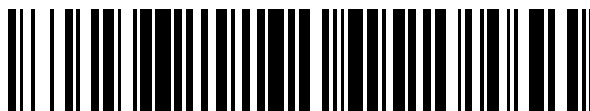


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 490 590**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2002** **E 02772089 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014** **EP 1451315**

54 Título: **Polipéptidos de factor VII de coagulación humana**

30 Prioridad:

02.11.2001 DK 200101627

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.09.2014

73 Titular/es:

NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
Thurgauerstrasse 36/38
8050 Zürich, CH

72 Inventor/es:

PERSSON, EGON y
OLSEN, OLE HVILSTED

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 490 590 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de factor VII de coagulación humana

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a polipéptidos de factor VII de coagulación humana nueva con actividad coagulante al igual que construcciones de polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, vectores y células huésped que comprenden y expresan el polinucleótido, composiciones farmacéuticas, usos y métodos de tratamiento.

10 Antecedentes de la invención

[0002] La coagulación sanguínea es un proceso que consiste en una interacción compleja de varios componentes sanguíneos (o factores) que finalmente dan lugar a un coágulo de fibrina. Generalmente, los componentes sanguíneos, que participan en lo que se ha referido como la coagulación en "cascada", son proteínas enzimáticamente inactivas (proenzimas o zimógenos) que se convierten en enzimas proteolíticas por la acción de un activador (que por sí mismo es un factor de coagulación activado). Los factores de coagulación que han sufrido tal conversión son generalmente referidos como "factores activos", y se designan por la adición de la letra "a" al nombre del factor de coagulación (por ejemplo factor VIIa).

[0003] La iniciación del proceso hemostático se media por la formación de un complejo entre factor tisular, expuesto como resultado de una lesión de la pared del vaso, y factor VIIa. Este complejo luego convierte los factores IX y X en sus formas activas. El factor Xa convierte cantidades limitadas de protrombina en trombina en la célula que produce el factor tisular. La trombina activa las plaquetas y los factores V y VIII en factores Va y VIIIa, ambos cofactores en otro proceso que lleva a la explosión de trombina completa. Este proceso incluye la generación del factor Xa por el factor IXa (en el complejo con factor VIIIa) y ocurre en la superficie de plaquetas activadas. La trombina convierte finalmente el fibrinógeno en fibrina dando como resultado la formación de un coágulo de fibrina. En los últimos años se ha encontrado que el factor VII y el factor tisular son los iniciadores principales de la coagulación sanguínea.

[0004] El factor VII es una glicoproteína plasmática de trazo que circula en la sangre como un zimógeno monocatenario. El zimógeno es catalíticamente inactivo. El factor VII monocatenario se puede convertir en factor VIIa bicatenario por factor Xa, factor XIIa, factor IXa, factor VIIa o trombina in vitro. Se cree que el factor Xa es el mayor activador fisiológico del factor VII. Como otras proteínas plasmáticas diferentes implicadas en la hemostasis, el factor VII depende de la vitamina K para su actividad, que se requiere para la gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico múltiples que son reagrupadas cerca del amino terminal de la proteína. Estos ácidos glutámicos gamma-carboxilados se requieren para la interacción inducida por iones de metal de factor VII con fosfolípidos. La conversión del factor VII zimógeno en la molécula bicatenaria activada ocurre por escisión de un enlace peptídico Arg₁₅₂-Ile₁₅₃ interno. En presencia de factor tisular, fosfolípidos e iones de calcio, el factor VIIa bicatenario activa rápidamente el factor X o factor IX por proteólisis limitada.

[0005] Es deseable frecuentemente estimular o mejorar la coagulación en cascada de un sujeto. El factor VIIa ha sido usado para controlar trastornos de sangrado que tienen diferentes causa tales como deficiencias de factor de coagulación (por ejemplo hemofilia A y B o deficiencia de factores XI o VII de coagulación) o inhibidores de factor de coagulación. El factor VIIa también se ha usado para controlar el sangrado excesivo que ocurre en sujetos con un funcionamiento normal de la coagulación en cascada de la sangre (sin deficiencias de factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación). Este sangrado puede, por ejemplo, ser provocado por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. El sangrado es también un problema importante en relación con la cirugía y otras formas de daño de tejido.

[0006] La patente europea nº 200,421 (ZymoGenetics) se refiere al factor VII humano de codificación de secuencia de nucleótidos y la expresión recombinante del factor VII en células de mamíferos.

[0007] Dickinson et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU (1996) 93,14379-14384) se refiere a una variante del Factor VII donde Leu305 se ha sustituido por Ala (FVII(Ala305)).

[0008] Iwanaga et al. (Thromb. Haemost. (supplement August 1999), 466, abstract 1474) se refiere a variantes del factor VIIa donde los residuos 316-320 son eliminados o los residuos 311-322 se sustituyen con los residuos correspondientes de tripsina.

[0009] El documento WO0158935 se refiere a conjugados que comprenden al menos una molécula no polipeptídica de manera covalente fijado a un FVII polipéptido.

[0010] El documento US 5580560 se refiere a moléculas de factor VII/VIIa modificadas que se estabilizan contra la escisión proteolítica, sobre todo mediante la modificación de la molécula en uno o varios sitios de escisión de tipo tripsina.

[0011] Hay una necesidad de variantes del factor VIIa con actividad coagulante, variantes con actividad alta que se pueden administrar en dosis relativamente bajas y variantes que no producen los efectos secundarios indeseables tales como activación sistémica del sistema de coagulación y sangrado, respectivamente, asociados a terapias convencionales.

Descripción de la invención

[0012] Se acaba de descubrir que las variantes polipeptídicas del factor de coagulación VIIa humano con mutaciones en el bucle que comprende residuos de aminoácidos 313-329 de SEC ID nº 1 (por ejemplo Ser314 y Lys316) y en posiciones fuera de este rango, pero espacialmente próximas a este bucle (por ejemplo Trp364; Gln366; His373 y Val376) han aumentado la actividad en comparación con el factor VIIa de tipo salvaje.

[0013] La presente invención se refiere a variantes polipeptídicas del factor VII de SEC ID nº: 1 que se pueden codificar por construcciones de polinucleótidos, donde S314 se sustituye con cualquier otro aminoácido natural de forma L, donde la proporción entre la actividad de la variante polipeptídica del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo de SEC ID nº 1 es al menos aprox. 2,0 cuando se ha evaluado en el Ensayo de hidrólisis in vitro. Dicho S314 se puede sustituir con un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gly y Glu.

[0014] Las variantes polipeptídicas del factor VII de SEC ID nº 1 pueden además comprender al menos una sustitución de aminoácido de uno o más aminoácido/s seleccionados del grupo consistente en aminoácidos 313-329 de SEC ID nº 1. En una forma de realización, K316 se puede sustituir con cualquier otro aminoácido natural de forma L, como un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gly, His, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp y Glu.

[0015] La variante polipeptídica del factor VII puede comprender además la sustitución de al menos un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio de proteasa con cualquier otro aminoácido natural de forma L. En una forma de realización, a lo sumo 20 aminoácidos adicionales en las posiciones restantes en el dominio de proteasa se pueden sustituir con otro aminoácido natural de forma L. En otra forma de realización, al menos un aminoácido que corresponde con un aminoácido en una posición seleccionada de 330-339 de SEC ID nº 1 se sustituye con cualquier otro aminoácido natural de forma L. En otra forma de realización, uno o varios aminoácidos seleccionados del grupo consistente en aminoácidos L305, K157, K337, D334, S336, V158, E296 y M298 de SEC ID nº 1 se sustituyen con cualquier otro aminoácido/s natural/es de forma de L.

[0016] El término "actividad" como se utiliza en este caso significa la capacidad de un polipéptido del factor VII para convertir el sustrato de factor X en el factor Xa activo. La actividad de un polipéptido del factor VII se puede medir con el "Ensayo de proteólisis in vitro" (véase ejemplo 5).

[0017] El término "actividad inherente" también incluye la capacidad para generar trombina en la superficie de plaquetas activadas en ausencia de factor tisular.

[0018] Debido a la actividad inherente más alta de las variantes polipeptídicas del factor VIIa descritas en comparación con FVIIa nativo, se puede adecuar una dosis inferior para obtener una concentración funcionalmente adecuada en el sitio de acción y así será posible administrar una dosis inferior al sujeto con episodios de sangrado o necesidad de mejora del sistema hemostático normal.

[0019] Se ha descubierto por los presentes inventores que al sustituir los aminoácidos en el bucle que comprenden residuos de aminoácidos 313-329 de SEC ID nº 1, por ejemplo Ser314 y en la posición fuera de este rango, pero espacialmente próxima a este bucle, por ejemplo Trp364, Gln366, His373 y Val376, el factor VIIa logra espontáneamente una conformación más activa que normalmente tiene que ser inducida por el factor tisular. Tales variantes polipeptídicas de factor VIIa muestran una actividad inherente que puede ser terapéuticamente útil en situaciones donde la actividad procoagulante es independiente de factor tisular (generación del factor Xa en la superficie de la plaqueta) como cuando se administran dosis altas de, por ejemplo, NovoSeven®.

[0020] En otra forma de realización, la sustitución adicional de aminoácidos en el dominio de proteasa facilitan la formación de la conformación activa de la molécula. En una forma de realización el polipéptido de factor VIIa comprende además la sustitución con cualquier otro aminoácido de uno o varios aminoácidos seleccionados del grupo consistente en aminoácidos Leu305, Lys157, Lys337, Asp334, Ser336, Val158, Glu296 y Met298.

[0021] La invención comprende además la sustitución de unos aminoácidos en el dominio Gla N-terminal (aminoácidos en la posición que corresponde con 1-37 de SEC ID nº 1) del factor VIIa que puede proporcionar a la proteína con una afinidad sustancialmente más alta para fosfolípidos de membrana, tales como fosfolípidos de membrana de células productoras de factor tisular o de plaquetas, generando así variantes polipeptídicas del factor VII que tienen un efecto procoagulante mejorado.

[0022] Así, las variantes polipeptídicas del factor VIIa mencionado anteriormente pueden, además de la sustitución ya realizada del aminoácido en la posición 313-329 de SEC ID nº 1 y las sustituciones de aminoácido opcional en otro lugar en el dominio de proteasa, también tienen al menos un aminoácido sustituido en el dominio Gla N-terminal, obteniendo así una proteína con una actividad aumentada al igual que una afinidad aumentada para fosfolípidos de membrana en comparación con el factor VIIa nativo. Preferiblemente los aminoácidos en posiciones 10 y 32 (en referencia a SEC ID nº 1) del factor VIIa se pueden sustituir con un aminoácido diferente. Ejemplos de aminoácidos preferidos para ser incorporado en las posiciones mencionadas anteriormente son: el aminoácido Pro en la posición 10 se sustituye por Gin, Arg, His, Gin, Asn o Lys; y/o el aminoácido Lys en la posición 32 se sustituye por Glu, Gin o Asn.

[0023] Otros aminoácidos en el dominio Gla, basados en las afinidades de fosfolípido diferentes y secuencias de las proteínas plasmáticas de vitamina K-dependiente, también se puede considerar para la sustitución.

[0024] El término "dominio GLA N-terminal" significa la secuencia de aminoácidos 1-37 de factor VII.

[0025] La indicación de tres letras "GLA" significa ácido 4-carboxiglutamico (γ -carboxiglutamato).

