise pode bloquear, eficientemente, o contacto com uma enzima proteolítica, o que conduziria, caso contrário, à degradação proteolítica da proteína.

Conforme se disse anteriormente, a estabilidade devida à degradação proteolítica é um problema conhecido no tratamento actual com o rhFVIIa. Assim, a degradação proteolítica é um obstáculo muito importante à obtenção de uma preparação em solução, ao contrário do que sucede com um produto liofilizado. A vantagem de se obter uma preparação solúvel estável resulta do facto de ser mais facilmente manipulada pelo paciente e, no caso de uma emergência, a sua acção ser mais rápida, o que pode ser potencialmente importante para salvar vidas. No documento WO 88/10295 estão descritas experiências para evitar a

degradação proteolítica por mutagenese dirigida ao local em locais proteolíticos principais.

O documento WO 01/58935 descreve diversas modificações convenientes que proporcionam um aumento da AUC_{iv} e da semi-vida funcional e/ou da semi-vida no soro *in vivo*. As variantes descritas no documento WO 01/58935 são o resultado de uma estratégia genericamente nova para o desenvolvimento de melhores moléculas de FVII ou FVIIa, as quais podem ser utilizadas também para o polipéptido original FVII ou FVIIa da presente invenção.

Mais concretamente, fazendo a remoção e/ou a introdução de um resíduo aminoácido, que compreenda um grupo de acoplamento para um radical não polipeptídico, no polipéptido original FVII ou FVIIa é possível adaptar convenientemente o polipéptido, de modo a fazer com que a molécula fique mais propensa para uma conjugação com um radical seleccionado não polipeptídico, para assim se otimizar o padrão de conjugação (v.g., para se garantir uma distribuição óptima e o número de radicais não polipeptídicos sobre a superfície da variante polipeptídica de FVII ou FVIIa e para se garantir que apenas os grupos de acoplamento que se pretende que venham a ser conjugados se encontram presentes na molécula), obtendo-se assim uma nova molécula conjugada que possui actividade amidolítica e que tem, suplementarmente, uma ou várias propriedades melhores, comparativamente com o rhFVIIa.

Em casos interessantes da presente invenção altera-se mais do que um resíduo aminoácido localizado fora do domínio Gla, v.g., a alteração abrange a remoção e também a introdução de resíduos aminoácidos que compreendem um grupo de acoplamento para o radical escolhido não polipeptídico.

Para além da remoção e/ou da introdução dos resíduos aminoácidos, a variante polipeptídica pode compreender outras substituições que não estejam relacionadas com a introdução e/ou a remoção dos resíduos aminoácidos que compreendem um grupo de acoplamento para o radical não polipeptídico.

Além disso, a variante polipeptídica pode ser acoplada a um inibidor da proteinase da serina para inibir o local catalítico da variante polipeptídica. Em alternativa, é possível mutacionar um ou vários dos resíduos aminoácidos presentes no local catalítico (S344, D242 e H193) para fazer com que a variante resultante fique inactiva. Um exemplo de uma mutação dessas é S344A.

O resíduo aminoácido que compreende um grupo de acoplamento para um radical não polipeptídico, quer seja removido ou introduzido, é seleccionado com base na natureza do radical escolhido não peptídico e, na maior parte dos casos, com base no método utilizado para se conseguir fazer a conjugação entre a variante polipeptídica e o radical não polipeptídico. Por exemplo, se o radical não polipeptídico for uma molécula polimérica, por exemplo, uma molécula derivada de polietileno-glicol ou de óxido de polioxialquileno, então os resíduos aminoácidos que compreendem um grupo de acoplamento podem ser seleccionados entre o conjunto constituído por lisina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, histidina e tirosina, de preferência lisina, cisteína, ácido aspártico e ácido glutâmico e mais preferencialmente lisina e cisteína, em particular cisteína.

Sempre que um grupo de acoplamento para um radical não polipeptídico seja introduzido num polipeptídeo original ou

dele removido, a posição do resíduo aminoácido que se pretende modificar está localizada, preferencialmente, à superfície do polipéptido original FVII ou FVIIa e, mais preferencialmente, está ocupada por um resíduo aminoácido que tem pelo menos 25% da sua cadeia lateral exposta à superfície (conforme aqui definido no exemplo 1) e preferencialmente pelo menos 50% da sua cadeia lateral exposta à superfície (conforme aqui definido no exemplo 1). Tais posições foram identificadas com base na análise de uma estrutura 3D da molécula hFVII ou hFVIIa, conforme descrito no documento WO 01/58935.

Além do mais, a posição que se pretende modificar é seleccionada, preferencialmente, a partir de uma parte da molécula FVII ou FVIIa que está localizada fora do local de ligação do factor tecidual, e/ou fora da região do local activo, e/ou fora da crista da fissura de ligação do local activo. Estes locais/regiões são aqui identificados no exemplo 1 e no documento WO 01/58935.

No caso de ser removido um grupo de acoplamento, o resíduo aminoácido relevante que compreende tal grupo e que ocupa uma posição, como se definiu antes, é substituído, preferencialmente, com um resíduo aminoácido diferente que não possui um grupo de acoplamento para o radical não polipeptídico em questão. Normalmente, o resíduo aminoácido que se pretende remover é um resíduo com o qual é desvantajosa a conjugação, *v.g.*, é um resíduo aminoácido localizado num local funcional do polipéptido ou próximo dele (uma vez que a conjugação em tal local pode ter como consequência a inactivação ou a redução de actividade do conjugado resultante, *v.g.*, devido a um reconhecimento defeituoso do receptor). No contexto da presente invenção,

o termo "local funcional" serve para indicar um ou vários resíduos aminoácidos essenciais para o funcionamento ou desempenho de FVII ou FVIIa ou que tenham qualquer outro tipo de envolvimento. Tais resíduos aminoácidos são uma parte do local funcional. O local funcional pode ser determinado por métodos conhecidos na especialidade, sendo identificado, preferencialmente, por análise de uma estrutura do complexo FVIIa-factor tecidual (ver Banner *et al.*, *Nature* 1996; 380:41-46).

No caso de se introduzir um grupo de acoplamento, introduz-se na posição relevante um resíduo aminoácido que compreenda tal grupo, de preferência por substituição do resíduo aminoácido que ocupa essa posição.

O número exacto de grupos de acoplamento presentes e disponíveis para conjugação no polipéptido FVII ou FVIIa está dependente do efeito desejado que se pretenda obter com a conjugação. O efeito que se pretende obter depende, *v.g.*, da natureza e do grau de conjugação (*v.g.*, a identidade do radical não polipeptídico, o número de radicais não polipeptídicos desejáveis ou que é possível conjugar com a variante polipeptídica, onde deve ser feita a conjugação ou onde deve ser evitada a conjugação, etc.).

O número total de resíduos aminoácidos que irão ser modificados fora do domínio Gla no polipéptido original FVII ou FVIIa (comparativamente com a sequência de aminoácidos identificada por SEQ ID NO:1), tipicamente não irá ser superior a 10. De preferência, a variante de FVII ou FVIIa compreende uma sequência de aminoácidos que difere em 1-10 resíduos aminoácidos entre os resíduos aminoácidos 46-406 indicados na SEQ ID NO:1, tipicamente em 1-8 ou em 2-8 resíduos aminoácidos, *v.g.*, em 1-5 ou em 2-5 resíduos

aminoácidos, por exemplo, em 1-4 ou em 1-3 resíduos aminoácidos, v.g., em 1, 2 ou 3 resíduos aminoácidos, entre os resíduos aminoácidos 46-406 indicados na SEQ ID NO:1.

De uma forma análoga, a variante polipeptídica da invenção pode conter 1-10 radicais não polipeptídicos (suplementares), tipicamente 1-8 ou 2-8 radicais não polipeptídicos (suplementares), de preferência 1-5 ou 2-5 radicais não polipeptídicos (suplementares), por exemplo, 1-4 ou 1-3 radicais não polipeptídicos (suplementares), v.g., 1, 2, ou 3 radicais não polipeptídicos (suplementares). Faz-se observar que tais radicais não polipeptídicos suplementares são acoplados, de forma covalente, a um grupo de acoplamento localizado fora do domínio Gla.

Variantes polipeptídicas da invenção em que o radical não polipeptídico é um radical açúcar

De acordo com uma forma de realização preferencial da invenção, introduziu-se e/ou removeu-se, mas preferencialmente introduziu-se um grupo de acoplamento para um radical açúcar, por exemplo, um local de glicosilação, em particular, um local de glicosilação *in vivo*, tal como um local de N-glicosilação *in vivo*, numa posição localizada fora do domínio Gla.

Quando utilizado no presente contexto, o termo "local de glicosilação que ocorre naturalmente" abrange os locais de glicosilação nas posições N145, N322, S52 e S60. O termo "local de O-glicosilação que ocorre naturalmente *in vivo*" inclui as posições S52 e S60, ao passo que o termo "local de N-glicosilação que ocorre naturalmente *in vivo*" inclui as posições N145 e N322.

Assim, numa forma de realização bastante interessante da presente invenção, o radical não polipeptídico é um radical açúcar e o grupo de acoplamento introduzido é um local de glicosilação, de preferência um local de glicosilação *in vivo*, por exemplo, um local de O-glicosilação *in vivo* ou um local de N-glicosilação *in vivo*, em particular, um local de N-glicosilação *in vivo*. Tipicamente, foram introduzidos 1-10 locais de glicosilação, em particular locais de N-glicosilação *in vivo* e, preferencialmente, foram introduzidos 1-8, 1-6, 1-4 ou 1-3 locais de glicosilação, em particular, locais de N-glicosilação *in vivo*, em uma ou em várias posições localizadas fora do domínio Gla. Por exemplo, podem ter sido introduzidos 1, 2 ou 3 locais de glicosilação, em particular locais de N-glicosilação *in vivo*, fora do domínio Gla, de preferência por substituição.

Faz-se observar que a variante polipeptídica, com a finalidade de se preparar uma variante polipeptídica em que essa variante polipeptídica possui um ou vários locais de glicosilação, tem de ser expressa numa célula hospedeira capaz de fixar radicais açúcar (oligossacarídeos) no(s) local(is) de glicosilação ou, em alternativa, sujeita a glicosilação *in vitro*. Na secção apresentada mais adiante com o título "Acoplamento a um radical açúcar" estão indicados exemplos de células hospedeiras para glicosilação.

Como exemplos de posições em que é possível introduzir os locais de glicosilação, em particular locais de N-glicosilação *in vivo*, refere-se as dos resíduos aminoácidos que possuem pelo menos 25% da sua cadeia lateral exposta à superfície (tal como aqui definido no exemplo 1), por

exemplo, pelo menos 50% da sua cadeia lateral exposta à superfície. A posição é seleccionada, preferencialmente, a partir de uma parte da molécula que se encontra localizada fora do local de ligação do factor tecidual e/ou na região do local activo e/ou fora da crista da fissura do local activo, conforme aqui definido no exemplo 1. Faz-se observar que o termo "pelo menos 25% (ou pelo menos 50%) da sua cadeia lateral exposta à superfície", quando utilizado a propósito da introdução de um local de N-glicosilação *in vivo*, se refere à acessibilidade superficial da cadeia lateral de aminoácidos na posição em que o radical açúcar está realmente fixado. Em muitos casos irá ser necessário introduzir um resíduo serina ou treonina na posição +2 relativamente ao resíduo asparagina ao qual o radical açúcar está realmente fixado, sendo admissível que as posições em que são introduzidos os resíduos serina ou treonina fiquem ocultas, isto é, tenham menos de 25% das suas cadeias laterais expostas à superfície.

Como exemplos concretos e preferenciais de tais substituições, para criar um local de N-glicosilação *in vivo*, refere-se as substituições seleccionadas entre o conjunto constituído por A51N, G58N, T106N, K109N, G124N, K143N+N145T, A175T, I205S, I205T, V253N, T267N, T267N+S269T, S314N+K316S, S314N+K316T, R315N+V317S, R315N+V317T, K316N+G318S, K316N+G318T, G318N, D334N e suas combinações. Mais preferencialmente, o local de N-glicosilação *in vivo* é introduzido por meio de uma substituição seleccionada entre o conjunto constituído por A51N, G58N, T106N, K109N, G124N, K143N+N145T, A175T, I205T, V253N, T267N+S269T, S314N+K316T, R315N+V317T, K316N+G318T, G318N, D334N e suas combinações. Ainda mais

preferencialmente, o local de N-glicosilação *in vivo* é introduzido por meio de uma substituição seleccionada entre o conjunto constituído por T106N, A175T, I205T, V253N, T267N+S269T e suas combinações, em particular, uma, duas ou três das substituições T106N, I205T e V253N.

