



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 327 044**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04722232 .8**

(96) Fecha de presentación : **22.03.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1608745**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

(54) Título: **Variantes de FVII o FVIIa.**

(30) Prioridad: **20.03.2003 US 456547 P**
19.06.2003 US 479708 P

(73) Titular/es: **Bayer HealthCare L.L.C.**
800 Dwight Way
Berkeley, California 94710, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.10.2009

(72) Inventor/es: **Andersen, Kim, Vilbour;**
Röpke, Mads;
Haaning, Jesper, Mortensen y
Glazer, Steven

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.10.2009

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de FVII o FVIIa.

5 Ámbito de la invención

La presente invención se refiere a nuevas variantes de FVII o FVIIa que contienen por lo menos una modificación de aminoácido en una posición elegida entre el grupo formado por 196, 237 y 341. La presente invención se refiere también al uso de tales variantes de polipéptido para la terapia, en particular para el tratamiento de muchos trastornos 10 relacionados con la coagulación.

Antecedentes de la invención

15 La coagulación de la sangre es un proceso que consiste en una interacción compleja de varios componentes (o factores) de la sangre, que eventualmente desemboca en la formación de un coágulo de fibrina. En general, los componentes de la sangre que participan en ello se denominan la "cascada de la coagulación" y son proenzimas o cimógenos, es decir, proteínas enzimáticamente inactivas que se convierten en la forma activa por acción de un activador. Uno de estos factores de coagulación es el factor VII (FVII).

20 El FVII es una proteína plasmática dependiente de la vitamina K, sintetizada en el hígado y secretada al torrente sanguíneo en forma de glucoproteína de cadena simple, de un peso molecular de 53 kDa (Broze & Majerus, J. Biol. Chem. 255, 1242-1247, 1980). El cimógeno FVII se convierte en la forma activada (FVIIa) por división proteolítica de un solo sitio, el R152-I153, que da lugar a dos cadenas unidas por un solo puente disulfuro. El FVIIa formando un complejo con el factor tisular (TF), el complejo FVIIa, es capaz de convertir tanto el FIX como el FX en sus formas 25 activadas, que intervienen en reacciones que conducen a una rápida producción de trombina y a la formación de fibrina (Østerud & Rapaport, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5260-5264, 1977).

El FVII sufre modificaciones post-traduccionales, incluida la carboxilación dependiente de la vitamina K, que da lugar a diez restos de ácido γ -carboxiglutámico en la región N-terminal de la molécula. Por tanto, los restos número 30 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 y 35 representados en la SEQ ID NO: 2 son restos de ácidos γ -carboxiglutámico del dominio Gla, importantes para la actividad del FVII. Otras modificaciones post-traduccionales incluyen la unión de restos azúcar a dos sitios de N-glucosilación de origen natural de las posiciones 145 y 322, respectivamente, y dos sitios de O-glucosilación de origen natural de las posiciones 52 y 60, respectivamente.

35 El gen que codifica al FVII humano (hFVII) se ha mapeado hasta el cromosoma 13 en q34-pter 9 (de Grouchy y col., Hum. Genet. 66, 230-233, 1984). Contiene nueve exones y abarca 12,8 kb (O'Hara y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5158-5162, 1987). La organización genética y la estructura de proteína del FVII son similares a las de otras proteínas procoagulantes dependientes de la vitamina K, cuyos exones 1a y 1b codifican la secuencia de señal; el exón 2 al propéptido y al dominio Gla; el exón 3 a una región hidrófoba corta; los exones 4 y 5 a los dominios 40 epidérmicos similares al factor de crecimiento; y del exón 6 al 8 al dominio catalítico de la serina-proteasa (Yoshitake y col., Biochemistry 24, 3736-3750, 1985).

45 Se han publicado artículos sobre las estructuras tridimensionales experimentales del hFVIIa (Pike y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 8925-30, 1999 y Kemball-Cook y col., J. Struct. Biol. 1999; 127,213-223), del hFVIIa formando complejo con el factor tisular soluble empleando métodos cristalográficos de rayos X (Banner y col., Nature 380, 41, 1996; y Zhang y col., J. Mol. Biol. 285, 2089, 1999), y de fragmentos más pequeños del hFVII (Muranyi y col., Biochemistry 37, 10605, 1998; y Kao y col., Biochemistry, 38, 7097, 1999).

50 Se han descrito relativamente pocas variantes de ingeniería de proteínas del FVII (Dickinson & Ruf, J. Biol. Chem. 272, 19875-19879, 1997; Kemball-Cook y col., J. Biol. Chem. 273, 8516-8521, 1998; Bharadwaj y col., J. Biol. Chem. 271, 30685-30691, 1996; Ruf y col., Biochemistry 38, 1957-1966, 1999).

55 Se han publicado artículos sobre la expresión del FVII en BHK o en otras células de mamíferos (WO 92/15686, WO 91/11514 y WO 88/10295) y sobre la co-expresión del FVII y de la endoproteasa kex2 en células eucariotas (WO 00/28065).

60 Las preparaciones comerciales de FVIIa humano recombinante (rhFVIIa) se suministran con el nombre comercial de NovoSeven®. El NovoSeven® es indicado para el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes de hemofilia A o B. El NovoSeven® es el único rhFVIIa para el tratamiento eficaz y fiable de episodios hemorrágicos disponible en el mercado.

En el documento WO 91/11514 se describe una forma inactiva del FVII, en la que la arginina 152 y/o la isoleucina 153 se han modificado. Estos aminoácidos están ubicados en el sitio de activación. En WO 96/12800 se describe la inactivación del FVIIa con un inhibidor de serina-proteinasa; la inactivación por carbamilación del FVIIa en el grupo α -aminoácido I153 se ha descrito en Petersen y col., Eur. J. Biochem. 261, 124-129, 1999. La forma inactivada es capaz de competir con el hFVII o el hFVIIa por la unión con el TF y de inhibir la actividad coagulante. La forma inactivada del FVIIa se ha propuesto para el uso en el tratamiento de pacientes que sufren estados hipercoagulables,

ES 2 327 044 T3

por ejemplo los pacientes de sepsis, riesgo de infarto de miocardio o de apoplejía trombótica. Shah, A.M. y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95(8), 4229-34, 14 abril 1998) describen que el mutante Q10E32 del factor VII tiene una actividad coagulante más intensa.

5 En WO 98/32466 se sugiere que el FVII, entre muchas otras proteínas, puede PEGilarse (es decir, unirse a una o más moléculas de polietilenglicol), pero no se aporta ninguna información adicional al respecto.

En WO 01/58935 se describe una nueva estrategia para desarrollar moléculas de FVII o FVIIa que tengan, entre otras, una vida media más larga, que consiste en la glucosilación o la PEGilación dirigidas.

10 En WO 03/093465 se describen variantes de FVII o FVIIa que tienen ciertas modificaciones en el dominio Gla y tienen uno o más sitios de N-glucosilación introducidos fuera del dominio Gla.

15 En el resumen para el registro sanitario del NovoSeven® se indica una vida media del rhFVIIa circulante de 2,3 horas (ver "Summary Basis for Approval for NovoSeven®", número de referencia FDA: 96-0597). Son necesarias dosis relativamente elevadas y una administración frecuente para alcanzar y mantener el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Como consecuencia de ello, es difícil conseguir la regulación adecuada de la dosis y la necesidad de administraciones intravenosas frecuentes supone restricciones para el modo de vida del paciente.

20 En la hemostasis normal, el sistema procoagulante se halla en equilibrio con los sistemas anticoagulantes que intervienen en la terminación de la reacción hemostática y el sistema fibrinolítico, que disuelve los coágulos después de haberse formado. Los sistemas anticoagulantes contienen diversos inhibidores de proteasas, p.ej. el inhibidor del mecanismo del factor tisular (TFPI), la antitrombina-III (AT-III), el cofactor-II de la heparina (HC-II) y el mecanismo de la proteína C.

25 El TFPI es un inhibidor reversible, dirigido a un sitio activo, que regula la coagulación inhibiendo al FVIIa-TF de un modo dependiente del FXa. El complejo TFPI-FXa se une al complejo FVIIa-TF, desembocando en la formación de un complejo TFFVIIa-TFPI-FXa.

30 La importancia del TFPI "*in vivo*" se ha confirmado con ensayos que demuestran el efecto hemostático de un anticuerpo neutralizador anti-TFPI en un modelo de hemorragia hemofílica (Erhardtzen y col., Blood Coagul. Fibrinolysis 6, 388-394, 1995). Además, en ensayos de reconstitución bioquímica, se demuestra que el TFPI extiende la fase de inicio y reduce la velocidad de generación de la trombina durante la fase de propagación (van't Veer y Mann; J. Biol. Chem. 272, 4367-4377, 1997).

35 Un objeto de la presente invención es proporcionar variantes de FVII o FVIIa que desplieguen una mayor actividad coagulante que el hFVIIa o el rhFVIIa. Se ha contemplado que esto puede conseguirse con variantes del FVII o FVIIa que tengan una afinidad alterada con el TFPI.

40 Otro problema del actual tratamiento con rhFVIIa es la relativa inestabilidad de la molécula con respecto a la degradación proteolítica. La degradación proteolítica es un obstáculo importante para obtener una preparación en solución si se contrapone a un producto liofilizado. La ventaja de obtener una preparación soluble estable radica en una mayor facilidad de manipulación para el paciente y, en el caso de una emergencia, una acción más rápida, que potencialmente puede ser sinónimo de salvar una vida. Los intentos de impedir la degradación proteolítica mediante 45 la mutagénesis dirigida a un sitio proteolítico importante se han descrito en WO 88/10295.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar variantes de FVII/FVIIa que, además de las propiedades ya mencionadas, sean más estables a la degradación proteolítica, es decir, que presenten menos susceptibilidad de degradación proteolítica.

50 Una molécula con una vida media prolongada en circulación reduciría el número de administraciones necesarias. Dada la asociación de del producto FVIIa actual con las inyecciones frecuentes y el potencial para obtener niveles terapéuticos de FVIIa óptimos con el consiguiente efecto terapéutico intensificado, es obvio que existe demanda de moléculas mejoradas de tipo FVII o FVIIa. Una manera de aumentar la vida media circulante de una proteína consiste 55 en asegurar la disminución de la eliminación renal de la proteína. Esto puede lograrse conjugando la proteína con un resto químico que sea capaz de conferir a la proteína una menor eliminación renal. Además, la unión de un resto químico a la proteína o la sustitución de los aminoácidos expuestos a la proteólisis pueden bloquear eficazmente a la enzima proteolítica, impidiéndole el contacto que conduciría a la degradación proteolítica de la proteína. El polietilenglicol (PEG) es uno de los restos químicos que se ha utilizado para la preparación de productos proteicos terapéuticos.

Otro objeto de la presente invención es, pues, proporcionar variantes de FVII/FVIIa que, además de las propiedades mejoradas recién mencionadas, tengan una mayor vida media funcional "*in vivo*" y/o una mayor vida media en el suero.

60 Las variantes mejoradas de FVII/FVIIa que se describen a continuación permiten alcanzar este objetivo.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona variantes recombinantes de FVII o FVIIa mejoradas que tienen una mayor actividad coagulante si se comparan con los hFVII o hFVIIa, difieren en 1-15 restos aminoácido de los hFVII o hFVII, tal como se indica en la SEQ ID NO: 2 y contienen la sustitución D196K, y opcionalmente contienen también por lo menos una modificación de aminoácido en una posición elegida entre el grupo formado por 237 y 341. Estas modificaciones de aminoácidos se manifiestan en una unión alterada entre FVIIa y TFPI. Tal como se ha indicado antes, las moléculas resultantes tienen una o más propiedades mejoradas si se comparan con el hFVIIa producto comercial, como es el NovoSeven®.

En las formas de ejecución interesantes, la variante de FVII o FVIIa se ha modificado además de modo que tiene una mayor afinidad de fijación con la membrana de fosfolípido, una vida media funcional más dilatada “*in vivo*”, una mayor vida media en plasma y/o una mayor superficie debajo de la curva (Area Under the Curve, AUC), cuando se administra por vía intravenosa (i.v.). Se contempla el tratamiento médico con tal variante para ofrecer una o más ventajas con respecto al compuesto rhFVIIa actualmente disponible, por ejemplo una dosificación más baja, una acción más rápida sobre hemorragias incontroladas y, opcionalmente, un período de tiempo más prolongado entre dos inyecciones consecutivas.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se refiere a una variante de FVII o FVIIa, definida en las reivindicaciones 1-14.

Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica a la variante de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos de la invención.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a una célula hospedante que contiene la secuencia de nucleótidos de la invención o el vector de expresión de la invención.

En otro aspecto más, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene la variante de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a una variante o composición farmacéutica de la invención, para el uso como medicamento.

Otros aspectos de la presente invención se podrán derivar de la descripción que sigue y de las reivindicaciones anexas.

Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se representa el tiempo de coagulación frente a la concentración del [G237GAA]rhFVIIa cuando se realiza el llamado “ensayo de sangre total”.

A título comparativo se incluye el resultado del rhFVIIa.

• rhFVIIa;

□ [G237GAA]rhFVIIa.

Descripción detallada de la invención**Definiciones**

En el contexto de la presente solicitud e invención se aplicarán las definiciones siguientes:

El término “conjugado” (o indistintamente “variante de polipéptido conjugado”) se emplea para indicar una molécula heterogénea (en el sentido de compuesta o químérica), formada por un enlace covalente de uno o más polipéptidos con uno o más restos no polipeptídicos, por ejemplo moléculas de polímeros, compuestos lipófilos, restos azúcar y agentes derivatizantes orgánicos. El conjunto es con preferencia soluble en concentraciones y condiciones relevantes, es decir, soluble en líquidos fisiológicos, por ejemplo en la sangre. Los ejemplos de variantes de polipéptidos conjugados de la invención incluyen a los polipéptidos glucosilados y/o PEGilados.

El término “enlace covalente” o “unido mediante enlace covalente” significa que la variante de polipéptido y el resto no polipéptido están unidos directamente entre sí mediante enlace covalente, o que están unidos indirectamente entre sí mediante un enlace covalente gracias a la intervención de uno o más restos, por ejemplo un puente, un espaciador o un resto o restos de engarce.

ES 2 327 044 T3

- Tal como se emplea aquí, el término “resto no polipéptido” indica una molécula que es capaz de conjugarse con un grupo de enlace de la variante de polipéptido de la invención. Los ejemplos preferidos de tales moléculas incluyen a las moléculas de polímeros, restos azúcar, compuestos lipófilos o agentes derivatizantes orgánicos, en particular restos azúcar. Cuando se emplea en el contexto de una variante de polipéptido de la invención se entenderá que el resto no polipéptido está unido a la parte polipéptido de la variante de polipéptido mediante un grupo de enlace de la variante de polipéptido. Tal como se expuso antes, el resto no polipéptido puede unirse directamente mediante enlace covalente al grupo de enlace o puede unirse indirectamente mediante enlace covalente gracias a un resto o resto intercalados, por ejemplo, un puente, un espaciador, un resto o restos de engarce.
- La “molécula de polímero” es una molécula formada por el enlace covalente de dos o más monómeros, en la que ninguno de los monómeros es un resto aminoácido, excepto cuando el polímero es una albúmina humana u otra proteína abundante en el plasma.
- El término “polímero” puede emplearse de modo indistinto con el término “molécula de polímero”. El término se emplea para indicar también moléculas de hidratos de carbono unidas mediante glucosilación “*in vitro*”, es decir, una glucosilación realizada “*in vitro*” que normalmente implica una unión covalente de una molécula de hidrato de carbono con un grupo de enlace de la variante de polipéptido, opcionalmente con intervención de un agente de unión cruzada. La glucosilación “*in vitro*” se discute con mayor detalle a continuación.
- El término “resto azúcar” se emplea para indicar una molécula que contiene un hidrato de carbono, que abarca a uno o más restos monosacáridos, capaces de unirse a la variante de polipéptido (para producir una variante de polipéptido conjugado en forma de variante de polipéptido glucosilado) mediante una glucosilación “*in vivo*”. El término “glucosilación *in vivo*” se emplea para indicar cualquier unión de un resto azúcar existente “*in vivo*”, es decir, durante el procesado post-traduccional en una célula glucosilada empleada para la expresión de la variante de polipéptido, p.ej. mediante una glucosilación con unión a N o con unión a O. La estructura exacta del oligosacárido dependerá en gran medida del organismo glucosilante en cuestión.

