



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 316 372**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/36 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00943706 .2**
(96) Fecha de presentación : **14.07.2000**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1200116**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2002**

(54) Título: **Uso de FVIIa o un agonista del factor tisular para regular la expresión genética y la migración celular o quimiotaxis.**

(30) Prioridad: **14.07.1999 DK 1999 01023**
12.08.1999 DK 1999 01117

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

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

(72) Inventor/es: **Ezban, Mirella;**
Petersen, Lars, Christian y
Siegbahn, Agneta

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

ES 2 316 372 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

Uso de FVIIa o un agonista del factor tisular para regular la expresión genética y la migración celular o quimiotaxis.

5 **Campo de la invención**

Se ha descrito una nueva célula que regula la actividad del factor de coagulación VII (FVII). La presente invención se refiere a la regulación de la migración de la célula o quimiotaxis poniendo en contacto la célula con FVIIa u otro agonista de TF, y a la determinación de la migración de dicha célula. La invención también se refiere al uso de FVIIa u otro agonista de TF, para la preparación de un medicamento para la regulación de la migración de la célula en un paciente. Además la presente invención se refiere a un método de detección de la actividad de compuestos, en particular de candidatos farmacológicos que interactúan con la migración de la célula.

15 **Antecedentes de la invención**

El sistema extrínseco de coagulación sanguínea es iniciado cuando el FVIIa que circula en el plasma se enlaza a la proteína integral de la membrana, el factor tisular (TF). El papel de TF en la coagulación sanguínea ha sido extensamente estudiado. La implicación de FVIIa como una enzima proteolítica en la cascada de coagulación sanguínea se considera que está limitada al foliolo extracelular de las células de expresión de TF. Una actividad intracelular de FVIIa estuvo primero implicada cuando la secuencia de TF mostraba homología a la superfamilia del receptor de citoquina/interferón o hematopoyético. La subclase I de la familia del receptor hematopoyético incluye receptores para la hormona de crecimiento, prolactina, interleuquinas 1 a 7, factores estimuladores de las colonias de macrófagos-granulocitos, eritropoietina y trombopoietina. La subclase II incluye TF y receptores para interferón a y b.

La similitud de TF a esta clase de receptores fue adicionalmente sustancializada con la aparición de la estructura cristalina. Es característico de esta clase de receptores de citoquina que incluye receptores para interferón b y g y IL-10 que su activación condujera a una rápida fosforilación de tirosina de los receptores mismos, al igual que un subconjunto de proteínas intracelulares. Unos minutos después de la fosforilación de tirosina inicial se activa un conjunto de quinasas (Ser/Thr) activadas por mitógenos (MAPK). Estas quinasas están dispuestas en diferentes rutas de señalización paralelas. Estudios profundos de la capacidad de señalización intracelular putativa de FVIIa han mostrado que inducen la movilización de calcio libre intracelular (Ca^{2+}) en la línea celular de carcinoma de vejiga humana, J82, que constitutivamente expresa TF y en células endoteliales de la vena umbilical que fueron tratadas previamente con interleuquina-1 para expresar TF, pero que no lograron mostrar ninguna activación tipo citoquina de las tirosina quinasas intracelulares. En conclusión FVIIa está considerado, dependiendo del TF, como inductor de la movilización de Ca^{2+} intracelular a través de activación de fosfolipasa C. El mecanismo por el que FVIIa activa la fosfolipasa C no es conocido, pero la activación de tirosina quinasa ha sido excluida específicamente.

Informes recientes de varios laboratorios indican que TF puede influir en un conjunto de funciones biológicas importantes aparte de la coagulación, tales como la angiogénesis, la vascularización del embrión y la metástasis tumoral. Actualmente, no obstante, no está claro cómo contribuye el TF en estos procesos biológicos. El dominio extracelular de TF consiste en dos módulos tipo fibronectina tipo III, como en el dominio extracelular del receptor de citoquina típico de clase II, elevando la posibilidad de que TF puede jugar un papel en la transducción de señales, función primaria del receptor de citoquina. No obstante, TF tiene un dominio citoplásmico muy corto (sólo 21 residuos de aminoácidos en longitud) y carece de motivos proximales de la membrana que median la unión de las quinasas Janus (Jaks) no receptoras que son esenciales para la señalización del receptor de citoquina. Sin embargo, diferentes conclusiones bioquímicas sugieren una función de transducción de señales para TF. El análisis de la secuencia de proteína de TF humano reveló un sitio de fosforilación putativo en el dominio citoplásmico, que es conservado en TF de ratón, rata y conejo. Residuos específicos de serina en la cola citoplásmica de TF son fosforilados en células después de la estimulación con el activador de la proteína quinasa C. La cola citoplásmica de TF humano es fosforilada *in vitro* en sitios múltiples cuando es incubada con lisados de células U87-MG. Un papel potencial para el dominio citoplásmico de TF en la transducción de señales está también indicado en estudios que mostraron función prometastática de TF es crucialmente dependiente del dominio citoplásmico de TF. Además, el dominio citoplásmico de TF está mostrado para interactuar con la proteína 280 de enlace de actina (ABP-280) y soporta la adhesión y migración de la célula a través del reclutamiento de ABP-280 para contactos de adhesión mediados por TF.