De acordo com uma forma de realização particular, é introduzido apenas um local de N-glicosilação *in vivo*, por substituição. De acordo com uma outra forma de realização, são introduzidos por substituição dois ou mais (por exemplo, dois) locais de N-glicosilação *in vivo*. Como exemplos de substituições preferenciais para criar dois locais de N-glicosilação *in vivo* refere-se as substituições seleccionadas entre o conjunto constituído por A51N+G58N, A51N+T106N, A51N+K109N, A51N+G124N, A51N+K143N+N145T, A51N+A175T, A51N+I205T, A51N+V253N, A51N+T267N+S269T, A51N+S314N+K316T, A51N+R315N+V317T, A51N+K316N+G318T, A51N+G318N, A51N+D334N, G58N+T106N, G58N+K109N, G58N+G124N, G58N+K143N+N145T, G58N+A175T, G58N+I205T, G58N+V253N, G58N+T267N+S269T, G58N+S314N+K316T, G58N+R315N+V317T, G58N+K316N+G318T, G58N+G318N, G58N+D334N, T106N+K109N, T106N+G124N, T106N+K143N+N145T, T106N+A175T, T106N+I205T, T106N+V253N, T106N+T267N+S269T, T106N+S314N+K316T, T106N+R315N+V317T, T106N+K316N+G318T, T106N+G318N, T106N+D334N, K109N+G124N, K109N+K143N+N145T, K109N+A175T, K109N+I205T, K109N+V253N, K109N+T267N+S269T, K109N+S314N+K316T, K109N+R315N+V317T, K109N+K316N+G318T, K109N+G318N, K109N+D334N, G124N+K143N+N145T, G124N+A175T, G124N+I205T, G124N+V253N, G124N+T267N+S269T, G124N+S314N+K316T, G124N+R315N+V317T, G124N+K316N+G318T, G124N+G318N, G124N+D334N, K143N+N145T+A175T, K143N+N145T+I205T, K143N+N145T+V253N, K143N+N145T+T267N+S269T,

K143N+N145T+S314N+K316T, K143N+N145T+R315N+V317T,
 K143N+N145T+K316N+G318T, K143N+N145T+G318N, K143N+N145T+D334N,
 A175T+I205T, A175T+V253N, A175T+T267N+S269T,
 A175T+S314N+K316T, A175T+R315N+V317T, A175T+K316N+G318T,
 A175T+G318N, A175T+D334N, I205T+V253N, I205T+T267N+S269T,
 I205T+S314N+K316T, I205T+R315N+V317T, I205T+K316N+G318T,
 I205T+G318N, I205T+D334N, V253N+T267N+S269T,
 V253N+S314N+K316T, V253N+R315N+V317T, V253N+K316N+G318T,
 V253N+G318N, V253N+D334N, T267N+S269T+S314N+K316T,
 T267N+S269T+R315N+V317T, T267N+S269T+K316N+G318T,
 T267N+S269T+G318N, T267N+S269T+D334N, S314N+K316T+R315N+V317T,
 S314N+K316T+G318N, S314N+K316T+D334N, R315N+V317T+K316N+G318T,
 R315N+V317T+G318N, R315N+V317T+D334N e G318N+D334N. Mais
 preferencialmente, as substituições são seleccionadas entre o
 conjunto constituído por T106N+A175T, T106N+I205T,
 T106N+V253N, T106N+T267N+S269T, A175T+I205T, A175T+V253N,
 A175T+T267N+S269T, I205T+V253N, I205T+T267N+S269T e
 V253N+T267N+S269T, e ainda mais preferencialmente entre o
 conjunto constituído por T106N+I205T, T106N+V253N e
 I205T+V253N.

De acordo com uma outra forma de realização, foram
 introduzidos por substituição três ou mais (por exemplo
 três) locais de N-glicosilação *in vivo*. Como exemplos de
 substituições preferíveis, para criar três locais de N-
 glicosilação *in vivo*, refere-se as substituições
 seleccionadas entre o conjunto constituído por
 I205T+V253N+T267N+S269T e T106N+I205T+V253N.

Conforme se disse antes, é preferível que o local de
 N-glicosilação *in vivo* seja introduzido numa posição que
 não faça parte do local de ligação do factor tecidual, da

região do local activo ou da crista da fissura de ligação do local activo, conforme aqui definido.

Faz-se observar que todas as modificações mencionadas nas secções anteriores podem ser combinadas entre si, para além de serem combinadas com as substituições supramencionadas nas posições 34 e/ou 36, em particular A34E/L e/ou R36E, e preferencialmente em combinação com as substituições supramencionadas nas posições 10 e/ou 32, em particular P10Q e/ou K32E. Entre as modificações supramencionadas para introdução de um local N-glicosilação *in vivo*, as modificações preferenciais compreendem uma, duas ou três modificações T106N, I205T e V253N, em particular duas destas modificações, isto é, T106N+I205T, T106N+V253N ou I205T+V253N.

Assim, de acordo com uma forma de realização preferencial da invenção, a variante de FVII ou FVIIa compreende as modificações P10Q+K32E+A34E+R36E+T106N+I205T.

De acordo com uma outra forma de realização preferencial, a variante de FVII ou FVIIa compreende as modificações P10Q+K32E+A34E+R36E+T106N+V253N.

De acordo com uma outra forma de realização preferencial, a variante de FVII ou FVIIa compreende as modificações P10Q+K32E+A34E+R36E+I205T+V253N.

De acordo com uma outra forma de realização preferencial, a variante de FVII ou FVIIa compreende as modificações P10Q+K32E+A34L+T106N+I205T.

De acordo com uma outra forma de realização preferencial, a variante de FVII ou FVIIa compreende as modificações P10Q+K32E+A34L+T106N+V253N.

De acordo com uma outra forma de realização preferencial, a variante de FVII ou FVIIa compreende as modificações P10Q+K32E+A34L+I205T+V253N.

De acordo com uma outra forma de realização preferencial, a variante de FVII ou FVIIa compreende as modificações P10Q+K32E+A34L+R36E+T106N+I205T.

De acordo com uma outra forma de realização preferencial, a variante de FVII ou FVIIa compreende as modificações P10Q+K32E+A34L+R36E+T106N+V253N.

De acordo com uma outra forma de realização preferencial, a variante de FVII ou FVIIa compreende as modificações P10Q+K32E+A34L+R36E+I205T+V253N.

Conforme explicado anteriormente, todas estas modificações também podem ser combinadas com inserções em que se insere pelo menos um resíduo aminoácido, tipicamente um único resíduo aminoácido, entre as posições 3 e 4, em que o resíduo inserido é, preferencialmente, um resíduo aminoácido hidrofóbico. Mais preferencialmente, a inserção é A3AY. Deste modo, noutros casos preferenciais da invenção, a variante de FVII ou FVIIa compreende as modificações seleccionadas entre:

A3AY+P10Q+K32E+A34E+R36E+T106N+I205T;
 A3AY+P10Q+K32E+A34E+R36E+T106N+V253N;
 A3AY+P10Q+K32E+A34E+R36E+I205T+V253N;
 A3AY+P10Q+K32E+A34L+T106N+I205T;
 A3AY+P10Q+K32E+A34L+T106N+V253N;
 A3AY+P10Q+K32E+A34L+I205T+V253N;
 A3AY+P10Q+K32E+A34L+R36E+T106N+I205T;
 A3AY+P10Q+K32E+A34L+R36E+T106N+V253N;
 A3AY+P10Q+K32E+A34L+R36E+I205T+V253N.

Outras modificações fora do domínio Gla

De acordo com uma outra forma de realização da presente invenção, a variante de FVII ou FVIIa, para além

das modificações descritas nas secções anteriores, contém também mutações sobre as quais se sabe já que aumentam a actividade intrínseca do polipéptido, por exemplo, as descritas no documento WO 02/22776.

Por exemplo, a variante pode compreender pelo menos uma modificação numa posição seleccionada entre o conjunto constituído por 157, 158, 296, 298, 305, 334, 336, 337 e 374. Como exemplos de substituições preferíveis refere-se as substituições seleccionadas entre o conjunto constituído por V158D, E296D, M298Q, L305V e K337A. Mais preferencialmente, as referidas substituições são seleccionadas entre o conjunto constituído por V158D+E296D+M298Q+L305V+K337A, V158D+E296D+M298Q+K337A, V158D+E296D+M298Q+L305V, V158D+E296D+M298Q, M298Q, L305V+K337A, L305V e K337A.

De acordo com uma outra forma de realização da presente invenção, a variante de FVII ou FVIIa, para além das modificações descritas nas secções anteriores, também pode conter outras mutações, tais como a substituição K341Q descrita por Neuenschwander et al., *Biochemistry*, 1995; 34:8701-8707. Outras substituições também possíveis são D196K, D196N, G237L, G237GAA e suas combinações.

Para se obter mais informação pormenorizada sobre a conjugação de FVII e FVIIa com radicais não polipeptídicos, ler os documentos WO 01/58935 e WO 03/093465, aos quais se faz referência e que são aqui incorporados por referência.

Métodos para a preparação de uma variante conjugada de acordo com a invenção

Em geral, é possível produzir uma variante conjugada, de acordo com a invenção, criando em cultura uma célula hospedeira adequada em condições convenientes para a

expressão do polipéptido variante, com a subsequente recuperação do polipéptido variante, em que a) o polipéptido variante compreende pelo menos um local de N-glicosilação ou de O-glicosilação e a célula hospedeira é uma célula hospedeira eucariótica capaz de glicosilação *in vivo*, e/ou b) o polipéptido variante é submetido a conjugação com um radical não polipeptídico *in vitro*.

Conjugação com uma molécula polimérica

A molécula polimérica, que irá ser acoplada ao polipéptido variante, pode ser qualquer molécula polimérica adequada, tal como um homopolímero ou um heteropolímero natural ou sintético, tipicamente com um peso molecular compreendido entre cerca de 300-100000 Da, por exemplo, entre cerca de 500-200000 Da, mais preferencialmente no intervalo entre cerca de 500-15000 Da, ainda mais preferencialmente no intervalo entre cerca de 2-12 kDa, por exemplo, no intervalo entre cerca de 3-10 kDa. Quando aqui se utiliza o termo "cerca de" associado a um determinado peso molecular, esse termo "cerca de" indica um peso molecular médio aproximado e traduz o facto de haver, normalmente, uma determinada distribuição de pesos moleculares numa dada preparação polimérica.

Como exemplos de homopolímeros refere-se os polióis (isto é, poli-OH), as poliaminas (isto é, poli-NH₂) e os ácidos policarboxílicos (isto é, poli-COOH). Um heteropolímero é um polímero que possui diferentes grupos de acoplamento, tais como um grupo hidroxilo e um grupo amina.

Como exemplos de moléculas poliméricas adequadas refere-se as moléculas poliméricas seleccionadas entre o conjunto

constituído por óxidos de polialquilenos (PAO), incluindo um polialquileno-glicol (PAG), por exemplo, polietileno-glicol (PEG) e polipropileno-glicol (PPG), os PEG ramificados, álcoois polivinílicos (PVA), policarboxilatos, poli-(vinilpirrolidona), anidrido do ácido polietileno-co-maleico, anidrido do ácido polistireno-co-maleico, dextrano, incluindo carboximetil-dextrano ou todos os outros biopolímeros adequados para reduzir a imunogenicidade e/ou para aumentar a semi-vida funcional e/ou a semi-vida no soro *in vivo*. Um outro exemplo de uma molécula polimérica é a albumina humana ou uma outra proteína abundante no plasma. De um modo geral, os polímeros derivados de polialquileno-glicol são biocompatíveis, não tóxicos, não antigénicos, não imunogénicos, solúveis em água e são facilmente excretados pelos organismos vivos.

A molécula de PEG é a molécula polimérica preferível, uma vez que tem apenas alguns grupos reactivos que podem participar em reticulações, comparativamente, *v.g.*, com polissacarídeos tais como o dextrano. Em particular, tem interesse a molécula de PEG monofuncional, *v.g.*, metoxipolietileno-glicol (mPEG), uma vez que a química do seu acoplamento é relativamente simples (há apenas um grupo reactivo disponível para conjugação com os grupos de acoplamento existentes no polipéptido). Em consequência, uma vez que está eliminado o risco de reticulação, as variantes conjugadas resultantes são mais homogéneas e é mais fácil controlar a reacção das moléculas poliméricas com o polipéptido variante.