Un “sitio de N-glucosilación” tiene la secuencia N-X-S/T/C, en la que X es cualquier resto aminoácido, excepto la prolina, N es asparagina y S/T/C es serina, treonina o cisteína, con preferencia serina o treonina, y con mayor preferencia treonina. Con preferencia, el resto aminoácido de la posición +3 con respecto al resto asparagina no es un resto prolina.

Un “sitio de O-glucosilación” es el grupo OH de un resto serina o treonina.

El término “grupo de enlace” se emplea para indicar un grupo funcional de la variante de polipéptido, en particular de un resto aminoácido de la misma o un resto hidrato de carbono, capaz de unir un resto no polipéptido, por ejemplo una molécula de polímero, una molécula lipófila, un resto azúcar o un agente derivatizante orgánico. Los grupos útiles de enlace y su apareamiento con resto no polipéptidos se recogen en la siguiente tabla.

40

45 grupo enlace	aminoácido	ejemplos de resto no polipéptido	método de conjuga- ción/PEG activado	referencia
-NH ₂	N-terminal, Lys	polímero, p.ej. PEG, con grupo amida o imina	mPEG-SPA mPEG tresilado	Nektar Therapeutics Delgado y col., Critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9(3,4), 249-304, 1992

55

60

65

-COOH	C-terminal, Asp, Glu	polímero, p.ej. PEG, con grupo éster o amida; resto hidrato de carbono	mPEG-Hz unión "in vitro"	Nektar Therapeutics
-SH	Cys	polímero, p.ej. PEG, con grupo disulfuro, maleimida o vinil-sulfona	PEG-vinil-sulfona PEG-maleimida	Nektar Therapeutics Delgado y col., Critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9(3,4), 249-304, 1992
-OH	Ser, Thr, Lys, OH-	resto azúcar, PEG con éster, éter, carbamato, carbonato	glucosilación con unión a O "in vivo"	
-CONH ₂	Asn como parte de un sitio de N-glucosilación	resto azúcar, polímero, p.ej. PEG	N-glucosilación "in vivo"	
resto aromático	Ph, Tyr, Trp	resto hidrato de carbono	unión "in vitro"	
-CONH ₂	Gln	resto hidrato de carbono	unión "in vitro"	Yan y Wold, Biochemistry 23(16), 3759-65, 31 julio 1984
alchido, cetona	oligosacárido oxidado	polímero, p.ej. PEG, PEG-hidrazida	PEGilación	Andresz y col., Macromol. Chem. 179, 301; WO 92/16555, WO 00/23114
guanidino	Arg	resto hidrato de carbono	unión "in vitro"	Lundblad y Noyes, Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc., Florida, EE.UU.
anillo imidazol	His	resto hidrato de carbono	unión "in vitro"	igual que para la guanidina

En el caso de la N-glucosilación "in vivo", el término "grupo de enlace" se emplea de modo no convencional para indicar los restos aminoácido que constituyen un sitio de N-glucosilación (con la secuencia N-X-S/T/C, en la que X es cualquier resto aminoácido, excepto prolina, N es asparagina y S/T/C es serina, treonina o cisteína, con preferencia serina o treonina, y con preferencia especial treonina). Aunque el resto asparagina del sitio de N-glucosilación es el que está unido el resto azúcar durante la glucosilación, esta unión no se consigue si no están presentes los demás restos aminoácido de la N-glucosilación. Por consiguiente, si el resto no polipéptido es un resto azúcar y la conjugación tiene que lograrse mediante una N-glucosilación "in vivo", el término "resto aminoácido que contiene un grupo de enlace para el resto no polipéptido" se emplea en relación con las alteraciones de la secuencia de aminoácidos de la variante de polipéptido se entenderá en el significado de uno o más restos aminoácido que constituyen un sitio de N-glucosilación "in vivo" tendrán que alterarse de tal manera que se introduzca en la secuencia de aminoácidos un sitio funcional de N-glucosilación "in vivo" o se elimine de dicha secuencia.

En la presente solicitud, los nombres de los aminoácidos y los nombres de los átomos (p.ej. CA, CB, CD, CG, SG, NZ, N, O, C, etc.) se emplean del modo definido por el Protein DataBank (PDB) (www.pdb.org), en base a la nomenclatura de la IUPAC (Nomenclatura IUPAC y simbolismo para aminoácidos y péptidos (nombres de restos,

ES 2 327 044 T3

nombres de átomos, etc.), Eur. J. Biochem. 138, 9-37, 1984, junto con sus correcciones publicadas en Eur. J. Biochem. 152, 1, 1985).

El término “resto aminoácido” se emplea para incluir cualquier resto aminoácido natural o sintético y para indicar

- 5 fundamentalmente un resto aminoácido perteneciente al grupo formado por los 20 aminoácidos de origen natural, es decir, elegido entre el grupo formado por los restos alanina (Ala o A), cisteína (Cys o C), ácido aspártico (Asp o D), ácido glutámico (Glu o E), fenilalanina (Phe o F), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), lisina (Lys o K), leucina (Leu o L), metionina (Met o M), asparagina (Asn o N), prolina (Pro o P), glutamina (Gln o Q), arginina (Arg o R), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), valina (Val o V), triptófano (Trp o W) y tirosina (Tyr o Y).

10 La terminología empleada para identificar posiciones de aminoácidos se ilustra del modo siguiente: G124 indica que la posición 124 está ocupada por un resto glicina en la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 2. G124R indica que el resto glicina de la posición 124 se ha sustituido por un resto arginina. Las sustituciones alternativas se indican con un “/”, p.ej. N145S/T significa una secuencia de aminoácidos, en la que la asparagina de

15 la posición 145 se ha sustituido por serina o por treonina. Las sustituciones múltiples se indican con un “+”, p.ej. K143N+N145S/T significa una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución del resto lisina de la posición 143 por un resto asparagina y una sustitución del resto asparagina de la posición 145 con un resto serina o un resto treonina. La inserción de un resto aminoácido adicional, por ejemplo, la inserción de un resto alanina después del G124 se indica con G124GA. La inserción de dos restos alanina adicionales después del G124 se indica con G124GAA, etc.

20 Tal como se emplea aquí, el término “insertado en la posición X” o “insertado en posición X” significa que el o los resto(s) aminoácido(s) se ha (han) insertado entre el resto aminoácido X y X+1. Una delección de un resto aminoácido se indica con un asterisco. Por ejemplo, la delección del resto glicina de la posición 124 se indica con G124*. A menos que se indique otra cosa, la numeración de los restos aminoácido de esta descripción se hace en relación con la secuencia de aminoácidos de hFVII/hFVIIa (SEQ ID NO: 2).

25 El término “difiere de” empleado en relación con mutaciones específicas indica diferencias adicionales presentes, aparte de la diferencia especificada de aminoácido. Por ejemplo, además de las modificaciones especificadas de las posiciones 196, 237 y 341, la variante de polipéptido FVII o FVIIa puede contener otras sustituciones. Los ejemplos de tales modificaciones o diferencias adicionales pueden incluir el truncamiento del extremo N y/o C con uno o más restos aminoácido (p.ej. con 1-10 restos aminoácido), o la adición de uno o más restos extra en el extremo N y/o C, p.ej. la adición de un resto metionina en el extremo N o la adición de un resto cisteína junto a o en el extremo C, así como las “sustituciones conservadoras de aminoácidos”, es decir, sustituciones realizadas dentro de los grupos de aminoácidos de características similares, p.ej. aminoácidos pequeños, aminoácidos ácidos, aminoácidos polares, aminoácidos básicos, aminoácidos hidrófobos y aminoácidos aromáticos.

35 En la tabla siguiente se recogen ejemplos de estas sustituciones conservadoras.

1	alanina (A)	glicina (G)	serina (S)	treonina (T)
2	ácido aspártico (D)	ácido glutámico (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)	triptófano (W)	

55 Otros ejemplos de modificaciones adicionales incluyen las modificaciones que dan lugar a una mayor vida media funcional “*in vivo*”, una mayor vida media en suero o una mayor AUC_{iv}. Los ejemplos específicos de estas modificaciones se facilitan a continuación. Además, la variante de polipéptido de la invención puede contener modificaciones adicionales que dan lugar a una mayor afinidad de fijación sobre membrana de fosfolípidos. Los ejemplos específicos de tales modificaciones se presentarán a continuación.

60 El término “variante” o “variante de polipéptido” (de hFVII o hFVIIa) abarca a un polipéptido que difiere en uno o más restos aminoácido de la SEQ ID NO: 2, normalmente en los restos aminoácido 1-15 (por ejemplo en los restos aminoácido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15), p.ej. en los restos aminoácido 1-10, 1-8, 1-6, 1-5, 1-4 ó 1-3, p.ej. uno o dos restos aminoácido. En el contexto presente, el término “modificación” abarca inserciones, delecciones, sustituciones y combinaciones de los mismos. Se da por supuesto que una variante de polipéptido según la presente invención estará modificada por lo menos en una de las posiciones siguientes: 196, 237 y/o 314.

ES 2 327 044 T3

El término “secuencia de nucleótidos” se emplea para indicar un tramo consecutivo de dos o más moléculas de nucleótido.

La secuencia de nucleótidos puede ser genómica, cDNA, RNA, de origen semisintético o sintético, o cualquier combinación de las mismas.

“Célula”, “célula hospedante”, “línea celular” y “cultivo celular” se emplean aquí indistintamente y cualquiera de estos términos se emplea para indicar la progenie resultante del cultivo de una célula.

“Transformación” y “transfección” se emplean indistintamente para indicar el proceso de introducción de DNA en una célula.

“Unido operativamente” indica en enlace covalente de dos o más secuencias de nucleótidos mediante ligación enzimática o de otro tipo, en una configuración con respecto a otra, de modo que pueda realizarse la función normal de las secuencias. En general, “unido operativamente” indica que las secuencias de nucleótidos a unir son contiguas y, en el caso de un líder secretorio, son contiguas y en fase de lectura.

Los términos “mutación” y “sustitución” se emplean aquí de forma indistinta.

En el contexto de la presente invención, los términos “modificación” o “modificación de aminoácido” se emplean para indicar el reemplazo de una cadena lateral de aminoácidos, la sustitución de un resto aminoácido, la delección de un resto aminoácido y la inserción de un resto aminoácido.

El término “introducir” indica la introducción de un resto aminoácido, en particular por sustitución de un resto aminoácido existente, o como alternativa por inserción de un resto aminoácido adicional.

El término “eliminar” significa quitar un resto aminoácido, en particular por sustitución del resto aminoácido a eliminar por otro resto aminoácido, o como alternativa por delección (sin sustitución) del resto aminoácido a eliminar.

El término “FVII” o “polipéptido FVII” indica una molécula de FVII en forma de cadena simple.

El término “FVIIa” o “polipéptido FVIIa” indica una molécula de FVII en su forma activada de cadena doble.

Si la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 se emplea para describir la secuencia de aminoácidos de FVIIa, entonces se da por supuesto que se ha partido el péptido unido entre R152 e I153 de la forma de cadena simple y que una de las cadenas contiene los restos aminoácido 1-152, la segunda cadena contiene los restos aminoácido 153-406.

Los términos “rFVII” y “rFVIIa” indican los polipéptidos FVII y FVIIa producidos por técnicas recombinantes.

Los términos “hFVII” y “hFVIIa” indican los FVII y FVIIa humanos de tipo salvaje, respectivamente, que tienen la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 2

Los términos “rhFVII” y “rhFVIIa” indican los FVII y FVIIa humanos de tipo salvaje, que tienen la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 2, producidos por medios recombinantes. Un ejemplo de rhFVIIa es el NovoSeven®.

El término “TF” significa factor tisular.

El término “TFPI” significa inhibidor del mecanismo de factor tisular.

El término “FX” significa factor X.

El término “dominio Gla” se emplea para indicar los aprox. 45 restos aminoácido contados desde el extremo N.

El término “dominio de proteasa” se emplea para indicar los restos 153-406 contados desde el extremo N.

El término “sitio catalítico” se emplea para indicar la tríada catalítica formada por S344, D242 y H193 de la variante de polipéptido.

El término “actividad amidolítica” se emplea para indicar la actividad en el “ensayo amidolítico” aquí descrito. Para poder desplegar “actividad amidolítica”, una variante de la invención, en su forma activada, debería tener por lo menos un 10% de la actividad amidolítica del rhFVIIa cuando se ensaya en el “ensayo amidolítico” aquí descrito. En una forma preferida de ejecución de la invención, la variante, en su forma activada, tiene por lo menos un 20% de la actividad amidolítica del rhFVIIa, a saber por lo menos un 30%, p.ej. por lo menos un 40%, con mayor preferencia por lo menos un 50%, a saber por lo menos un 60%, p.ej. por lo menos un 70%, con mayor preferencia todavía por lo menos un 80%, en especial por lo menos un 90% de la actividad amidolítica del rhFVIIa cuando se ensaya en

el “ensayo amidolítico” aquí descrito. En una forma interesante de ejecución, la variante, en su forma activada, has sustancialmente la misma actividad amidolítica que el rhFVIIa, por ejemplo una actividad amidolítica del 75-125% de la actividad amidolítica del rhFVIIa.