[0026] El término "dominio de proteasa" significa la secuencia de aminoácidos 153-406 del factor VII (la cadena pesada del factor VIIa).

[0027] El término "polipéptido del factor VII" como se utiliza en este caso significa cualquier proteína que comprende la secuencia de aminoácidos 1- 406 de factor VII humano nativo (SEC ID nº 1) o variantes de las mismas. Esto incluye pero de forma no limitativa el factor VII humano, factor VIIa humano y variantes de los mismos.

[0028] El término "factor VII" como se utiliza en este caso se entiende que comprende la molécula de factor VII zimógeno monocatenaria inactiva al igual que la molécula de factor VII bicatenaria activada (factor VIIa). Esto incluye proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos 1-406 de factor VII humano nativo o factor VIIa. También incluye proteínas con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal modificado incluyendo deleciones o adiciones de aminoácido N-terminal mientras aquellas proteínas sustancialmente retienen la actividad del factor VIIa. El término "factor VIIa" o "FVIIa" como se utiliza en este caso significa un producto que consiste en la forma activada (factor VIIa). "Factor VII" o "factor VIIa" en la definición anterior también incluye variantes alélicas naturales que pueden existir y ocurren de un individuo a otro. También, el grado y la ubicación de glicosilación u otras modificaciones de postraduccion pueden variar dependiendo de las células huésped elegidas y la naturaleza del entorno celular huésped.

[0029] Los términos "variante" o "variantes", como se utilizan en este caso, se entiende que designan al factor VII con la secuencia de SEC ID nº 1, donde uno o varios aminoácidos de la proteína progenitora han sido sustituidos por otro aminoácido y/o donde uno o varios aminoácidos de la proteína progenitora han sido eliminados y/o donde uno o varios aminoácidos han sido insertados en la proteína y/o donde uno o varios aminoácidos han sido añadidos a la proteína progenitora. Tal adición puede tener lugar bien en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la proteína progenitora o en ambos. "Variante" o "variantes" dentro de esta definición todavía tiene FVII actividad en su forma activada. En una forma de realización, una variante es 70 % idéntica a la secuencia de SEC ID nº 1. En una forma de realización, una variante es 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID nº 1. En otra forma de realización, una variante es 90 % idéntica a la secuencia de SEC ID nº 1. En otra forma de realización, una variante es 95 % idéntica a la secuencia de SEC ID nº 1.

[0030] En otro aspecto, la invención se refiere a una construcción polinucleótida que codifica un polipéptido del factor VII de la invención.

[0031] El término "construcción" se entiende que indica un segmento polinucleótido que se puede basar en una secuencia de nucleótidos natural completa o parcial que codifica el polipéptido de interés. La construcción puede opcionalmente contener otros segmentos polinucleótidos. De una manera similar, el término "aminoácidos que son codificados por construcciones polinucleótidas" cubre los aminoácidos que se pueden codificar por las construcciones polinucleótidas definidas anteriormente, es decir aminoácidos como Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

[0032] En otro aspecto, la invención proporciona un vector recombinante comprendiendo la construcción polinucleótida que codifica un polipéptido del factor VII de la invención.

[0033] El término "vector", como se utiliza en este caso, significa cualquier entidad de ácido nucleico capaz de la amplificación en una célula huésped. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el/los cromosoma/s en que ha sido integrado. La elección de vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que se va a introducir. Vectores incluye, pero de forma no limitativa, vectores plásmidos, vectores fágicos, virus o vectores cósmidos. Los vectores normalmente contienen un origen de replicación y al menos un gen seleccionable, es decir, un gen que codifica un producto que es fácilmente detectable o la presencia del cual es esencial para el crecimiento celular.

[0034] En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped recombinante que comprende la construcción polinucleótida o el vector. En una forma de realización, la célula huésped recombinante es una célula eucariota. En otra forma de realización, la célula huésped recombinante es de origen mamífero. En otra forma de realización, la célula huésped recombinante se selecciona del grupo consistente en células CHO, células HEK y células BHK.

[0035] El término "una célula huésped", como se utiliza en este caso, representa cualquier célula, incluyendo células híbridas, donde puede expresarse ADN heterólogo. Las células huésped típicas incluyen, pero de forma no limitativa, células de insecto, células de levadura, células de mamífero, incluyendo células humanas, tales como células BHK, CHO, HEK y COS. En la práctica de la presente invención, las células huésped que son cultivadas son preferiblemente células de mamífero, de forma más preferible una línea celular de mamífero establecida, incluyendo, sin limitación, líneas celulares CHO (por ejemplo, ATCC CCL 61), COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), riñón de cría de hámster (BHK) y HEK293 (por ejemplo, ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72,1977). Una línea celular preferida BHK es la línea celular BHK tk- ts13 (Waechter y Baserga, Proc. Natl.Acad.Sci. EEUU 79:1106-1110,1982), de ahora en adelante referida como células BHK 570. La línea celular BHK 570 está disponible de la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, bajo número de acceso ATCC CRL 10314. Una línea celular BHK tk- ts13 está también disponible de la ATCC bajo número de acceso CRL 1632. Otras líneas celulares adecuadas incluyen, sin limitación, Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) y células DUKX (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 77:4216-4220,1980). También son útiles las células 3T3, células Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células.

[0036] En otro aspecto, la invención proporciona un animal transgénico que contiene y expresa la construcción polinucleótida.

[0037] En otro aspecto, la invención proporciona una planta transgénica que contiene y han de expresión la construcción polinucleótida.

[0038] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir el polipéptido del factor VII de la invención, el método que comprende el cultivo de una célula que comprende la construcción polinucleótida en un medio de crecimiento apropiado bajo condiciones que permiten la expresión de la construcción polinucleótida y la recuperación del polipéptido resultante del medio de cultivo.

[0039] Como se utiliza en este caso el término "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido del factor VII de la invención.

[0040] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir el polipéptido del factor VII, el método comprende la recuperación del polipéptido de leche producido por el animal transgénico.

[0041] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir el polipéptido del factor VII, el método comprende el cultivo de una célula de una planta transgénica que comprende la construcción polinucleótida y la recuperación del polipéptido de la planta resultante.

[0042] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una variante polipeptídica del factor VII de SEC ID nº 1 que se puede codificar por construcciones polinucleótidas, donde S314 se sustituye con cualquier otro aminoácido natural de forma L, donde la proporción entre la actividad de dicha variante polipeptídica del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID nº 1 es al menos

aprox. 2,0, cuando se ha evaluado en el Ensayo de hidrólisis in vitro; y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

[0043] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una variante polipeptídica del factor VII de SEC ID n° 1 que se puede codificar por construcciones polinucleótidas, donde S314 se sustituye con cualquier otro aminoácido natural de forma L, donde la proporción entre la actividad de dicha variante polipeptídica del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID n° 1 es al menos aprox. 2,0 cuando se ha evaluado en el Ensayo de hidrólisis in vitro, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de sangrado o episodios de sangrado o para la mejora del sistema hemostático normal.

[0044] En una forma de realización, el uso es para el tratamiento de la hemofilia A o B.

[0045] En el presente contexto, el término "tratamiento" se entiende que incluye ambas prevención de un sangrado previsto, como en cirugía, y regulación de un sangrado que ya ha ocurrido, como en traumatismo, con el propósito de inhibir o minimizar el sangrado. La administración profiláctica del polipéptido de factor VIIa según la invención se incluye así en el término "tratamiento".

[0046] El término "episodios de sangrado" se entiende que incluye sangrado descontrolado y excesivo. Los episodios de sangrado pueden ser un problema importante ambos en relación con cirugía y otras formas de daño de tejido. El sangrado descontrolado y excesivo puede ocurrir en sujetos con un sistema de coagulación normal y sujetos con trastornos de coagulación o de sangrado. Como se utiliza en este caso el término "trastorno de sangrado" refleja cualquier defecto, congénito, adquirido o inducido, de origen molecular o celular que se manifiesta en sangrados. Ejemplos son deficiencias de factor de coagulación (por ejemplo hemofilia A y B o deficiencia de factores XI o VII de coagulación), inhibidores de factor de coagulación, función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand.

[0047] Los sangrados excesivos también ocurren en sujetos con una función normal de coagulación en cascada de la sangre (sin deficiencias de factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación) y se pueden causar por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. En tales casos, los sangrados se pueden comparar a los sangrados provocados por hemofilia debido a que el sistema hemostático, como en la hemofilia, carece de o tiene "componentes" de coagulación esencial anormales (tales como plaquetas o proteínas de factor de von Willebrand) que causa sangrados importantes. En sujetos que experimentan daño de tejido extenso en asociación con cirugía o gran traumatismo, el mecanismo hemostático normal se puede saturar por la demanda de hemostasis inmediata y estos pueden desarrollar sangrado a pesar de un mecanismo hemostático normal. Lograr la hemostasis satisfactoria también es un problema cuando los sangrados ocurren en órganos como el cerebro, región de oído interno y ojos con posibilidad limitada de hemostasis quirúrgica. El mismo problema puede surgir en el proceso de tomar biopsias de varios órganos (hígado, pulmón, tejido tumoral, tracto gastrointestinal) al igual que en la cirugía laparoscópica. Es común para todas estas situaciones la dificultad para proporcionar hemostasis por técnicas quirúrgicas, (sutura, clips, etc.) que también es el caso cuando el sangrado es difuso (gastritis hemorrágica y sangrado uterino profuso). Pueden también ocurrir sangrados profusos y agudos en sujetos en terapia anticoagulante a lo que se les ha inducido una hemostasis defectuosa por la terapia dada. Estos sujetos pueden precisar intervenciones quirúrgicas en el caso de que el efecto anticoagulante tenga que ser contrarrestado rápidamente. La prostatectomía retropública radical es un procedimiento comúnmente realizado para sujetos con cáncer de próstata localizado. La operación se complica frecuentemente por la pérdida de sangre significativa y a veces masiva. La pérdida de sangre considerable durante la prostatectomía está relacionada principalmente con la situación anatómica complicada, con varios sitios vascularizados densamente que no son fácilmente accesibles para la hemostasis quirúrgica, y que pueden resultar en el sangrado difuso de un área grande. Otra situación que puede causar problemas en el caso de hemostasis insatisfactoria es cuando los sujetos con un mecanismo hemostático normal reciben terapia anticoagulante para prevenir enfermedad tromboembólica. Esta terapia puede incluir heparina, otras formas de proteoglicanos, warfarina u otras formas de antagonistas de la vitamina K al igual que aspirina y otros inhibidores de agregación plaquetaria.

[0048] En una forma de realización de la invención, el sangrado está asociado a la hemofilia. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a la hemofilia con inhibidores adquiridos. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a la trombocitopenia. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a la enfermedad de von Willebrand. En otra forma de realización, el sangrado está asociado al daño de tejido severo. En otra forma de realización, el sangrado está asociado al traumatismo severo. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a la cirugía. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a la cirugía laparoscópica. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a la gastritis hemorrágica. En otra forma de realización, el sangrado es sangrado uterino profuso. En otra forma de realización, el sangrado se produce en órganos con una posibilidad limitada de hemostasis mecánica. En otra forma de realización, el sangrado se produce en el cerebro, la región de oído interno o los ojos. En otra forma de realización, el sangrado está asociado al proceso de tomar biopsias. En otra forma de realización,

ES 2 490 590 T3

el sangrado está asociado a la terapia anticoagulante.