Para se efectuar o acoplamento covalente da(s) molécula(s) polimérica(s) ao polipéptido variante, os grupos terminais hidroxilo da molécula polimérica têm de estar na

forma activada, isto é, com grupos funcionais reactivos (como exemplos, refere-se os grupos amino primários, hidrazida, (HZ), tiol, succinato (SUC), succinato de succinimidilo (SS), succinamida de succinimidilo (SSA), propionato de succinimidilo (SPA), butirato de succinimidilo (SBA), carboximetilato de succinimidilo (SCM), carbonato de benzotriazol (BTC), N-hidroxi-succinimida (NHS), aldeído, carbonato de nitrofenilo (NPC) e tresilato (TRES)). As moléculas poliméricas activadas e convenientes podem ser obtidas nos circuitos comerciais, *v.g.*, em Nektar Therapeutics, Hunstville, AL, E.U.A. ou em PolyMASC Pharmaceuticals plc, UK.

Como exemplos concretos de moléculas poliméricas activadas, lineares ou ramificadas, para utilização na presente invenção, refere-se os que estão descritos em 'Nektar Molecule Engineering Catalog 2003' (Nektar Therapeutics), documento aqui incorporado por referência.

Como exemplos concretos de polímeros de PEG activados refere-se os PEG lineares seguintes: NHS-PEG (*v.g.* SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG e SCM-PEG) e NOR-PEG, BTC-PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO-PEG e MAL-PEG e os PEG ramificados, tais como PEG2-NHS e também os descritos nos documentos US 5 932 462 e US 5 643 575, considerando-se ambos aqui incorporados por referência. Há outras publicações que descrevem moléculas poliméricas úteis, as metodologias químicas de peguilação e métodos de conjugação, as quais estão enumeradas nos documentos WO 01/58935 e WO 03/093465.

Como exemplos concretos de polímeros PEG activados, particularmente preferenciais, para acoplamento a resíduos

cisteína refere-se os PEG lineares seguintes: vinilsulfona-PEG (VS-PEG), de preferência vinilsulfona-mPEG (VS-mPEG); maleimida-PEG (MAL-PEG), de preferência maleimida-mPEG (MAL-mPEG) e dissulfureto de ortopiridilo-PEG (OPSS-PEG), de preferência dissulfureto de ortopiridilo-mPEG (OPSS-mPEG). Tipicamente, tais polímeros de PEG ou de mPEG tem pesos moleculares de cerca de 5 kDa, cerca de 10 kD, cerca de 12 kDa ou cerca de 20 kDa.

Um especialista na matéria sabe que o método de activação e/ou a química de conjugação utilizáveis dependem dos grupos de acoplamento do polipéptido variante (os correspondentes exemplos foram apresentados anteriormente) e também dos grupos funcionais do polímero (*v.g.*, amina, hidroxilo, carboxilo, aldeído, sulfidrilo, succinimidilo, maleimida, vini-sulfona ou haloacetato). A peguilação pode ser orientada para a conjugação de todos os grupos de acoplamento disponíveis no polipéptido variante (isto é, os correspondentes grupos de acoplamento que estejam expostos à superfície do polipéptido) ou pode ser orientada para um ou vários grupos de acoplamento particulares, *v.g.*, o grupo amino do terminal N, conforme descrito no documento US 5 985 265, ou para os resíduos cisteína. Por outro lado, a conjugação pode ser conseguida num só passo ou de uma maneira progressiva (*v.g.*, conforme descrito no documento WO 99/55377).

No caso da peguilação orientada para os resíduos cisteína (ver *supra*), a variante de FVII ou de FVIIa é tratada normalmente com um agente redutor, tal como o ditiotreitol (DDT) antes da peguilação. O agente redutor é removido depois por meio de qualquer método convencional, por exemplo, pela metodologia de extracção de sais. A

conjugação de PEG com um resíduo cisteína decorre, tipicamente, num tampão adequado a pH entre 6-9 e a temperaturas compreendidas entre 4°C e 25°C durante períodos que vão até 16 horas.

Faz-se observar que a peguilação é concebida de modo a produzir a molécula óptima, relativamente ao número de moléculas de PEG acopladas, ao peso molecular, à forma de tais moléculas (*v.g.*, quer sejam lineares ou ramificadas) e aos locais de acoplamento no polipéptido variante. O peso molecular do polímero que irá ser utilizado pode ser escolhido, *v.g.*, com base no efeito desejado que se pretende alcançar.

Em associação com a conjugação a um único grupo de acoplamento na proteína (*v.g.*, o grupo amino do terminal N), pode ser vantajoso que a molécula polimérica, que pode ser linear ou ramificada, tenha um peso molecular elevado, de preferência entre cerca de 10-25 kDa, por exemplo, entre cerca de 15-25 kDa, *v.g.*, cerca de 20 kDa.

Normalmente, a conjugação do polímero é efectuada em condições que visem fazer reagir com as moléculas poliméricas tantos grupos disponíveis para acoplamento polimérico quantos os possíveis. Isto é conseguido por meio de um excesso molar conveniente do polímero, relativamente ao polipéptido. Tipicamente, as razões molares entre moléculas poliméricas activadas e moléculas do polipéptido vão até cerca de 1000:1, por exemplo, até cerca de 200:1 ou até cerca de 100:1. Em alguns casos, a razão pode ser ligeiramente inferior; no entanto, pode ser de cerca de 50:1, 10:1, 5:1, 2:1 ou 1:1 para se obter uma reacção óptima.

De acordo com a invenção, também está previsto acoplar as moléculas poliméricas ao polipéptido através de um ligador. Os ligadores adequados são perfeitamente conhecidos pelos especialistas na matéria; ver também o documento WO 01/58935.

A seguir à conjugação, as moléculas poliméricas activadas residuais são bloqueadas de acordo com métodos conhecidos na especialidade, *v.g.*, por adição de uma amina primária à mistura de reacção, sendo as moléculas poliméricas inactivadas resultantes removidas por meio de um método conveniente.

Dependendo das circunstâncias, *v.g.*, a sequência de aminoácidos do polipéptido variante, a natureza do composto PEG activado que irá ser utilizado e as condições particulares de peguilação, incluindo a razão molar entre PEG e o polipéptido, faz-se observar que é possível obter graus variáveis de peguilação, sendo obtido, geralmente, um grau mais elevado de peguilação com uma razão maior entre PEG e polipéptido variante. No entanto, os polipeptidos variantes peguilados, resultantes de todos os processos de peguilação, irão compreender, normalmente, uma distribuição estocástica de variantes polipeptídicas conjugadas que apresentam graus ligeiramente diferentes de peguilação.

Acoplamento a um radical açúcar

Para se conseguir *in vivo* a glicosilação de uma molécula de FVII que possua um ou vários locais de glicosilação, a sequência nucleotídica que codifica o polipéptido variante tem de ser inserida num hospedeiro de expressão eucariótico que seja glicosilador. A célula hospedeira de expressão pode ser seleccionada entre células de fungos (fungos filamentosos

ou leveduras), células de insectos ou de animais ou células de plantas transgênicas. De acordo com uma forma de realização da invenção, a célula hospedeira é uma célula de um mamífero, por exemplo, uma célula de CHO, BHK ou HEK, v.g., uma célula HEK 293, ou uma célula de um insecto, tal como uma célula SF9, ou uma célula de uma levedura, v.g., de *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris*, ou quaisquer outras células hospedeiras adiante mencionadas.

Também se pode praticar o acoplamento covalente de radicais açúcar *in vitro* (tais como o dextrano) a resíduos aminoácidos no polipéptido variante, v.g., conforme descrito, por exemplo, no documento WO 87/05330 e na obra de Aplin *et al.*, *CRC Crit Rev. Biochem*, pp. 259-306, 1981. Ver também o documento WO 03/093465 para se obter mais informação sobre a glicosilação de variantes de FVII ou FVIIa *in vitro*.

Acoplamento de um inibidor da protease da serina

O acoplamento de um inibidor da protease da serina pode ser feito em conformidade com o método descrito no documento WO 96/12800.

Métodos para a preparação de uma variante polipeptídica da invenção

A variante polipeptídica da presente invenção, facultativamente numa forma glicosilada, pode ser produzida por meio de todos os métodos convenientes conhecidos na especialidade. Tais métodos compreendem a construção de uma sequência nucleotídica que codifica a variante polipeptídica, e a expressão da sequência numa célula hospedeira adequada, transformada ou transfectada. De

preferência, a célula hospedeira é uma célula hospedeira γ -carboxiladora, tal como uma célula de um mamífero. No entanto, as variantes polipeptídicas da invenção podem ser produzidas, embora menos eficientemente, por síntese química ou mediante uma combinação de síntese química com a tecnologia de ADN recombinante.

É possível construir uma sequência nucleotídica que codifique um polipéptido da presente invenção, isolando ou sintetizando uma sequência nucleotídica que codifica o FVII original, por exemplo, o hFVII, com a sequência de aminoácidos identificada por SEQ ID NO:1, e modificando depois a sequência nucleotídica de modo a que seja efectuada a introdução (isto é, a inserção ou a substituição) ou a remoção (isto é, a deleção ou a substituição) do(s) resíduo(s) aminoácido(s) relevante(s).

A sequência nucleotídica é modificada, convenientemente, por mutagénese dirigida, de acordo com métodos convencionais. Em alternativa, prepara-se a sequência nucleotídica por síntese química, v.g., utilizando um sintetizador de oligonucleótidos, em que os oligonucleótidos são concebidos com base na sequência de aminoácidos do polipéptido desejado, sendo seleccionados, preferencialmente, os codões que são favorecidos na célula hospedeira em que o polipéptido recombinante irá ser produzido. Por exemplo, é possível sintetizar diversos oligonucleótidos pequenos que codificam partes do polipéptido desejado e montá-los por PCR (reação em cadeia da polimerase), por reação de ligação ou por reação de ligação em cadeia (LCR) (Barany, *Proc Natl Acad Sci USA* 88:189-193, 1991). Os oligonucleótidos individuais contêm,

tipicamente, extremidades salientes 5' ou 3' para a montagem complementar.

Depois de montada (por síntese, por mutagénesis dirigida ao local ou por qualquer outro método), a sequência nucleotídica que codifica o polipéptido é inserida num vector recombinante e funcionalmente ligada para controlar as sequências necessárias para a expressão do FVII na desejada célula hospedeira transformada.

Os especialistas na matéria irão ser capazes de seleccionar vectores adequados e sequências de controlo da expressão e células hospedeiras adequadas para a expressão do polipéptido. O vector recombinante pode ser um vector autonomamente replicante, isto é, um vector que exista como entidade extracromossómica, cuja replicação seja independente da replicação cromossómica, *v.g.*, um plasmídeo. Em alternativa, o vector é tal que ao ser introduzido numa célula hospedeira é integrado no genoma da célula hospedeira e replicado conjuntamente com os cromossomas onde tenha sido integrado.

O vector é, preferencialmente, um vector de expressão em que a sequência nucleotídica que codifica a variante polipeptídica da invenção está funcionalmente ligada a segmentos suplementares necessários para a transcrição da sequência nucleotídica. O vector deriva, tipicamente, de ADN plasmídico ou viral. Há diversos vectores de expressão convenientes para a expressão numa célula hospedeira, aqui mencionados, que estão disponíveis nos circuitos comerciais ou descritos na literatura. É possível encontrar informação minuciosa sobre vectores adequados para a expressão de FVII no documento WO 01/58935, aqui incorporado por referência.

O termo "sequências de controlo" é aqui definido e pretende abranger todos os componentes que são necessários ou vantajosos para a expressão da variante polipeptídica da invenção. Cada sequência de controlo pode ser nativa ou exógena em relação à sequência de ácido nucleico que codifica a variante polipeptídica. Tais sequências de controlo compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, uma sequência líder, uma sequência de poliadenilação, uma sequência propeptídica, uma sequência promotora, intensificadora ou activadora a montante, uma sequência do péptido de sinal e um terminador da transcrição. No mínimo, as sequências de controlo compreendem um promotor.

Na presente invenção é possível utilizar uma grande variedade de sequências de controlo da expressão, *v.g.*, todas as sequências de controlo explicitadas no documento WO 01/58935, aqui incorporado por referência.