No obstante, TF también ha sido mostrado para participar en ciertos tipos de señalización de células para servir como un cofactor para su ligando fisiológico FVIIa en una señalización extracelular por un mecanismo proteolítico. Por ejemplo, la unión de FVIIa a la superficie celular de TF está mostrada para inducir oscilaciones de Ca^{2+} intracelulares en un número de células de expresión de TF, fosforilación transitoria de tirosina en monocitos, activación de MAP quinasa, alteración en la expresión génica en fibroblastos y expresión mejorada de receptor de uroquinasa en células tumorales. FVIIa catalíticamente inactivo (FVIIai) no logra inducir muchas de las respuestas de señalización anteriores, de oscilaciones de Ca^{2+} para la activación de MAP quinasa y reducción genética, y resulta que la actividad catalítica de FVIIa puede ser requerida para al menos alguna transducción de señales mediada por TF-FVIIa. Actualmente, se sabe poco sobre la(s) ruta(s) de señalización que son inducidas por FVIIa proteolíticamente activo y cómo las señales generadas por FVIIa podrían contribuir a la angiogénesis y metástasis tumoral.

Para estudiar el programa temporal de transcripción subyacente a la respuesta inducida por FVIIa, en el estudio presente, hemos examinado la respuesta de fibroblastos humanos para FVIIa usando un biochip de ADNc. Los datos

revelaron que la expresión celular de diferentes genes fue detectablemente alterada en fibroblastos tras la exposición a FVIIa. Un tal gen es *Cyr61*, un gen temprano intermediario inducible por el factor de crecimiento, cuyo producto está mostrado para promover la adhesión celular, aumentar la síntesis de ADN inducida por el factor de crecimiento y estimular la migración de la célula en fibroblastos y células endoteliales.

Resumen de la invención

El objetivo de la invención está definido en las reivindicaciones. La presente invención se refiere al uso de FVII y/o FVIIa y/u otro agonista de TF para la preparación del medicamento para el tratamiento terapéutico de condiciones patológicas que pueden estar relacionadas con la migración de la célula o tratadas por la regulación específica de la migración de la célula o quimiotaxis.

En otro aspecto la invención se refiere al uso de FVII y/o FVII y/u otro agonista de TF para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico de condiciones patológicas que puede estar relacionado con la regulación de la expresión de al menos un gen en una célula p. ej. el gen *Cyr61*.

En otro aspecto la invención se refiere al método para inducir o aumentar la migración de la célula, comprendiendo la fase de contactar dicha célula con un agonista del factor tisular.

En una forma de realización, el agonista del factor tisular es FVII o FVIIa.

En otro aspecto la invención se refiere a un método de reducción o inhibición de la migración de la célula, que comprende la fase de contactar la célula con un antagonista del factor tisular.

En una forma de realización el antagonista del factor tisular es FVII modificado.

En una forma de realización la célula es una célula humana que expresa el factor tisular, incluyendo fibroblastos, células del músculo liso, células tumorales, células hematopoyéticas y células epiteliales.

En una forma de realización el factor VII modificado es seleccionado de factor VII modificado con Dansil-Phe-Pro-Arg clorometil cetona, Dansil-Glu-Gly-Arg clorometil cetona; Dansil-Phe-Phe-Arg clorometil cetona, Phe-Phe-Arg clorometilcetona, dansil-D-Phe-Pro-Arg clorometil cetona, dansil-D-Glu-Gly-Arg clorometil cetona, Dansil-D-Phe-Phe-Arg clorometil cetona y D-Phe-Phe-Arg clorometiletona.

En otro aspecto la invención se refiere a la preparación de un medicamento para inducir o aumentar la cicatrización de una herida en un paciente, para la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica comprendiendo Factor VIIa o factor VII u otro agonista del factor tisular o una combinación de los mismos.

La invención se refiere a la regulación de la expresión de al menos un gen en una célula, que comprende la fase de contactar dicha célula con un agonista de factor tisular o bien de contactar dicha célula con un antagonista del factor tisular.

En una forma de realización, el gen es un gen de la familia del gen CCN.

En otra forma de realización el gen es seleccionado del grupo que consiste en *Cyr61*, CTFG, receptor D2 de la dopamina, EST *Incyte* PD 395116 o receptor del nucleótido P2U.

En una forma de realización el gen es el gen *Cyr61*.

En una forma de realización la regulación está induciendo o aumentando la expresión.

En una forma de realización FVII o FVIIa u otro agonista de factor tisular induce o aumenta la expresión génica, p. ej. cuando el gen es un gen de la familia del gen CCN, o el gen es seleccionado del grupo que consiste en *Cyr61*, CTFG, receptor D2 de la dopamina, EST *Incyte* PD 395116 o receptor del nucleótido P2U.

En otra forma de realización FVII o FVIIa u otro agonista del factor tisular reduce o inhibe la expresión génica, p. ej., cuando el gen es *EST PD674714*.

Los estados enfermizos, que pueden ser tratados, son condiciones patológicas tales como, por ejemplo, aterosclerosis o angiogénesis. Otros estados que pueden ser tratados son, por ejemplo, la curación de lesiones incluyendo la regeneración de paredes vasculares y tratamiento de quemaduras, o inflamación, o la regulación de la migración de la célula *in vitro* tal como, por ejemplo, crecimiento tisular.