- 5 [0049] El término "sujeto", como se utiliza en este caso, se entiende que significa cualquier animal, en particular mamíferos, como seres humanos, y puede usarse, cuando es apropiado, de forma intercambiable con el término "paciente".
- [0050] El término "mejora del sistema homeostático normal" significa una mejora de la capacidad para generar trombina.
- 10 [0051] En otro aspecto, la invención se refiere al polipéptido del factor VII de la invención para uso como un medicamento.
- [0052] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde Q313 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 15 [0053] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde R315 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- [0054] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde V317 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 20 [0055] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde G318 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- [0056] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde D319 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 25 [0057] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde S320 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- [0058] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde P321 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 30 [0059] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde N322 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 35 [0060] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde I323 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- [0061] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde T324 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 40 [0062] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde E325 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- [0063] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde Y326 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 45 [0064] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde M327 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 50 [0065] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde F328 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- [0066] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde C329 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 55 [0067] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde K316 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 60 [0068] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde W364 se sustituye por cualquier otro aminoácido.

ES 2 490 590 T3

- [0069] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde Q366 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 5 [0070] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde H373 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- [0071] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde V376 se sustituye por cualquier otro aminoácido.
- 10 [0072] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde L305 se sustituye posteriormente por cualquier otro aminoácido.
- [0073] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde K157 se sustituye posteriormente por cualquier otro aminoácido.
- 15 [0074] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde K337 se sustituye posteriormente por cualquier otro aminoácido.
- [0075] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde D334 se sustituye posteriormente por cualquier otro aminoácido.
- 20 [0076] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde S336 se sustituye posteriormente por cualquier otro aminoácido.
- 25 [0077] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde V158 se sustituye posteriormente por cualquier otro aminoácido.
- [0078] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde E296 se sustituye posteriormente por cualquier otro aminoácido.
- 30 [0079] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde M298 se sustituye posteriormente por cualquier otro aminoácido.
- [0080] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio de proteasa se ha sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 35 [0081] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde a lo sumo 20 aminoácidos adicionales en las posiciones restantes en el dominio de proteasa se han sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 40 [0082] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido que corresponde con un aminoácido en una posición seleccionada de 159-170 de SEC ID nº 1 se ha sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 45 [0083] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido que corresponde con un aminoácido en una posición seleccionada de 290-304 de SEC ID nº 1 se ha sustituido por cualquier otro aminoácido.
- [0084] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde R304 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Tyr, Phe, Leu y Met.
- 50 [0085] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido que corresponde con un aminoácido en una posición seleccionada de 306-312 de SEC ID nº 1 se ha sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 55 [0086] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde M306 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Asp y Asn.
- [0087] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde D309 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser y Thr.
- 60

ES 2 490 590 T3

- 5 [0088] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido que corresponde con un aminoácido en una posición seleccionada de 330-339 de SEC ID nº 1 se ha sustituido por cualquier otro aminoácido.
- [0089] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde A274 se ha sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 10 [0090] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el A274 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Met, Leu, Lys y Arg.
- [0091] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el S314 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gly y Glu.
- 15 [0092] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el K316 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gly, His, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp y Glu.
- [0093] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el S314 ha sido sustituido por Glu.
- 20 [0094] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el K316 ha sido sustituido por Gin.
- [0095] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el K157 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.
- 25 [0096] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el K337 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ala, Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gin, Asp, y Glu.
- [0097] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el D334 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gly y Glu.
- 30 [0098] En otra forma de realización de la invención, los polipéptidos de Factor VII es un polipéptido, donde el S336 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gly y Glu.
- 35 [0099] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el V158 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser, Thr, Asn, Gin, Asp y Glu.
- [0100] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el E296 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Arg, Lys y Val.
- 40 [0101] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el M298 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Lys, Arg, Gln y Asn.
- [0102] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el L305 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Val, Tyr e Ile.
- 45 [0103] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el L305 ha sido sustituido por Val.
- 50 [0104] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el aminoácido ha sido sustituido por un aminoácido diferente que se puede codificar por construcciones polinucleótidas.
- [0105] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el polipéptido del factor VII es factor VII humano.
- 55 [0106] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el polipéptido del factor VII es factor VIIa humano.
- 60 [0107] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID

ES 2 490 590 T3

nº 1 es al menos aprox. 1,25. En una forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID nº 1 es al menos aprox. 2,0. En otra forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID nº 1 es al menos aprox. 4,0.

[0108] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID nº 1 es al menos aprox. 1,25 cuando se evalúa en un ensayo de actividad de factor VIIa. En una forma de realización, la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID nº 1 es al menos aprox. 2,0 cuando se evalúa en un ensayo de actividad de factor VIIa. En otra forma de realización, la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID nº 1 es al menos aprox. 4,0 cuando se evalúa en un ensayo de actividad de factor VIIa. La actividad de factor VIIa se puede medir por los ensayos descritos en los ejemplos 4 o 5.

[0109] La proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID nº 1 es al menos aproximadamente 2,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de hidrólisis in vitro". En otra forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID nº 1 es al menos aproximadamente 4,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de hidrólisis in vitro".

[0110] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID nº 1 es al menos aproximadamente 1,25 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro". En una forma de realización, la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID nº 1 es al menos aproximadamente 2,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro". En otra forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID nº 1 es al menos aprox. 4,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro". En otra forma de realización, la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID nº 1 es al menos aproximadamente 8,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro".

[0111] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es FVII humano con al menos dos sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, donde las sustituciones son (i) S314X² y (ii) uno o varios aminoácidos seleccionados del grupo consistente en K157X¹, S316X¹, K337A, D334X², S336X³, V158X⁴, L305X⁵, E296V, y M298Q, donde X¹ es Gly, His, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp o Glu; X² es Gly o Glu; X³ es Gly o Glu; X⁴ es Thr o Asp; X⁵ es Val, Tyr o Ile.

[0112] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es FVII humano con al menos dos sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, donde las sustituciones son (i) S316X¹ y (ii) uno o varios aminoácidos seleccionados del grupo consistente en, K157X¹, S314X², K337A, D334X², S336X³, V158X⁴, L305X⁵, E296V, y M298Q, donde X¹ es Gly, His, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp o Glu; X² es Gly o Glu; X³ es Gly o Glu; X⁴ es Thr o Asp; X⁵ es Val, Tyr o Ile.

[0113] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/K316H-FVII.

[0114] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/K316Q-FVII.

[0115] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V-FVII.

[0116] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/K337A-FVII.

[0117] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/V158D-FVII.

[0118] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/E296V-FVII.

[0119] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/M298Q-FVII.

[0120] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/V158T-FVII.

[0121] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E-FVIIa.

ES 2 490 590 T3

[0122] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/K337A-FVII.

[0123] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158D-FVII.

5 [0124] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/E296V-FVII.

[0125] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/M298Q-FVII.

[0126] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158T-FVII.

10 [0127] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/K337A/V158T-FVII.

[0128] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII.

15 [0129] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/K337A/E296V-FVII.

[0130] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/K337A/V158D-FVII.

[0131] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII.

20 [0132] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158D/E296V-FVII.

[0133] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII.

25 [0134] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158T/E296V-FVII.

[0135] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII.

30 [0136] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII.

[0137] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII.

35 [0138] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII.

[0139] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII.

40 [0140] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII.

45 [0141] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII.

[0142] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII.

50 [0143] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII.

[0144] En otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos de factor de coagulación VIIa humano que han aumentado la actividad independiente del factor de tejido en comparación con factor de coagulación VIIa humano nativo. En otro aspecto, la actividad aumentada no se acompaña de cambios en la especificidad de sustrato. En otro aspecto de la invención, la unión de las variantes polipeptídicas para factor de tejido no debería ser perjudicada y las variantes polipeptídicas deberían tener al menos la actividad de factor VIIa de tipo salvaje cuando se unen al factor de tejido.

60 [0145] La terminología para sustituciones de aminoácidos usada en esta descripción es como sigue. La primera letra representa el aminoácido naturalmente presente en una posición de SEC ID nº 1. El siguiente número representa la posición en la SEC ID nº 1. La segunda letra representa la sustitución del aminoácido diferente para el aminoácido

ES 2 490 590 T3

natural. Un ejemplo es L305V/K337A-FVII, la leucina de la posición 305 de SEC ID nº 1 se sustituye por una valina y la lisina de la posición 337 de SEC ID nº 1 se sustituye por una alanina, ambas mutaciones en el misma variante polipeptídica del factor VII.

- 5 [0146] En el presente contexto, las indicaciones de tres letras o de una sola letra de los aminoácidos se han usado en su significado convencional como se indica en la tabla 1. A menos que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionados aquí son L-aminoácidos. Además, los extremos a la izquierda y a la derecha de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, los N- y C-terminales a menos que se especifique lo contrario.
- 10 Tabla 1: Abreviaturas para los aminoácidos:

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

Preparación de variantes polipeptídicas del factor VII

- 15 [0147] La invención también se refiere a un método de preparación de variantes polipeptídicas de factor VII humano como se ha mencionado anteriormente. Las variantes polipeptídicas del factor VII descritas aquí se pueden producir mediante técnicas de ácido nucleico recombinante. En general, una secuencia de ácidos nucleicos de factor VII de tipo salvaje clonado se modifica para codificar la proteína deseada. Esta secuencia modificada se inserta luego en un vector de expresión, que a su vez es transformado o transfectado en células huésped. Las células eucarióticas mayores, en particular células de mamífero cultivadas, son preferidas como células huésped. El nucleótido completo y las secuencias de aminoácidos para el factor VII humano son conocidos (véase el documento U.S. 4,784,950, donde se describen la clonación y expresión de factor VII humano recombinante). La secuencia de factor VII bovino se describe en Takeya et al., J. Biol. Chem. 263:14868-14872 (1988)).
- 20
- 25 [0148] Las alteraciones de secuencia de aminoácidos se pueden realizar por una variedad de técnicas. La modificación

de la secuencia de ácidos nucleicos puede ser por mutagénesis específica de sitio. Las técnicas para la mutagénesis específica de sitio se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Zoller y Smith (DNA 3:479-488, 1984) o en "Splicing by extension overlap" Horton et al., Gene 77, 1989, pp. 61-68. Así, el uso de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de factor VII, puede introducir la/s alteración/es de elección. Asimismo, los procedimientos para preparar una construcción de ADN usando la reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos se conocen por personas expertos en la técnica (cf. PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, EEUU).

[0149] Los polipéptidos de la presente invención también pueden comprender residuos de aminoácidos que ocurren de forma no natural. Los aminoácidos que ocurren de forma no natural incluyen, sin limitación, beta-alanina, desaminohistidina, trans-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, N-metilglicina, allostreonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido piperídico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, tert-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina, y 4-fluorofenilalanina. Diferentes métodos se conocen en la técnica para la incorporación de residuos de aminoácidos que ocurren de forma no natural en polipéptidos. Por ejemplo, un sistema in vitro se puede emplear donde las mutaciones sin sentido se suprimen supresores químicamente aminoacilados ARNt. Los métodos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt se conocen en la técnica. La transcripción y translación de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se realiza en un sistema libre de célula que incluyen un extracto de E. coli S30 y enzimas disponibles comercialmente y otros reactivos. Los polipéptidos se purifican por cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Ellman et al., Methods Enzymol. 202:301, 1991; Chung et al., Science 259:806-9, 1993; y Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 90:10145-9, 1993). En un segundo método, la translación se realiza en xenopus por microinyección de ARNm mutado y supresores químicamente aminoacilados ARNt (Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271:19991-8, 1996). En un tercer método, las células de E. coli se cultivan en ausencia de un aminoácido natural que debe ser sustituido (por ejemplo; fenilalanina) y en presencia de aminoácido/s que ocurre/n de forma no natural deseado/s (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina, o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido que ocurre de forma no natural se incorpora en el polipéptido en lugar de su duplicado natural. Véase Koide et al., Biochem. 33:7470-6, 1994. Los residuos de aminoácidos que ocurren de forma natural se pueden convertir en especies que ocurren de forma no natural por modificación química in vitro. La modificación química se puede combinar con mutagénesis dirigida de sitio para expandir más el rango de sustituciones (Wynn and Richards, Protein Sci. 2:395-403, 1993).