A sequência nucleotídica da invenção que codifica uma variante polipeptídica, quer seja preparada por mutagénese dirigida ao local, síntese, métodos de PCR ou outros métodos, pode incluir, facultativamente, uma sequência nucleotídica que codifique um péptido de sinal. O péptido de sinal encontra-se presente se a variante polipeptídica for segregada pelas células em que é expressa. Tal péptido de sinal, se estiver presente, deve ser um péptido reconhecido pelas células escolhidas para expressão da variante polipeptídica. O péptido de sinal pode ser homólogo (isto é, normalmente associado a hFVII) ou heterólogo (isto é, originário de uma outra fonte diferente de hFVII) em relação ao polipéptido, ou pode ser homólogo ou heterólogo em relação à célula hospedeira, isto é, um péptido de sinal normalmente expresso pela célula

hospedeira ou um péptido que seja normalmente expresso pela célula hospedeira. Para mais informação sobre péptidos de sinal adequados ver o documento WO 01/58935.

É possível utilizar todas as células hospedeiras adequadas para a produção da variante polipeptídica, incluindo células ou linhagens celulares de bactérias (embora estas não sejam particularmente preferíveis), fungos (incluindo leveduras), plantas, insectos, mamíferos ou de outros animais adequados, e também células de plantas ou animais transgénicos. São preferíveis as células de mamíferos. Como exemplos de células hospedeiras bacterianas refere-se as de bactérias gram-positivas, tais como as estirpes de *Bacillus*, v.g., *B. brevis* ou *B. subtilis*, *Pseudomonas* ou *Streptomyces*, ou as bactérias gram-negativas, tais como as estirpes de *E. coli*. Como exemplos de células hospedeiras de fungos filamentosos adequados refere-se as de estirpes de *Aspergillus*, v.g., *A. oryzae*, *A. niger* ou *A. nidulans*, *Fusarium* ou *Trichoderma*. Como exemplos de células hospedeiras de leveduras adequadas refere-se as de estirpes de *Saccharomyces*, v.g., *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Klyveromyces*, *Pichia*, tais como *P. pastoris* ou *P. methanolica*, *Hansenula*, tais como *H. Polymorpha* ou *Yarrowia*. Como exemplos de células hospedeiras de insectos adequados refere-se as da linhagem celular de *Lepidopteros*, tais como as células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9 ou Sf21) ou *Trichoplusia ni* ('High Five') (US 5 077 214). Como exemplos de células hospedeiras de mamíferos adequados refere-se as linhagens de células de ovário do criceto chinês (CHO), (v.g., CHO-K1; ATCC CCL-61), as linhagens de células do macaco verde (COS) (v.g., COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); as células

de murganhos (e.g., NS/O), as linhagens de células de rim do criceto bebé (BHK) (v.g., ATCC CRL-1632 ou ATCC CCL-10), e as células humanas (v.g., HEK 293 (ATCC CRL-1573)). Há outras linhagens de células adequadas conhecidas na especialidade e que estão disponíveis em instituições públicas, tais a Colecção Americana de Culturas Tipo, Rockville, Maryland. De igual modo, também é possível modificar células de mamíferos, tais como as células de CHO, para expressão de sialil-transferase, v.g., 1,6-sialil-transferase, v.g., conforme descrito no documento US 5 047 335, com a finalidade de se conseguir obter uma melhor glicosilação da variante polipeptídica.

Com a finalidade de se aumentar a secreção, pode ter um particular interesse produzir a variante polipeptídica da invenção conjuntamente com uma endoprotease, em particular uma PACE (enzima conversora de aminoácidos básicos emparelhados) (v.g., conforme descrito no documento US 5 986 079), por exemplo, uma endoprotease Kex2 (v.g., conforme descrito no documento WO 00/28065).

No documento WO 01/58935, aqui incorporado por referência, estão descritos métodos para introduzir ADN exógeno nos tipos de células supramencionados, aí constando também informação relativa à expressão, produção e purificação de variantes de FVII.

Composição farmacêutica da invenção e sua utilização

De acordo com um outro aspecto, a presente invenção diz respeito a uma composição, em particular a uma composição farmacêutica, que compreende uma variante polipeptídica da invenção e um veículo, ou um excipiente, farmaceuticamente aceitável.

A variante polipeptídica, ou a composição farmacêutica, de acordo com a invenção pode ser utilizada como um medicamento.

Devido às melhores propriedades supramencionadas, as variantes polipeptídicas da invenção, ou a composição farmacêutica da invenção, são particularmente úteis para o tratamento de fenómenos hemorrágicos incontroláveis em pacientes traumáticos, em pacientes trombocitopénicos, em pacientes sujeitos a tratamento anticoagulante e em pacientes cirróticos com hemorragias varicelares, ou para outras hemorragias do tracto gastrintestinal superior, em pacientes sujeitos a transplante hepático ortotópico ou nos casos de ressecção hepática (permitindo uma cirurgia sem transfusão), ou em pacientes hemofílicos.

Define-se o trauma como sendo uma lesão de tecidos vivos, causada por um agente extrínseco. É a quarta causa de morte nos Estados Unidos da América do Norte e constitui um pesado fardo financeiro para a economia.

Os traumas são classificados em ocultos ou penetrativos. O trauma oculto tem como resultado uma compressão interna, a lesão de órgãos e hemorragias internas, ao passo que o trauma penetrativo (em consequência de um agente que penetre no corpo e destrua tecidos, vasos e órgãos) tem como resultado uma hemorragia externa.

Os traumas podem ser causados por inúmeros fenómenos, v.g., acidentes rodoviários, ferimentos provocados por armas de fogo, quedas, acidentes com máquinas e ferimentos provocados por armas brancas.

A cirrose hepática pode ser provocada por uma lesão directa do fígado, incluindo o alcoolismo crónico, a

hepatite viral crónica (tipos B, C e D) e a hepatite auto-imune, e também por lesão indirecta provocada por uma danificação do canal biliar, incluindo a cirrose biliar primária, a colangite esclerosante primária e a atresia biliar. As causas menos frequentes de cirrose são a lesão hepática directa, resultante de patologia hereditária, por exemplo, a fibrose cística, a deficiência em antitripsina α -1, a hemocromatose, a doença de Wilson, a galactosemia e a doença de armazenagem do glicogénio. Os transplantes constituem a intervenção fundamental para o tratamento de pacientes cirróticos em estado avançado.

Assim, um outro aspecto da presente invenção diz respeito a uma variante polipeptídica da invenção para a produção de um medicamento para o tratamento de doenças ou patologias em que seja desejável a coagulação. A presente invenção também diz respeito às variantes da invenção utilizáveis num método para tratar um mamífero que padeça de uma doença ou de uma patologia em que seja desejável a coagulação, consistindo tal método em administrar a um mamífero que disso necessite uma quantidade eficaz da variante polipeptídica ou da composição farmacêutica da invenção

Como exemplos de doenças/patologias em que seja desejável uma maior coagulação refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, as hemorragias, incluindo as hemorragias cerebrais, e também os casos de pacientes com hemorragias descontroladas graves, tais como as resultantes de traumas. Outros exemplos abrangem os casos de pacientes sujeitos a transplantes de tecidos vivos, pacientes sujeitos a ressecção e pacientes com hemorragias varicelares. Um outro tipo de doença/patologia generalizada, em que se prevê

que os polipeptidos da invenção venham a ser úteis para uma maior coagulação, é a hemofilia, v.g., a doença de Willebrand, a hemofilia A, a hemofilia B ou a hemofilia C.

As variantes polipeptídicas da invenção são administradas aos pacientes numa dose terapeuticamente eficaz, normalmente uma dose que seja aproximadamente idêntica à utilizada na terapia com rFVII, tal como o NovoSeven®, ou em doses menores. O termo "dose terapeuticamente eficaz" aqui utilizado designa uma dose suficiente para produzir os efeitos desejados em relação ao estado de saúde para o qual é administrada. A dose exacta irá depender das circunstâncias e irá ser determinada por um especialista na matéria, recorrendo a técnicas conhecidas. Normalmente, a dose deve ser capaz de evitar ou reduzir a gravidade ou a disseminação da patologia ou do estado de saúde que se pretende tratar. É evidente, para os especialistas na matéria, que uma quantidade eficaz de uma variante polipeptídica ou de uma composição da invenção irá depender, *inter alia*, da doença, da dose, da posologia, independentemente de a variante polipeptídica ou a composição ser administrada por si só ou em conjunto com outros agentes terapêuticos, da semi-vida das composições no plasma e do estado geral de saúde do paciente.

A variante polipeptídica da invenção é administrada, de preferência, numa composição que contenha um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável. O termo "farmacêuticamente aceitável" designa um veículo ou excipiente que não provoque efeitos indesejados nos pacientes aos quais seja administrado. Tais veículos e excipientes farmacêuticamente aceitáveis e também os métodos de formulação farmacêutica adequados são perfeitamente

conhecidos na especialidade (ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edição, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer e L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; e Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edição, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]).

A variante polipeptídica da invenção pode ser utilizada, "tal qual" e/ou numa sua forma salina. Os sais adequados compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os sais obtidos com metais alcalinos ou com metais alcalino-terrosos, tais como sódio, potássio, cálcio e magnésio, e também, *v.g.*, os sais de zinco. Estes sais ou complexos podem estar presentes sob a forma de uma estrutura cristalina e/ou amorfa.

As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas por si sós ou em conjunto com outros agentes terapêuticos. Estes agentes podem ser incorporados como parte da mesma composição farmacêutica ou podem ser administrados separadamente da variante polipeptídica da invenção, simultaneamente ou de acordo com uma outra posologia. Além disso, a variante polipeptídica ou a composição farmacêutica da invenção pode ser utilizada como adjuvante para outras terapias.

No âmbito da presente invenção, um "paciente" pode ser um ser humano ou outro animal. Assim, as variantes da invenção são aplicáveis na terapia de seres humanos e em aplicações veterinárias, em particular na terapia de seres humanos.

A composição farmacêutica que compreende a variante polipeptídica da invenção pode ser formulada de diversas

formas, v.g., no estado líquido, em gel, liofilizada ou como sólido comprimido. A forma preferível irá depender da patologia particular que se pretende tratar e é um assunto evidente para os especialistas na matéria.

Em particular, a composição farmacêutica que contém a variante polipeptídica da invenção pode ser formulada numa forma liofilizada ou numa forma solúvel e estável. A variante polipeptídica pode ser liofilizada por meio de diversos métodos conhecidos na especialidade. A variante polipeptídica pode assumir uma forma solúvel e estável, mediante remoção ou protecção dos locais de degradação proteolítica, conforme aqui descrito. A vantagem de se obter uma preparação solúvel e estável é o facto de o paciente a poder manipular mais facilmente e, em caso de emergência, uma acção mais rápida, o que pode, potencialmente, salvar vidas. A forma preferível irá depender da patologia particular que se pretende tratar e é um assunto evidente para os especialistas na matéria.

A administração da formulação da presente invenção pode ser efectuada por diversas vias, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, as vias oral, subcutânea, intravenosa, intracerebral, intranasal, transdermal, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal, intraocular ou de qualquer outra maneira aceitável. As formulações podem ser administradas continuamente por infusão, embora seja aceitável a injeção em ampola grande, utilizando técnicas perfeitamente conhecidas na especialidade, por exemplo, por meio de bombas ou por implantação. Em alguns casos, as formulações podem ser aplicadas directamente sob a forma de uma solução ou aspersão.

Formulações parentéricas

Um exemplo preferencial de uma composição farmacêutica é uma solução, em particular uma solução aquosa, concebida para administração parentérica. Embora em muitos casos as formulações farmacêuticas em solução sejam apresentadas no estado líquido, adequadas para utilização imediata, tais formulações parentéricas também podem ser fornecidas numa forma congelada ou liofilizada. No primeiro caso, a composição tem de ser descongelada antes de ser utilizada. O último caso é utilizado, frequentemente, para aumentar a estabilidade do composto activo contido na composição, sujeito a uma grande variedade de condições de armazenagem, uma vez que os especialistas na matéria sabem que as preparações liofilizadas são, geralmente, mais estáveis do que as preparações equivalentes no estado líquido. Tais preparações liofilizadas são reconstituídas antes da sua utilização, mediante a adição de um ou vários diluentes adequados e farmacêuticamente aceitáveis, tais como a água estéril para injeções ou o soluto salino fisiológico estéril.