Lista de figuras (fra 6011)

Fig. 1A y 1B: análisis citométrico del flujo de la expresión de TF en fibroblastos (1A). Las células fueron teñidas bien con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con fluoresceinisotiocianato (FITC) monoclonal de murina (área

no completada) que fue usado como control negativo o bien con un anticuerpo anti factor tisular (TF) conjugado con FITC monoclonal (área completada). La Fig.1 B muestra la actividad procoagulante de fibroblastos. Los fibroblastos con expresión de TF generó un aumento de 10 veces en PCA en comparación con monocitos sin expresión de TF.

Fig. 2A: efectos de FVIIa y FFR-FVIIa en quimiotaxis inducida por PDGF-BB en fibroblastos humanos. ■ muestra la respuesta quimiotáctica de fibroblastos para concentraciones diferentes de PDGF-BB. Fibroblastos incubados con 100 nM FVIIa (●) o 100 nM FFR-FVIIa (○) emigraron hacia concentraciones diferentes de PDGF-BB. Los resultados son medias y SEM de tres experimentos separados. Los valores de P inferiores a 0,05,* fueron considerados estadísticamente significantes (test de Student).

Fig. 3 A-D: influencia de diferentes concentraciones de FVIIa o FFR-FVIIa en quimiotaxis inducida por PDGF-BB en fibroblastos. ■ muestra la migración de fibroblastos para concentraciones diferentes de PDGF-BB. Las células fueron incubadas con 12,5 (A), 25 (B), 50(C) y 100 (D) nM de FVIIa (●) o FFR-FVIIa (○) y evaluadas en la cámara de Boyden hacia concentraciones diferentes de PDGF-BB. Los resultados son medias y SEM de tres experimentos diferentes. *= $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$ test de Student.

Fig. 4A: una mezcla de tres anticuerpos monoclonales para TF bloquea los efectos de FVIIa y FFR-FVIIa en la quimiotaxis inducida por PDGF- BB en los fibroblastos. ■ muestra la migración hacia PDGF-BB de fibroblastos sin anticuerpos de TF, ● fibroblastos preincubados con anticuerpos de TF y 100 nM de FVIIa, y ○ fibroblastos preincubados con anticuerpos de TF y 100 nM de FFR-FVIIa. Los resultados son medias y SEM de tres experimentos separados.

Fig. 5A y 5B: influencia de FXa en la respuesta quimiotáctica para PDGF-BB inducida por FVIIa. Los fibroblastos fueron preincubados con 200 nM de TAP (fig. 5 A) (■) o con 0,2-2 μ M de TAP (fig. 5B) (■) y luego con 100 nM de FVIIa (●). TAP estuvo presente durante los experimentos enteros. La quimiotaxis fue inducida por concentraciones diferentes de PDGF-BB (5A) o por 0,1 ng/ml de PDGF-BB (5B). Los resultados son medias y SD de dos experimentos separados.

Fig. 6A: influencia de trombina en la respuesta quimiotáctica para PDGF-BB inducida por FVIIa. Los fibroblastos fueron preincubados con 5 U/ml (concentración final) de Hirudina y luego con 100 nM de FVIIa. La hirudina estuvo presente durante los experimentos enteros. La quimiotaxis fue inducida por concentraciones diferentes de PDGF-BB. ■ muestra las células incubadas con Hirudina solo y ● células con Hirudina y FVIIa. Los resultados son medias y SD de dos experimentos separados.

Fig. 7A: efecto de la inhibición de la PI3'-quinasa en quimiotaxis en fibroblastos incubados con FVIIa. Las células fueron preincubadas con concentraciones variables de LY294002 durante 30 min a 37°C, y luego con 100 nM de FVIIa (●) o sin FVIIa (■). El inhibidor estuvo presente en todo el ensayo de quimiotaxis. La quimiotaxis fue inducida por 0,1 ng/ml de PDGF-BB. Los resultados son medias y SD de dos experimentos separados.

Fig. 8A y 8B: efecto de la inhibición de la PLC en quimiotaxis en fibroblastos incubados con FVIIa. Las células fueron incubadas con concentraciones variables de U73122 (inhibidor de PLC activo) (8A) o U73343 (control inactivo) (8B) durante 30 min a 37°C antes de la incubación con o sin 100 nM de FVIIa, y luego evaluadas en la cámara de Boyden a un gradiente de concentración de 0,1 ng/ml de PDGF-BB. Los agentes estaban presentes durante los experimentos enteros. ■ muestra células con U73122 o U73343 solo, ● células con U73122 o U73343 y FVIIa. Los resultados son medias y SD de dos experimentos separados.

Fig. 9: liberación de inositol trifosfato (IP_3) de fibroblastos estimulados con FVIIa, FFR-FVIIa solo o en combinación con PDGF-BB. Las células fueron marcadas durante la noche con mio [3H] inositol, incubadas con o sin 100 nM FVIIa o FFR-FVIIa en ausencia o presencia de 10 ng/ml o 100 ng/ml de PDGF-BB. Las células fueron luego analizadas para la emisión en IP_3 . Barras abiertas muestran células sin FVIIa o FFR-FVIIa (control), barras rayadas muestran células con FFR-FVIIa, y barras negras muestran células incubadas con FVIIa.