[0150] La construcción de ácidos nucleicos que codifican la variante polipeptídica del factor VII de la invención puede adecuadamente ser de origen genómico o de ADNc, por ejemplo obtenido preparando una genoteca genómica o de ADNc y seleccionando las secuencias de ADN que codifican todo o parte del polipéptido mediante hibridación usando sondas de oligonucleótidos de hibridación conforme a técnicas estándar (cf. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

[0151] La construcción de ácidos nucleicos que codifica la variante polipeptídica del factor VII también se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. Según el método de fosfoamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, por ejemplo en un sintetizador de ADN automático, purificado, hibridado, ligado y clonado en vectores adecuados. Las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas de factor VII humano también se puede preparar por reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en el documento US 4,683,202, Saiki et al., Science 239 (1988), 487 - 491, o Sambrook et al., supra.

[0152] Además, la construcción de ácidos nucleicos puede ser de origen mezclado sintético y genómico, mezclado sintético y ADNc o mezclado genómico y de ADNc preparada por fragmentos de ligamiento de origen sintético genómico o de ADNc (según corresponda), los fragmentos que corresponden a varias partes de la construcción de ácidos nucleicos entera, conforme a las técnicas estándar.

[0153] La construcción de ácidos nucleicos es preferiblemente una construcción de ADN. Las secuencias de ADN para usar en las variantes polipeptídicas del factor VII en la producción según la presente invención codifican típicamente un pre-pro polipéptido en el amino-terminal del factor VII para obtener un tratamiento postranslacional apropiado (por ejemplo gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico) y secreción de la célula huésped. El pre-pro polipéptido puede ser aquel de factor VII u otra proteína plasmática dependiente de vitamina K, tal como Factor IX, Factor X, protrombina, proteína C o proteína S. Como será apreciado por expertos en la técnica, las modificaciones adicionales pueden hacerse en la secuencia de aminoácidos de las variantes polipeptídicas del factor VII donde aquellas modificaciones significativamente no perjudican la capacidad de la proteína para hacer de coagulante. Por ejemplo, las variantes polipeptídicas del factor VII también pueden ser modificadas en el sitio de escisión de activación para inhibir la conversión del factor VII de zimógeno en su forma bicatenaria activada, como generalmente se describe en el documento U.S. 5,288,629, incorporado aquí como referencia.

[0154] Las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas de factor VII humano son normalmente insertadas en un vector recombinante que pueden ser cualquier vector, que puede convenientemente ser sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección de vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en que va a ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el/los cromosoma/s en el que ha sido integrado.

[0155] El vector es preferiblemente un vector de expresión donde la secuencia de ADN que codifica las variantes polipeptídicas de factor VII humano está operativamente unido a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN. En general, el vector de expresión se deriva de ADN plásmido o vírico, o puede contener elementos de ambos. El término, "unido operativamente" indica que los segmentos están dispuestos de modo que ellos funcionan de concierto para sus fines previstos, por ejemplo la transcripción inicia en un promotor y procede a través de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido.

[0156] Los vectores de expresión para usar en las variantes polipeptídicas de factor VIIa de expresión comprenderán un promotor capaz de digerir la transcripción de un gen clonado o ADNc. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se puede derivar de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula huésped.

[0157] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica la variante polipeptídica del factor VII humano en células de mamífero son el promotor SV40 (Subramani et al., Mol. Cell Biol. 1 (1981), 854 -864), el promotor MT-1 (gen de metalotioneína) (Palmiter et al., Science 222 (1983), 809 - 814), el promotor CMV (Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985) o el promotor tardío de mayor de adenovirus 2 (Kaufman and Sharp Mol. Cell. Biol, 2:1304-1319, 1982).

[0158] Un ejemplo de un promotor adecuado para usar en las células de insecto es el promotor de polihedrina (US 4,745,051; Vasuvedan et al., FEBS Lett. 311; (1992) 7 - 11), el promotor P10 (J.M. Vlak et al., J. Gen. Virology 69, 1988, pp. 765- 776), el promotor de proteína básica de virus de poliedrosis de Autographa californica (EP 397 485), el promotor 1 de gen temprano inmediato de baculovirus (US 5,155,037; US 5,162,222), o el promotor de gen temprano tardío de baculovirus 39K (US 5,155,037; US 5,162,222).

[0159] Ejemplos de promotores adecuados para usar en las células huésped de levadura incluyen promotores de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255 (1980), 12073 - 12080; Alber and Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419 - 434) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young et al., in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender et al, eds.), Plenum Press, New York, 1982), o los promotores TPI1 (US 4,599,311) o ADH2-4c (Russell et al., Nature 304 (1983), 652 - 654).

[0160] Ejemplos de promotores adecuados para usar en las células huésped de hongo filamentoso son, por ejemplo, el promotor ADH3 (McKnight et al., el EMBO J. 4 (1985), 2093 - 2099) o el promotor tpiA. Ejemplos de otros promotores útiles son aquellos derivados del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, proteínaasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, α -amilasa neutra de *A. niger*, α -amilasa ácido estable de *A. niger*, glucoamilasa de *A. niger* o *A. awamori* (gluA), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosafosfato isomerasa de *A. oryzae* o acetamidasa de *A. nidulans*. Preferido son los promotores TAKA amilasa y la gluA. Los promotores adecuados son mencionados, por ejemplo en EP 238 023 y EP 383 779.

[0161] Las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas de factor VII humano puede también, si es necesario, conectarse operativamente a un terminador adecuado, como el terminador de la hormona de crecimiento humana (Palmiter et al., Science 222, 1983, pp. 809-814) o el terminador TPI1 (Alber y Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1, 1982, pp. 419-434) o el terminador ADH3 (McKnight et al., The EMBO J. 4, 1985, pp. 2093-2099). Los vectores de expresión también puede contener un conjunto de sitios de unión de ARN localizados abajo del promotor y arriba del sitio de inserción para la secuencia de factor VII en sí misma. Los sitios de unión del ARN preferidos se pueden obtener de adenovirus y/o genes de inmunoglobulina. También está contenido en los vectores de expresión una señal de poliadenilación localizada abajo del sitio de inserción. Las señales de poliadenilación particularmente preferidas incluyen la señal de poliadenilación tardía o temprana de SV40 (Kaufman y Sharp, ibid.), la señal de poliadenilación de la región adenovirus 5 Elb, el terminador de gen de hormona de crecimiento humana (DeNoto et al. Nucl. Acids Res. 9:3719-3730, 1981) o la señal de poliadenilación del gen de factor VII humano o el gen de factor VII bovino. Los vectores de expresión también puede incluir una secuencia líder vírica no codificante, como la guía tripartita de adenovirus 2, localizado entre el promotor y los sitios de unión del ARN; y secuencias potenciadoras, como el potenciador SV40.

[0162] Para dirigir las variantes polipeptídicas del factor VII humano de la presente invención en la vía secretora de las células huésped, una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia guía, prepro secuencia o pre secuencia) se puede proporcionar en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas del factor VII humano en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras se sitúan comúnmente 5' a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser que esté normalmente asociada a la proteína o puede ser de un gen que codifica otra proteína segregada.

[0163] Para la secreción de células de levadura, la secuencia señal secretora puede codificar cualquier péptido señal, que asegura dirección eficaz de las variantes polipeptídicas de factor VII humano expresado en la vía secretora de la célula. El péptido señal puede ser péptido señal producido de forma natural, o una parte funcional del mismo, o éste puede ser un péptido sintético. Los péptidos señal adecuados se ha encontrado que son el péptido de señal α -factor (cf. US 4,870,008), el péptido señal de amilasa salival de ratón (cf. O. Hagenbuchle et al., Nature 289, 1981, pp. 643-646), un péptido señal de carboxipeptidasa modificada (cf. L.A. Valls et al., Cell 48, 1987, pp. 887-897), el péptido señal BAR1 de levadura (cf. WO 87/02670), o el péptido señal de la proteasa aspártica de levadura 3 (YAP3) (cf. M. Egel-Mitani et al., Yeast 6, 1990, pp. 127-137).

[0164] Para una secreción eficaz en levadura, una secuencia que codifica un péptido líder también se puede insertar abajo de la secuencia de señal y arriba de la secuencia de ADN que codifica las variantes polipeptídicas del factor VII humano. La función del péptido líder es la de permitir al péptido expresado ser dirigido del retículo endoplasmático al aparato de Golgi y además a una vesícula secretora para la secreción en el medio de cultivo (es decir, exportación de las variantes polipeptídicas de factor VII humano a través de la pared celular o al menos a través de la membrana celular en el espacio periplásmico de la célula de levadura) El péptido líder puede ser el alfa-factor líder de levadura (el uso del cual se describe, por ejemplo, en los documentos US 4,546,082, US 4,870,008, EP 16 201, EP 123 294, EP 123 544 y EP 163 529). Alternativamente, el péptido líder puede ser un péptido líder sintético, es decir, un péptido líder que no se encuentra en la naturaleza. Los péptidos líder sintéticos pueden, por ejemplo, construirse como se describe en el documento WO 89/02463 o WO 92/11378.

[0165] Para usar en hongos filamentosos, el péptido señal puede convenientemente derivar de un gen que codifica una amilasa o proteasa de *Aspergillus sp.*, un gen que codifica una lipasa o proteasa de *Rhizomucor miehei* o una lipasa *Humicola lanuginosa*. El péptido señal se deriva preferiblemente de un gen que codifica una TAKA amilasa de *A. oryzae*, α -amilasa neutra de *A. niger*, amilasa ácido estable de *A. niger*, o glucoamilasa de *A. niger*. Péptidos señal adecuados se describe, por ejemplo, en los documentos EP 238 023 y EP 215 594.

[0166] Para usar en las células de insecto, el péptido señal puede convenientemente derivar de un gen de insecto (cf. WO 90/05783), tal como el péptido señal precursor de hormona adipocinética del lepidóptero *Manduca sexta* (cf. US 5,023,328).

[0167] Los procedimientos usados para unir las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas del factor VII humano, el promotor y opcionalmente el terminador y/o secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados con la información necesaria para la replicación, son conocidos por los expertos en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

[0168] Los métodos de transfección de células de mamífero y secuencias de ADN de expresión introducidas en las células se describen, por ejemplo, en Kaufman and Sharp, J. Mol. Biol. 159 (1982), 601 - 621; Southern and Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 327 - 341; Loyter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 79 (1982), 422 - 426; Wigler et al., Cell 14 (1978), 725; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7 (1981), 603. Graham and van der Eb, Virology 52 (1973), 456 ; and Neumann et al., EMBO J. 1 (1982), 841 - 845.