No caso das formulações parentéricas, estas são preparadas para armazenagem como formulações liofilizadas ou como soluções aquosas, misturando, conforme se considere adequado, a variante polipeptídica, que tenha o grau de pureza desejado, com um ou vários veículos, excipientes ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis, vulgarmente utilizados na especialidade (todos eles designados por "excipientes"), por exemplo, agentes de tamponamento, agentes estabilizadores, conservantes, reguladores da isotonicidade, agentes tensioactivos não iónicos ou detergentes, antioxidantes e/ou outros aditivos diversificados, tais como

agentes ou cargas diluentes, agentes quelantes, antioxidantes e co-solventes.

Nos documentos WO 01/58935 e WO 03/093465, aqui incorporados por referência, há informação pormenorizada sobre formulações parentéricas adequadas para a administração de variantes de FVII e também para a produção de preparações de libertação prolongada.

Seguidamente descrever-se-á a invenção por meio de exemplos não limitativos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Região dos locais activos

Define-se a região dos locais activos como sendo a de todos os resíduos que possuam pelo menos um átomo com menos de 10 Å entre todos os átomos da tríade catalítica (resíduos H193, D242, S344).

Medição da sensibilidade reduzida à degradação proteolítica

É possível medir a degradação proteolítica utilizando o ensaio descrito no exemplo 5 do documento US 5 580 560, em que a proteólise é uma autoproteólise.

Além disso, é possível testar a proteólise reduzida num modelo *in vivo*, utilizando amostras identificadas com radioisótopos e comparando a proteólise do rhFVIIa e da variante polipeptídica da invenção, recorrendo a amostras de sangue e submetendo-as ao protocolo de ensaio SDS-PAGE e a autorradiografia.

Independentemente do protocolo de ensaio utilizado para a determinação da degradação proteolítica, o termo "degradação proteolítica reduzida" pretende significar uma

redução mensurável da clivagem, comparativamente com aquela que é obtida pelo rhFVIIa, conforme medido por inspecção de geles contrastados com o corante de Coomassie, utilizados no protocolo de SDS-PAGE, por HPLC ou conforme medido pela actividade catalítica conservada, comparativamente com a espontânea típica, recorrendo ao ensaio de actividade independente do factor tecidual, adiante descrito.

Determinação do peso molecular das variantes polipeptídicas

Determina-se o peso molecular das variantes polipeptídicas por SDS-PAGE, filtração em gel, transferências de Western, espectrometria de massa / dessorção da matriz auxiliada por laser ou centrifugação em equilíbrio, v.g., SDS-PAGE, em conformidade com Laemmli, U.K., *Nature* Vol 227 (1970), pp. 680-85.

Determinação da afinidade de ligação à membrana fosfolipídica

É possível determinar a afinidade de ligação à membrana fosfolipídica conforme descrito por Nelsestuen et al., *Biochemistry*, 1977; 30; 10819-10824 ou conforme descrito no exemplo 1 do documento US 6 017 882.

Ensaio de activação do factor X independente de TF

Este ensaio foi descrito minuciosamente por Nelsestuen et al., na página 39826 de *J Biol Chem*, 2001; 276:39825-39831.

Dito de forma abreviada, a molécula que se pretende experimentar (hFVIIa, rhFVIIa ou a variante polipeptídica da invenção na sua forma activada) é misturada com uma fonte de fosfolípidos (de preferência, fosfatidil-colina e fosfatidil-serina numa razão de 8:2) e com factor X

relipidado em tampão Tris contendo BSA. Decorrido um período determinado de incubação, interrompe-se a reacção por adição de EDTA em excesso. Mede-se então a concentração do factor Xa em função da alteração da absorvência a 405 nm, após a adição de um substrato cromogénico (S-2222, Chromogenix). Depois de feitas as correcções compensatórias de actividade espontânea, determina-se a actividade do rhFVIIa (a_{wt}) independente do factor tecidual, em termos da alteração da absorvência ao fim de 10 minutos e determina-se também a actividade da variante polipeptídica da invenção ($a_{variante}$) independente do factor tecidual, em termos de alteração de absorvência ao fim de 10 minutos. A razão entre a actividade da variante polipeptídica, na sua forma activada, e a actividade do rhFVIIa é definida por $a_{variante}/a_{wt}$.

Ensaio de coagulação

Mediu-se a actividade coagulante do FVIIa e suas variantes em ensaios de uma só etapa, tendo os tempos de coagulação sido registados com um coagulómetro 'Thrombotrack IV' (Medinor). Reconstituiu-se plasma humano isento de factor VII (American Diagnostica) e levou-se ao equilíbrio à temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Depois, transferiu-se 50 μ L de plasma para os cálices do coagulómetro.

Efectuou-se a diluição de FVIIa e suas variantes em tampão 'Glyoxaline' (barbiturato 5,7 mM, citrato de sódio 4,3 mM, NaCl 117 mM, BSA na concentração de 1 mg/mL, pH 7,35). Acrescentou-se as amostras aos cálices, com 50 μ L, e manteve-se tudo a incubar a 37°C durante 2 minutos.

Reconstituiu-se a tromboplastina (Medinor) com água e acrescentou-se CaCl_2 até à concentração final de 4, 5 mM. Iniciou-se a reacção adicionando 100 μL de tromboplastina.

Para se medir a actividade coagulante na ausência de TF utilizou-se o mesmo ensaio, mas sem a adição de tromboplastina. Os dados foram analisados utilizando a aplicação informática 'PRISM'.

Ensaio com sangue total

Mediu-se a actividade coagulante do FVIIa e suas variantes em ensaios de uma só etapa, tendo os tempos de coagulação sido registados com um coagulómetro 'Thrombotrack IV' (Medinor). Diluiu-se 100 μL de FVIIa, ou suas variantes num tampão contendo glicil-glicina 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl_2 37,5 mM, a pH 7,35, e depois fez-se a transferência para o cálice de reacção. Iniciou-se a reacção de coagulação acrescentando 50 μL de sangue contendo 10% de anticoagulante constituído por citrato de sódio 0,13 M. Os dados foram analisados utilizando a aplicação informática Excel ou PRISM.

Prova amidolítica

A aptidão das diversas variantes, para clivar substratos de péptidos pequenos, pode ser medida utilizando o substrato cromogénico S-2288 (D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida). Diluiu-se FVIIa até cerca de 10-90 nM em tampão de ensaio (Na-Hepes 50 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl_2 5 mM, 0,1% de BSA, heparina na concentração de 1 U/mL). Além disso, diluiu-se o TF solúvel (sTF) até 50-450 nM em tampão de ensaio. Misturou-se 120 μL de tampão de ensaio com 20 μL da amostra de FVIIa e 20 μL de sTF. Após 5

minutos de incubação à temperatura ambiente, com agitação suave, seguindo-se 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, iniciou-se a reacção mediante a adição do substrato S-2288 até à concentração de 1 mM e determinou-se a absorção a 405 nm, em diversos instantes.

Protocolo ELISA

As concentrações de FVII/FVIIa (ou variantes) foram determinadas pelo protocolo ELISA. As cavidades de uma placa de microtitulação foram recobertas com um anticorpo dirigido contra o domínio da protease, utilizando uma solução com a concentração de 2 µg/mL em PBS (100 µL por cavidade). Após o período de cobertura, de um dia para o outro à temperatura ambiente (T.A.), efectuou-se a lavagem das cavidades 4 vezes com tampão THT (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, a pH 7,2, com 0,05% de Tween-20). Depois, acrescentou-se a cada cavidade, para bloqueio, 200 µL de caseína a 1% (diluída a partir de um lote com concentração de 2,5%, utilizando NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, a pH 7,2). Decorrida 1 hora de incubação à T.A., esvaziou-se as cavidades e acrescentou-se 100 µL de amostra (facultativamente diluída em tampão de diluição (THT + caseína a 0,1%). Após uma outra incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, efectuou-se a lavagem das cavidades 4 vezes com tampão THT e acrescentou-se 100 µL de um anticorpo, marcado com biotina, dirigido contra o domínio de tipo EGF (1 µg/mL). Após uma outra incubação durante 1 hora à T.A., seguida por mais 4 lavagens com tampão THT, acrescentou-se 100 µL de estreptavidina-peroxidase do rábano (DAKI A/S, Glostrup, Dinamarca, diluída a 1/10000). Após uma outra incubação durante 1 hora à T.A., seguida de mais 4 lavagens com tampão THT, acrescentou-se 100 µL de TMB

(3,3',5-5'tetrametil-benzidina, Kem-en-Tech A/S, Dinamarca). Após 30 minutos de incubação à T.A., ao abrigo da luz, acrescentou-se 100 µL de H₂SO₄ 1 M e determinou-se o valor de DO_{450nm}. Preparou-se uma curva padrão utilizando o rhFVIIa (NovoSeven®).

Em alternativa, é possível quantificar FVII/FVIIa ou suas variantes através do domínio Gla em vez do domínio da protease. Neste protocolo ELISA, as cavidades foram recobertas, de um dia para o outro, com um anticorpo dirigido contra o domínio de tipo EGF e para a detecção utilizou-se um domínio anti-Gla monoclonal marcado com biotina, dependente do cálcio (2 µg/mL, 100 µL por cavidade). Neste protocolo, acrescentou-se CaCl₂ 5 mM aos tampões THT e de diluição.

Ensaio do trombograma

Testou-se o efeito de hFVIIa, rhFVIIa ou de variantes de FVIIa sobre a geração de trombina no plasma humano, de acordo com uma versão modificada do ensaio descrito na página 589 da obra de Hemker *et al.*, (2000) *Thromb Haemostasis* 83:589-91. Dito de forma abreviada, mistura-se a molécula que se pretende experimentar (quer seja hFVIIa, rhFVIIa ou uma variante) com plasma pobre em plaquetas (PPP) e isento de FVII, contendo quer factor tecidual recombinante relipidado (tal como 'Innovin' de Dade Behring) quer fosfolípidos (fosfatidilcolina e fosfatidilserina à razão de 8:2, ou fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanol à razão de 4:2:4).

Iniciou-se a reacção por adição de um substrato de trombina fluorogénico e cloreto de cálcio. Mediu-se a fluorescência continuamente e determinou-se a actividade

amidolítica da trombina, calculando o valor da tangente da curva de fluorescência (o aumento da fluorescência em função do tempo). Deste modo, é possível calcular o tempo durante o qual se obtém a actividade máxima amidolítica da trombina (T_{\max}), a velocidade de geração de trombina (aumento máximo da actividade da trombina) e a actividade total da trombina (área sob a curva (AUC)).

O plasma citado, isento de FVII e congelado, foi descongelado na presença de inibidor de tripsina do milho (100 µg/mL de soro) para inibir a via de coagulação por contacto. A cada cavidade de uma placa de microtitulação de 96 cavidades acrescentou-se 80 µL de plasma e 20 µL de tampão contendo rhFVII ou uma variante que se pretendia testar, com uma concentração final compreendida entre 0,1 e 100 nM. Acrescentou-se factor tecidual humano recombinante (rTF) em 5 µL de tampão de ensaio, até à concentração final de 1 pM. O tampão de ensaio é constituído por Hepes 20 mM, NaCl 50 mM e BSA na concentração de 60 mg/mL em água destilada. Iniciou-se a reacção adicionando 20 µL de solução de substrato, contendo cloreto de cálcio 0,1 M. A placa de ensaio e os reagentes foram previamente aquecidos a 37°C, tendo a reacção decorrido a esta temperatura. O fluorímetro utilizado era um aparelho 'BMG Fluormeter' com um filtro de excitação a 390 nm e com um filtro de emissão a 460 nm. Mediu-se a fluorescência em cada cavidade das placas de fundo transparente de 96 cavidades a intervalos de 20-40 segundos durante 30-180 minutos. Os dados foram analisados utilizando a aplicação informática PRISM.

Ensaio de ressonância do plasmão da superfície de ligação do factor tecidual (ensaio Biacore)

Utilizou-se a análise de ressonância do plasmão da superfície para se determinar a ligação, relativa do factor VIIa de tipo selvagem e suas variantes, ao factor tecidual solúvel. O factor tecidual solúvel e recombinante que contém o domínio extracelular foi acoplado a 270 unidades de resposta numa microplaca 'Biacore CM5', utilizando o acoplamento NHS/EDC. O factor tecidual solúvel foi acoplado a pH 4,5, para permitir a interacção com a superfície da microplaca.