Fig. 10: fosforilación de tirosina de PLC- γ 1 en respuesta a PDGF-BB solo (control), FVIIa o FFR-FVIIa en combinación con PDGF-BB. Las células fueron incubadas con 100 nM de FVIIa o FFR-FVIIa durante una hora, y luego con o sin PDGF-BB a las concentraciones indicadas. Las células fueron lisadas y la fosforilación de tirosina de PLC- γ 1 fue detectada como se describe en métodos.

Fig. 1. *Análisis de transferencia de Northern que confirma los datos obtenidos con el ensayo de biochip de ADNc.* Diez g de ARN total (de las mismas muestras de ARN que fueron usadas para aislar poli (A) ARN para generar sondas para la hibridación del biochip de ADNc) fueron sintetizados para el análisis de transferencia de Northern y evaluados con *Cyr61* marcado con ^{32}P (una longitud parcial de ADNc, obtenida de Genomisc Systems). Panel B. Las señales de hibridación son cuantificadas con FosforImager (Molecular Dynamics).

Fig. 2 y 2B. *Expresión inducida por factor VIIa dependiente del tiempo de *Cyr61*.* Monocapas quiescentes de células WI-38 fueron tratadas con factor VIIa (5 g/ml) (2A) o PDGF-BB (10 ng/ml) (2B) para variar los períodos de tiempo. ARN total (10 g) fue sintetizado para análisis de transferencia de Northern y evaluado con *Cyr61* radio marcado. La coloración de bromuro de etidio de ARN ribosómico 28S de la transferencia correspondiente está mostrada en el panel inferior como control de carga de ARN.

Fig. 3. *Expresión inducida por factor VIIa dependiente de la dosis de Cry61*. Monocapas quiescentes de células WI-38 fueron tratadas con dosis variables de factor VIIa, 0, 0,1, 0,5, 2,0 y 5,0 g/ml durante 45 min. ARN total (10 g) fue sintetizado para análisis de transferencia de Northern y evaluado con *Cry61* radiomarcado. La coloración de bromuro de etidio de ARN ribosómico 28S de la transferencia correspondiente está mostrada en el panel inferior como control de carga de ARN.

Fig. 4. *Actividad catalítica de factor VIIa es requerida para la expresión inducida de Cry61*. Monocapas quiescentes de células WI-38 fueron tratadas con un medio de control sin suero o medio sin suero conteniendo factor VIIa (5 g/ml) o factor VIIa con sitio activo inactivado (VIIai, 5 g/ml) durante 45 min. ARN total (10 g) fue sintetizado para análisis de transferencia de Northern y evaluado con *Cry61* radiomarcado. La coloración de bromuro de etidio de ARN ribosómico 28S de la transferencia correspondiente está mostrada en el panel inferior como control de carga de ARN.

Fig. 5. *Expresión inducida por factor VIIa de Cry61 no es anulada por inhibidores específicos de Factor Xa y trombina*. Monocapas quiescentes de células WI-38 fueron tratadas con medio de control o el medio conteniendo factor VIIa (5 g/ml; 100 nM durante 45 min. Las células fueron preincubadas con 200 nM de fila 3 de TAP recombinante) o hirudina (fila 4) durante 30 min antes de la exposición al factor VIIa durante 45 min. El ARN total (10 g) fue sintetizado para análisis de transferencia de Northern y evaluado con *Cry61* radiomarcado. La coloración de bromuro de etidio de ARN ribosómico 28S de la transferencia correspondiente está mostrado en el panel inferior como control de carga de ARN.

Fig. 6. *Efecto de actinomicina-D y cicloheximida en niveles de estado estacionario de ARNm de Cry61 inducido por el factor VIIa*. Monocapas quiescentes de células WI-38 fueron preincubadas con un vehículo de control, dactinomicina (10 g/ml) o cicloheximida (10 g/ml) durante 30 min antes de que las células fueran expuestas al factor VIIa (5 g/ml) durante 45 min. El ARN total (10 g) fue sintetizado para análisis de transferencia de Northern y evaluado con *Cry61* radiomarcado. La coloración de bromuro de etidio de ARN ribosómico 28S de la transferencia correspondiente está mostrada en el panel inferior como control con carga de ARN.

Fig. 7. *El factor VIIa induce la expresión de CTGF*. Monocapas quiescentes de células WI-38 fueron tratadas con factor VIIa (5 g/ml) para variar los períodos de tiempo. El ARN total (10 g) fue sintetizado para análisis de transferencia de Northern y evaluado con CTGF radiomarcado. La coloración de bromuro de etidio de ARN ribosómico 28S de la transferencia correspondiente está mostrada como control con carga de ARN.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de FVII o FVIIa u otro agonista de TF para la producción de una composición farmacéutica para inducir o aumentar la migración de la célula.

En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de FVII, FVIIa u otro agonista de TF para la producción de una composición farmacéutica para inducir o aumentar la cicatrización de una herida o angiogénesis.

En una forma de realización la migración de la célula se hace en un sujeto.

En otro aspecto la presente invención concierne un método para inducir o aumentar la migración de la célula en un paciente, que comprende la administración de una cantidad eficaz de FVII o FVIIa u otro agonista de TF a dicho paciente.

En una forma de realización particular la cantidad eficaz es una dosificación diaria de aproximadamente 5 μ /kg/día a aproximadamente 500 μ /kg/día.