[0169] Las secuencias de ADN clonadas se introducen en células de mamífero cultivadas, por ejemplo, por transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler et al., Cell 14:725-732, 1978 ; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603-616, 1981 ; Graham and Van der Eb, Virology 52d:456-467, 1973) o electroporación (Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982). Para identificar y seleccionar células que expresan el ADN exógeno, un gen que confiere un fenotipo seleccionable (un marcador seleccionable) se introduce generalmente en células junto con el gen o ADNc de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen genes que confieren resistencia a fármacos tales como neomicina, higromicina, y metotrexato. El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Un marcador seleccionable amplificable preferido es una secuencia de dehidrofolato reductasa (DHFR). Los marcadores seleccionables se evalúan por Tilli (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA, incorporado aquí como referencia). El experto en la técnica será fácilmente capaz de elegir marcadores seleccionables adecuados.

[0170] Los marcadores seleccionables se pueden introducir en la célula en un plásmido separado al mismo tiempo que

el gen de interés, o se pueden introducir en el mismo plásmido. Si, en el mismo plásmido, el marcador seleccionable y el gen de interés pueden estar bajo el control de diferentes promotores o el mismo promotor, esta última disposición produce un mensaje bicistrónico. Las construcciones de este tipo se conocen en la técnica (por ejemplo, Levinson y Simonsen, U.S. 4,713,339). También puede ser ventajoso añadir ADN adicional, conocido como "portador de ADN", a la mezcla que se introduce en las células.

[0171] Después de que las células hayan absorbido el ADN, crecen en un medio de crecimiento apropiado, típicamente de 1-2 días, para iniciar la expresión el gen de interés. Como se utiliza en este caso, el término "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión de las variantes polipeptídicas de factor VII humano de interés. Los medios generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, azúcares esenciales, vitaminas, sales, fosfolípidos, proteína y factores de crecimiento. Para la producción de proteínas gamma-carboxiladas, el medio contendrá vitamina K, preferiblemente en una concentración de aprox. 0,1 µg/ml a aprox. 5 µg/ml. La selección farmacológica se aplica luego para seleccionar el crecimiento de células que están expresando el marcador seleccionable en una forma estable. Para células que han sido transfectadas con un marcador seleccionable amplificable, la concentración farmacológica se pueden aumentar para seleccionar un número de copias aumentado de las secuencias clonadas, aumentando así los niveles de expresión. Los clones de células transfectadas estables se seleccionan luego para la expresión de la variante polipeptídica de factor VII humano de interés.

[0172] La célula huésped en la que las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas de factor VII humano es introducida puede ser cualquier célula, que sea capaz de producir las variantes polipeptídicas de factor VII humano modificado postranslacional e incluye levadura, hongos y células eucariotas superiores.

[0173] Ejemplos de líneas celulares de mamífero para usar en la presente invención son las líneas celulares COS-1 (ATCC CRL 1650), riñón de cría de hámster (BHK) y 293 (ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Una línea celular BHK preferida es la línea celular BHK tk-ts13 (Waechter and Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 79:1106-1110, 1982, incorporado aquí como referencia), de ahora en adelante referido como células BHK 570. La línea celular BHK 570 ha sido depositada con la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852, bajo número de acceso ATCC CRL 10314. Una línea celular BHK tk- ts13 está también disponible de la ATCC bajo número de acceso CRL 1632. Además, varias otras líneas celulares se pueden utilizar en la presente invención, incluyendo Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 61) y células DUKX (Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 77:4216-4220, 1980).

[0174] Ejemplos de células de levaduras adecuadas incluyen células de *Saccharomyces* spp. o *Schizosaccharomyces* spp., en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces kluyveri*. Los métodos para la transformación de células de levadura con ADN heterólogo y polipéptidos heterólogos se describen, por ejemplo, en los documentos US 4,599,311, US 4,931,373, US 4,870,008, 5,037,743 y US 4,845,075, todos incluidos aquí como referencia. Las células transformadas se seleccionan por un fenotipo determinado por un marcador seleccionable, comúnmente resistencia farmacológica o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente particular, por ejemplo leucina. Un vector preferido para usar en la levadura es el vector POT1 descrito en el documento US 4,931,373. Las secuencias de DNA que codifican las variantes polipeptídicas de factor VII humano se pueden preceder por una secuencia señal y opcionalmente una secuencia líder, por ejemplo como se ha descrito anteriormente. Otros ejemplos de células de levadura adecuada son las cepas de *Kluyveromyces*, como *K. lactis*, *Hansenula*, por ejemplo *H. polymorpha*, o *Pichia*, por ejemplo *P. pastoris* (cf. Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, pp. 3459-3465; US 4,882,279).

[0175] Ejemplos de otras células fúngicas son las células de hongos filamentosos, por ejemplo *Aspergillus*, spp., *Neurospora* spp., *Fusarium* spp. o *Trichoderma* spp., en particular cepas de *A. oryzae*, *A. nidulans* o *A. Noger*. El uso de *Aspergillus* spp. para la expresión de proteínas se describe en, por ejemplo, EP 272 277, EP 238 023, EP 184 438. La transformación de *F. oxysporum* puede, por ejemplo, efectuarse como se describe por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156. La transformación de *Trichoderma* spp. se puede realizar por ejemplo como se describe en el documento EP 244 234.

[0176] Cuando un hongo filamentosos se usa como la célula huésped, se puede transformar con la construcción de ADN de la invención, convenientemente integrando la construcción de ADN en el cromosoma huésped para obtener una célula huésped recombinante. Esta integración es generalmente considerada una ventaja, ya que la secuencia de ADN es más posible que se mantenga de forma estable en la célula. La integración de las construcciones de ADN en el cromosoma huésped se pueden realizar según métodos convencionales, por ejemplo, por recombinación homóloga o heteróloga.

[0177] La transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos heterólogos en estos se pueden realizar

como se describe en los documentos US 4,745,051; US 4,879,236; US 5,155,037, 5,162,222; EP 397,485) todos estos se incorporan aquí como referencia. La línea celular de insecto usada como huésped puede adecuadamente ser una línea celular de lepidópteros, tales como células de *Spodoptera frugiperda* o células de *Trichoplusia ni* (cf. US 5,077,214). Las condiciones de cultivo pueden adecuadamente ser como se describe, por ejemplo, en los documentos

[0178] La célula huésped transformada o trasfectada descrita anteriormente se cultiva luego en un medio nutritivo adecuado en condiciones que permiten la expresión de la variante polipeptídica de factor VII humano después de la cual todo o parte del péptido resultante se puede recuperar del cultivo. El medio usado para el cultivo de las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huésped, tales como medios mínimos o complejos que contienen suplementos apropiados. Los medios adecuados están disponibles en proveedores comerciales o se pueden preparar según las recetas publicadas (por ejemplo en catálogos de la American Type Culture Collection). La variante polipeptídica de factor VII humano producido por las células puede recuperarse luego del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo la separación de las células huésped del medio por centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteico acuosos del sobrenadante o filtrado mediante una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similares, dependiendo del tipo de polipéptido en cuestión.

[0179] La tecnología animal transgénica se puede emplear para producir las variantes polipeptídicas del factor VII de la invención. Se prefiere producir las proteínas en las glándulas mamarias de un mamífero femenino huésped. La expresión en la glándula mamaria y secreción posterior de la proteína de interés en la leche supera muchas dificultades encontradas en proteínas aisladas de otras fuentes. La leche se recoge fácilmente, está disponible en grandes cantidades, y está bioquímicamente bien caracterizada. Además, las proteínas de leche importantes están presentes en la leche en altas concentraciones (típicamente aprox. 1 a 15 g/l).

[0180] Desde un punto de vista comercial, se prefiere claramente usar como huésped una especie que tenga una gran producción de leche. Mientras que los animales más pequeños como ratones y ratas se pueden usar (y se prefieren para la comprobación de fase de principio), se prefiere usar mamíferos de ganado incluyendo, pero no limitado a, cerdos, cabras, ovejas y ganado vacuno. Las ovejas se prefieren particularmente debido a factores como la historia precedente de transgénesis en esta especie, la producción de leche, el coste y la disponibilidad de equipamiento preparado para recolectar leche de oveja (véase, por ejemplo, el documento WO 88/00239 para una comparación de factores que influyen en la elección de especies huésped). Es generalmente deseable seleccionar una raza de animal huésped que ha sido criada para uso lácteo, como la oveja de Frisia oriental, o para introducir materia prima láctea por cultivo de la línea transgénica a una fecha posterior. De cualquier manera, deberían usarse los animales con un buen estado de salud conocido.

[0181] Para obtener la expresión en la glándula mamaria, se usa un promotor de transcripción de un gen de proteína de leche. Los genes de proteína de leche incluyen aquellas caseínas que codifican genes (véase U.S. 5,304,489), beta-lactoglobulina, a-lactoalbúmina, y proteína ácida de suero de leche. Se prefiere el promotor de beta-lactoglobulina (BLG). En el caso del gen de beta-lactoglobulina ovina, una región de al menos el proximal 406 pb de la secuencia flanqueante 5' del gen se usará generalmente, aunque se prefieren partes más grandes de la secuencia flanqueante 5', hasta aprox. 5 kbp, como un segmento de ADN ~4,25 kbp que abarca el promotor flanqueante 5' y parte no codificante del gen de beta-lactoglobulina (véase Whitelaw et al., Biochem. J. 286: 31-39 (1992)). También son adecuados fragmentos similares de promotor de ADN de otras especies.

[0182] Otras regiones del gen de beta-lactoglobulina también se puede incorporar en construcciones, ya que pueden expresarse regiones genómicas del gen. Se acepta generalmente en la técnica que intrones carentes de construcciones, por ejemplo, que se expresan pobremente en comparación con aquellos que contienen tales secuencias de ADN (véase Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 85: 836-840 (1988); Palmiten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 88: 478-482 (1991); Whitelaw et al., Transgenic Res. 1: 3-13 (1991); WO 89/01343; y WO 91/02318, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia). A este respecto, se prefiere generalmente, cuando sea posible, usar secuencias genómicas que contengan todos o alguno de los intrones nativos de un gen que codifica la proteína o polipéptido de interés, así se prefiere la inclusión adicional de al menos algunos intrones de, por ejemplo, el gen de beta-lactoglobulina. Esta región es un segmento de ADN que proporciona la eliminación de intrones y la poliadenilación del ARN desde la región no codificante 3' del gen de la beta-lactoglobulina ovina. Cuando se sustituye por secuencias 3' no codificantes naturales de un gen, este segmento de beta-lactoglobulina ovina puede ambos mejorar y estabilizar los niveles de expresión de la proteína o polipéptido de interés. Dentro de otras formas de realización, la región circundante la iniciación ATG de la secuencia de factor VII variante se sustituye con secuencias correspondientes de un gen de proteína específica de leche. Esta sustitución proporciona un entorno de iniciación de tejido específica putativa para mejorar la expresión. Es conveniente reemplazar la variante del factor VII pre-pro entera y las secuencias 5' no

codificantes con aquellas de, por ejemplo, el gen BLG, aunque las regiones más pequeñas pueden ser sustituidas.

[0183] Para la expresión de variantes polipeptídicas del factor VII en animales transgénicos, un segmento de ADN que codifica la variante del factor VII se une operativamente a segmentos de ADN adicionales requeridos por su expresión para producir unidades de expresión. Tales segmentos adicionales incluyen el promotor mencionado anteriormente, al igual que secuencias que proveen a terminación de transcripción y poliadenilación de ARNm. Las unidades de expresión además incluirán un segmento de ADN que codifica una secuencia de señal secretora operativamente unida al segmento que codifica el factor VII modificado. La secuencia señal secretora puede ser una secuencia señal secretora del factor VII nativo o puede ser de otra proteína, como una proteína de leche (véase, por ejemplo, von Heijne, Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986); y Meade et al., U.S. 4,873,316, que se incorporan aquí como referencia).