- 5 El término “actividad coagulante” se emplea para indicar la actividad medida en el “ensayo de sangre total” aquí descrito. Se da por supuesto que la actividad medida en el “ensayo de sangre total” es el tiempo requerido para obtener la formación de un coágulo. Por lo tanto, un tiempo más corto de coagulación equivale a una actividad coagulante mayor.
- 10 El término “mayor actividad coagulante” se emplea para indicar que el tiempo de coagulación de la variante de polipéptido es significativamente menor en sentido estadístico con respecto al generado por el rhFVIIa, cuando se determina en condiciones iguales y se mide en el “ensayo de sangre total” aquí descrito.
- 15 El término “inmunogenicidad” empleado en relación con una sustancia determinada se emplea para indicar la capacidad de la sustancia para inducir una respuesta en un sistema inmune. La respuesta inmune puede ser una respuesta mediada por una célula o anticuerpo (véase, p.ej., Roitt: Essential Immunology (8^a edición, Blackwell) para una definición más completa de la inmunogenicidad). Normalmente, una reactividad menor de un anticuerpo será una indicación de menor inmunogenicidad. La inmunogenicidad reducida puede determinarse con un método apropiado, ya conocido en la técnica, p.ej. “*in vivo*” o “*in vitro*”.
- 20 25 El término “vida media funcional ”*in vivo*“” se emplea en su significado normal, es decir, el tiempo en el que el 50% de la actividad biológica de la variante de polipéptido está todavía presente en el cuerpo/órgano diana, o el tiempo en el que la actividad amidolítica o coagulante de la variante de polipéptido queda reducida al 50% del valor inicial.
- 30 Como alternativa para la determinación de la vida media funcional “*in vivo*” puede determinarse la “vida media en suero”, es decir, el tiempo en el que el 50% de la variante de polipéptido circula en el plasma o en el torrente sanguíneo antes de ser eliminada. La determinación de la vida media en suero suele ser más simple que la determinación de la vida media funcional “*in vivo*” y la magnitud de la vida media en suero es por lo general una buena indicación de la magnitud de la vida media funcional “*in vivo*”. Los términos alternativos de la vida media en suero incluyen la “vida media en plasma”, “vida media circulante”, “eliminación en suero”, “eliminación en plasma” y “vida media de eliminación”. La variante de polipéptido se elimina por acción de uno o más de los sistemas reticuloendoteliales (RES), los riñones, el bazo o el hígado, por eliminación mediada por el factor tisular, por el receptor SEC o por otros receptores, o por proteólisis específica o inespecífica. Normalmente, la eliminación depende del tamaño (respecto al tamaño de corte de la filtración glomerular), la carga, las cadenas de hidratos de carbono unidas y la presencia de receptores celulares de la proteína. La funcionalidad a retener se elige normalmente entre actividad procoagulante, proteolítica o de unión al receptor. La vida media funcional “*in vivo*” y la vida media en suero pueden determinarse por cualquier método apropiado ya conocido de la técnica.
- 40 El término “mayor” se emplea en relación con la vida media funcional “*in vivo*” o la vida media en suero para indicar que la vida media relevante de la variante de polipéptido es significativamente mayor en sentido estadístico que la que tiene la molécula de referencia, por ejemplo el rhFVIIa, cuando se determina en las condiciones similares (se determina por ejemplo en animales experimentales, como son las ratas, conejos, cerdos y monos).
- 45 50 El término “AUC_{iv}” o “superficie debajo de la curva cuando se administra por vía intravenosa” se emplea en su significado normal, es decir, es la superficie albergada debajo de la curva de la actividad en suero frente al tiempo, cuando la variante de polipéptido se ha administrado por vía intravenosa, en particular cuando se ha administrado por vía intravenosa a las ratas. Una vez se han determinado los valores experimentales de actividad frente al tiempo, la AUC_{iv} puede calcularse de modo conveniente con un programa de ordenador, por ejemplo el GraphPad Prism 3.01.
- 55 60 El término “sensibilidad reducida a la degradación proteolítica” significa ante todo que la variante de polipéptido tiene una sensibilidad reducida a la degradación proteolítica en comparación con el rhFVIIa cuando se determinan en condiciones similares. Con preferencia, la degradación proteolítica se reduce por lo menos en un 10% (p.ej. en un 10-25% o en un 10-50%), a saber por lo menos en un 25% (p.ej. en un 25-50%, en un 25-75% o en un 25-100%), con mayor preferencia por lo menos en un 35%, a saber por lo menos en un 50%, (p.ej. en un 50-75% o en un 50-100%), con mayor preferencia todavía por lo menos en un 60%, a saber por lo menos en un 75% (p.ej. en un 75-100%) o incluso por lo menos en un 90%. Con preferencia especial, la degradación proteolítica se reduce por lo menos en un 99%.
- 65 El término “eliminación renal” se emplea en su significado normal para indicar cualquier eliminación que tenga lugar en los riñones, p.ej. por filtración glomerular, excreción tubular o degradación en las células tubulares. La eliminación renal depende de las características físicas del polipéptido, incluyendo el tamaño (diámetro), volumen hidrodinámico, simetría, forma/rigidez y carga. Un peso molecular en torno a 67 kDa se suele considerar como el valor de corte para la eliminación renal. La eliminación renal puede determinarse por cualquier ensayo idóneo, mediante un ensayo “*in vivo*”. La eliminación renal se determina por ejemplo administrando un polipéptido marcado (p.ej. radiomarcado o marcado con un marcador fluorescente) a un paciente y midiendo la actividad del marcador en la orina recogida del paciente. Una eliminación renal reducida se determina frente al correspondiente polipéptido

ES 2 327 044 T3

de referencia, p.ej. el rhFVIIa, en condiciones equivalentes. Con preferencia, la velocidad de eliminación renal de la variante de polipéptido se reduce por lo menos en un 50%, p.ej. por lo menos en un 75% o por lo menos en un 90% por comparación con el rhFVIIa.

5 Variantes de polipéptido de la invención

En su aspecto más amplio, la presente invención se refiere a una variante de FVII o FVIIa definida en la reivindicación 1, aunque la variante contendrá por ejemplo la modificación D196K, puede contener también otras modificaciones, definidas en las reivindicaciones 1-14.

- 10 En las secciones que siguen se indican las modificaciones preferidas.

Posición 196

- 15 En una forma de ejecución de la invención, la presente invención se refiere a una variante de FVII o FVIIa, dicha variante contiene, si se compara con el hFVII o hFVIIa (SEQ ID NO: 2), la sustitución D196K.

La variante tendrá en general un total de 1-15 modificaciones de aminoácidos (p.ej. sustituciones), por ejemplo 1-10 modificaciones de aminoácidos (p.ej. sustituciones), p.ej. 1-5 modificaciones de aminoácidos (p.ej. sustituciones) o 1-3 modificaciones de aminoácidos (p.ej. sustituciones).

Por ejemplo, la variante puede contener por lo menos otra modificación de aminoácido realizada en el dominio Gla tal como se explica en la siguiente sección titulada “modificaciones del dominio Gla” y/o por lo menos otra modificación adicional de aminoácido que conduce a la introducción de un sitio de N-glucosilación “*in vivo*” tal como se explica en la siguiente sección titulada “introducción de restos azúcar adicionales”, y/o por lo menos otra modificación de aminoácido capaz de aumentar la actividad intrínseca y/o por lo menos otra modificación de aminoácido que aumenta la afinidad de fijación sobre el TF. Los ejemplos de las últimas modificaciones se encontrarán en la siguiente sección titulada “otras modificaciones”.

30 Posición 237

En otra forma de ejecución de la invención, la presente invención se refiere a una variante de FVII o FVIIa, dicha variante contiene por lo menos una modificación en la posición 237 si se compara con el hFVII o hFVIIa (SEQ ID NO: 2).

- 35 En una forma preferida de ejecución de la invención, la modificación de la posición 237 es una sustitución, en particular G237L.

La variante tendrá en general un total de 1-15 modificaciones de aminoácidos (p.ej. sustituciones), por ejemplo 1-10 modificaciones de aminoácidos (p.ej. sustituciones), p.ej. 1-5 modificaciones de aminoácidos (p.ej. sustituciones) o 1-3 modificaciones de aminoácidos (p.ej. sustituciones).

Por ejemplo, la variante puede tener por lo menos una modificación adicional de aminoácido realizada en el dominio Gla tal como se explica en la siguiente sección titulada “Modificaciones del dominio Gla”, y/o por lo menos una modificación adicional de aminoácido que conduce a la introducción de un sitio de N-glucosilación “*in vivo*” tal como se explica en la siguiente sección titulada “Introducción de restos azúcar adicionales”, y/o por lo menos una modificación adicional de aminoácido capaz de aumentar la actividad intrínseca y/o por lo menos una modificación adicional de aminoácido que aumenta la capacidad de fijación sobre el TF. Los ejemplos de las últimas modificaciones se describen en la siguiente sección titulada “otras modificaciones”.

- 50 En otra forma de ejecución más de la invención, la modificación de la posición 237 es una inserción. En una forma de ejecución interesante, la inserción se elige entre el grupo formado por G237GXX, G237GXXX y G237GXXXX, en los que X es cualquier resto aminoácido. Con preferencia, X se elige entre el grupo formado por Ala, Val, Leu, Ile, Gly, Ser y Thr, en particular Ala. Los ejemplos específicos de inserciones preferidas incluyen a la G237GAA, G237GAAA y G237GAAAA. Con preferencia especial, las inserciones son G237GAA.

Posición 341

- 60 En otra forma de ejecución de la invención, la presente invención se refiere a una variante de FVII o FVIIa, dicha variante contiene por lo menos una modificación de la posición 341 si se compara con el hFVII o hFVIIa (SEQ ID NO: 2).

En una forma preferida de ejecución de la invención, la modificación de la posición 341 es una sustitución, por ejemplo K341N o K341Q, en particular K341Q.

65 La variante abarca en general un total de 1-15 modificaciones de aminoácidos (p.ej. sustituciones), por ejemplo 1-10 modificaciones de aminoácidos (p.ej. sustituciones), p.ej. 1-5 modificaciones de aminoácidos (p.ej. sustituciones) o 1-3 modificaciones de aminoácidos (p.ej. sustituciones).

Por ejemplo, la variante puede contener por lo menos una modificación adicional de aminoácido realizada en el dominio Gla, tal como se explica en la siguiente sección titulada "Modificaciones del dominio Gla", y/o por lo menos una modificación adicional de aminoácido que conduce a la introducción de un sitio de N-glucosilación "*in vivo*", tal como se explica en la siguiente sección titulada "Introducción de restos azúcar adicionales", y/o por lo menos una modificación adicional de aminoácido capaz de aumentar la actividad intrínseca y/o por lo menos una modificación adicional de aminoácido que aumenta la capacidad de fijación sobre el TF. Los ejemplos de las últimas modificaciones se describen en la siguiente sección titulada "otras modificaciones".

Propiedades de las variantes o la invención

Las variantes descritas pueden tener una afinidad alterada con el TFPI, que puede evaluarse empleando el BIACore®. Los ensayos se describen a continuación. Aplicando el ensayo BIACore® es posible estimar las diversas constantes cinéticas de fijación, por ejemplo la constante de disociación, K_D , en la que $K_D = k_d/k_a$, en el que k_a es la constante de velocidad de asociación y k_d es la constante de velocidad de disociación. Se entenderá que un valor más elevado de la K_D equivalente a una afinidad menor con el TFPI.

Las variantes de la invención poseen una actividad incrementada de coagulación (o un tiempo reducido de coagulación) si se comparan con el hFVIIa o rhFVIIa. En una forma preferida de ejecución de la invención, la relación entre el tiempo hasta la formación del coágulo para la variante ($t_{variante}$) y el tiempo hasta la formación del coágulo para el hFVIIa o rhFVIIa (t_{wt}) se sitúa como máximo en 0,9 cuando se determina en el "ensayo de sangre total" aquí descrito. Con mayor preferencia, la relación ($t_{variante}/t_{wt}$) se sitúa como máximo en 0,75, por ejemplo en 0,7, con mayor preferencia todavía la relación ($t_{variante}/t_{wt}$) se sitúa como máximo en 0,6, con preferencia especial, la ($t_{variante}/t_{wt}$) se sitúa como máximo en 0,5 cuando se determina mediante el "ensayo de sangre total" aquí descrito.

Otras modificaciones

Tal como se ha indicado antes, la variante de FVII o FVIIa de la invención puede contener modificaciones adicionales destinadas a conferir propiedades ventajosas adicionales a la molécula de FVII o FVIIa, p.ej. por lo menos una sustitución adicional de aminoácido.

Con el fin de evitar una dispersión excesiva de la estructura y función del polipéptido de FVII o FVIIa, la variante de polipéptido de FVII o FVIIa de la invención tendrá de modo típico una secuencia de aminoácidos de una identidad superior al 95% con la SEQ ID NO: 2, con preferencia una identidad superior al 96% con la SEQ ID NO: 2, por ejemplo una identidad superior al 97% con la con SEQ ID NO: 2, con mayor preferencia por lo menos una identidad del 98% con SEQ ID NO: 2, por ejemplo una identidad superior al 99% con la SEQ ID NO: 2. La homología/identidad de la secuencia de aminoácidos se determina de modo conveniente a partir de las secuencias alineadas, empleando p.ej. el programa ClustalW, versión 1.8, junio de 1999, aplicando los parámetros por defecto (Thompson y col., ClustalW: "Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680, 1994) o a partir del PFAM families database, versión 4.0 (<http://pfam.wustl.edu/>) (Nucleic Acids Res. 27(1), 260-2, 1 enero 1999) empleando el programa GENEDOC, versión 2.5 (Nicholas y col., GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, EMBNEWNEWS 4, 14, 1997; Nicholas, K.B. y Nicholas, H.B. Jr., GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, 1997).

Modificaciones del dominio Gla

En una forma de ejecución interesante de la invención, se efectúa por lo menos una modificación adicional de aminoácido en el dominio Gla, es decir, dentro de los primeros aprox. 45 restos aminoácido contados desde el extremo N de la molécula de FVII o FVIIa. Con preferencia, no se efectúan modificaciones en los restos 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 ni 35.

Sin limitarse a ninguna teoría concreta, actualmente se cree que se puede conseguir una mayor actividad coagulante con una mayor afinidad de fijación de la molécula de FVIIa con las membranas de fosfolípido presentes en la superficie de las plaquetas activadas. Se cree que esta mayor actividad se manifiesta en una mayor concentración local del polipéptido de FVIIa activado en la proximidad inmediata de otros factores de coagulación, en particular del FX. Por consiguiente, la velocidad de activación de FX - FXa será mayor, sencillamente porque hay una proporción molar más elevada entre polipéptido FVII activado y FX. La mayor velocidad de activación del FX se traduce entonces cantidades más elevadas de trombina activa y, por ello, en una velocidad más alta de uniones cruzadas de la fibrina.

Por lo tanto, en una forma preferida de ejecución según este aspecto de la invención, la variante de polipéptido tiene, en su forma activada, una mayor actividad de fijación sobre la membrana de fosfolípido si se compara con el polipéptido de rhFVIIa. La afinidad de unión con la membrana de fosfolípidos puede medirse por métodos ya conocidos de la técnica, por ejemplo los ensayos BIACore® descritos por K. Nagata y H. Handa (coord.), Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions, editorial Springer, Tokyo, 2000, capítulo 6, titulado "Interacciones de lípido-proteína".

En la técnica se han descrito muchas modificaciones del dominio Gla de FVII que conducen a una mayor afinidad de fijación sobre la membrana (véase, por ejemplo, WO 99/20767 y WO 00/66753). Las posiciones especialmente interesantes del dominio Gla que pueden modificarse son las posiciones P10, K32, D33, A34 así como la inserción de un resto aminoácido entre A3 y F4. Por tanto, en una forma preferida de ejecución de la invención, la variante, además de una o más modificaciones mencionadas antes, contempla también una sustitución en una posición elegida entre el grupo formado por P10, K32, D33 y A34 y las combinaciones de los mismos, así como una inserción entre A3 y F4. Las posiciones especialmente preferidas son P10 y K32.

La sustitución que se realizará con preferencia en la posición 32 es la K32E, la sustitución que se realizará con preferencia en la posición 10 es la P10Q, la sustitución que se realizará con preferencia en la posición 33 es la D33F, la sustitución que se realizará con preferencia en la posición 34 es la A34E y la inserción entre A3 y F4 es con preferencia la A3AY. En una forma de ejecución interesante de la invención, la variante contempla por lo menos una de las siguientes modificaciones adicionales: A3AY, P10Q, K32E, D33F, A34E o combinaciones de las mismas. Con preferencia especial, la variante contiene una de las siguiente modificaciones adicionales: K32E, P10Q+K32E, A3AY+P10Q+K32E+D33F+A34E.

Introducción de restos no polipeptídicos

En otra forma de ejecución, la variante FVII o FVIIa se modifica además de modo que la variante de polipéptido resultante tenga una mayor vida media funcional “*in vivo*” y/o una mayor vida media en plasma y/o una mayor superficie debajo de la curva cuando se administra por vía intravenosa (AUC_{iv}), en particular cuando se administra por vía intravenosa a ratas, y/o una mayor biodisponibilidad y/o una susceptibilidad reducida de degradación proteolítica. El tratamiento médico con una variante de polipéptido según este aspecto de la invención puede ofrecer muchas ventajas sobre el compuesto rFVIIa actualmente disponible, por ejemplo una dosificación más baja y, opcionalmente, un período de tiempo más prolongado entre dos inyecciones consecutivas. En el documento WO 01/58935 se describe numerosos ejemplos de sustituciones relevantes de aminoácidos.