La presente invención proporciona un mecanismo para una actividad de FVII y/o FVIIa que se refiere a la estimulación de la migración de la célula. Tal mecanismo proporciona la base para establecer la participación de FVII y/o FVIIa en condiciones patológicas donde participan células de expresión de TF como células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, células del músculo liso y monocitos/macrófagos. La invención además proporciona la base para identificar objetivos farmacológicos específicos que son útiles para la intervención terapéutica.

Así, la presente invención se refiere al uso de FVII y/o FVIIa en el tratamiento terapéutico de condiciones patológicas que pueden estar relacionadas con la migración de la célula o pueden ser tratadas por la regulación específica de la migración de la célula.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de detección de candidatos farmacológicos que regulan la migración de la célula, dicho método comprende

- a) cultivo una célula de expresión de TF;
- b) medición de la migración de la célula;
- c) incubación de la célula con un candidato farmacológico, y

d) medición de la migración de la célula incubada y determinación de cualquier cambio en el nivel de migración en comparación con la migración medida en la fase b, tal cambio siendo indicativo de un candidato farmacológico biológicamente activo en dicha célula.

Generalmente, los componentes de la sangre, que participan en aquello que se ha denominado como la coagulación en “cascada” son proenzimas o zimógenos, proteínas enzimáticamente inactivas, que son convertidas en enzimas proteolíticas por la acción de un activador, como un factor de coagulación activado. Los factores de coagulación que han sufrido tal conversión son generalmente denominados como “factores activos”, y están designados por la adición de la letra “a” al nombre del factor de coagulación (p. ej. factor VIIa).

El término “quelante de zinc” se destina a incluir un compuesto que se enlaza al factor VIIa e induce la sustitución de iones calcio con iones zinc dentro del factor VIIa, de ese modo inhibiendo la actividad del factor VIIa o complejo factor tisular-factor VIIa (TF-FVIIa).

Un antagonista de TF tal y como se define según la invención puede ser un compuesto quelante de zinc, p. ej. un dihidroxamato o una dihidracida con los grupos hidroxamato o hidracida localizados uno respecto al otro en tal posición que estos sean capaces de quelar un ión zinc. El compuesto quelante de zinc actúa en combinación con FVIIa. Los iones Zn^{2+} ejercen su acción inhibitoria en competencia con un efecto estimulador de iones Ca^{2+} . Está previsto que los iones Zn^{2+} desplazan los iones Ca^{2+} de uno o más sitio(s) de unión de calcio dentro de FVIIa. Los compuestos quelantes de zinc, p. ej. hidroxamatos e hidracidas, son capaces de actuar como soportes potentes para unir iones zinc en competencia con los iones calcio. Los compuestos específicos de ese modo potencian la inhibición de zinc de la actividad del complejo factor VIIa/factor tisular. La actividad de factor VIIa en complejo con factor tisular puede ser inhibida por un mecanismo donde un quelante de zinc se enlaza al factor VIIa y facilita la sustitución de Ca^{2+} con Zn^{2+} . Por esta acción el quelante ejerce un efecto modulador en TF en la concentración normal de iones sin Ca^{2+} ni Zn^{2+} en la sangre.

El término “FVII” o “factor VII” significa factor de coagulación VII (zimogénico) de “cadena sencilla”. El término “Factor VIIa”, o “FVIIa” significa factor de coagulación VII activado “bicatenario” dividido por seccionamiento específico en el enlace peptídico Arg152-Ile153. FVII y FVIIa pueden ser purificados de la sangre o producidos por medios recombinantes. Es evidente que la práctica de los métodos descritos aquí es independiente de cómo el factor VIIa purificado es derivado y, en consecuencia, la presente invención está contemplada para cubrir el uso de cualquier preparación de factor VII o FVIIa adecuadas para el uso en la presente. Es preferido el FVIIa humano. FVII o FVIIa está también destinado a incluir variantes de FVII donde uno o más residuos de aminoácidos ha(han) sido sustituido(s).

El término “factor VII modificado”, “FVII inactivado” o “FVIIai” se destina a significar FVIIa que tiene al menos una modificación en su centro catalítico, cuya modificación sustancialmente inhibe la capacidad de FVIIa modificado para activar FX y FIX. Los términos pueden ser usados de forma intercambiable. Tal modificación incluye la sustitución de aminoácido (o sustitución) de uno o más de los residuos de la triada catalítica Ser344, Asp142 y His193, y también incluye la modificación de residuos de la triada catalítica con inhibidores de la serina proteasa tales como compuestos de organofósforo, sulfanilfluoruro, péptido halometil cetona o azapéptido. FFR-FVIIa es un ejemplo de un derivado de FVIIai obtenido mediante bloqueo del centro activo de FVIIa con el inhibidor irreversible, D-fenilalanina-L-fenilalanina-L-argininina clorometil cetona (FFR cmk). Otros derivados adecuados de FVIIai son FVIIa inactivado obtenido u obtenible mediante bloqueo del centro activo con L-fenilalanina-L-fenilalanina-L-argininina clorometil cetona, dansil-L-fenilalanina-L-fenilalanina-L-argininina clorometil cetona, o dansil-D-fenilalanina-L-fenilalanina-L-argininina clorometil cetona, es preferido FFR-FVIIa (FVIIa inactivado por FFR cmk).