[0184] La construcción de unidades de expresión para usar en animales transgénicos se realiza convenientemente por inserción de una secuencia de la variante del factor VII en un plásmido o fago vector que contiene los segmentos de ADN adicionales, aunque la unidad de expresión se puede construir esencialmente por cualquier secuencia de ligaduras. Es particularmente conveniente proporcionar un vector que contenga un segmento de ADN que codifica una proteína de la leche y reemplazar la secuencia codificante para la proteína de leche con esa variante del Factor VII; creando así una fusión de gen que incluye las secuencias de control de expresión del gen de proteína de leche. De cualquier manera, la clonación de las unidades de expresión en plásmidos u otros vectores facilita la amplificación de la secuencia de la variante del factor VII. La amplificación se realiza convenientemente en células huésped bacterianas (por ejemplo E. coli), así los vectores incluirán típicamente un origen de replicación y un marcador funcional seleccionable en células huésped bacterianas. La unidad de expresión se introduce luego en óvulos fertilizados (incluyendo embriones de fase temprana) de las especies de huésped elegidas. La introducción de ADN heterólogo se puede realizar por una de diferentes vías, incluyendo microinyección (por ejemplo la patente estadounidense U.S. n° 4,873,191), infección retroviral (Jaenisch, Science 240: 1468-1474 (1988)) o integración dirigida usando células madre embrionarias (ES) (evaluado por Bradley et al., Bio/Technology 10: 534-539 (1992)). Los óvulos se implantan luego en los oviductos o úteros de mujeres pseudoembarazadas y se les permite desarrollar hasta término. La descendencia que lleva el ADN introducido en su línea germinal puede pasar el ADN a su progenie en la forma mendeliana normal, permitiendo el desarrollo de manadas transgénicas. Los procedimientos generales para producir animales transgénicos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simons et al., Bio/Technology 6: 179-183 (1988); Wall et al., Biol. Reprod. 32: 645-651 (1985); Buhler et al., Bio/Technology 8: 140-143 (1990); Ebert et al., Bio/Technology 9: 835-838 (1991); Krimpenfort et al., Bio/Technology 9: 844-847 (1991); Wall et al., J. Cell. Biochem. 49: 113-120 (1992); U.S. 4,873,191; U.S. 4,873,316; WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; y GB 87/00458). Las técnicas para introducir secuencias de ADN externas en mamíferos y sus células germinales fueron originalmente desarrolladas en el ratón (véase, por ejemplo, Gordon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 77: 7380-7384 (1980); Gordon and Ruddle, Science 214: 1244-1246 (1981); Palmiter and Brinster, Cell 41: 343-345 (1985); Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 82: 4438-4442 (1985); y Hogan et al. (ibid.)). Estas técnicas se adaptaron posteriormente para usar con animales más grandes, incluyendo especies de ganado (véase, por ejemplo, WO 88/00239, WO 90/05188, y WO 92/11757; y Simons et al., Bio/Technology 6: 179-183 (1988)). Para resumir, en la vía más eficaz usada hasta la fecha en la generación de ratones o ganado transgénicos, varios cientos de moléculas lineales del ADN de interés se inyectan en uno del pronúcleos de un óvulo fertilizado según técnicas establecidas. También puede emplearse la inyección de ADN en el citoplasma de un cigoto.

[0185] También puede emplearse la producción en plantas transgénicas. La expresión se puede generalizar o dirigir a un órgano particular, como un tubérculo (véase, Hiatt, Hiatt, Nature 344:469-479 (1990); Edelbaum et al., J. Interferon Res. 12:449-453 (1992); Sijmons et al., Bio/Technology 8:217-221 (1990); y EP 0 255 378).

[0186] Las variantes polipeptídicas del factor VII de la invención se recuperan del medio de cultivo celular o de la leche. Las variantes polipeptídicas del factor VII de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico, cromatografía de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo (IEF), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico) o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989). Preferiblemente, se puede purificar por cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpos anti-Factor VII. El uso de anticuerpos calcio-dependientes monoclonales, como se describe por Wakabaishi et al., J. Biol. Chem. 261:11097-11108; (1986) y Thim et al., Biochemistry 27: 7785-7793, (1988), se prefiere particularmente. La purificación adicional se puede conseguir por medios de purificación química convencional, como cromatografía líquida de alto rendimiento. Otros métodos de purificación, incluyendo la precipitación de citrato de bario, se conocen en la técnica, y se pueden aplicar a la purificación de las variantes polipeptídicas del factor VII nuevas aquí descritas (véase, por ejemplo, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982).

[0187] Para uso terapéutico se prefiere que las variantes polipeptídicas del factor VII de la invención sean

sustancialmente puras. Así, en una forma de realización preferida de la invención, las variantes polipeptídicas del factor VII de la invención se purifica por lo menos aprox. de 90 a 95% de homogeneidad, preferiblemente por lo menos aprox. 98% de homogeneidad. La pureza se puede evaluar, por ejemplo, por electroforesis de gel y secuenciación de aminoácido aminoterminal.

[0188] La variante del Factor VII se divide en su sitio de activación para convertirse en su forma bicaenaria. La activación se puede realizar según procedimientos conocidos en la técnica, como aquellos descritos por Osterud, et al., Biochemistry 11:2853-2857 (1972); Thomas, patente estadounidense U.S. n° 4,456,591; Hedner and Kisiel, J. Clin. Invest. 71:1836-1841 (1983); o Kisiel and Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73:29-42 (1983). Alternativamente, como se describe por Bjoem et al. (Research Disclosure, 269 September 1986, pp. 564-565), el factor VII se puede activar pasando este a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, como Mono Q® (Pharmacia fine Chemicals) o similares. La variante del Factor VII activada resultante puede luego ser formulada y administrada como se describe más adelante.

Ensayos

[0189] La invención también proporciona ensayos adecuados para la selección de variantes del factor VIIa preferidas según la invención. Estos ensayos se pueden realizar como una simple prueba preliminar in vitro.

[0190] Así, el ejemplo 4 aquí divulga una prueba simple (titulada "Ensayo de proteólisis in vitro") para la actividad de variantes de factor VIIa de la invención. Basado en esto, las variantes de factor VIIa que son de interés particular son aquellas variantes donde la proporción entre la actividad de la variante y la actividad de factor VII nativo mostradas en la Fig. 1 se sitúa por encima de 1,0, por ejemplo al menos aprox. 1,25, preferiblemente al menos aprox. 2,0, tal como al menos aprox. 3,0 o, más preferido incluso, al menos aprox. 4,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro".

[0191] La actividad de las variantes también pueden medirse utilizando un sustrato fisiológico tal como el factor X ("Ensayo de proteólisis in vitro") (véase ejemplo 5), adecuadamente a una concentración de 100-1000 nM, donde el factor Xa generado se mide después de la adición de un sustrato cromogénico adecuado (por ejemplo, S-2765). Además, el ensayo de actividad puede llevarse a cabo a temperatura fisiológica.

[0192] La capacidad de las variantes de factor VIIa para generar trombina también pueden medirse en un ensayo que comprende todos los factores de coagulación pertinentes e inhibidores a concentraciones fisiológicas (menos el factor VIII cuando se imitan condiciones de hemofilia A) y plaquetas activadas (como se describe en p. 543 en Monroe et al. (1997) Brit. J. Haematol. 99,542-547 que se incorpora en la presente como referencia).

Administración y composiciones farmacéuticas

[0193] Las variantes polipeptídicas del factor VII según la presente invención se pueden utilizar para controlar trastornos de sangrado que tienen diferentes causas tales como deficiencias del factor de coagulación (por ejemplo hemofilia A y B o deficiencia de los factores de coagulación XI o VII) o inhibidores de factor de coagulación, o se pueden utilizar para controlar el sangrado excesivo que ocurre en sujetos con una coagulación en cascada de la sangre de funcionamiento normal (sin deficiencias de factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación). Los sangrados se pueden provocar por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. También se pueden ver en sujetos en los que una actividad aumentada fibrinolítica ha sido inducida por estímulos varios.

[0194] En sujetos que han experimentado daño tisular extenso en asociación con cirugía o traumatismo extenso, el mecanismo hemostático se puede saturar por la demanda de hemostasis inmediata y pueden desarrollar sangrados a pesar de un mecanismo hemostático normal. La realización satisfactoria de la hemostasis es también un problema cuando los sangrados ocurren en órganos tales como el cerebro, la región de oído interno y los ojos y también puede ser un problema en casos de sangrados difusos (gastritis hemorrágica y sangrado uterino profuso) cuando es difícil de identificar la fuente. El mismo problema puede surgir en el proceso de tomar biopsias de varios órganos (hígado, pulmón, tejido tumoral, tracto gastrointestinal) al igual que en la cirugía laparoscópica. Estas situaciones comparten la dificultad de provisión de hemostasis por técnicas quirúrgicas (sutura, clips, etc.). También pueden ocurrir sangrados profusos y agudos en sujetos en terapia anticoagulante en los que una hemostasis defectuosa ha sido inducida por la terapia dada. Tales intervenciones quirúrgicas pueden precisar sujetos en caso de que el efecto anticoagulante tenga que ser contrarrestado rápidamente. Otra situación que puede causar problemas en el caso de hemostasis insatisfactoria es cuando los sujetos con un mecanismo hemostático normal reciben terapia anticoagulante para prevenir la enfermedad tromboembólica. Tal terapia puede incluir heparina, otras formas de proteoglicanos, warfarina u otras formas de antagonistas de vitamina K al igual que aspirina y otros inhibidores de agregación plaquetaria.

[0195] Una activación sistémica de la coagulación en cascada puede llevar a la coagulación intravascular diseminada (DIC, por sus siglas en inglés). No obstante, tales complicaciones no se han visto en sujetos tratados con dosis altas de factor VIIa recombinante debido a un proceso hemostático localizado del tipo inducido por la formación del complejo entre factor VIIa y TF expuesto en el sitio de la herida de la pared de vaso. Las variantes polipeptídicas del factor VII según la invención pueden también usarse así en su forma activada para controlar tales sangrados excesivos asociados a un mecanismo hemostático normal.

[0196] Para el tratamiento en relación con intervenciones deliberadas, las variantes polipeptídicas del factor VII de la invención se administran típicamente aprox. dentro de las 24 horas antes de que se realice la intervención, y hasta 7 días o más después. La administración como un coagulante puede ser por una variedad de vías como se describe en este caso.

[0197] La dosis de las variantes polipeptídicas del factor VII varía de aprox. 0,05 mg a 500 mg/día, preferiblemente de aprox. 1 mg a 200 mg/día, y de forma más preferible de aprox. 10 mg a aprox. 175 mg/día para un sujeto de 70 kg como dosis de carga y de mantenimiento, dependiendo del peso del sujeto y de la gravedad de la enfermedad.