Las variantes descritas en WO 01/58935 son el resultado de una estrategia generalmente nueva para el desarrollo de mejores moléculas de FVII o FVIIa. Esta estrategia, en la que se unen restos no polipeptídicos a las variantes FVII/FVIIa, puede utilizarse también para las variantes de FVII o FVIIa de la presente invención. Más en concreto, eliminando y/o introduciendo un resto aminoácido que contenga un grupo de enlace con un resto no polipeptídico de una variante de polipéptido FVII o FVIIa de la invención, es posible adaptar específicamente la variante de polipéptido de modo que se convierta la molécula en más susceptible de conjugación con un resto no polipeptídico de elección, de optimizar el modelo de conjugación (p.ej. para asegurar una distribución óptima y un número óptimo de restos no polipeptídicos en la superficie de la variante de polipéptido de FVII o FVIIa y asegurar que solamente los grupos de unión deseados se conjugarán estarán presentes en la molécula) y de este modo de obtener una nueva molécula de conjugado, que tiene actividad y además una o más propiedades mejoradas si se compara con las moléculas de FVII y FVIIa actualmente disponibles. Por ejemplo, si se aumenta o disminuye hasta un nivel optimizado el número total de restos aminoácido que contienen un grupo de enlace con el no polipéptido elegido, entonces la eliminación renal del conjugado se reduce significativamente debido a la forma, tamaño y/o carga alterados de la molécula resultante de esta conjugación.

Por lo tanto, las variantes de polipéptido interesantes según este aspecto de la presente invención son aquellos polipéptidos en los que dentro de la variante de polipéptido FVII o FVIIa se ha introducido o eliminado por lo menos un resto aminoácido que contiene un grupo de enlace con un resto no polipeptídico del modo descrito en esta solicitud.

En las formas de ejecución interesantes de la presente invención se altera más de un resto aminoácido de la variante de polipéptido FVII o FVIIa, la alteración consiste p.ej. en la eliminación o en la introducción de restos aminoácido que llevan un grupo de enlace con el resto no polipeptídico elegido. Además de eliminar y/o introducir restos aminoácido, la variante de polipéptido contener otras sustituciones o glucosilaciones que no guarden relación con la introducción y/o eliminación de restos aminoácido que llevan un grupo de enlace con el resto no polipeptídico. La variante de polipéptido puede estar también unida, p.ej., a un inhibidor de serina-proteinasas para inhibir el sitio catalítico del polipéptido.

El resto aminoácido que contiene un grupo de enlace con un resto no polipeptídico, si se tiene que eliminar o introducir, se elegirá en función de la naturaleza del resto no polipeptídico elegido y, en la mayoría de casos, en función del método aplicado para realizar la conjugación entre la variante de polipéptido y el resto no polipeptídico. Por ejemplo, si el resto no polipeptídico es una molécula de polímero, por ejemplo una molécula de polietilenglicol o de un derivado poli(óxido de alquíleno), entonces los restos aminoácido que llevan el grupo de enlace podrán elegirse entre el grupo formado por la lisina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina y tirosina, con preferencia la lisina, cisteína, ácido aspártico y ácido glutámico, con mayor preferencia la lisina y cisteína, en particular la cisteína.

Si el grupo de enlace para un resto no polipeptídico se ha de introducir en o eliminar de una variante de polipéptido FVII o FVIIa, la posición del resto aminoácido a modificar se situará con preferencia en la superficie del polipéptido FVII o FVIIa y con mayor preferencia estará ocupada por un resto aminoácido que está expuesto en más del 25% de su cadena lateral a la superficie (tal como se define en WO 01/58935 y en el presente ejemplo 1), está expuesto con preferencia en más del 50% de su cadena lateral a la superficie (tal como se define en WO 01/58935 y en el presente ejemplo 1).

Además, la posición se elige con preferencia entre una parte de la molécula de FVII que está situada fuera del sitio de fijación del factor tisular, el dominio Gla, la región de sitio activo y/o la cresta de la región partida del sitio de unión activo. Estos sitios/regiones se identifican en el presente ejemplo 1.

- 5 La variante de polipéptido de la invención puede contener restos no polipeptídicos 1-10, por ejemplo 1-8 ó 2-8 restos no polipeptídicos, con preferencia 1-5 ó 2-5 restos no polipeptídicos, a saber 1-4 ó 1-3 restos no polipeptídicos, p.ej. 1, 2 ó 3 restos no polipeptídicos, en particular PEG, por ejemplo mPEG o restos azúcar.

10 Otros detalles relativos a la introducción de restos no polipeptídicos se encontrarán en WO 01/58935.

Introducción de restos azúcar adicionales

En una forma de ejecución interesante de la invención, el resto no polipeptídico es un resto azúcar, es decir, la variante de polipéptido de la invención es aquellas que, además de una o más modificaciones ya descritas en otra parte 15 de esta solicitud, contiene por lo menos un resto azúcar unido mediante enlace covalente con el sitio de glucosilación introducido. Con preferencia, dicho sitio de glucosilación es un sitio de glucosilación “*in vivo*”, en particular un sitio de N-glucosilación “*in vivo*”, que se ha introducido por sustitución.

Con preferencia, dicho sitio de glucosilación se introduce en una posición situada fuera del dominio Gla, el sitio 20 de unión del factor tisular, la región de sitio activo y la cresta de la región partida del sitio de unión activo.

Tal como se emplea en el presente contexto, el término “sitio de glucosilación de origen natural” abarca a los sitios 25 de glucosilación de las posiciones N145, N322, S52 y S60. De manera similar, el término “sitio de O-glucosilación “*in vivo*“ de origen natural” incluye a las posiciones S52 y S60, mientras que el término “sitio de N-glucosilación ”*in vivo*“ de origen natural” incluye las posiciones N145 y N322.

Por tanto, en una forma de ejecución muy interesante de la invención, el resto no polipeptídico es un resto azúcar y el grupo de enlace introducido es un sitio de glucosilación, con preferencia sitio de glucosilación “*in vivo*”, por ejemplo un sitio de O-glucosilación “*in vivo*” o un sitio de N-glucosilación “*in vivo*”, en particular un sitio de N-glucosilación “*in vivo*”. Se introducen por ejemplo 1-10 sitios de glucosilación, en particular en particular sitios de N-glucosilación “*in vivo*”, con preferencia 1-8, 1-6, 1-4 ó 1-3 sitios de glucosilación. En particular, se introducen 1, 2 ó 3 sitios de N-glucosilación “*in vivo*”, con preferencia por sustitución.

Se entenderá que con el fin de preparar una variante de polipéptido, la presente variante de polipéptido FVII o 35 FVIIa que contenga uno o más sitios de glucosilación, la variante de polipéptido tendrá que expresarse en una célula hospedante capaz de fijar restos azúcar (oligosacárido) al o a los sitios de glucosilación. Los ejemplos de células hospedantes de glucosilación se indican en la siguiente sección titulada “unión a un resto azúcar”.

Los ejemplos de posiciones, en las que pueden introducirse sitios de glucosilación, incluyen, pero no se limitan 40 a: posiciones que contienen un resto aminoácido que tiene por lo menos un 25% de su cadena lateral expuesta a la superficie (del modo definido en el presente ejemplo 1), por ejemplo de una posición que tenga un resto aminoácido que tenga por lo menos un 50% de su cadena lateral expuesta a la superficie (del modo definido en el presente ejemplo 1). Se entenderá que si el término “por lo menos un 25% (o por lo menos un 50%) de su cadena lateral expuesta a la superficie” se emplea en relación con la introducción de un sitio de N-glucosilación “*in vivo*”, este término indica 45 la accesibilidad a la superficie de la cadena lateral de aminoácidos de la posición en la que actualmente está unido el resto azúcar. En muchos casos será necesario introducir un resto serina o treonina en la posición +2 con respecto al resto asparagina, con el que actualmente está unido el resto azúcar (obviamente, a menos que esta posición ya esté ocupada por un resto serina o treonina) y se permite que estas posiciones, en las que se han introducido los restos serina o treonina, estén enterradas, es decir, que tengan menos del 25% (o del 50%) de sus cadenas laterales expuestas 50 a la superficie.

Los ejemplos específicos de tales sustituciones que crean un sitio de N-glucosilación “*in vivo*” incluyen a una sustitución elegida entre el grupo formado 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 y las combinaciones de las mismas. En una forma preferida de ejecución de la invención, el sitio de N-glucosilación “*in vivo*” se crea realizando una sustitución elegida entre el grupo formado por A51N, G58N, T106N, K109N, G124N, K143N+N145T, A175T, I205T, V253N, T267N+S269T, S314N+K316T, R315N+V317T, K316N+G318T, G318N, D334N y combinaciones de las mismas, con mayor preferencia una sustitución elegida entre el grupo formado por T106N, A175T, I205T, V253N, T267N+S269T y combinaciones de las mismas, en particular la I205T.

En una forma de ejecución de la invención, se introduce un sitio de N-glucosilación “*in vivo*” por sustitución. En otra forma de ejecución de la invención se introducen por sustitución por lo menos dos sitios de N-glucosilación “*in vivo*”, por ejemplo 2 sitios de N-glucosilación “*in vivo*”. Los ejemplos específicos de sustituciones que 65 crean sitios de N-glucosilación “*in vivo*” incluyen a las 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+T2671V+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, X109N+I205T, K109N+V253N, K109N+T267N+S269T,

5 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 o G318N+D334N, con preferencia T106N+A175T, T106N+I205T, T106N+V253N, T106N+T267N+S269T, A175T+I205T, A175T+V253N, A175T+T267N+S269T, I205T+V253N, I205T+T267N+S269T o V253N+T267N+S269T, con mayor preferencia T106N+I205T, T106N+V253N o I205T+T2671V+S269T.

20 En otra forma de ejecución adicional de la invención se introducen por sustitución por lo menos tres sitios de N-glucosilación “*in vivo*”, por ejemplo tres sitios de N-glucosilación “*in vivo*”. Los ejemplos específicos de sustituciones que crean tres sitios de N-glucosilación “*in vivo*” incluyen I205T+V253N+T267N+S269T y T106N+I205T+V253N.

25 Además de un resto azúcar, la variante de polipéptido según el aspecto de la invención descrito en esta sección puede contener restos no polipeptídicos adicionales, en particular una molécula de polímero, descrita en la presente solicitud, conjugada con uno o más grupos de enlace presentes en la variante de FVII o FVIIa.

30 Se da por supuesto que cualquiera de los cambios de aminoácidos, en particular las sustituciones, especificadas en esta sección, puede combinarse con cualquiera de los cambios de aminoácidos, en particular sustituciones, especificadas en otras secciones de esta solicitud, en las que se describen cambios específicos de aminoácidos. Por ejemplo, cualquiera de las variantes de polipéptidos glucosilados descritos en esta sección, en la que se haya introducido y/o eliminado por lo menos un sitio de glucosilación, podrá conjugarse además con una molécula de polímero, por ejemplo PEG, o con cualquier otro resto no polipeptídico.

35 Más información sobre la introducción de sitios de glucosilación se puede encontrar en los documentos WO 01/58935 y WO 03/093465.

Introducción de restos no polipeptídicos que tengan la cisteína como grupo de enlace

40 En otra forma interesante de ejecución de la invención, el resto no polipeptídico tiene la cisteína como grupo de enlace, es decir, la variante de polipéptido de la invención es aquella que, además de una o varias de las modificaciones antes descritas, contiene por lo menos un resto no polipeptídico unido mediante enlace covalente con la cisteína introducida. Con preferencia, dicho resto cisteína se introduce por sustitución. Con preferencia, dicho resto cisteína se introduce en una posición situada fuera del sitio de unión del TF, el dominio Gla, la región del sitio activo y la cresta del sitio activo de unión partida.

45 El FVII/FVIIa contiene 22 restos cisteína situados fuera del dominio Gla y los puentes disulfuro se establecen entre los siguientes restos cisteína: C50 y C61, C55 y C70, C72 y C81, C91 y C102, C98 y C112, C114 y C127, C135 y C262, C159 y C164, C178 y C194, C310 y C329 y entre C340 y C368.

50 Por consiguiente, en una forma de ejecución interesante de la invención, se introduce por lo menos un resto cisteína, con preferencia por sustitución, en la variante de polipéptido FVII o FVIIa. Se introducen por ejemplo 1-10 restos cisteína, se introducen con preferencia 1-8, 1-6, 1-4 ó 1-3 restos cisteína. En particular se introducen 1, 2 ó 3 restos cisteína, con preferencia por sustitución.

55 Los ejemplos de posiciones, en las que pueden introducirse los restos cisteína incluyen, pero no se limitan a: posiciones que contienen un resto aminoácido que tiene un resto aminoácido que tiene por lo menos un 25% de su cadena lateral expuesta a la superficie (tal como se define en el presente ejemplo 1), por ejemplo en una posición que contiene un resto aminoácido que tiene por lo menos un 50% de su cadena lateral expuesta a la superficie (tal como se define en el presente ejemplo 1).

60 En una forma de ejecución interesante de la invención, se introduce un resto cisteína resto junto a o en el extremo C. por ejemplo, puede introducirse un resto cisteína ya sea por sustitución, ya sea por inserción, en la posición 400-406. Los ejemplos específicos de sustituciones incluyen: L400C, L401C, R402C, A403C, P404C, F405C y P406C, en particular P406C. Los ejemplos específicos de inserciones incluyen L400LC, L401LC, R402RC, A403AC, P404PC, F405FC y P406PC, en particular P406PC.

El resto no polipeptídico según este aspecto de la invención puede ser cualquier molécula que, cuando se aplica un método de conjugación determinado, tiene la cisteína como grupo de enlace, mientras que ahora es preferido que el resto no polipeptídico sea una molécula de polímero. La molécula de polímero puede ser cualquiera de las moléculas mencionadas en la sección titulada “Conjugación con una molécula de polímero”, pero se elegirá con preferencia entre el grupo formado por el polietilenglicol lineal o ramificado y otros polí(óxidos de alquileno). En una forma de ejecución especialmente interesante, la molécula de polímero es PEG, por ejemplo un VS-PEG.

La conjugación entre la variante de polipéptido y el polímero se consigue por cualquier método adecuado, p.ej. del modo descrito en WO 01/58935.

Si la variante de polipéptido FVII o FVIIa contiene solamente un resto de cisteína conjugable, este resto se conjugará con preferencia con un resto no polipeptídico de un peso molecular de 5 kDa a 20 kDa, p.ej. de 10 kDa a 20 kDa, por ejemplo un peso molecular de 5 kDa, de 10 kDa, de 12 kDa, de 15 kDa o de 20 kDa, y se conjugará directa o indirectamente hasta formar un polímero de peso molecular bajo (del modo descrito en WO 99/55377). Si la Variante de polipéptido de FVII o FVIIa contiene dos o más restos cisteína conjugables, normalmente cada uno de los restos non-polipeptídicos tendrá un peso molecular de 5 a 10 kDa, por ejemplo de 5 kDa o de 10 kDa.

Se da por supuesto que cada uno de los cambios de aminoácido, en particular las sustituciones, especificados en esta sección puede combinarse con cualquiera de las modificaciones de aminoácidos especificadas en otras secciones de esta descripción.

Otras modificaciones

En otra forma de ejecución de la presente invención, la variante de FVII o FVIIa, además de las modificaciones descritas en las secciones anteriores, puede contener también mutaciones de las que ya se sabe que aumentan la actividad intrínseca del polipéptido, p.ej. las descritas en WO 02/22776.

Los ejemplos de sustituciones preferidas incluyen las que se eligen entre el grupo formado por V158D, E296D, M298Q, L305V y K337A. Con mayor preferencia, dichas sustituciones se eligen entre el grupo formado por V158D+E296D+M298Q+L305V+K337A, V158D+E296D+M298Q+K337A, V158D+E296D+M298Q+L305V, V158D+E296D+M298Q, M298Q, L305V+K337A, L305V y K337A.

Además, la variante puede contener modificaciones que aumenten la afinidad de fijación con el TF. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen las sustituciones, que se elige entre el grupo formado por L39E, L39Q, L39H, I42R, S43H, S43Q, K62E, K62R, L65Q, L65S, F71D, F71Y, F71E, F71Q, F71N, E82Q, E82N, E82K, F275H y las combinaciones de las mismas, en particular L65Q, F71Y, K62E, S43Q y las combinaciones de las mismas.

Tal como se ha indicado antes, la variante puede contener también sustituciones conservadoras de aminoácidos.