El término “proteína quinasa” se destina a indicar una enzima que es capaz de fosforilar serina y/o treonina y/o tirosina en péptidos y/o proteínas.

El término “candidato farmacológico” se destina a indicar cualquier muestra, que tiene una función biológica o ejerce un efecto biológico en un sistema celular. La muestra puede ser una muestra de un material biológico tal como un extracto microbiano o vegetal, o puede ser una muestra que contiene un compuesto o mezcla de compuestos preparados por síntesis orgánica o técnicas genéticas.

El término “agonista de TF” comprende compuestos que inducen

a) transducción de señales por unión directa a TF (p. ej. FVIIa),

b) estimulación de cascada de MAPK,

c) revocamiento de inhibición de MAPK (p. ej. inhibidores de PTPasa), cuyos agonistas son candidatos farmacológicos tal y como se ha definido anteriormente.

El término “antagonista de TF” comprende

a) reactivos que concurren con FVIIa para la unión a TF sin transmisión, p. ej. FVIIai,

b) reactivos que se enlazan con FVIIa y previenen la unión a TF, p. ej. hidroxamato de Zn,

c) reactivos que inhiben la transducción de señales para interferir con elementos de la cascada de MAPK ,

d) reactivos que se enlazan con FVIIa/TF y previenen la transmisión,

5 e) reactivos que se enlazan con FVIIa/TF/FX y previenen la transmisión,

f) reactivos que bloquean la activación del factor humano X catalizado por el complejo factor tisular humano/factor VIIa, cuyos antagonistas son candidatos farmacológicos tal y como se ha definido anteriormente.

10 El término “objetivos farmacológicos” se destina a indicar una proteína que puede alterar la migración de células de expresión de TF.

El término “gen reportero” se destina a indicar un constructo de ADN que, cuando es transcrito, produce una proteína que puede ser detectada.

15 El término “elemento promotor de SRE” significa una secuencia de ADN que enlaza factores de transcripción inducidos por componentes presentes en el suero.

El término “célula de expresión de TF” significa cualquier célula mamífera que expresa TF.

20 El término “fosforilación proteínica” se destina a indicar la fosforilación de serina y/o treonina y/o tirosina en péptidos y/o proteínas.

25 Modulación o regulación de la migración de la célula se define como la capacidad de FVIIa u otro agonista de TF o FVIIai u otro antagonista de TF a 1) sea aumentar o reducir la migración de la célula en curso, normal o anormal, 2) iniciar la migración de la célula normal, y 3) iniciar la migración de la célula anormal.

30 Modulación o regulación de la expresión génica está definida como la capacidad de FVIIa u otro agonista de TF o FVIIai u otro antagonista de TF a 1) sea aumentar o reducir la migración de la célula, normal o anormal, 2) iniciar la migración de la célula normal, y 3) iniciar la migración de la célula anormal.

35 En este contexto, el término “tratamiento” se entiende para incluir tanto la prevención de una condición adversa como la regulación de una condición ya ocurrida con el propósito de inhibir o minimizar la condición. La administración profiláctica de FVIIa u otro agonista de TF o FVIIai u otro antagonista de TF está por lo tanto incluida en el término “tratamiento”.

40 En este contexto, el término “una unidad” se define como la cantidad de factor VII presente en 1 ml de plasma normal, correspondiente a aproximadamente 0,5 µg de proteína. Después de la activación 50 unidades corresponden a aproximadamente 1 µg de proteína.

En este contexto, el término “paciente” se define como cualquier animal, en particular mamíferos, tales como los seres humanos. El término “sujeto” se usa de forma intercambiable con “paciente”

Abreviaturas

45	TF	factor tisular
	FVII	factor VII en su forma monocatenaria inactivada
50	FVIIa	factor VII en su forma activada
	RFVIIa	factor VII recombinante en su forma activada
	FVIIai	factor VII (inactivado) modificado
55	FFR-FVIIai	factor VII inactivado por reacción con D-Phe-L-Phe-L-Arg clorometil cetona

60 El factor tisular (TF) es el receptor celular para el factor FVIIa (FVIIa) y el complejo es el iniciador principal de la coagulación sanguínea. Hemos estudiado los efectos del FVIIa que se une a TF en la migración de la célula y la transducción de señales de los fibroblastos humanos que expresan cantidades altas de TF. Los fibroblastos incubados con FVIIa emigraron hacia un gradiente de concentración de PDGF-BB a aproximadamente una concentración cien veces inferior que la de los fibroblastos no ligados con FVIIa. Los anticuerpos anti-TF inhibieron el aumento en la quimiotaxis inducida por FVIIa/TF. Además, se observó una supresión pronunciada de la quimiotaxis inducida por PDGF-BB con el FVIIa inhibido por el sitio activo (FFR-FVIIa). Se excluyó la posibilidad de que la hiperquimiotaxis fuera inducida por una generación putativa de actividad de FXa y de trombina.

FVIIa indujo la producción de inositol-1,4,5-trisfosfato a la misma extensión que PDGF-BB; los efectos de FVIIa y PDGF-BB fueron aditivos. FFR-FVIIa no indujo ninguna liberación de inositol-1,4,5-trisfosfato. La respuesta de

la migración de la célula a PDGF-BB y FVIIa fue totalmente bloqueada por un inhibidor de PLC, sugiriendo que la activación de PLC es importante para la respuesta. Por lo tanto, la unión de FVIIa a TF puede independientemente de la coagulación, modular respuestas celulares, tal como quimiotaxis, y la actividad catalítica de FVIIa es necesaria.