Neste ensaio, comparou-se a ligação do factor tecidual à proteína do factor VII, para uma única concentração de FVIIa ou de uma variante, para permitir fazer uma comparação relativa das variantes espontâneas típicas. Determinou-se esta concentração por meio de uma curva padrão do FVIIa de tipo selvagem que se fez passar sobre a microplaca em concentrações compreendidas entre 75 e 0 µg/mL. Removeu-se o FVIIa por adição de EDTA 100 mM. Deste modo, determinou-se que uma concentração de 15 µg/mL permitia a ligação no domínio linear. Depois, fez-se passar as variantes de FVIIa sobre a microplaca, com uma concentração de 15 µg/mL, para se determinar a intensidade de ligação relativa do FVIIa, ou das variantes, ao factor tecidual.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Neste exemplo utilizou-se a estrutura radiográfica do hFVIIa em complexo com o factor tecidual solúvel, segundo Banner *et al.*, *J Mol Biol*, 1996; 285:2089. Para melhor

informação sobre os cálculos deste exemplo, ver o documento WO 01/58935.

Exposição superficial

O cálculo fraccional dos valores das ASA permitiu concluir que os resíduos a seguir indicados têm mais de 25% da sua cadeia lateral exposta à superfície: A1, N2, A3, F4, L5, E6, E7, L8, R9, P10, S12, L13, E14, E16, K18, E19, E20, Q21, S23, F24, E25, E26, R28, E29, F31, K32, D33, A34, E35, R36, K38, L39, W41, I42, S43, S45, G47, D48, Q49, A51, S52, S53, Q56, G58, S60, K62, D63, Q64, L65, Q66, S67, I69, F71, L73, P74, A75, E77, G78, R79, E82, T83, H84, K85, D86, D87, Q88, L89, I90, V92, N93, E94, G97, E99, S103, D104, H105, T106, G107, T108, K109, S111, R113, E116, G117, S119, L120, L121, A122, D123, G124, V125, S126, T128, P129, T130, V131, E132, I140, L141, E142, K143, R144, N145, A146, S147, K148, P149, Q150, G151, R152, G155, K157, V158, P160, K161, E163, L171, N173, G174, A175, N184, T185, I186, H193, K197, K199, N200, R202, N203, I205, S214, E215, H216, D217, G218, D219, S222, R224, S232, T233, V235, P236, G237, T238, T239, N240, H249, Q250, P251, V253, T255, D256, E265, R266, T267, E270, R271, F275, V276, R277, F278, L280, L287, L288, D289, R290, G291, A292, T293, L295, E296, N301, M306, T307, Q308, D309, L311, Q312, Q313, R315, K316, V317, G318, D319, S320, P321, N322, T324, E325, Y326, Y332, S333, D334, S336, K337, K341, G342, H351, R353, G354, Q366, G367, T370, V371, G372, R379, E385, Q388, K389, R392, S393, E394, P395, R396, P397, G398, V399, L400, L401, R402, P404 e P406 (os resíduos A1-S45 estão localizados no domínio Gla, estando as posições restantes localizadas fora o domínio).

Para os resíduos a seguir indicados determinou-se que tinham mais de 50% da sua cadeia lateral exposta à superfície: A1, A3, F4, L5, E6, E7, L8, R9, P10, E14, E16, K18, E19, E20, Q21, S23, E25, E26, E29, K32, A34, E35, R36, K38, L39, I42, S43, G47, D48, A51, S52, S53, Q56, G58, S60, K62, L65, Q66, S67, I69, F71, L73, P74, A75, E77, G78, R79, E82, H84, K85, D86, D87, Q88, L89, I90, V92, N93, E94, G97, T106, G107, T108, K109, S111, E116, S119, L121, A122, D123, G124, V131, E132, L141, E142, K143, R144, N145, A146, S147, K148, P149, Q150, G151, R152, G155, K157, P160, N173, G174, A175, K197, K199, N200, R202, S214, E215, H216, G218, R224, V235, P236, G237, T238, H249, Q250, V253, D256, T267, F275, R277, F278, L288, D289, R290, G291, A292, T293, L295, N301, M306, Q308, D309, L311, Q312, Q313, R315, K316, G318, D319, N322, E325, D334, K341, G354, G367, V371, E385, K389, R392, E394, R396, P397, G398, R402, P404 e P406 (os resíduos A1-S43 estão localizados no domínio Gla, estando as posições restantes localizadas fora o domínio).

Local de ligação do factor tecidual

Utilizando os cálculos dos valores das ASA, determinou-se que os resíduos a seguir indicados, no hFVII, mudam as suas ASA no complexo. Ficou definido que os resíduos a seguir indicados constituem o local de ligação do receptor: L13, K18, F31, E35, R36, L39, F40, I42, S43, S60, K62, D63, Q64, L65, I69, C70, F71, C72, L73, P74, F76, E77, G78, R79, E82, K85, Q88, I90, V92, N93, E94, R271, A274, F275, V276, R277, F278, R304, L305, M306, T307, Q308, D309, Q312, Q313, E325 e R379.

Região dos locais activos

Define-se a região dos locais cativos como sendo os resíduos que possuem pelo menos um átomo a uma distância inferior a 10 Å de qualquer átomo da tríade catalítica (resíduos H193, D242, S344): I153, Q167, V168, L169, L170, L171, Q176, L177, C178, G179, G180, T181, V188, V189, S190, A191, A192, H193, C194, F195, D196, K197, I198, W201, V228, I229, I230, P231, S232, T233, Y234, V235, P236, G237, T238, T239, N240, H241, D242, I243, A244, L245, L246, V281, S282, G283, W284, G285, Q286, T293, T324, E325, Y326, M327, F328, D338, S339, C340, K341, G342, D343, S344, G345, G346, P347, H348, L358, T359, G360, I361, V362, S363, W364, G365, C368, V376, Y377, T378, R379, V380, Q382, Y383, W386, L387, L400 e F405.

A crista da fissura de ligação dos locais activos

Definiu-se a crista da fissura de ligação dos locais activos por inspecção visual da estrutura 1FAK.pdb do FVIIa, sendo: N173, A175, K199, N200, N203, D289, R290, G291, A292, P321 e T370.

Exemplo 2

Concepção de uma cassette de expressão para a expressão do rhFVII em células de mamíferos

Concebeu-se a cassette de expressão para a expressão do rhFVII e efectuou-se a sua clonagem conforme descrito no exemplo 2 do documento WO 01/58935.

Exemplo 3

Construção da cassette de expressão que codifica as variantes da invenção

Utilizou-se a PCR para prolongamento sobressaliente da sequência (SOE) para gerar construções que possuem grelhas de leitura aberta das variantes de FVII, com codões substituídos, utilizando métodos convencionais.

Exemplo 4

Expressão das variantes polipeptídicas em células da linhagem CHO K1

Com células da linhagem celular CHO K1 (ATCC n° CCL-61) inoculou-se, para uma confluência de 50%, balões T-25, utilizando MEM α , FCS a 10% (Gibco/BRL Cat n° 10091), P/S e filloquinona na concentração de 5 μ g/mL e esperou-se que crescessem até à confluência. A camada monocelular confluyente foi transfectada com 5 μ g do plasmídeo relevante, descrito *supra*, utilizando o agente de transfecção 'Lipofectamina 2000' (Life Technologies), em conformidade com as instruções do fabricante. Decorridas 24 horas após a transfecção, retirou-se uma amostra e quantificou-se, utilizando, *v.g.*, um protocolo ELISA que permite reconhecer o domínio EGF1 do hFVII. Nesta altura, é possível efectuar sobre as células uma selecção relevante (*v.g.*, com higromicina B) com a finalidade de se obter um lote de transfectantes estáveis. Quando se utiliza a linhagem celular CHO K1 e o gene da resistência à higromicina B como marcador seleccionável sobre o plasmídeo, isto consegue-se normalmente ao fim de uma semana.

Exemplo 5

Geração de células da linhagem CHO K1 que expressam estavelmente as variantes polipeptídicas

Descongelou-se um frasco que continha o lote transfectante da linhagem CHO-K1, tendo as células sido utilizadas para inocular um balão de 175 cm², para tecidos, contendo 25 ml de MEM α , FCS a 10%, filoquinona (5 μ g/mL), penicilina (100 U/L) e estreptomicina (100 μ g/L), tendo crescido depois durante 24 horas. As células foram então colhidas, diluídas e aplicadas sobre placas de microtitulação de 96 cavidades, até se obter uma densidade celular de 1/2-1 célula / cavidade. Ao fim de uma semana de desenvolvimento, estão presentes nas cavidades colónias de 20-100 células, tendo sido marcadas com um identificador as cavidades que continham apenas uma colónia. Decorridas mais duas semanas, os meios de todas as cavidades que continham apenas uma colónia foram substituídos por 200 μ L de meio recente. Ao fim de 24 horas retirou-se uma amostra de meio e analisou-se, v.g., pelo protocolo ELISA. Foram seleccionados os clones de produção elevada, tendo sido utilizados para a produção, em grande escala, de FVII ou suas variantes.

Exemplo 6

Purificação das variantes polipeptídicas e activação subsequente

A purificação do FVII e das variantes de FVII faz-se conforme a seguir se descreve. O processo é realizado a 4°C. Os meios das culturas colhidas, provenientes da produção em grande escala, são submetidos a uma operação de ultrafiltração, utilizando um sistema 'Millipore TFF' com membranas filtrantes 'Pellicon' com um valor crítico de 30 kDa. Após a concentração do meio, acrescentou-se citrato até à concentração 5 mM e ajustou-se o pH para 8,6. Se necessário, reduz-se a condutividade para um valor inferior a 10 mS/cm. Seguidamente, aplica-se a amostra a uma coluna de 'Q-sepharose FF',

equilibrada com NaCl 50 mM, Tris 10 mM a pH 8,6. Após a lavagem da coluna com NaCl 100 mM, Tris 10 mM a pH 8,6, seguindo-se NaCl 150 mM, Tris 10 mM a pH 8,6, efectua-se a eluição do FVII com Tris 10 mM, NaCl 25 mM, CaCl_2 35 mM a pH 8,6.

Para o segundo passo cromatográfico, prepara-se uma coluna de afinidade acoplando um anticorpo monoclonal do domínio anti-Gla, dependente do cálcio, à 'Q-sepharose FF' activada por CNBr. Por cada mL de resina são acoplados cerca de 5,5 mg de anticorpo. Equilibra-se a coluna com Tris 10 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 35 mM a pH 7,5. Acrescenta-se NaCl à amostra, até uma concentração de NaCl 100 mM, e ajusta-se o pH para valores entre 7,4-7,6. Após uma aplicação da amostra, de um dia para o outro, lavou-se a coluna com NaCl 100 mM, CaCl_2 35 mM, Tris 10 mM a pH 7,5, e fez-se a eluição da proteína FVII com NaCl 100 mM, citrato 50 mM, Tris 75 mM a pH 7,5.

Para o terceiro passo cromatográfico, diminuiu-se a condutividade da amostra para um valor inferior a 10 mS/cm, se necessário, e ajustou-se o pH para 8,6. Depois, aplicou-se a amostra a uma coluna de 'Q-sepharose' (equilibrada com NaCl 50 mM, Tris 10 mM a pH 8,6), com uma densidade de cerca de 3-5 mg de proteína por mL de gel para se conseguir uma activação eficiente. Após a aplicação, lavou-se a coluna com NaCl 50 mM, Tris 10 mM a pH 8,6 durante cerca de 4 horas com um caudal de 3-4 volumes de coluna (vc) por hora. Efectuou-se a eluição da proteína FVII utilizando um gradiente a variar entre 0-100% de NaCl 500 mM, Tris 10 mM a pH 8,6 para uma quantidade de 40 vc. Preparou-se um lote com as fracções que continham FVII

Para o passo cromatográfico final, diminuiu-se a condutividade para um valor inferior a 10 mS/cm. Depois aplicou-se a amostra a uma coluna de 'Q-sepharose' (equilibrada com NaCl 140 mM, glicilglicina 10 mM a pH 8,6)

com uma concentração de 3–5 mg de proteína por mL de gel. Depois, lavou-se a coluna com NaCl 140 mM, glicilglicina 10 mM a pH 8,6 e fez-se a eluição do FVII com NaCl 140 mM, CaCl₂ 15 mM, glicilglicina 10 mM a pH 8,6. Diluiu-se o produto de eluição em CaCl₂ 10 mM e ajustou-se o pH para 6,8–7,2. Finalmente, acrescentou-se Tween-80 até à concentração de 0,01% e ajustou-se o pH para 5,5 para armazenagem a –80°C.