40 El resto no polipeptídico

Tal como se ha indicado anteriormente, el resto no polipeptídico de la variante de polipéptido de la invención se elige con preferencia entre el grupo formado por una molécula de polímero, un compuesto lipófilo, un resto azúcar (a modo de glucosilación “*in vivo*”) y un agente derivatizante orgánico. Estos agentes pueden conferir propiedades deseables a la variante de polipéptido, en particular una mayor vida media funcional “*in vivo*” y/o una mayor vida media en plasma.

La variante de polipéptido se conjuga normalmente solo con un tipo de restos no polipeptídicos, pero puede conjugarse con dos o más tipos de restos no polipeptídicos, p.ej. con una molécula de polímero y un resto azúcar, con un grupo lipófilo y un resto azúcar, con un agente derivatizante orgánico y un resto azúcar, con un grupo lipófilo y una molécula de polímero, etc. La conjugación con dos o más restos no polipeptídicos diferentes puede realizarse de modo simultáneo o sucesivo. Más información sobre la conjugación con restos no polipeptídicos se puede encontrar en WO 01/58935 y WO 03/093465.

55 Métodos de preparar una variante de polipéptido conjugado de la invención

En general, una variante de polipéptido conjugado según la invención puede producirse por cultivo de una célula hospedante apropiada en condiciones que conduzcan a la expresión del polipéptido y a la recuperación de la variante de polipéptido, en el que a) la variante de polipéptido contiene por lo menos un sitio de N- o O-glucosilación y la célula hospedante es una célula hospedante eucariota capaz de glucosilación “*in vivo*” y/o b) la variante de polipéptido se somete a conjugación con resto no polipeptídico “*in vitro*”. Para más información sobre la preparación de variantes conjugadas de FVII véase p.ej. WO 01/58935 y WO 03/093465.

Conjugación con una molécula de polímero

La molécula de polímero que puede unirse a la variante de polipéptido puede ser cualquier molécula de polímero adecuada, por ejemplo un homo-polímero o hetero-polímero naturales o sintéticos, a saber que tengan un peso molecular comprendido aprox. entre 300 y 100.000 Da, p.ej. entre aprox. 500 y 20.000 Da, con mayor preferencia entre

aprox. 500 y 15.000 Da, con mayor preferencia incluso entre aprox. 2 y 12 kDa, a saber entre 3 y 10 kDa. Si el término “aprox.” se emplea en relación con un determinado peso molecular, la palabra “aprox.” indica un peso molecular medio aproximado y sugiere que normalmente se produce una cierta distribución de pesos moleculares durante la preparación de un polímero determinado.

5 Los ejemplos de homo-polímeros incluyen a un poliol (es decir, poli-OH), una poliamina (es decir, poli-NH₂) y un ácido policarboxílico (es decir, poli-COOH). Un hetero-polímero es un polímero que contiene diferentes grupos repetidos, por ejemplo grupos hidroxilo y grupos amina.

10 Los ejemplos de moléculas adecuadas de polímeros incluyen a las moléculas de polímeros elegidas entre el grupo formado por poli(óxido de alquíleno) (PAO), incluidos el polialquilenglicol (PAG), por ejemplo el polietilenglicol (PEG) y el polipropilenglicol (PPG), los PEG ramificados, el poli(alcohol vinílico) (PVA), los policarboxilatos, poli-15 (vinilpirolidona), polietileno-anhídrido maleico, poliestireno-anhídrido maleico, dextrano, incluido el carboximetildextrano, o cualquier otro biopolímero adecuado para reducir la inmunogenicidad y/o aumentar la vida media funcional “*in vivo*” y/o la vida media en suero. Otro ejemplo de una molécula de polímero es la albúmina humana u otra proteína abundante en el plasma. En general, los polímeros derivados de polialquilenglicol son biocompatibles, no tóxicos, no antigenicos, no inmunogénicos, tienen diversas propiedades de solubilidad en agua y se excretan fácilmente de los organismos vivos.

20 El PEG es la molécula de polímero preferida, ya que tiene muy pocos grupos reactivos capaces de uniones cruzadas si se compara p.ej. con los polisacáridos, por ejemplo el dextrano. En particular es de interés el PEG monofuncional, p.ej. el metoxipolietilenglicol (mPEG), porque su química de unión es relativamente simple (solamente dispone de un grupo reactivo que pueda conjugarse con los grupos de enlace existentes en el polipéptido). Por consiguiente, se elimina el riesgo de uniones cruzadas, las variantes de polipéptido conjugado resultantes son más homogéneas y la reacción de las moléculas de polímeros con la variante de polipéptido es más fácil de controlar.

25 Para conseguir el enlace covalente de la(s) molécula(s) de polímero con la variante de polipéptido, los grupos hidroxilo terminales de la molécula de polímero tienen que estar presentes en forma activada, es decir, con grupos funcionales reactivos (ejemplos de ello incluyen los grupos amino primarios, las hidrazidas (HZ), tioles, succinatos (SUC), 30 succinato de succinimidilo (SS), succinimidil-succinamida (SSA), propionato de succinimidilo (SPA), carboximetilato de succinimidilo (SCM), carbonato de benzotriazol (BTC), N-hidroxisuccinimida (NHS), aldehído, carbonato de nitrofenilo (NPC) y tresilato (TRES)). Las moléculas de polímeros activadas idóneas son productos comerciales, suministrados p.ej. por Nektar Therapeutics, Huntsville, AL, EE.UU., o por PoliMASC Pharmaceuticals plc, GB. Los ejemplos específicos de moléculas de polímeros lineales o ramificados, activadas, para el uso en la presente invención 35 se describen en el catálogo 2003 de Ingeniería Molecular de Nektar (Nektar Therapeutics).

40 En una forma de ejecución especialmente interesante, la PEGilación se realiza por conjugación del o de los grupos PEG con los restos cisteína introducidos. Los ejemplos específicos de polímeros PEG activados especialmente preferidos para la unión con restos cisteína incluyen a los siguientes PEG lineales: vinilsulfona-PEG (VS-PEG), con preferencia vinilsulfona-mPEG (VS-mPEG); maleimida-PEG (MAL-PEG), con preferencia maleimida-mPEG (MAL-mPEG) y disulfuro de ortopiridilo-PEG (OPSS-PEG), con preferencia disulfuro de ortopiridilo-mPEG (OPSS-mPEG). Por ejemplo, los polímeros PEG o mPEG tendrán un tamaño de aprox. 5 kDa, 10 kDa, 12 kDa o 20 kDa.

45 En otra forma de ejecución, puede unirse una molécula adecuada de PEG al extremo N.

50 Se puede encontrar información detallada sobre los métodos y polímeros que pueden emplearse para la PEGilación del FVII en el documento WO 01/58935.

Unión con un resto azúcar

55 Con el fin de conseguir la glucosilación “*in vivo*” de la variante de polipéptido de la invención, la secuencia de nucleótidos que codifican a la variante de polipéptido tiene que insertarse en un hospedante de expresión glucosilante, eucariota. La célula hospedante de expresión puede elegirse entre las células fúngicas (hongos filamentosos o levadura), células de insectos o de animales y células de plantas transgénicas. En una forma de ejecución, la célula hospedante es una célula de mamífero, por ejemplo una célula de CHO, una célula de COS, una célula BHK o una célula HEK, p.ej. una célula de HEK 293; o una célula de insecto, por ejemplo una célula SF9, o una célula de levadura, p.ej. de *S. cerevisiae* o *Pichia pastoris*, o cualquiera de las células hospedantes mencionadas a continuación. Más información sobre la glucosilación “*in vivo*” del FVII y FVIIa se puede encontrar en WO 01/58935 y WO 03/093465.

Métodos de obtención de una variante de polipéptido de la invención

60 La variante de polipéptidos de la presente invención, opcionalmente en forma glucosilada, puede producirse por cualquier método apropiado ya conocido de la técnica. Dichos métodos incluyen la construcción de una secuencia de nucleótidos que codifique a la variante de polipéptido y exprese la secuencia en un hospedante apropiado, transformado o transfecitado. Con preferencia, la célula hospedante es una célula hospedante gamma-carboxilante, por ejemplo una célula de mamífero. Sin embargo, las variantes de polipéptido de la invención pueden producirse, aunque con menor eficacia, por síntesis química o una combinación de síntesis química y tecnología de DNA recombinante.

Una secuencia de nucleótidos que codifica a una variante de polipéptido de la invención puede construirse aislando o sintetizando una secuencia de nucleótidos que codifique al hFVII y después cambiando la secuencia de nucleótidos para efectuar la introducción (es decir, inserción o sustitución) o la eliminación (es decir, delección o sustitución) del o de los restos aminoácido relevantes.

5 La secuencia de nucleótidos se modifica de modo conveniente por mutagénesis dirigida a sitio con arreglo a métodos convencionales. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede prepararse por síntesis química, p.ej. empleando un sintetizador de oligonucleótidos, en la que los oligonucleótidos se diseñan en función de la secuencia de aminoácidos de la variante de polipéptido deseada y con preferencia seleccionando aquellos codones que son favoritos de la célula hospedante, en la que se pretende producir la variante de polipéptido recombinante. Por ejemplo, pueden sintetizarse diversos oligonucleótidos pequeños que codifican a porciones de la variante de polipéptido deseada y ensamblarse por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), ligación o reacción en cadena de ligación (LCR) (Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 189-193, 1991). Los oligonucleótidos individuales contienen por ejemplo apéndices 10 5' o 3' para el ensamblado complementario.

15 Una vez ensamblada (por síntesis, mutagénesis dirigida a sitio u otro método), la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido se inserta en un vector recombinante y se une operativamente a secuencias de control necesarias para la expresión del FVII en la célula hospedante transformada deseada.

20 Los expertos ya saben seleccionar los vectores adecuados, secuencias de control y hospedantes para la expresión del polipéptido.

25 El vector recombinante puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector, que existe en una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p.ej. un plásmido. Como alternativa, el vector es aquel, que una vez introducido en una célula hospedante, se integra en el genoma de la célula hospedante y se replica junto con el o los cromosomas, en los que se ha integrado.

30 El vector es con preferencia un vector de expresión, en el que la secuencia de nucleótidos que codifican a la variante de polipéptido de la invención está unida operativamente a segmentos adicionales, requeridos para la transcripción de la secuencia de nucleótidos.

35 El vector se deriva por ejemplo de un DNA plásmido o vírico. Muchos de los vectores idóneos para la expresión en la célula hospedantes aquí mencionados son productos comerciales o vectores descritos en la bibliografía técnica. Se puede encontrar información detallada sobre los vectores apropiados para la expresión del FVII en WO 01/58935.

40 El término "secuencias de control" se emplea aquí para indicar todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de la variante de polipéptido de la invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o ajena a la secuencia de secuencia que codifica a la variante de polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a: una secuencia líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, una secuencia de promotor, intensificador o activante anterior (upstream), una secuencia de péptido de señal, y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor. En la presente invención pueden utilizarse muchas secuencias de control de expresión, p.ej. cualquiera de las secuencias de control descritas en WO 01/58935.

45 La secuencia de nucleótidos de la invención que codifica a una variante de polipéptido, si se prepara mediante mutagénesis dirigida a sitio, síntesis, PCR u otros métodos, puede incluir opcionalmente una secuencia de nucleótidos que codifique a un péptido de señal. El péptido de señal está presente si la variante de polipéptido tiene que secretarse en las células, en las que se expresa. Dicho péptido de señal, si está presente, debería ser uno que pudiera ser reconocido por la célula elegida para la expresión de la variante de polipéptido.

55 El péptido de señal puede ser homólogo (es decir, asociado normalmente con el hFVII) o heterólogo (es decir, procedente de una fuente distinta al hFVII) con el polipéptido o puede ser homólogo o heterólogo con la célula hospedante, es decir, puede ser un péptido de señal expresado normalmente en la célula hospedante o uno que normalmente no sea expresado en la célula hospedante. Más información sobre los péptidos de señal adecuados podrá encontrarse en WO 01/58935.

60 Puede emplearse cualquier hospedante idóneo para producir la variante de polipéptido, incluidas las bacterias (aunque no son especialmente preferidas), los hongos (incluidas las levaduras), células o líneas celulares vegetales, de insectos, de mamíferos o de otros animales apropiados así como de animales o de plantas transgénicos. Son preferidas las células de mamíferos. Los ejemplos de células hospedantes bacterianas incluyen a las bacterias gram-positivas, por ejemplo las cepas de *Bacillus*, p.ej. *B. brevis* o *B. subtilis*, o *Streptomyces*, o las bacterias gram-negativas, por ejemplo las cepas de *E. coli*. Los ejemplos de células hospedantes apropiadas de hongos filamentosos incluyen cepas de *Aspergillus*, p.ej. *A. oryzae*, *A. niger* o *A. nidulans*, *Fusarium* o *Trichoderma*. Los ejemplos de células hospedantes apropiadas de levadura incluyen las cepas de *Saccharomyces*, p.ej. *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, por ejemplo *P. pastoris* o *P. metanolica*, *Hansenula*, por ejemplo *H. polymorpha* o de *Yarrowia*. Los ejemplos de células hospedantes apropiadas de insectos incluyen a una línea celular de *Lepidoptera*, por ejemplo la *Spodoptera frugiperda* (Sf9 o Sf21) o las células de *Trichoplusioa ni* (High Five) (US-5,077,214). Los ejemplos de células hos-

pedantes apropiadas de mamíferos incluyen a las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), (p.ej. CHO-K1; ATCC CCL-61), líneas celulares de mono verde (COS) (p.ej. COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); células de ratón (p.ej. NS/O), líneas celulares de riñón de hámster bebé (BHK) (p.ej. ATCC CRL-1632 o ATCC CCL-10) y células humanas (p.ej. HEK 293 (ATCC CRL-1573)). Se conocen en la técnica otras líneas celulares idóneas adicionales que están disponibles en organismos depositarios públicos, por ejemplo la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. También las células de mamíferos, por ejemplo las células CHO, pueden modificarse para expresar la sialiltransferasa, p.ej. la 1,6-sialiltransferasa, p.ej. del modo descrito en US 5,047,335, con el fin de proporcionar una mejor glucosilación de la variante de polipéptido.

10 Los métodos para introducir el DNA exógeno en los anteriores tipos de células así como más información relativa a la expresión, producción y purificación de las variantes de FVII se puede encontrar en WO 01/58935.

Composición farmacéutica de la invención y su uso

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición, en particular a una composición farmacéutica, que contiene una variante de polipéptido de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La variante de polipéptido o la composición farmacéutica según la invención pueden utilizarse como medicamentos.

20 Debido a su alta eficacia coagulante, la variante de polipéptido de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, es especialmente útil para el tratamiento de episodios hemorrágicos incontrolables en pacientes traumáticos, pacientes trombocitopénicos, pacientes en tratamiento anticoagulante y pacientes de cirrosis con hemorragias de varices u otras hemorragias del tracto gastrointestinal superior, en pacientes sometidos a trasplante de hígado ortotópico o
25 a resección del hígado (que permite la cirugía sin transfusiones) o en pacientes de hemofilia.

Se define el trauma como una lesión del tejido vivo, causada por un agente externo. Es la 4^a causa más importante de muerte en Estados Unidos y supone una gran carga financiera para la economía.

30 El trauma se clasifica como contusivo o penetrante. El trauma contusivo tiene como consecuencia una compresión interna, una lesión orgánica o una hemorragia interna, mientras que el trauma penetrante (como consecuencia de un agente que penetra en el cuerpo y destruye tejidos, vasos y órganos) provoca una hemorragia externa.

35 El trauma puede venir causado por numerosos sucesos, p.ej. accidentes de tráfico, heridas de bala, caídas, accidentes de manejo de maquina y heridas por cuchilladas.