Se considera que TF ejerce una función en la metástasis de las células tumorales, pero todavía no se conoce el mecanismo. No obstante, Ott *et al.* identificaron muy recientemente la proteína 280 de unión a la actina (ABP-280) como un ligando para el dominio citoplásmico de TF, suministrando una ruta molecular por la cual TF puede soportar la metástasis de las células tumorales. Las señales moleculares y las funciones biológicas transducidas por FVIIa/TF son, no obstante, además mal entendidas.

Los fibroblastos humanos tienen una expresión constitutiva de TF. Estas células también expresan receptores para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). PDGF induce en sus células diana mitogenicidad, reorganización de actina y migración dirigida de la célula (quimiotaxis). Previamente hemos demostrado que PDGF-BB es un factor quimiotáctico eficaz para los fibroblastos humanos y que la respuesta quimiotáctica es mediada por la clase del receptor β . En consecuencia, estas células fueron elegidas para estudiar la transducción de señales putativas y la migración de la célula inducida mediante la unión de FVIIa a TF.

Más abajo demostramos por primera vez una conexión clara entre la señalización inducida por FVIIa que se une a TF y la respuesta celular a un factor de crecimiento. Presentamos datos acerca de que en los fibroblastos humanos el complejo FVIIa/TF conduce a una respuesta hiperquimiotáctica a PDGF-BB. Además, FVIIa inhibido por el sitio activo (FFR-FVIIa) en una vía dependiente de la dosis suprimió la migración dirigida hacia PDGF-BB. Mediante el uso de inhibidores específicos para PLC y fosfatidilinositol 3'-quinasa (PI3'-quinasa) también demostramos que la respuesta hiperquimiotáctica hacia PDGF-BB inducida por la señalización de FVIIa/TF es dependiente de la actividad de la fosfolipasa C (PLC) pero independiente de PI3'-quinasa. FVIIa y PDGF-BB indujeron la producción de inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃), uno de los segundos mensajeros liberados después de la activación de PLC, de una manera aditiva.

TF está constitutivamente expresado en la membrana plasmática de muchas células extravasculares, tales como los fibroblastos estromales en la túnica adventicia vascular y en cápsulas fibrosas del hígado, bazo y riñón. Por lo tanto, la expresión de TF se encuentra en los sitios físicamente separados de la sangre circulante y suministrando un revestimiento hemostático. Tras la herida, se cree que esta barrera protege el organismo contra el sangrado. TF puede, no obstante, ser inducido en monocitos/macrófagos, células del músculo liso vascular, células endoteliales y en varias células tumorales por una variedad de agentes, incluso citoquinas y factores de crecimiento. La inducción en el nivel transcripcional ocurre rápidamente después de la estimulación, identificando TF como un gen temprano inmediato relacionado con el crecimiento.

En este estudio hemos investigado el papel de TF como un receptor de la señalización. Hemos demostrado que los fibroblastos humanos con una expresión constitutiva de TF sobre la unión de ligandos de FVIIa migran hacia concentraciones extremadamente bajas de PDGF-BB. TF/FVIIa solo no indujo la migración espontánea mejorada, es decir, la migración aleatoria. Por lo tanto, fue necesaria una combinación de transducción de señales intracelulares por FVIIa/TF y el factor de crecimiento PDGF-BB para conseguir la respuesta de motilidad. No sólo la unión a TF, sino también la actividad catalítica de TF/FVIIa fue obligatoria, puesto que FVIIa inhibido por el sitio activo no suscitó una respuesta de migración mejorada. Además, los anticuerpos inhibitorios monoclonales evitaban la intensificación de la respuesta quimiotáctica por FVIIa. También excluimos que la señalización indirecta ocurriera debido a que FXa o trombina, puesto que TAP e Hírudina no tuvieron efecto en la quimiotaxis inducida por FVIIa/TF. En cambio encontramos que las concentraciones en aumento de FFR-FVIIa inhibieron activamente la quimiotaxis inducida por PDGF-BB. Los fibroblastos incubados con FFR-FVIIa mostraron una migración aleatoria completamente normal. El efecto inhibitorio de FFR-FVIIa en la quimiotaxis inducida por PDGF-BB no fue observada en presencia de la combinación de anticuerpos anti-TF de ese modo descartando la posibilidad de que FFR-FVIIa sea tóxico. Los resultados sugieren más bien, que en las células que expresan receptores β de PDGF y TF, el complejo FVIIa/TF es importante para la respuesta quimiotáctica a PDGF-BB.