Exemplo 7

Resultados experimentais – actividade de activação do FX

Submetendo as variantes da invenção ao "ensaio de activação do factor X independente de TF" foram obtidos os resultados adiante indicados (os resultados são expressos em percentagem da actividade da variante P10Q+K32E como referência):

Quadro 1

Variante	Activação do FX independente do TF
	$(a_{\text{variante}}/a_{\text{P10QK32E}}) \times 100$
rhFVIIa	10
P10Q+K32E (referência)	100
A3AY+P10Q+K32E+A34L	216
P10Q+K32E+D33F+A34E	194
P10Q+K32E+A34E+P74S	190
P10Q+K32E+A34E+R36E+K38E	144
P10Q+K32E+A34D+R36E	140

Dos resultados anteriores pode concluir-se que as variantes da invenção revelaram uma melhoria substancial na actividade de activação do FX, comparativamente com o rhFVIIa e também comparativamente com [P10Q+K32E]rhFVIIa.

Exemplo 8

Resultados experimentais - actividade coagulante no "Ensaio com Sangue Total"

Submetendo as variantes da invenção ao "Ensaio com Sangue Total" verificou-se que revelavam uma actividade coagulante significativamente maior (isto é, tempo de coagulação reduzido), comparativamente com o rhFVIIa e também comparativamente com [P10Q+K32E]rhFVIIa. Os resultados experimentais estão ilustrados na figura 1 e no quadro 2 subsequente.

Quadro 2

Variante	Tempo de coagulação (Ensaio com Sangue Completo
	$t_{\text{variante}}/t_{\text{wt}}$
rhFVIIa (referência)	1
A3AY+P10Q+K32E+E116D	0,4
A3AY+P10Q+K32E+A34L	0,3
P10Q+K32E+A34E+P74S	0,3
A3AY+P10Q+K32E+E77A	0,4

Exemplo 9

Resultados experimentais - actividade coagulante no "Ensaio de Coagulação"

Quando as variantes da invenção foram experimentadas num ensaio de coagulação dependente do TF ("Ensaio de Coagulação", descrito anteriormente na secção 'Materiais e Métodos'), foi evidente que essas variantes da invenção, que possuem a substituição R36E, têm uma actividade coagulante significativamente reduzida quando comparadas com o rhFVII ou com outras variantes da invenção. Ver o

quadro 3 subsequente. No entanto, conforme ilustrado no exemplo 7 anterior, as variantes que possuem a substituição R36E têm uma actividade de activação do factor X maior no "Ensaio de Activação do Factor X Independente do TF".

Quadro 3

Variante	Actividade coagulante média	
	(unidades / mg _{variante} /unidades/mg _{wt})	
	(n = 2-3)	
NovoSeven® (referência)	52 119	(100%)
P10Q+K32E	52 714	(101%)
A3AY+P10Q+K32E+A34L	56 948	(107%)
P10Q+K32E+A34E+R36E	1 439	(2,7%)
P10Q+K32E+A34D+R36E+K38E	1 232	(2,4%)

Exemplo 10

Resultados experimentais - geração de trombina no Ensaio do Trombograma

Utilizando o trombograma dependente do fosfolípido (PL) e o trombograma dependente do factor tecidual (TF) (ver a descrição anterior do Ensaio do Trombograma), determinou-se a taxa máxima de geração de trombina para as variantes de FVIIa com concentrações diferentes das proteínas variantes. Colocando num gráfico as taxas máximas de geração de trombina (expressas em UF (unidades de fluorescência) por s²) em função da concentração da variante indicada em pM, foram obtidos os resultados ilustrados na figura 2 (taxa máxima de geração de trombina dependente do factor tecidual) e na figura 3 (taxa máxima de geração de trombina dependente do fosfolípido).

A partir destes resultados, é evidente que a variante P10Q K32E A34E R36E do FVIIa tem uma aptidão diferenciada

para geração de trombina, consoante a reacção é dependente do PL ou ser dependente do TF. A taxa máxima de geração de trombina dependente de TF para esta variante diminuiu aproximadamente 10 vezes (linha pontilhada na figura 2), comparativamente com as variantes P10Q K32E ou A34Y P10Q K32E A34L do FVIIa. Além disso, também são reduzidos o tempo de atraso, o tempo até se obter um máximo, a altura desse máximo e (com menor intensidade) a AUC para a variante P10Q K32E A34E R36E, comparativamente com as outras variantes (resultados não apresentados). Em contraste com a actividade dependente de TF, a actividade dependente de PL da variante P10Q K32E A34E R36E é equivalente às das outras variantes experimentadas neste exemplo (ver a figura 3), isto é, esta variante tem uma actividade plena dependente de PL, se bem que a actividade dependente de TF seja substancialmente reduzida.

Na mesma experiência, comparou-se a variante P10Q K32E A34E R36E directamente com a variante P10Q K32E A34E P74S, que possui uma taxa elevada de geração de trombina dependente de TF, conforme ilustrado na figura 2. Admite-se que as diferenças de ligação a TF, entre estas duas variantes (isto é, a reduzida ligação a TF da variante P10Q K32E A34E R36E) possa ser atribuída, directamente, à presença da substituição R36E, possivelmente com um efeito sinérgico com a substituição A34E.

Exemplo 11

Resultados experimentais - ligação do FVIIa ao factor tecidual no Ensaio 'Biacore'

Submetendo as variantes da invenção ao ensaio de ressonância do plasmão da superfície, num sistema

'Biacore', utilizando uma microplaca de TF, conforme descrito na secção 'Materiais e Métodos', foram obtidos os resultados a seguir indicados:

Quadro 4

Variante	Nº médio de unidades de resposta (n = 5)
FVIIa de tipo selvagem	888
P10Q; K32E	714
A3AY; P10Q; K32E; A34L	967*
P10Q; K32E; A34E; R36E	414

* n=2

Consistentemente com os dados sobre as taxas de geração de trombina dependente de TF, obtidos no Ensaio do Trombograma (exemplo 10), os resultados do quadro 4 indicam que a substituição R36E confere menor ligação ao factor tecidual.

No mesmo Ensaio 'Biacore', também foram experimentadas variantes de FVIIa que possuem as mesmas modificações que a variantes enumeradas no quadro 4, conjuntamente com mais duas modificações que introduzem dois locais de glicosilação (T106N e V253N ou I205T), para ligação ao factor tecidual. Os resultados estão transpostos para o quadro 5 subsequente.

Quadro 5

Variante	Nº médio de unidades de resposta (n = 5)
T106N; V253N	717
T106N; I205T	612
P10Q; K32E; T106N; I205T	502
P10Q; K32E; T106N; V253N	498
A3AY; P10Q; K32E; A34L; T106N; V253N	522
P10Q; K32E; A34E; R36E; T106N; I205T	216

Os resultados são consistentes com os do quadro 4 e mostram que ao serem comparados com os de algumas variantes (ou com a espontânea típica) no quadro 4, sem os locais de glicosilação suplementares, a presença de dois novos locais de glicosilação nas variantes do quadro 5 proporciona uma redução (maior) na ligação ao factor tecidual. Tal como sucedeu no caso das variantes do quadro 4, a presença da substituição R36E numa variante de glicosilação tem como resultado também um nível de ligação ao factor tecidual que é substancialmente menor do que a ligação ao factor tecidual das outras variantes de glicosilação que não possuem esta substituição.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> Maxygen ApS

Maxygen Holdins Ltd.

Haaning, Jesper Mortensen

Andersen, Kim Vibour

Bornaes, Claus

<120> Variantes FVII ou FVIIa do domínio Gla

<130> 0274wo310

<150> US 60/479 780

<151> 2003-06-19

<150> DK PA 2004 00930

<151> 2004-06-15

<160> 1

<170> PatentIn Versão 3.2

<210> 1

<211> 406

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165 170 175
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180 185 190
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195 200 205
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210 215 220
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225 230 235 240
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245 250 255
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260 265 270
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
 275 280 285
 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290 295 300
 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305 310 315 320
 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325 330 335
 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340 345 350
 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355 360 365
 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370 375 380
 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pelo requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- WO 9215686 A [0008]
- WO 9111514 A [0008] [0010]
- WO 8810295 A [0008] [0123]
- WO 0028065 A [0008] [0190]
- WO 9612800 A [0010] [0179]
- WO 9920767 A [0012]
- US 6017882 A [0012] [0218]
- WO 0066753 A [0012]
- WO 0158935 A [0013] [0124] [0129] [0130] [0159] [0167] [0174] [0185] [0187] [0188] [0191] [0211] [0234] [0240]
- WO 03093465 A [0014] [0159] [0167] [0178] [0211]
- WO 2004029091 A [0015]
- WO 0222776 A [0156]
- US 5932462 A [0167]
- US 5643575 A [0167]
- US 5985265 A [0169]
- WO 9955377 A [0169]
- WO 8705330 A [0178]
- US 5077214 A [0189]
- US 5047335 A [0189]
- US 5986079 A [0190]

- US 5580560 A [0214]
- US 60479780 B [0259]
- DK PA200400930 [0259]

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- **Broze; Majerus.** J.Biol. Chem., 1980, vol. 255, 1242-1247 [0003]
- **Østerud ; Rapport.** Proc Natl Acad Sci USA, 1977, vol. 74, 5260-5264 [0003]
- **de Grouchy et al.** Hum Genet, 1984, vol. 66, 230-233 [0005]
- **O'Hara et al.** Proc Natl Acad Sci USA, 1987, vol. 84, 5158-5162 [0005]
- **Yoshitake et al.** Biochemistry, 1985, vol. 24, 3736-3750 [0005]
- **Pike et al.** Proc Natl Acad Sci USA, 1999, vol. 96, 8925-30 [0006]
- **Kemball-Cook et al.** J. Struct. Biol., 1999, vol. 127, 213-223 [0006]
- **Banner et al.** Nature, 1996, vol. 380, 41 [0006]
- **Zhang et al.** J. Mol. Biol., 1999, vol. 285, 2089 [0006]
- **Muranyi et al.** Biochemistry, 1998, vol. 37, 10605 [0006]
- **Kao et al.** Biochemistry, 1999, vol. 38, 7097 [0006]
- **Dickinson ; Ruf.** J Biol Chem, 1997, vol. 272, 19875-19879 [0007]
- **Kemball-Cook et al.** J Biol Chem, 1998, vol. 273, 8516-8521 [0007]
- **Bharadwaj et al.** J Biol Chem, 1996, vol. 271, 30685-30691 [0007]
- **Ruf et al.** Biochemistry, 1999, vol. 38, 1957-1966 [0007]

- **Petersen et al.** Eur JBiochem, 1999, vol. 261, 124-129 [0010]
- **Hedner et al.** Blood Coagulation & Fibrinolysis, 2000, vol. 11, 107-111 [0011]
- Eur-. J. Biochem., 1984, vol. 138, 9-37 [0046]
- Eur. J. Biochem., 1985, vol. 152, 1 [0046]
- **Banner et al.** Nature, 1996, vol. 380, 41-46 [0131]
- **Neuenschwander et al.** Biochemistry, 1995, vol. 34, 8701-8707 [0158]
- **Aplin et al.** CRC Crit Rev. Biochem, 1981, 259-306 [0178]
- **Barany.** Proc Natl Acad Sci USA, 1991, vol. 88, 189-193 [0182]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, 1990 [0202]
- Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Taylor & Francis, 2000 [0202]
- Handbook of Pharmaceutical Excipients. Pharmaceutical Press, 2000 [0202]
- **Laemmli, U.K.** Nature, 1970, vol. 227, 680-85 [0217]
- **Nelsestuen et al.** Biochemistry, 1977, vol. 30, 10819-10824 [0218]
- **Nelsestuen et al.** J Biol Chem, 2001, vol. 276, 39825-39831 [0219]
- **Hemker et al.** Thromb Haemosi, 2000, vol. 83, 589-91 [0229]
- **Banner et al.** J Mol Biol, 1996, vol. 285, 2089 [0234]

Lisboa, 16/03/2010

REIVINDICAÇÕES

1. Variante polipeptídica do factor VII (FVII) ou do factor VIIa (FVIIa) que possui uma sequência de aminoácidos que difere em 1 a 15 resíduos de aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos do factor VII humano (hFVII) ou do factor VIIa humano (hFVIIa) apresentada na SEQ ID NO:1, em que foi introduzido um resíduo aminoácido com carga negativa por substituição na posição 36, em que a referida variante polipeptídica na sua forma activada possui uma maior actividade de activação do FX comparativamente com factor VIIa humano recombinante.
2. Variante da reivindicação 1, em que a referida substituição é R36D.
3. Variante da reivindicação 1, em que a referida substituição é R36E.
4. Variante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, a qual compreende também uma substituição de um aminoácido na posição 34.
5. Variante da reivindicação 4, em que um resíduo aminoácido com carga negativa foi introduzido por substituição na posição 34.
6. Variante da reivindicação 5, que compreende as substituições A34E+R36E.