La cirrosis del hígado puede estar causada por una lesión directa del hígado, incluido el alcoholismo crónico, la hepatitis vírica crónica (tipos B, C y D) y hepatitis autoinmune así como por lesión indirecta por conducto biliar dañado, incluidas la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria y la atresia biliar. Las causas menos frecuentes de cirrosis incluyen la lesión directa del hígado como enfermedad hereditaria, por ejemplo la fibrosis quística, la deficiencia de alfa-1-antitripsina, la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, la galactosemia y la enfermedad de almacenaje de glucógeno. El trasplante es la intervención clave para tratar a los pacientes que se hallan en un estado cirrótico avanzado.

45 Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a una variante de polipéptido de la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades o trastornos, en el que sea deseable la formación de coágulos. Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un método para tratar un mamífero que tenga una enfermedad o trastorno, en el que la formación de coágulo sea deseable, que consiste en administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de la variante de polipéptido o de la composición farmacéutica de la invención.

50 Los ejemplos de enfermedades/trastornos, en los que es deseable una mayor formación de coágulo, incluyen pero no se limitan a: hemorragias, incluidas las hemorragias cerebrales, así como los pacientes de hemorragias severas incontroladas, por ejemplo en caso de trauma. Otra enfermedad/trastorno muy frecuente, en el que se contempla que los polipéptidos de la invención puedan ser útiles para una mayor formación de coágulos es la hemofilia, p.ej. la enfermedad de Willebrand, la hemofilia A, la hemofilia B o la hemofilia C.

La variante de polipéptido de la invención se administra a los pacientes en una dosis terapéuticamente eficaz, normalmente una dosis aproximadamente paralela a la aplicada en la terapia con rhFVII, por ejemplo la terapia con NovoSeven®, o una dosis menor. Se entiende por "dosis terapéuticamente eficaz" aquella dosis que es suficiente para producir los efectos deseados en relación con el estado patológico, para el que se administra. La dosis exacta dependerá de las circunstancias y los expertos podrán determinarse en base a técnicas ya conocidas. Normalmente, la dosis deberá ser capaz de prevenir o mitigar la severidad o la extensión del estado patológico o indicación tratados. Para los expertos es obvio que la cantidad eficaz de una variante de polipéptido o composición de la invención dependerá, entre otros, de la enfermedad, de la dosis, del régimen de administración, de si la variante de polipéptido o composición se administra sola o en combinación con otros agentes terapéuticos, de la vida media de las composiciones en el plasma y del estado general de salud del paciente.

La variante de polipéptido de la invención se administra con preferencia en una composición que incluye un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" significa un vehículo o excipiente que no provoca ningún efecto nocivo en los pacientes, a los que se administra. Tales vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición, A.R. Gennaro, coord., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer y L. Hovgaard, coordinadores, Tailor & Francis [2000]; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3^a edición, A. Kibbe, coord., Pharmaceutical Press [2000]).

La variante de polipéptidos de la invención puede utilizarse "tal cual" o en forma de sal. Las sales idóneas incluyen, pero no se limitan a: sales de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos, por ejemplo de sodio, potasio, calcio y magnesio, también p.ej. sales de cinc. Estas sales o complejos pueden estar presentes en forma de estructuras cristalinas y/o amorfas.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse sola o en combinación con otros agentes terapéuticos. Estos agentes pueden incorporarse como parte de la misma composición farmacéutica o pueden administrarse por separado de la variante de polipéptido de la invención, ya sea de modo simultáneo, ya sea con arreglo a otro régimen de tratamiento. Además, la variante de polipéptido o composición farmacéutica de la invención puede utilizarse como adyuvante de otras terapias.

Un "paciente" para los fines de la presente invención incluye tanto a los humanos, como a otros mamíferos. Por tanto, los métodos son aplicables tanto a la terapia humana como a la veterinaria.

La composición farmacéutica que contiene la variante de polipéptido de la invención puede presentarse de muchas formas, p.ej. como líquido, gel, sólido liofilizado o comprimido. La forma preferida dependerá de la indicación concreta a tratar y los expertos la podrán elegir sin problemas.

En particular, la composición farmacéutica que contiene la variante de polipéptido de la invención puede formularse en forma liofilizada o en forma soluble estable. La variante de polipéptido puede liofilizarse por muchos procedimientos ya conocidos de la técnica. La variante de polipéptido puede ser una forma soluble estable por eliminación o protección de los sitios susceptibles de degradación proteolítica ya descrito antes. La ventaja de fabricar una preparación soluble estable estriba en que los pacientes la manejan con mayor facilidad y, en el caso de emergencia, su acción es más rápida, pudiendo potencialmente salvar vidas. La forma preferida dependerá de la indicación particular a tratar y los expertos la sabrán elegir con claridad.

La administración de las formulaciones de la presente invención puede efectuarse de muchas maneras, incluidas, pero sin limitarse a ellas, la vía oral, subcutánea, intravenosa, intracerebral, intranasal, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal, intraocular o cualquier otra vía aceptable. Las formulaciones pueden administrarse de modo continuo por infusión, aunque la inyección de bolo es también aceptable, empleando métodos ya conocidos de la técnica, por ejemplo bombas o implantes. En algunos casos, las formulaciones pueden aplicarse directamente en forma de solución o nebulizador.

Administración parenteral

Un ejemplo preferido de una composición farmacéutica es una solución, en particular una solución acuosa diseñada para la administración parenteral. Aunque en muchos casos se proporcionan formulaciones farmacéuticas en solución en forma líquida, apropiada para el uso inmediato, dichas formulaciones parenterales pueden suministrarse también en forma congelada o liofilizada. En el primer caso, la composición tiene que descongelarse antes del uso. La última forma se emplea a menudo para mejorar la estabilidad del compuesto activo contenido en la composición en un gran abanico de condiciones de almacenaje; los expertos reconocen que las preparaciones liofilizadas son en general más estables que las formulaciones líquidas equivalentes. Estas preparaciones liofilizadas se reconstituyen antes del uso con la adición de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo agua esterilizada para inyectables o solución salina fisiológica estéril.

En el caso de composiciones parenterales, estas se preparan para el almacenaje en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas por mezclado, si procede, de la variante de polipéptido que tenga el grado deseado de pureza con uno o más vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que se emplean habitualmente en la técnica (todos ellos denominados "excipientes"), por ejemplo, agentes tamponantes, agentes estabilizantes, conservantes, agentes isotónicos, tensioactivos o detergentes no iónicos, antioxidantes y/o otros aditivos diversos.

Más información sobre formulaciones parenteral idóneas para la administración de variantes de FVII, así como sobre preparaciones de liberación sostenida se puede encontrar en WO 01/58935 y WO 03/093465.

La invención se describe ahora con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

*Materiales y métodos**Región de sitio activo*

- 5 La región de sitio activo se define como los restos que tienen por lo menos un átomo dentro de una distancia de 10 Å de cualquier átomo de la tríada catalítica (restos H193, D242, S344).

Medición de la susceptibilidad reducida de degradación proteolítica

- 10 La degradación proteolítica puede medirse con el ensayo descrito en US 5,580,560, ejemplo 5, en el que la proteólisis es una autoproteólisis.

15 Además, la proteólisis reducida puede comprobarse en un modelo “*in vivo*” empleando muestras radiomarcadas y comparando la proteólisis del rhFVIIa y de la variante de polipéptido de la invención extrayendo muestras de sangre y sometiéndolas a ensayos SDS-PAGE y autoradiografía.

20 Con independencia del ensayo aplicado para determinar la degradación proteolítica, una “degradación proteolítica reducida” indica una reducción medible de la degradación comparada con la obtenida con el rhFVIIa, dicha reducción se mide por escaneo a través de geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie, por HPLC o se mide por actividad catalítica conservada, comparada con la del tipo salvaje, empleando un ensayo de actividad independiente del factor tisular, descrito a continuación.

Determinación del peso molecular de las variantes de polipéptido

- 25 Se determina el peso molecular de las variantes de polipéptido por SDS-PAGE, filtración a través de gel, Western Blots, espectrometría de masas con desorción láser asistida por matriz, o por centrifugación en equilibrio, p.ej. por SDS-PAGE según Laemmli, GB, Nature, vol. 227, pp. 680-85, 1970.

Determinación de la inhibición por TFPI

- 30 Puede hacerse el seguimiento de la inhibición del FVII causada por el TFPI en el ensayo amidolítico descrito por Chang y col., Biochemistry 38, 10940-10948, 1999.

Determinación de la afinidad con el TFPI

- 35 La capacidad de las variantes de fijarse sobre el TFPI se evalúa aplicando uno o más de los tres ensayos BIACore® descritos por Dickinson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14379-14384, 1996; Roberge y col., Biochemistry 40, 9522-9531, 2001; y Ruf y col., Biochemistry 38(7), 1957-1966, 1999.

Ensayo de activación del factor X independiente de TF

- 40 Este ensayo se ha descrito con detalle en la página 39826 de Nelsestuen y col., J. Biol. Chem. 276, 39825-39831, 2001.

45 En resumen, se mezcla la molécula a ensayar (ya sea el hFVIIa, el rhFVIIa o la variante de polipéptido de la invención en su forma activada) con una fuente de fosfolípido (con preferencia fosfatidilcolina y fosfatidilserina en una proporción de 8:2) y el factor X re-lipidado en el tampón Tris que contiene BSA. Despues de un tiempo de incubación específico se interrumpe la reacción por adición de un exceso de EDTA. Entonces se mide la concentración del factor Xa por el cambio de absorbancia a 405 nm después de la adición de un sustrato cromogénico (S-2222, Chromogenix).
 50 Después de la corrección con la base se determina la actividad de rhFVIIa (a_{wt}) independiente del factor tisular en forma de cambio de absorbancia después de 10 minutos y se determina también la actividad de la variante de polipéptido de la invención ($a_{variante}$) independiente del factor tisular en forma de cambio de absorbancia después de 10 minutos. El cociente entre la actividad de la variante de polipéptido, en su forma activada, y la actividad del rhFVIIa se define como $a_{variante}/a_{wt}$.

Ensayo de coagulación

- 55 Se mide la actividad coagulante del FVIIa y de sus variantes en ensayos de un estadio y se registran los tiempos de coagulación en un aparato coagulómetro tipo Thrombotrack IV (Medinor). Se reconstituye el plasma humano privado del factor VII (American Diagnostica) y se equilibra a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Se trasvasan 50 microlitros de plasma a las copas del coagulómetro.

60 El FVIIa y sus variantes se diluyen en tampón glioalina (5,7 mM barbiturato, 4,3 mM citrato sódico, 117 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, pH 7,35). Se introducen 50 μ l de la muestra en la copa y se incuban a 37°C durante 2 minutos.

65 Se reconstituye la Technoplastin His (Medinor) con agua y se le añade CaCl₂ hasta una concentración final de 4,5 mM. Se equilibra la mezcla a 37°C durante 15-20 min. Se inicia la reacción añadiendo 100 μ l de Technoplastin His.

ES 2 327 044 T3

Para medir la actividad coagulante en ausencia del TF se efectúa el mismo ensayo sin añadir la Technoplastin His. Los datos se analizan con un programa informático de PRISM.

Ensayo de sangre entera

5 Se mide la actividad coagulante del FVIIa y sus variantes en ensayos de un estadio y se registran los tiempos de coagulación en un aparato coagulómetro tipo Thrombotrack IV (Medinor). Se diluyen 100 µl de FVIIa o de sus variantes con un tampón que contiene 10 mM glicilglicina, 50 mM NaCl, 37,5 mM CaCl₂, pH 7,35 y se introducen 10 en la copa de reacción. Se inicia la reacción de coagulación con la adición de 50 µl de sangre que, como anticoagulante, contiene un 10% de citrato trisódico 0,13 M. Se analizan los datos con el programa informático Excel o PRISM.

Ensayo amidolítico

15 La capacidad de las variantes de descomponer sustratos de péptidos pequeños puede medirse empleando el sustrato cromogénico S-2288 (D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida). Se diluye el FVIIa hasta aprox. 10-90 nM en tampón de ensayo (50 mM Na-Hepes, pH 7,5; 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,1% BSA, 1 U/ml de heparina). Además se diluye el 20 TF soluble (sTF) hasta 50-450 nM en tampón de ensayo. Se mezclan 120 µl de tampón de ensayo con 20 µl de la muestra de FVIIa y 20 µl de sTF. Después de incubar a temperatura ambiente durante 5 min con agitación suave y posterior incubación a 37°C durante 10 minutos, se inicia la reacción con la adición del sustrato S-2288 hasta 1 mM y se determina la absorción a 405 nm en diferentes momentos del ensayo.

Ensayo ELISA

25 Se determinan las concentraciones del FVII/FVIIa (o de sus variantes) con un ensayo ELISA. Se recubren los hoyos de una placa de microvaloración con un anticuerpo dirigido contra el dominio proteasa empleando una solución de 2 µg/ml en PBS (100 µl por hoyo). Después de la incubación a t.amb. (temperatura ambiente) durante una noche se lavan los hoyos 4 veces con tampón THT (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 0,05% Tween-20). A continuación se añaden 200 µl de caseína al 1% (diluida a partir de un patrón al 2,5% con 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl de 30 pH 7,2) a cada hoyo para bloquear. Después de incubar a t.amb. durante 1 h se vacían los hoyos y se añaden 100 µl de muestra (opcionalmente diluida con tampón de dilución (THT + caseína al 0,1%)). Después de otra incubación a temperatura ambiente durante 1 h, se lavan los hoyos 4 veces con tampón THT y se les añaden 100 µl de un anticuerpo marcado con biotina, dirigido contra el dominio similar al EGF (1 µg/ml). Después de otra incubación a temperatura ambiente durante 1 h, se realizan 4 lavados más con tampón THF y se añaden 100 µl de estreptavidina-peroxidasa 35 de rábano rusticano (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca, diluida 1/10000). Después de otra incubación a temperatura ambiente durante 1 h se realizan 4 lavados más con tampón THT y se añaden 100 µl de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Kem-en-Tech A/S, Dinamarca). Después de una incubación en la oscuridad a t.amb. durante 30 min se añaden 100 µl de H₂SO₄ 1 M y se determina la densidad óptica OD_{450 nm}. Se traza una curva estándar con el rhFVIIa (NovoSeven®).

40 Como alternativa, el FVII/FVIIa o sus variantes pueden cuantificarse a través del dominio Gla en lugar del dominio de la proteasa. En esta adaptación del ELISA, se recubren los hoyos con anticuerpo dirigido contra el dominio similar al EGF y se incuban durante una noche, empleando para la detección un anticuerpo monoclonal anti-dominio Gla marcado con biotina y dependiente de calcio (2 µg/ml, 100 µl por hoyo).

45 En este ensayo se añade 5 mM CaCl₂ al tampón THT y al tampón de dilución.

Ejemplos

50 Ejemplo 1

En este ejemplo se emplea la estructura obtenida por rayos X del hFVIIa en complejo con factor tisular por Banner y col., J. Mol. Biol. 285, 2089, 1996. Conviene advertir que la numeración de los restos en la referencia no sigue la de la secuencia. Aquí hemos utilizado la numeración consecutiva de la SEQ ID NO: 2. Los ácidos gamma-carboxi-glutámicos de las posiciones 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 y 35 se llaman aquí todos Glu (abreviatura de tres letras) o E (abreviatura de una letra). Los restos 143-152 no están presentes en la estructura. Para más información sobre los cálculos de este ejemplo, véase WO 01/58935.

Exposición de superficie

60 Por los cálculos ASA fraccional realizados se constata que los restos siguientes tienen más del 25% de su cadena lateral expuesta a la superficie: 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, 42, 543, 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,

ES 2 327 044 T3

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, 5 E385, Q388, K389, R392, S393, E394, P395, R396, P397, G398, V399, L400, L401, R402, P404 y P406.

Se determina que los restos siguientes tienen más del 50% de su cadena lateral expuesta a la superficie: 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, 142, S43, G47, D48, A51, S52, 553, Q56, G58, S60, K62, L65, Q66, S67, I69, F71, L73, P74, A75, E77, G78, R79, E82, 10 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, 15 E385, K389, R392, E394, R396, P397, G398, R402, P404 y P406.