[0198] Las composiciones farmacéuticas está principalmente destinadas a la administración parenteral para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran parenteralmente, es decir, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscularmente, o se pueden administrar por infusión pulsátil o continua. Las composiciones para administración parenteral comprenden la variante del Factor VII de la invención en combinación con, preferiblemente disuelto en, un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Una variedad de soportes acuosos pueden utilizarse, tales como agua, agua tamponada, solución salina 0,4 %, glicina 0,3 % y similares. Las variantes polipeptídicas del factor VII de la invención también pueden ser formuladas en las preparaciones de liposoma para la administración u objetivo en los sitios de herida. Las preparaciones de liposoma se describen generalmente, por ejemplo, en U.S. 4,837,028, U.S. 4,501,728, y U.S. 4,975,282. Las composiciones se pueden esterilizar por técnicas de esterilización convencionales conocidas. Las soluciones acuosas resultantes se pueden empaquetar para uso o filtrado bajo condiciones asépticas y liofilizadas, la preparación liofilizada se combina con una solución estéril acuosa antes de la administración. Las composiciones puede contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, como pH ajustado y agentes amortiguadores, agentes ajustadores de tonicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc.

[0199] La concentración de la variante del Factor VII en estas formulaciones puede variar mucho, es decir, de menos de aprox. 0,5 % en peso, normalmente a o al menos a aprox. 1 % en peso a un máximo de 15 o 20 % en peso y será seleccionado principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., conforme al modo particular de administración seleccionado.

[0200] Así, una composición farmacéutica típica para infusión intravenosa se puede hacer para contener 250 ml de solución de Ringer estéril y 10 mg de la variante del Factor VII. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables parenteralmente serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990).

[0201] Las composiciones con las variantes polipeptídicas del factor VII de la presente invención se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En usos terapéuticos, las composiciones se administran a un sujeto que ya sufre de una enfermedad, como se ha descrito anteriormente, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o parcialmente detener la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como "cantidad terapéuticamente eficaz". Como será entendido por el experto en la técnica, las cantidades eficaces para este propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o herida al igual que el peso y estado general del sujeto. En general, no obstante, la cantidad eficaz variará de aprox. 0,05 mg hasta aprox. 500 mg de la variante del Factor VII al día para un sujeto de 70 kg, con dosificaciones de aprox. 1,0 mg a aprox. 200 mg de la variante del Factor VII al día siendo más comúnmente usado.

[0202] Los polipéptidos FVIIa de la presente invención pueden generalmente ser empleados en enfermedad grave o estados de herida, es decir, situaciones que ponen en riesgo la vida o que la ponen en riesgo potencialmente. En tales casos, vista la minimización de sustancias extrañas y la carencia general de inmunogenicidad de las variantes polipeptídicas de factor VII humano en seres humanos, puede ser deseable por el médico tratante administrar un exceso sustancial de estas composiciones de la variante del factor VII.

[0203] En aplicaciones profilácticas, las composiciones con la variante del Factor VII de la invención se administran a un sujeto susceptible de o de otra manera en riesgo de un estado de enfermedad o herida para mejorar la capacidad coagulante propia del sujeto. Tal cantidad se define como una "dosis profilácticamente efectiva". En aplicaciones

profilácticas, las cantidades precisas otra vez dependen del estado de salud y peso del sujeto, pero la dosis generalmente varía de aprox. 0,05 mg a aprox. 500 mg al día para un sujeto de 70 kilogramos, más comúnmente de aprox. 1,0 mg a aprox. 200 mg al día para un sujeto de 70 kilogramos.

5 [0204] Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones puede llevarse a cabo con niveles de dosis y modelos que se seleccionan por el médico tratante. Para sujetos ambulatorios que requieren niveles de mantenimiento diarios, las variantes polipeptídicas del factor VII se pueden administrar por uso de infusión continua, por ejemplo, un sistema de bomba portátil.

10 [0205] La administración local de la variante del factor VII de la presente invención, como, por ejemplo, aplicación tópica, puede realizarse, por ejemplo, mediante una pulverización, perfusión, catéteres de doble balón, stent, incorporado en injertos vasculares o stents, hidrogeles usados para revestir catéteres de balón u otros métodos bien establecidos. De cualquier manera, las composiciones farmacéuticas deberían proporcionar una cantidad de variante del factor VII suficiente para tratar eficazmente al sujeto.

15 [0206] La presente invención se ilustra posteriormente por los siguientes ejemplos que, no obstante, no deben ser interpretados como limitación del alcance de la protección. Las características descritas en la descripción precedente y en los siguientes ejemplos puede, tanto por separado como en cualquier combinación de los mismos, ser material para la realización de la invención en formas diversas de esta.

20 Breve descripción de los dibujos

[0207] La Figura 1 muestra la secuencia completa de aminoácidos del factor VII de coagulación humano nativo (tipo salvaje) (SEC ID nº 1).

25 Ejemplos

[0208] La terminología para sustituciones de aminoácidos usada en los siguientes ejemplos son de la siguiente manera. La primera letra representa el aminoácido naturalmente presente en una posición de SEC ID nº 1. El siguiente número representa la posición en la SEC ID nº 1. La segunda letra representa la sustitución del aminoácido diferente para el aminoácido natural. Un ejemplo es S314E/K316H-FVII, la serina en la posición 314 de SEC ID nº 1 se sustituye por un ácido glutámico y la lisina en la posición 316 de SEC ID nº 1 se sustituye por una histidina, ambas mutaciones en el misma variante del factor VII.

35 Ejemplo 1

[0209] ADN que codifica S314E-FVII, S314E/K316H-FVII y S314E/K316Q-FVII.

40 [0210] Construcciones de ADN que codifican S314E/K316H-FVII y S314E/K316Q-FVII se prepararon por mutagénesis dirigida usando un vector bicatenario superenrollado una inserción de interés y dos cebadores sintéticos con la mutación deseada. Se usaron los siguientes cebadores:

SEC ID nº 2 (cebador de ADN para preparación de S314E/K316H-FVII):
5'-CTG CCT GCA GCA GGA ACG GCA CGT GGG AGA CTC CCC-3'

45 SEC ID nº 3 (cebador de ADN para preparación de S314E/K316H FVII):-
5'-GGG GAG TCT CCC ACG TGC CGT TCC TGC TGC AGG CAG-3'

SEC ID nº 4 (cebador de ADN para preparación de S314E/K316Q-FVII):
50 5'-CCT GCA GCA GGA ACG GCA GGT GGG AGA CTC CCC-3'

SEC ID nº 5 (cebador de ADN para preparación de S314E/K316Q-FVII):
5'-GGG GAG TCT CCC ACC TGC CGT TCC TGC TGC AGG-3'

55 SEC ID nº 6 (cebador de ADN para preparación de S314E-FVII):
5'-GCC TGC AGC AGG AAC GGA AGG TGG GAG ACT CC-3'

SEC ID nº 7 (cebador de ADN para preparación de S314E-FVII):
60 5'-GGA GTC TCC CAC CTT CCG TTC CTG CTG CAG GC-3'

[0211] Los cebadores oligonucleótidos, cada complementario a cadenas opuestas del vector, fueron extendidos durante variación cíclica de la temperatura mediante Pfu ADN polimerasa. En la incorporación de los cebadores, un plásmido mutado con cortes en bisel fue generado. Después del ciclo de temperatura, el producto fue tratado con DpnI que es específico para ADN hemimetilado y metilado para asimilar el molde de ADN parental y para seleccionar el ADN sintetizado con la mutación.

[0212] Los procedimientos para preparar una construcción de ADN usando reacción en cadena de polimerasa usando unos cebadores específicos se conoce por los expertos en la técnica (cf. PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, EEUU).

Ejemplo 2

[0213] Preparación de S314E/K316H-FVII.

[0214] Células BHK fueron trasfectadas esencialmente tal y como se describe anteriormente (Thim et al. (1988) Biochemistry 27, 7785- 7793 ; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante S314E/K316H-FVII. La variante del Factor VII fue purificada de la siguiente manera:

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

[0215] La elución de la proteína fue realizada paso por paso de 10 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 0,1 % de Triton X-100, pH 8,0 a 10 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 25 mM de CaCl₂, 0,1 % Triton X-100, pH 8,0. Las fracciones que contienen S314E/K316H-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna de 25 ml que contiene anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a sefaroza 4B CNBr-activada (Pharmacia Biotech).

[0216] La columna fue equilibrada con 50 mM de Hepes, pH 7,5, que contiene 10 mM de CaCl₂, 100 mM de NaCl y 0,02 % Triton X-100. Después de lavado con tampón de equilibrio y tampón de equilibrio conteniendo 2 M de NaCl, el material ligado fue eluido con tampón de equilibrio conteniendo 10 mM de EDTA en vez de CaCl₂. Antes del uso o almacenamiento, fue añadido exceso de CaCl₂ sobre EDTA o S314E/K316H-FVII fue transferido a un tampón con Ca²⁺. El rendimiento de cada paso fue seguido por mediciones ELISA del factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 3

[0217] Preparación de S314E/K316Q-FVII.

[0218] Células BHK fueron transfectadas esencialmente tal y como se describe anteriormente (Thim et al. (1988) Biochemistry 27, 7785- 7793 ; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante S314E/K316Q-FVII. La variante del Factor VII fue purificada de la siguiente manera:

El medio acondicionado fue cargado sobre una columna de 25 ml de Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) después de la adición de 5 mM de EDTA, 0, 1 % de Triton X-100 y 10 mM de Tris, ajuste del pH a 8,0 y ajuste de la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada paso por paso de 10 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 0,1 % de Triton X-100, pH 8,0 a 10 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 25 mM de CaCl₂, 0,1 % Triton X-100, pH 8,0. Las fracciones que contienen S314E/K316Q-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna de 25 ml que contiene anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a sefaroza 4B CNBr-activada (Pharmacia Biotech).

[0219] La columna fue equilibrada con 50 mM de Hepes, pH 7,5, que contiene 10 mM de CaCl₂, 100 mM de NaCl y 0,02 % de Triton X-100. Después del lavado con tampón de equilibrio y tampón de equilibrio conteniendo 2 M de NaCl, el material ligado fue eluido con tampón de equilibrio conteniendo 10 mM de EDTA en vez de CaCl₂. Antes del uso o almacenamiento, fue añadido exceso de CaCl₂ sobre EDTA o S314E/K316Q-FVII fue transferido a un tampón con Ca²⁺. El rendimiento de cada paso fue seguido por mediciones de ELISA de factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

[0220] El resto del polipéptido del factor VII según la presente invención se puede preparar con cebadores específicos conocidos por el experto en la técnica, por el mismo método que se describe en los ejemplos precedentes.