7. Variante de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, a qual compreende também substituições de aminoácidos nas posições 10 e/ou 32.

8. Variante da reivindicação 7, que compreende a substituição K32E.

9. Variante da reivindicação 7, que compreende a substituição P10Q.

10. Variante da reivindicação 7, que compreende as substituições P10Q+K32E.

11. Variante da reivindicação 10, que compreende as substituições P10Q+K32E+A34E+R36E.

12. Variante da reivindicação 10, que compreende as substituições P10Q+K32E+A34L+R36E.

13. Variante de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que foi introduzido pelo menos um resíduo aminoácido, que compreende um grupo de acoplamento para uma fracção não polipeptídica, numa posição localizada fora do domínio Gla.

14. Variante da reivindicação 13, em que o referido grupo de acoplamento é um local de N-glicosilação *in vivo* introduzido por substituição.

15. Variante da reivindicação 14, em que o referido local de N-glicosilação *in vivo* é introduzido por meio de uma

substituição seleccionada entre o conjunto constituído por A51N, G58N, T106N, K109N, G124N, K134N+N145T, A175T, I205S, I205T, V253N, T267N, T267N+S269T, S314N+K316S, S314N+K316T, R315N+V317S, R315N+V317T, K316N+G318S, K316N+G318T, G318N E D334N e suas combinações.

16. Variante da reivindicação 15, que compreende pelo menos uma substituição seleccionada entre o conjunto constituído por T106N, I205T e V253N.

17. Variante da reivindicação 16, que compreende dois locais de N-glicosilação *in vivo* introduzidos por substituições seleccionadas entre o conjunto constituído por T106N+I205T, T106N+V253N e I205T+V253N.

18. Variante da reivindicação 17, que compreende as substituições P10Q+K32E+A34E+R36E+T106N+I205T.

19. Variante da reivindicação 17, que compreende as substituições P10Q+K32E+A34E+R36E+T106N+V253N.

20. Variante da reivindicação 17, que compreende as substituições P10Q+K32E+A34E+R36E+I205T+V253N.

21. Variante da reivindicação 17, que compreende as substituições P10Q+K32E+A34L+R36E+T106N+I205T.

22. Variante da reivindicação 17, que compreende as substituições P10Q+K32E+A34L+R36E+T106N+V253N.

23. Variante da reivindicação 17, que compreende as substituições P10Q+K32E+A34L+R36E+I205T+V253N.

24. Variante de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, a qual compreende também uma inserção de pelo menos um resíduo aminoácido entre as posições 3 e 4.

25. Variante da reivindicação 24, que compreende uma inserção de um resíduo aminoácido entre as posições 3 e 4.

26. Variante da reivindicação 25, em que é inserido um resíduo aminoácido hidrofóbico entre as posições 3 e 4

27. Variante da reivindicação 26, em que a referida inserção é A3AY.

28. Variante da reivindicação 27, que compreende a inserção A3AY e as substituições P10Q+K32E+A34E+R36E.

29. Variante da reivindicação 27, que compreende a inserção A3AY e as substituições P10Q+K32E+A34L+R36E.

30. Variante da reivindicação 27, que compreende a inserção A3AY e as substituições P10Q+K32E+A34E+R36E+T106N+I205T.

31. Variante da reivindicação 27, que compreende a inserção A3AY e as substituições P10Q+K32E+A34E+R36E+T106N+V253N.

32. Variante da reivindicação 27, que compreende a inserção A3AY e as substituições P10Q+K32E+A34E+R36E+I205T+V253N.

33. Variante da reivindicação 27, que compreende a inserção A3AY e as substituições P10Q+K32E+A34L+R36E+T106N+I205T.
34. Variante da reivindicação 27, que compreende a inserção A3AY e as substituições P10Q+K32E+A34L+R36E+T106N+V253N.
35. Variante da reivindicação 27, que compreende a inserção A3AY e as substituições P10Q+K32E+A34L+R36E+I205T+V253N.
36. Variante de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida variante está na sua forma activada.
37. Sequência nucleotídica que codifica uma variante tal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 36.
38. Vector de expressão que compreende a sequência nucleotídica da reivindicação 37.
39. Célula hospedeira que compreende a sequência nucleotídica da reivindicação 37 ou o vector de expressão da reivindicação 38.
40. Composição que compreende uma variante tal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 36 e pelo menos um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.
41. Variante tal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 36, ou uma composição tal como definida na reivindicação 40, para utilização como um medicamento.

42. Utilização de uma variante tal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 36 para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou patologia em que seja desejável a formação de coágulo.

43. Utilização de acordo com a reivindicação 42, em que a referida doença ou patologia é seleccionada entre o conjunto constituído por hemorragias, incluindo as hemorragias cerebrais, hemorragias descontroladas graves, tais como as resultantes de traumas, hemorragias em pacientes sujeitos a transplantes ou ressecções, hemorragias varicosas e hemofilia.

44. Variante tal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 36, para utilização no tratamento de uma doença ou patologia em que seja desejável a formação de coágulo.

45. Variante tal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 36 para utilização no tratamento de uma doença ou patologia seleccionada entre o conjunto constituído por hemorragias, incluindo as hemorragias cerebrais, hemorragias descontroladas graves, tais como as resultantes de traumas, hemorragias em pacientes sujeitos a transplantes ou ressecções, hemorragias varicosas e hemofilia.

Lisboa, 16/03/2010

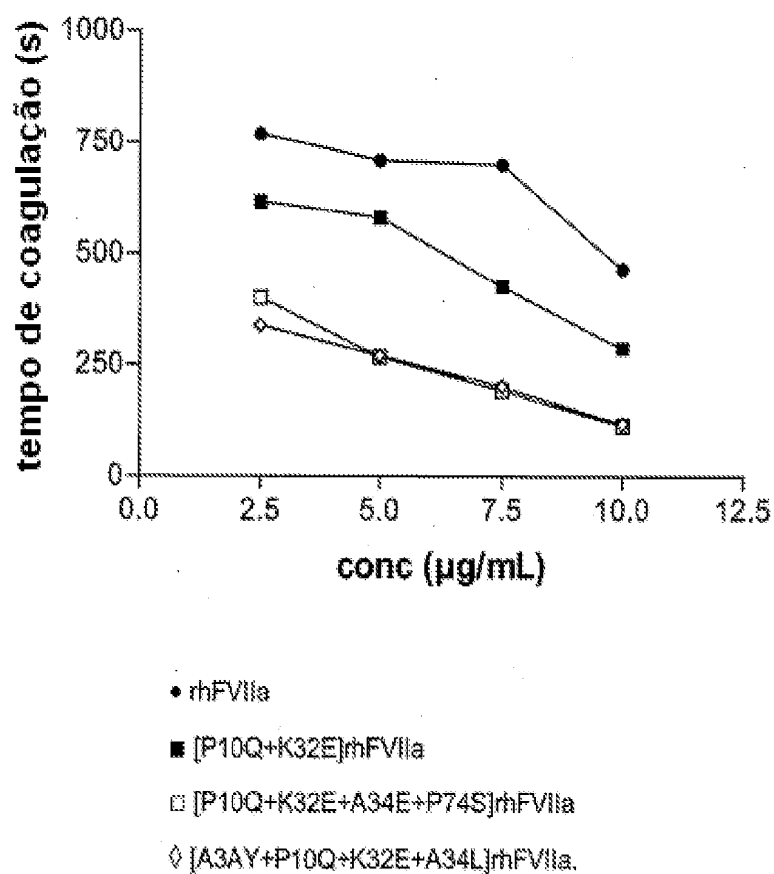


Fig. 1

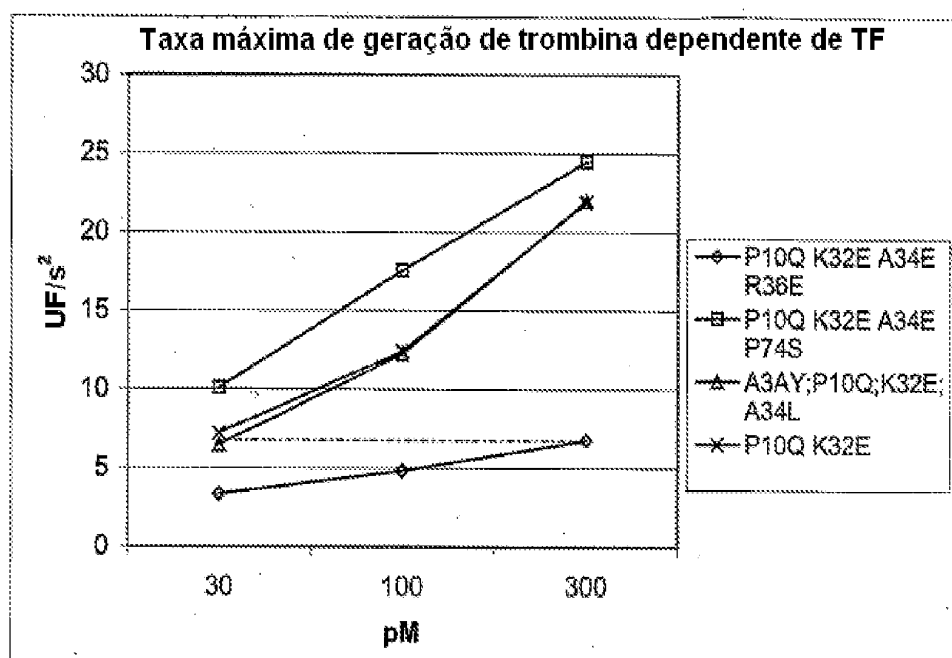


Fig. 2

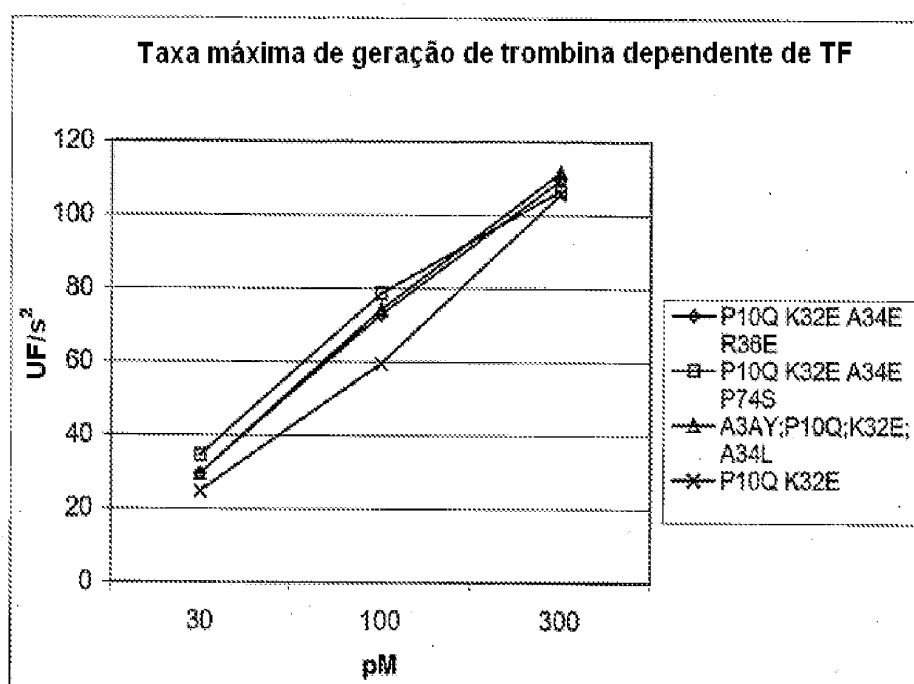


Fig. 3