Sitio de unión del factor tisular

Por cálculos ASA se determina que los restos siguientes del hFVII cambian su ASA en el complejo. Estos restos 20 se definen como constitutivos del sitio de unión del factor tisular: L13, K18, F31, E35, R36, L39, F40, 142, 543, 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 y R379.

Región de sitio activo

25 Se define la región de sitio activo como cualquier resto que tenga por lo menos un átomo dentro de una distancia de 10 Å de cualquier átomo de la tríada catalítica (restos 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, 30 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 y F405.

Cresta de la región partida del sitio de unión activo

35 La cresta de la región partida del sitio de unión activo se define por inspección visual de la estructura 1FAK.pdb del FVIIa como: N173, A175, K199, N200, N203, D289, R290, G291, A292, P321 y T370.

40 Ejemplo 2

Diseño de un cassette de expresión para la expresión del hFVII en células de mamífero

45 Se sintetiza la secuencia de DNA representada en la SEQ ID NO: 1, que abarca la forma corta del cDNA de longitud completa que codifica al hFVII con su péptido corto nativo de señal (Hagen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2412, 1986) con el fin de facilitar una expresión elevada en células de mamífero. En primer lugar se modifica el contexto del codón de inicio ATG según la secuencia de consenso de Kozak (Kozak, M., J. Mol. Biol. 196(4), 947-50, 20 agosto 1987), de modo que sea un apareamiento perfecto con la secuencia de consenso situada antes (upstream) 50 del codón de inicio ATG. En segundo lugar se modifica el marco abierto de lectura del cDNA nativo haciendo un bies en el uso del codón hacia los codones empleados con frecuencia en genes humanos de expresión elevada. Se insertan además dos codones de paro traduccional en el extremo del marco abierto de lectura con el fin de facilitar un paro efectivo de la traducción. Se ensambla el gen totalmente sintético y de expresión optimizada del hFVII a partir de oligonucleótidos de DNA 70-mer y finalmente se amplifica empleando cebadores de extremo que insertan los sitios BamH1 y HindIII en los extremos 5' y 3' respectivamente aplicando técnicas PCR estándar, de este modo se obtiene 55 la secuencia siguiente (SEQ ID NO: 3):

5 ggatccggccaccatggtcagccaggccctccgcctgtgcgtcgggtgcaggcgtgcggctggctgcgttcacc
 caggaggaagcccattggcggtccatgcgcggcgccggccaatgccttctgaaagagactccgcctggctccctgaaacgcg
 aatgcaaagaggaacagtgcagcttgaggaagccccggagattttcaaaagacgcgtgagcggaccacaaactgttttggattagcta
 10 cgatggcgatcagtgcgcctccagccctggccagaacggggctcctgaaagaccagactgcagagctataatctgccttcgcctgcct
 gcctttagggcgcaattgcgaaacccataaggatgaccagctgatttgcgtcaacgaaaacggggctgcgagcagactgcag
 cgatcacacgggcacgaagcggagctgccgtgccacgaaggctatagccttcggctgacgggggtcctgcacgcccacggtg
 15 gaataccctgcgggaagattccattctagaaaaagcggaaacgcgtagcaaaccccagggccggatcgtcggcgggaagggtctgccc
 taaggggagtgccctggcaggtctgtctggtaacggggcccagctgtgcggcgggaccctcatcaattaccattttgggtcgt
 gtccgcgcgtcactgcattcgataagatggcggaaacctcatgcgtgtcggcgaacacgcgtctgtccgagcatgacgg
 20 gacgaacagtcggccgggtggctcaggcatcattccctccacctatgtgcctggcactgacgaccaatcagatcgcctgcctgcct
 ccaccagccgtcgtcaccgcgtcgtgcctgtgcctgagcggacccttagcgaacgcacgcgtggcttcgtccgc
 tttagcctcggtccggctggggccagctgcgtcaccggcgctccgcgtcggatgtggctcaacgtccccggcigatga
 25 cccaggactgcctgcagcgtccgcggaaactgtggggactccccaaatatcaggatatagtttgcgtggctatagcgatggc
 caaggatagctgcaagggggactccggcggcccaatgcacgcactatcgcggacctggtaacctcaccggatcgtcagctgg
 ggccaggggctgcggccacgggtgggcacttggcgtcacacgcgtcagccagttgatggctgcaagctcatgcggag
 30 cgaacccggccgggtgcctcgtcggcccttcctgtataaaagctt

35 Se prepara un vector para la clonación del producto PCR generado, que contiene el cassette de expresión del hFVII, por clonación del intrón del pCINeo (Promega). Se amplifica el intrón sintético del pCI-Neo aplicando condiciones PCR estándar y los cebadores:

40 CBProFpr174: 5' - AGCTGGCTAGCCACTGGGCAGGTAAGTATCA -3' (SEQ ID NO: 4) y

CBProFpr175: 5' - TGGCGGGATCCTTAAGAGCTGTAATTGAAC -3' (SEQ ID NO: 5)

45 obteniéndose un fragmento PCR de 332 bp. Se corta este fragmento con NheI y BamH1 antes de clonarlo en pCD-NA3.1/HygR (suministrado por Invitrogen), formándose el PF#34.

50 El cassette de expresión del hFVII se clona entre los sitios BamH1 y HindIII del PF#34, obteniéndose el plásmido PF#226.

Ejemplo 3

Construcción de vectores de expresión que codifican a las variantes de polipéptido de la invención

55 Se aplica una PCR de extensión de apéndice de secuencia (sequence overhang extension, SOE) para generar constructos que tienen los marcos de lectura abierta de la variante de FVII con codones sustituidos. En la SOE-PCR se amplifican en primer lugar tanto la parte del extremo N como la parte terminal del extremo C del marco de lectura abierto del FVII mediante PCR primarias individuales.

60

65

ES 2 327 044 T3

Con el fin de cambiar el codón del D196 por el codón de N196 se emplean los siguientes cebadores por pares para las PCR primarias:

5	CB499:	5'- CCCATT <u>CTAGAAA</u> ACGGAACGCCAGCAAACCCCAGGG -3'	(SEQ ID NO: 6) y
	CB562:	5'- CCAATT <u>CTTAATCTTGT</u> GAAGCAGTGAGCGGCG -3',	(SEQ ID NO: 7) y
10	CB256:	5'- CTCCGTGATATTGGGGGAGTC -3'	(SEQ ID NO: 8) y
	CB561:	5'- CGCCGCTCACTGCT <u>CAACAAG</u> ATTAAGAATTGG -3'	(SEQ ID NO: 9).

Después se combinan los productos de las PCR primarias y se añaden los cebadores terminales (CB499 y CB256), que permiten obtener el producto secundario de longitud completa que codifica al fragmento mutado de la variante D196N deseada. Este producto PCR se restringe con XbaI y XhoI y se emplea para sustituir el fragmento equivalente de la región de codificación del FVII del vector de expresión PF226, que conduce al vector de expresión pB0014 que codifica a la variante D196N.

Excepto los constructos de las variantes de la posición 341, los demás constructos se obtienen de igual manera que el D196N. Los constructos de las variantes de la posición 341 se obtienen empleando los cebadores de extremos:

20	CB220:	5'- CGCTCTCGAGCTGATGGTGCTC -3'	(SEQ ID NO: 10) y
	CB362:	5'- CAAACA.ACAGATGGCTGGCAAC -3'	(SEQ ID NO: 11)

que permiten la clonación direccional entre XhoI y HindIII. Los cebadores centrales empleados para las reacciones SOE-PCR de las variantes de sustitución son:

30	<u>D196K</u>		
	CB563:	CGCCGCTCACTGCTCAAGAAGATTAAGAATTGG	(SEQ ID NO: 12)
35	CB564:	CCAATT <u>CTTAATCTTCTTGT</u> GAAGCAGTGAGCGGCG	(SEQ ID NO: 13)

40	<u>G237L</u>		
	CB565:	CTCCACCTATGTGCCTCTGACGACCAATCACGA	(SEQ ID NO: 14)
45	CB566:	TCGTGATTGGTCGTCAGAGGCACATAGGTGGAG	(SEQ ID NO: 15)

50	<u>K341Q</u>		
	CB569:	CCAAGGATGCCAGGGGACTCCGGCGGGC	(SEQ ID NO: 16)
55	CB570:	GCCCCGCCAGTCCCCCTGGCAGCTATCCTTGG	(SEQ ID NO: 17)

Para la variante de inserción, los cebadores centrales son:

55	<u>G237GAA</u>		
	CB597:	ACCTATGTGCCTGGCGCTGCCACGACCAATCACGAT	(SEQ ID NO: 18)
60	CB598:	ATCGTGATTGGTCGTTGGCAGCGCCAGGCACATAGGT	(SEQ ID NO: 19)

ES 2 327 044 T3

Ejemplo 4

Expresión del FVII o de las variantes de FVII en células CHO K1

- 5 Se siembra la línea celular CHO K1 (ATCC nº CCL-61) en frascos T-25 en una confluencia del 50% empleando MEM α , 10% FCS (Gibco/BRL, nº de cat. 10091), P/S y 5 μ g/ml de filoquinona y se cultivan hasta confluencia. Se transfecta la monocapa celular confluente con 5 μ g del plásmido relevante antes descrito empleando el agente de transfección Lipofectamina 2000 (Life Technologies) con arreglo a las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección se saca una muestra y se cuantifica empleando p.ej. un ELISA que reconozca el dominio 10 EGF1 I del hFVII. En este momento puede realizarse una selección relevante (p.ej. con higromicina B) de las células con el fin de generar un conjunto de transfectantes estables. Cuando se emplean las células CHO K1 y el gen de resistencia a la higromicina B como marcador seleccionable del plásmido, esto se consigue normalmente en el plazo de una semana.

15

Ejemplo 5

Generación de células CHO-K1 que expresan de modo estable en las variantes del polipéptido

- 20 Se descongela un vial que tiene un conjunto de transfectantes de CHO-K1 y se siembran las células en un frasco de tejido de 175 cm² que contiene 25 ml de MEM α , 10% FCS, filoquinona (5 μ g/ml), 100 U/l penicilina, 100 μ g/l de estreptomicina y se cultivan durante 24 horas. Se recogen las células, se diluyen y se reparten en placas de microvialación de 96 hoyos en una densidad de 1/2-1 células/hoyo. Después de una semana de cultivo hay colonias de 20-100 células en los hoyos y se marcan aquellos hoyos que solamente contienen una colonia. Después de dos semanas 25 se sustituyen los medios de todos los hoyos que contienen solo una colonia por 200 μ l de medio fresco. Pasadas 24 horas se saca una muestra del medio y se analiza, p.ej. por ELISA. Se seleccionan los clones de producción elevada y se emplean para obtener el FVII o su variante a gran escala.

30 Ejemplo 6

Purificación de variantes de polipéptido y activación posterior

- Se purifican el FVII y las variantes de FVII del modo siguiente: se realiza el procedimiento a 4°C. Se someten a 35 ultrafiltración los medios de cultivo recogidos de la producción a gran escala con un sistema TFF de Millipore con membranas Pellicon de corte en 30 kDa. Después de concentrar el medio se le añade citrato hasta 5 mM y se ajusta el pH a 8,6. Si fuera necesario se baja la conductividad hasta un valor inferior a 10 mS/cm. A continuación se introduce la muestra en una columna de Q-Sepharose FF, equilibrada con 50 mM NaCl, 10 mM Tris, de pH 8,6. Después de lavar la columna con 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,6, y después con 150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,6, se eluye el FVII mediante 10 mM Tris, 25 mM NaCl, 35 mM CaCl₂, pH 8,6.

40 Para el segundo paso cromatográfico se prepara una columna de afinidad asociando un anticuerpo monoclonal anti-dominio Gla dependiente del calcio a una Sepharose FF activada con CNBr. Se añaden unos 5,5 mg de anticuerpo por ml de resina. Se equilibra la columna con 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 35 mM CaCl₂, pH 7,5. Se añade NaCl a la muestra hasta una concentración de 100 mM NaCl y se ajusta el pH a un valor entre 7,4 y 7,6. Después de la aplicación O/N de la muestra, se lava la columna con 100 mM NaCl, 35 mM CaCl₂, 10 mM Tris, de pH 7,5, y se eluye la proteína del FVII con 100 mM NaCl, 50 mM citrato, 75 mM Tris, de pH 7,5.

45 Para el tercer paso cromatográfico se baja la conductividad de la muestra hasta un valor inferior a 10 mS/cm, si fuera necesario, y se ajusta el pH a 8,6. Entonces se introduce la mezcla en una columna de Q-Sepharose (equilibrada con 50 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,6) con una densidad de aprox. 3-5 mg de proteína por ml de gel para obtener una activación eficaz. Después de la aplicación, se lava la columna con 50 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,6 durante unas 4 horas con un caudal de 3-4 volúmenes de columna (cv) por hora. Se eluye la proteína del FVII aplicando un gradiente de 0-100% de 500 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,6, a lo largo de 40 cv. Se recogen las fracciones que contienen FVII.

55 Para el paso cromatográfico final se baja la conductividad hasta un valor inferior a 10 mS/cm. A continuación se introduce la muestra en una columna de Q-Sepharose (equilibrada con 140 mM NaCl, 10 mM glicilglicina, pH 8,6) en una concentración de 3-5 mg de proteína por ml de gel. Entonces se lava la columna con 140 mM NaCl, 10 mM glicilglicina, pH 8,6 y se eluye el FVII con 140 mM NaCl, 15 mM CaCl₂, 10 mM glicilglicina, de pH 8,6. Se diluye el líquido eluido con 10 mM CaCl₂ y se ajusta el pH a 6,8-7,2. Finalmente se añade el Tween-80 hasta 0,01% y se ajusta el pH a 5,5 para el almacenaje a 80°C.

65

ES 2 327 044 T3

Ejemplo 7

Resultados experimentales

5 Sometiendo las variantes de la invención al “ensayo de sangre total” se pone de manifiesto que las variantes poseen una actividad coagulante significativamente aumentada (tiempo de coagulación más reducido) con respecto al rhFVIIa. Los resultados experimentales se recogen en la siguiente tabla 1. Los resultados se ilustran además en la figura 1 anexa, en la que se representa el tiempo de coagulación frente a la concentración de la variante G237GAA comparada con el rhFVIIa.