Ejemplo 4

ES 2 490 590 T3

Ensayo de hidrólisis *in vitro*

[0221] Factor VIIa nativo (tipo salvaje) y variante de factor VIIa (ambos de aquí en adelante referidos como "Factor VIIa") se evalúan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se realiza en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida (S-2288, Chromogenix, Suecia), concentración final 1 mM, se añade al factor VIIa (concentración final 100 nM) en 50 mM de Hepes, pH 7.4, que contiene 0,1 M de NaCl, 5 mM de CaCl₂ y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La absorbancia a 405 nm se mide continuamente en un Lector de placa de SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EEUU). La absorbancia desarrollada durante una incubación de 20 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo vacío que no contiene enzima, se utiliza para calcular la proporción entre las actividades de variante y factor VIIa de tipo salvaje:

$$\text{Proporción} = A_{405 \text{ nm}} \text{ variante del factor VIIa} / (A_{405 \text{ nm}} \text{ factor VIIa tipo salvaje})$$

Ejemplo 5

Ensayo de proteólisis *in vitro*

[0222] Factor VIIa nativo (tipo salvaje) y variante de factor VIIa (ambos de aquí en adelante referidos como "Factor VIIa") se evalúan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se realiza en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). Factor VIIa (10 nM) y Factor X (0,8 microM) en 100 microL 50 mM de Hepes, pH 7,4, que contiene 0,1 M de NaCl, 5 mM de CaCl₂ y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, se incuban durante 15 min. Escisión del factor X se detiene luego por la adición de 50 microL 50 mM de Hepes, pH 7,4, que contiene 0,1 M de NaCl, 20 mM de EDTA y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La cantidad de Factor Xa generada se mide por adición del sustrato cromogénico Z-D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Suecia), concentración final 0,5 mM. La absorbancia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placa SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EEUU). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo vacío que no contiene FVIIa, se utiliza para calcular la proporción entre las actividades proteolíticas de variante y factor VIIa de tipo salvaje:

$$\text{Proporción} = A_{405 \text{ nm}} \text{ variante del factor VIIa} / (A_{405 \text{ nm}} \text{ factor VIIa tipo salvaje})$$

Ejemplo 6

[0223] Actividades relativas de variantes de FVIIa medidas en los ensayos descritos en ejemplos 4 y 5.

Variante	Proporción en el ejemplo 4	Proporción en el ejemplo 5
S314E-FVIIa	2,6	1,5
S314E/K316Q-FVIIa	2,8	1,2
S314E/K316H-FVIIa	2,9	0,8
Wt-FVIIa	1,0	1,0

Listado de secuencias

[0224]

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Polipéptidos del factor VII de coagulación humana

<130> 6410-WO

<160> 7

<170> Versión de patentIn 3.1

ES 2 490 590 T3

<210> 1
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (1)..(406)
 <223> Xaa significa ácido 4-carboxiglutámico (gamma-carboxiglutamato)

<400> 1

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Xaa	Xaa	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Xaa	Arg	Xaa	1	5	10	15
Cys	Lys	Xaa	Xaa	Gln	Cys	Ser	Phe	Xaa	Xaa	Ala	Arg	Xaa	Ile	Phe	Lys	20	25	30	
Asp	Ala	Xaa	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	35	40	45	
Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	50	55	60	
Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	65	70	75	80
Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	85	90	95	
Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	100	105	110	
Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	115	120	125	
Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	130	135	140	

ES 2 490 590 T3

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

ES 2 490 590 T3

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

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

5 <210> 2
<211> 36
<212> ADN
<213> Desconocido

10 <220>
<223> Cebador de ADN para preparación de S314E/K316H-FVII
<400> 2
ctgcctgcag caggaacggc acgtgggaga ctcccc 36

15 <210> 3
<211> 36
<212> ADN
<213> Desconocido

20 <220>
<223> Cebador de ADN para preparación de S314E/K316H FVII
<400> 3
ggggagtctc ccacgtgccg ttctgtctgc aggcag 36

25 <210> 4
<211> 33
<212> ADN
<213> Desconocido

30 <220>
<223> Cebador de ADN para preparación de S314E/K316Q-FVII
<400> 4
cctgcagcag gaacggcagg tgggagactc ccc 33

35 <210> 5
<211> 33
<212> ADN
<213> Desconocido

40 <220>
<223> Cebador de ADN para preparación de S314E/K316Q-FVII
<400> 5
ggggagtctc ccacgtgccg ttctgtctgc agg 33

45 <210> 6
<211> 32
<212> ADN
<213> Desconocido

50 <220>
<223> Cebador de ADN para preparación de S314E-FVII

55 <400> 6

ES 2 490 590 T3

gcctgcagca ggaacggaag gtgggagact cc 32

<210> 7

<211> 32

5 <212> ADN

<213> Desconocido

<220>

10 <223> Cebador de ADN para preparación de S314E-FVII

<400> 7

ggagtctccc accttccgtt cctgctgcag gc 32

15

REIVINDICACIONES

1. Variante polipeptídica del factor VII de SEC ID nº 1 que se puede codificar por construcciones de polinucleótidos, donde S314 se sustituye con cualquier otro aminoácido natural de forma L, donde la proporción entre la actividad de dicha variante polipeptídica del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativo mostrada en la SEC ID nº 1 es al menos aprox. 2,0, cuando se evalúa en el Ensayo de hidrólisis *in vitro*.
5
2. Variante polipeptídica del factor VII según la reivindicación 1, donde dicho S314 se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gly y Glu.
10
3. Variante polipeptídica del factor VII según la reivindicación 2, donde S314 se sustituye con Glu.
4. Variante polipeptídica del factor VII según la reivindicación 3, que es S314E-FVIIa.
5. Variante polipeptídica del factor VII según la reivindicación 1, que comprende además al menos una sustitución de aminoácido de uno o varios aminoácido/s seleccionado/s del grupo consistente en los aminoácidos 313-329 de SEC ID nº 1.
15
6. Variante polipeptídica del factor VII según la reivindicación 5, donde K316 se sustituye con cualquier otro aminoácido natural de forma L.
20
7. Variante polipeptídica del factor VII según la reivindicación 6, donde K316 se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gly, His, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp y Glu.
8. Variante polipeptídica del factor VII según la reivindicación 7, donde dicho K316 se sustituye con Gln.
25
9. Variante polipeptídica del factor VII según la reivindicación 8, que es S314E/K316Q-FVII.
10. Variante polipeptídica del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde al menos un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio de proteasa se sustituye con cualquier otro aminoácido natural de forma L.
30
11. Variante polipeptídica del factor VII según la reivindicación 10, donde a lo sumo 20 aminoácidos adicionales en las posiciones restantes en el dominio de proteasa se sustituyen con otros aminoácidos naturales de forma L.
12. Variante polipeptídica del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, donde al menos un aminoácido que corresponde con un aminoácido en una posición seleccionada de 330-339 de SEC ID nº 1 se sustituye con cualquier otro aminoácido natural de forma L.
35
13. Variante polipeptídica del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, donde uno o varios aminoácidos seleccionados del grupo consistente en los aminoácidos L305; K157; K337; D334; S336; V158; E296 y M298 de SEC ID nº 1 se sustituyen con cualquier otro aminoácido natural de forma L.
40
14. Variante polipeptídica del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde la proporción entre la actividad de dicha variante polipeptídica del factor VII y la actividad del polipéptido de factor VIIa nativos mostrados en la SEC ID nº 1 es al menos aprox. 4,0, cuando se evalúa en el Ensayo de hidrólisis *in vitro*.
45
15. Construcción polinucleótida que codifica una variante polipeptídica del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
16. Construcción polinucleótida según la reivindicación 15, que es un vector.
50
17. Célula huésped que comprende la construcción polinucleótida según cualquiera de las reivindicaciones 15-16.
18. Célula huésped según la reivindicación 17, que es una célula eucariota.
55
19. Célula huésped según la reivindicación 18, que es de origen mamífero.
20. Célula huésped según la reivindicación 19, donde la célula se selecciona del grupo consistente en células CHO, células HEK y células BHK.
60
21. Método para producir la variante polipeptídica del factor VII definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-14, el

ES 2 490 590 T3

método comprendiendo el cultivo de una célula tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 17-20 en un medio de crecimiento apropiado bajo condiciones que permiten la expresión de la construcción polinucleótida y la recuperación del polipéptido resultante del medio de cultivo.

- 5 22. Composición farmacéutica que comprende una variante polipeptídica del factor VII tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-14, y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.
- 23. Uso de una variante polipeptídica del factor VII tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de sangrado o episodios de sangrado o para la mejora del sistema hemostático normal.
- 10 24. Uso según la reivindicación 23 para el tratamiento de la hemofilia A o B.
- 25. Variante polipeptídica del factor VII tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para uso como un medicamento.
- 15

FIGURA 1. La secuencia de aminoácidos del factor VII de coagulación humano nativo.

Ala-Asn-Ala-Phe-Leu-GLA-GLA-Leu-Arg-Pro-Gly-Ser-Leu-GLA-Arg-GLA-Cys-Lys-
5 10 15

GLA-GLA-Gln-Cys-Ser-Phe-GLA-GLA-Ala-Arg-GLA-Ile-Phe-Lys-Asp-Ala-GLA-Arg-
20 25 30 35

Thr-Lys-Leu-Phe-Trp-Ile-Ser-Tyr-Ser-Asp-Gly-Asp-Gln-Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-
40 45 50

Cys-Gln-Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Lys-Asp-Gln-Leu-Gln-Ser-Tyr-Ile-Cys-Phe-Cys-
55 60 65 70

Leu-Pro-Ala-Phe-Glu-Gly-Arg-Asn-Cys-Glu-Thr-His-Lys-Asp-Asp-Gln-Leu-Ile-
75 80 85 90

Cys-Val-Asn-Glu-Asn-Gly-Gly-Cys-Glu-Gln-Tyr-Cys-Ser-Asp-His-Thr-Gly-Thr-
95 100 105

Lys-Arg-Ser-Cys-Arg-Cys-His-Glu-Gly-Tyr-Ser-Leu-Leu-Ala-Asp-Gly-Val-Ser-
110 115 120 125

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

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

Glu-Cys-Pro-Trp-Gln-Val-Leu-Leu-Leu-Val-Asn-Gly-Ala-Gln-Leu-Cys-Gly-Gly-
165 170 175 180

Thr-Leu-Ile-Asn-Thr-Ile-Trp-Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Asp-Lys-Ile-
185 190 195

Fig. 1

Lys-Asn-Trp-Arg-Asn-Leu-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-His-Asp-Leu-Ser-Glu-His-			
200	205	210	215
Asp-Gly-Asp-Glu-Gln-Ser-Arg-Arg-Val-Ala-Gln-Val-Ile-Ile-Pro-Ser-Thr-Tyr-			
220	225	230	
Val-Pro-Gly-Thr-Thr-Asn-His-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Arg-Leu-His-Gln-Pro-Val-			
235	240	245	250
Val-Leu-Thr-Asp-His-Val-Val-Pro-Leu-Cys-Leu-Pro-Glu-Arg-Thr-Phe-Ser-Glu-			
255	260	265	270
Arg-Thr-Leu-Ala-Phe-Val-Arg-Phe-Ser-Leu-Val-Ser-Gly-Trp-Gly-Gln-Leu-Leu-			
275	280	285	
Asp-Arg-Gly-Ala-Thr-Ala-Leu-Glu-Leu-Met-Val-Leu-Asn-Val-Pro-Arg-Leu-Met-			
290	295	300	305 306
Thr-Gln-Asp-Cys-Leu-Gln-Gln-Ser-Arg-Lys-Val-Gly-Asp-Ser-Pro-Asn-Ile-Thr-			
310	315	320	
Glu-Tyr-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Ser-Asp-Gly-Ser-Lys-Asp-Ser-Cys-Lys-Gly-			
325	330	335	340
Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-His-Ala-Thr-His-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Tyr-Leu-Thr-Gly-			
345	350	355	360
Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Gln-Gly-Cys-Ala-Thr-Val-Gly-His-Phe-Gly-Val-Tyr-Thr-			
365	370	375	
Arg-Val-Ser-Gln-Tyr-Ile-Glu-Trp-Leu-Gln-Lys-Leu-Met-Arg-Ser-Glu-Pro-Arg-			
380	385	390	395
Pro-Gly-Val-Leu-Leu-Arg-Ala-Pro-Phe-Pro			
400	405 406		

Fig. 1 (continuación)