10

TABLA 1

variante	tiempo de coagulación (ensayo de sangre total) $t_{variante}/t_{wt}$
rhFVIIa (referencia)	1
D196K	0,4
D196N	0,4
K341Q	0,4
G237L	0,3
G237GAA	0,3

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante de polipéptido del factor VII humano (hFVII) o del factor VIIa humano (hFVIIa) que posee una actividad coagulante superior a la del hFVII o hFVIIa, dicha variante difiere en 1-15 restos aminoácido del hFVII o hFVIIa, está representada en la SEQ ID NO: 2 y contiene la sustitución D196K.
- 10 2. La variante de reivindicación 1, dicha variante contiene además una modificación en la posición 237 si se compara con el hFVII o el hFVIIa, y se representa en la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. La variante de reivindicación 2, en la que dicha modificación es una sustitución.
- 20 4. La variante de reivindicación 3, en la que dicha sustitución es G237L.
- 25 5. La variante de reivindicación 2, en la que dicha modificación es una inserción.
- 30 6. La variante de reivindicación 5, en la que dicha inserción se elige entre el grupo formado por G237GXX, G237GXXX y G237GXXXX, en los que X es cualquier resto aminoácido.
- 35 7. La variante de reivindicación 6, en la que X se elige entre el grupo formado por Ala, Val, Leu, Ile, Gly, Ser y Thr.
- 40 8. La variante de reivindicación 7, en la que X es Ala.
- 45 9. La variante de reivindicación 7, en la que dicha inserción es G237GAA.
- 50 10. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha variante contiene además una modificación en la posición 341 si se compara con el hFVII o hFVIIa y se representa en la SEQ ID NO: 2.
- 55 11. La variante de reivindicación 10, en la que dicha modificación es una sustitución.
- 60 12. La variante de reivindicación 11, en la que dicha sustitución es K341Q.
- 65 13. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, dicha variante contiene 1-10 modificaciones adicionales de aminoácidos.
- 70 14. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, dicha variante está en su forma activada.
- 75 15. Una secuencia de nucleótidos que codifican a una variante definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
- 80 16. Un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 15.
- 85 17. Una célula hospedante que contiene una secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 15 o un vector de expresión definido en la reivindicación 16.
- 90 18. La célula hospedante de reivindicación 17, dicha célula hospedante es una célula gamma-carboxilante capaz de glucosilación “*in vivo*”.
- 95 19. Una composición que contiene una variante definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y por lo menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 100 20. Una variante definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para el uso como medicamento.
- 105 21. Uso de una variante definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad o de un trastorno, en el que es deseable la formación de coágulos.
- 110 22. Uso según la reivindicación 21, en el que dicha enfermedad o trastorno se elige entre el grupo formado por hemorragias, incluidas las hemorragias cerebrales, las hemorragias severas incontroladas, por ejemplo en caso de trauma, las hemorragias de pacientes sometidos a trasplantes o resección, hemorragias de varices y hemofilia.
- 115 23. Uso según la reivindicación 22, en el que dicha enfermedad o trastorno es un trauma.
- 120 24. Uso según la reivindicación 22, en el que dicha enfermedad o trastorno es la hemofilia.
- 125 25. Una variante definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para el uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno definido en una cualquiera de las reivindicaciones 21-24.

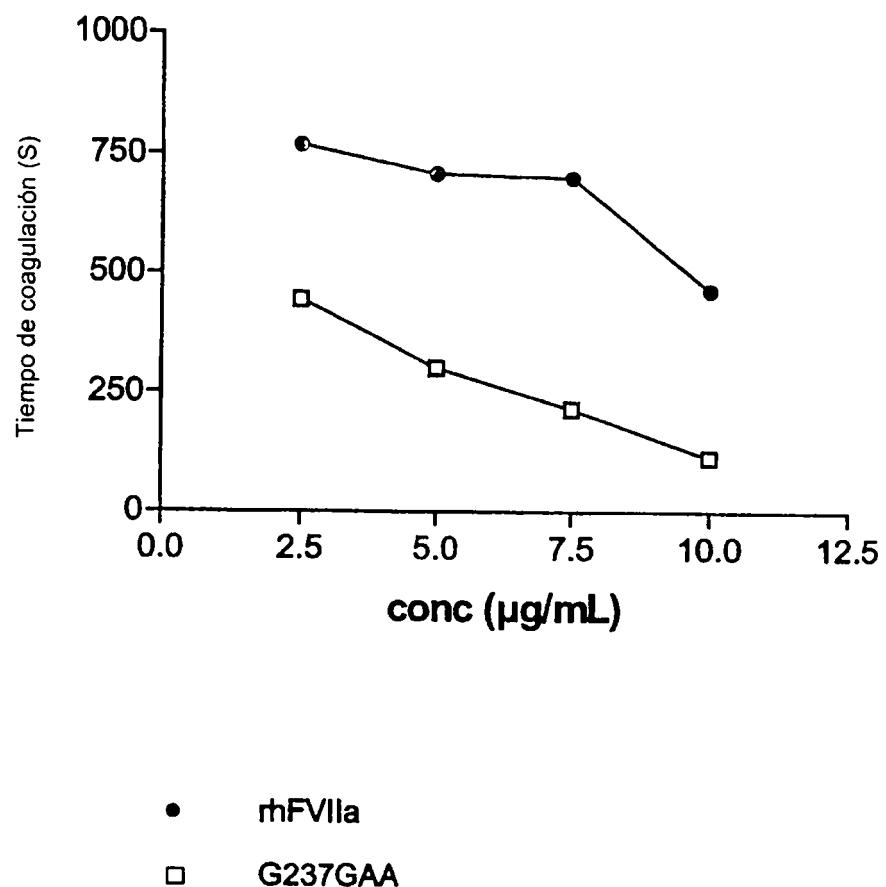


Fig. 1

ES 2 327 044 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Maxygen ApS
 Maxygen Holdings Ltd.
 Haaning Jesper Mortensen
 Andersen, Kim Vilbour
 Röpke, Mads
 Glazer, Steven
 <120> Variantes de FVII o FVIIa
 <130> 0272wo310
 <150> US 60/456,547
 <151> 2003-03-20
 <150> US 60/479,708
 <151> 2003-06-19
 <160> 19
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (115)...(1338)
 <400> 1

```

atggtcagcc aggccctccg ctcctgtgc ctgctcctgg ggctgcaggc ctgcctggct      60
35 gccgtcttcg tcacccagga ggaagcccat ggcgtccctgc atcgccggcg ccgg gcc      117
                               Ala
                               1

40 aat gcc ttt ctg gaa gag ctc cgc cct ggc tcc ctg gaa cgc gaa tgc      165
Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys
      5                      10                     15

45 aaa gag gaa cag tgc agc ttt gag gaa gcc cgg gag att ttc aaa gac      213
Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp
      20                     25                     30

50 gct gag cgg acc aaa ctg ttt tgg att agc tat agc gat ggc gat cag      261
Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln
      35                     40                     45

55 tgc gcc tcc agc cct tgc cag aac ggg ggc tcc tgc aaa gac cag ctg      309
Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu
      50                     55                     60                     65

60 cag agc tat atc tgc ttc tgc ctg cct gcc ttt gag ggg cgc aat tgc      357
Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys
      70                     75                     80

65 gaa acc cat aag gat gac cag ctg att tgc gtc aac gaa aac ggg ggc      405
Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly
      85                     90                     95

70 tgc gag cag tac tgc agc gat cac acg ggc acg aag cgg agc tgc cgc      453
Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg
      100                    105                    110
  
```

ES 2 327 044 T3

	Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro	
	115 120 125	
5	acg gtg gaa tac cct tgc ggg aag att ccc att Cta gaa aag cg aac 549 Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn 130 135 140 145	
10	gct agc aaa ccc cag ggc cgg atc gtc ggc ggg aag gtc tgc cct aag 597 Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys 150 155 160	
15	ggg gag tgc ccc tgg cag gtc ctg ctc ctg gtc aac ggg gcc cag ctg 645 Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu 165 170 175	
20	tgc ggc ggg acc ctc atc aat acc att tgg gtc gtg tcc gcc gct cac 693 Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His 180 185 190	
25	tgc ttc gat aag att aag aat tgg cgg aac ctc atc gct gtg ctc ggc 741 Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly 195 200 205	
30	gaa cac gat ctg tcc gag cat gac ggg gac gaa cag tcc cgc cgg gtg 789 Glu His Asp Leu Ser Gln His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val 210 215 220 225	
35	gct cag gtc atc att ccc tcc acc tat gtg cct ggc acg acc aat cac 837 Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His 230 235 240	
40	gat atc gct ctg ctc cgc ctc cac cag ccc gtc gtg ctc acc gat cac 885 Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His 245 250 255	
45	gtc gtg cct ctg tgc ctc gag cgg acc ttt agc gaa cgc acg ctg 933 Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu 260 265 270	
50	gct ttc gtc cgc ttt agc ctc gtg tcc ggc tgg ggc cag ctg ctc gac 981 Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp 275 280 285	
55	cgg ggc gct acc gct ctc gag ctg atg gtg ctc aac gtc ccc cgg ctg 1029 Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu 290 295 300 305	
60	atg acc cag gac tgc ctg cag cag tcc cgc aaa gtg ggg gac tcc ccc 1077 Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro 310 315 320	
65	aat atc acg gag tat atg ttt tgc gct ggc tat agc gat ggc tcc aag 1125 Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys 325 330 335	
	gat agc tgc aag ggg gac tcc ggc ggg ccc cat gcc acg cac tat cgc 1173 Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg 340 345 350	
	ggg acc tgg tac ctc acc ggg atc gtc agc tgg ggc cag ggc tgc gcc 1221 Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala 355 360 365	
	acg gtg ggg cac ttt ggc gtc tac acg cgc gtc agc cag tac att gag 1269 Thr Val Glu His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu 370 375 380 385	
	tgg ctg cag aag ctc atg cgg agc gaa ccc cgg ccc ggg gtg ctc ctg 1317 Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu	

ES 2 327 044 T3

	390	395	400	
5	cg g g c c c t t c c t g a t a			1338
	Arg Ala Pro Phe Pro			
	405			
10	<210> 2			
	<211> 406			
	<212> PRT			
	<213> <i>Homo sapiens</i>			
	<400> 2			
15	A a A s n A a P h e L e u G l u G l u L e u A r g P r o G l y S e r L e u G l u A r g G l u			
	1 5 10 15			
20	C y s L y s G l u G l u G l n C y s S e r P h e G l u G l u A l a A r g G l u I l e P h e L y s			
	20 25 30			
25	A s p A a G l u A r g T h r L y s L e u P h e T r p I l e S e r T y r S e r A s p G l y A s p			
	35 40 45			
30	G l n C y s A a S e r S e r P r o C y s G l n A s n G l y G l y S e r C y s L y s A s p G l n			
	50 55 60			
35	L e u G l n S e r T y r I l e C y s P h e C y s L e u P r o A a P h e G l u G l y A r g A s n			
	65 70 75 80			
40	C y s G l u T h r H i s L y s A s p A s p G l n L e u I l e C y s V a l A s n G l u A s n G l y			
	85 90 95			
45	G l y C y s G l u G l n T y r C y s S e r A s p H i s T h r G l y T h r L y s A r g S e r C y s			
	100 105 110			
50	A r g C y s H i s G l u G l y T y r S e r L e u L e u A a A s p G l y V a l S e r C y s T h r			
	115 120 125			
55	P r o T h r V a l G l u T y r P r o C y s G l y L y s I l e P r o I l e L e u G l u L y s A r g			
	130 135 140			
60	A s n A a S e r L y s P r o G l n G l y A r g I l e V a l G l y G l y V a l C y s P r o			
	145 150 155 160			
65	L y s G l y G l u C y s P r o T r p G l n V a l L e u L e u V a l A s n G l y A a G l n			
	165 170 175			
70	L e u C y s G l y G l y T h r L e u I l e A s n T h r I l e T r p V a l V a l S e r A a A a			
	180 185 190			
75	H i s C y s P h e A s p L y s I l e L y s A s n T r p A r g A s n L e u I l e A a V a l L e u			
	195 200 205			
80	G l y G l u H i s A s p L e u S e r G l u H i s A s p G l y A s p G l u G l n S e r A g A g			
	210 215 220			

ES 2 327 044 T3

Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240

5 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255

10 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270

15 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285

20 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300

25 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320

30 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335

35 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

40 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380

45 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400

50 Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

55 <210> 3

<211> 1357

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

60 <223> gen sintético para optimizar la expresión del hFVII

ES 2 327 044 T3

<400> 3

	ggatcccgcc accatggtca gccaggccct ccgcctcctg tgcctgctcc tggggctgca	60
5	gggctgcctg gctgcgtct tcgtcaccca ggaggaagcc catggcgtcc tgcacgcgg	120
	gcgccgggcc aatgccttc tggaaagagct ccgcctggc tccctggaac gcgaatgcaa	180
	agaggaacag tgcagcttg aggaagcccgg gtagattttc aaagacgctg agcggacc	240
10	actgtttgg attagctata gcgtggcga tcagtgcgcc tccagccctt gccagaacgg	300
	gggctcctgc aaagaccagc tgcagagcta tatctgcttc tgccctgcctg ccttgagg	360
15	gcccattgc gaaacccata aggtatgacca gctgattgc gtcaacgaaa acggggctg	420
	cgagcagtac tgcagcgtac acacgggcac gaagcggagc tgccctgccc acgaaggct	480
	tagcctcctg gctgacgggg tgcctgcac gcccacggg gataaccctt gcgggaagat	540
20	tcccattcta gaaaagcgga acgctagcaa accccaggc cggatcgtcg gcgggaaggt	600
	ctgcccataag ggggagtgcc cctggcaggt cctgcctgc gtcaacgggg cccagctgt	660
	cggcgggacc ctcatcaata ccattgggt cgtgtccgccc gctcaatgtc tcgataagat	720
25	taagaattgg cggAACCTCA tcgctgtcgt cggtggacac gatctgtccg agcatgacgg	780
	ggacgaacag tcccggccggg tggctcaggt catcattccc tccacctatg tgccctggcac	840
30	gaccaatcac gatatcgctc tgctccgcct ccaccagccc gtcgtgctca ccgatcacgt	900
	cgtgcctctg tgccctgcctg agcggacctt tagcgaacgc acgctggctt tcgtccgcct	960
	tagcctcgtg tccggctggg gccagctgct cgaccggggc gctaccgctc tcgagctgat	1020
35	ggtgctcaac gtccccccggc tgcgtggcc ggcactgcctg cagcagtccc gcaaatggg	1080
	ggactcccccc aatatcacgg agtatatgtt ttgcgtggc tatacgatg gctccaagga	1140
	tagctgcaag ggggactccg gcggggccca tgccacgcac tatgcggga cctggcac	1200
40	caccgggatc gtcagctggg gccaggcgtg ccgcacggg gggcactttg gcgtctacac	1260
	gcgcgtcagc cagtacattg agtggctgca gaagctcatg cggagcgaac cccggccccc	1320
	ggtgctcctg cggggccctt tcccttgata aaagctt	1357

45 <210> 4

<211> 31

50 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

55 <223> Cebador

<400> 4

agctggctag ccactggca ggtaagtata a

31

60 <210> 5

<211> 31

<212> DNA

65 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

ES 2 327 044 T3

<400> 5		
	tggcggtac cttaagagct gtaattgaac t	31
5	<210> 6	
	<211> 38	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 6	
	cccattctag aaaagcgaa cgccagcaa ccccagg	38
20	<210> 7	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
30	<400> 7	
	ccaattcta atcttgtga agcagtgagc ggcg	34
	<210> 8	
35	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 8	
45	ctccgtata ttggggagat c	21
	<210> 9	
50	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador	
	<400> 9	
60	cgccgctcac tgcttcaaca agattaagaa ttgg	34
	<210> 10	
	<211> 22	
65	<212> DNA	
	<213> Artificial	

ES 2 327 044 T3

<220>		
<223> Cebador		
5 <400> 10		
	cgctctcgag ctgatggc tc	22
10 <210> 11		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial,		
15 <220>		
<223> Cebador		
	<400> 11	
20	caaacaacag atggctggca ac	22
	<210> 12	
25 <211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial		
30 <220>		
<223> Cebador		
	<400> 12	
35 cgccgctcac tgcttcaaga agattaagaa ttgg		34
	<210> 13	
40 <211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
45 <223> Cebador		
	<400> 13	
50 ccaattctta atcttcttga agcagtgagc ggcg		34
	<210> 14	
<211> 33		
55 <212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
60 <223> Cebador		
	<400> 14	
65 ctccacccat gtgcctctga cgaccaatca cga		33
	<210> 15	
<211> 33		

ES 2 327 044 T3

<212> DNA
<213> Artificial
<220>
5 <223> Cebador

<400> 15

10 tcgtgattgg tcgtcagagg cacataggtg gag 33

<210> 16
<211> 29
15 <212> DNA
<213> Artificial
<220>
20 <223> Cebador

<400> 16

25 ccaaggatgc cagggggact ccggcgcc 29

<210> 17
<211> 33
30 <212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador

35 <400> 17

40 gcccggcga gtccccctgg cagctatcct tgg 33

<210> 18
<211> 36
<212> DNA
45 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador

50 <400> 18

55 acatatgtgc ctggcgctgc cacgaccaat cacgat 36

<210> 19
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial
60 <220>
<223> Cebador

65 <400> 19

atcgtgattg gtcgtggcag cgccaggcac ataggt 36