Nuestro descubrimiento de que FVIIa aumenta la producción de IP₃, y los datos previamente proporcionados sobre las oscilaciones de Ca²⁺ inducidas por FVIIa/TF especialmente en células MDCK, soportan fuertemente la noción de que PLC es activado por la señalización de FVIIa/TF en un número de células. Además, la respuesta hiperquimiotáctica en fibroblastos humanos para PDGF-BB inducida por FVIIa/TF fue bloqueada en una vía dependiente de la dosis por un inhibidor de PLC. Hemos descubierto previamente una respuesta similar hiperquimiotáctica para PDGF-BB en las células mutantes Y934F de receptor β de PDGF, lo que mostró una fosforilación aumentada y activación de PLC- γ 1. En estas células, la fosforilación aumentada de PLC- γ 1 estaba correlacionada con una producción de IP₃ tres veces más alta en comparación con células tipo salvaje de β -expresión de PDGF. La combinación de FVIIa/TF y PDGF-BB indujo aproximadamente un aumento doble en la producción de IP₃ en los fibroblastos humanos. La producción de IP₃ inducida por FVIIa/TF, no obstante, no se correlaciona con la fosforilación de PLC- γ 1. La fosforilación de tirosina de PLC- γ 2 inducida por FVIIa/TF no puede ser excluida, pero parece improbable puesto que la expresión de PLC- γ 2 es muy baja en los fibroblastos humanos. Además, la parte intracelular de TF no está dotada con actividad de la proteína tirosina quinasa intrínseca. Estos resultados sugieren que FVIIa/TF induce la activación de isozimas PLC β y/o δ . En el ensayo para la liberación de IP₃ el medio de cultivo celular fue suplementado con el 0,1% de FBS conteniendo sólo aproximadamente 0,1 nM de FXa. Encontramos que una concentración superior a 20 nM de FXa es necesaria para inducir la producción de IP₃. El mecanismo por el que las isozimas PLC β o δ son activadas queda pendiente de ser elucidado. Se cree que la activación implica la cooperación entre TF y una proteína asociada a la membrana.

Recientemente, se ha identificado la conexión de TF con el citoesqueleto. Una interacción molecular entre el dominio citoplasmático de TF y la proteína ABP 280 de unión al filamento de actina fue demostrada. Además, TF resultó estar en contacto cercano con actina y proteínas de unión al filamento de actina, tales como α -actinina y ABP280 en lamellipodia y áreas de la membrana onduladas en células epiteliales en extensión. ABP 280, un elemento de la subfamilia de la filamina, es requerida para la función normal de la lamellipodia y por lo tanto muy importante para la motilidad de la célula. PI3'-quinasa e isozimas PLC están implicadas en las respuestas quimiotácticas, tales como la movilización de proteínas de unión de actina. En estudios precedentes hemos observado que la ruta de PI3'-quinasa en la quimiotaxis inducida por receptor β de PDGF parece menos importante en células con sobre-expresión y actividad mejorada de PLC- γ 1. Éste fue también el caso para células con FVIIa unido a TF. Esto indica que la magnitud de la activación de PI3'-quinasa e isozimas PLC determinará cuáles de estas rutas dominarán. Considerados en conjunto, nuestros datos demuestran que la migración de la célula es una función morfogénica importante inducida por señalización de FVIIa/TF.

La quimiotaxis juega un papel esencial en la cicatrización de una herida, en la angiogénesis y en la metástasis. La quimiotaxis es también un componente importante en el desarrollo de placas ateroscleróticas. En estos procesos, una variedad de células expresan TF así como PDGF y receptores de PDGF. La restenosis es una complicación más importante después del procedimiento intervencional de arterias obstruidas. PDGF ha sido implicado en la respuesta de la pared vascular (formación de neointima) para herida mecánica para mediar la migración y proliferación de células del músculo liso y fibroblastos. Hemos demostrado ahora por primera vez que la unión de FVIIa a células de expresión de TF tienen una respuesta quimiotáctica aumentada para PDGF, que es independiente de la coagulación.

Actualmente, se sabe poco sobre la señalización de ruta(s) que son inducidas por VIIa proteolíticamente activo y cómo las señales generadas por VIIa podrían contribuir en procesos celulares. Una posibilidad es que FVIIa podría inducir la expresión de reguladores de crecimiento que actúan como flujo descendente para inducir procesos celulares. Para investigar esta posibilidad, en el presente estudio, hemos examinado cambios en el programa transcripcional en fibroblastos humanos en respuesta a la exposición a VIIa usando un biochip de ADNc que contiene más de 8.000 genes humanos individuales. Elegimos los fibroblastos puesto que estas células normalmente tienen suero, conteniendo factores de crecimiento y factores de coagulación activados en el contexto de la herida vascular debido a las condiciones físicas (p. ej., cirugía) y patofisiológicas. El programa temporal de expresión génica observado en respuesta al suero sugiere que los fibroblastos están programados para interpretar la exposición brusca al suero no como un estímulo mitogénico general sino como una señal fisiológica específica. La caracterización de activación transcripcional en respuesta al suero y los factores de crecimiento también sugieren que los fibroblastos son un participante activo en una discusión entre las células diversas que controlan colectivamente la inflamación, la angiogénesis y la cicatrización de una herida.

El análisis de biochip de ADNc con ARNm aislado de fibroblastos expuestos a VIIa durante 90 min muestra regulación al alza de *Cry61*. El análisis de transferencia de Northern confirmó la expresión de *Cry61* inducida por VIIa en fibroblastos. Aunque no de forma tan exagerada como en los fibroblastos, VIIa también aumenta la expresión de *Cry61* en células del músculo liso vascular. La inducción de la expresión de *Cry61* depende de la actividad catalítica de FVIIa puesto que FVIIa no puede inducir la expresión de *Cry61*. Aunque el factor Xa y la trombina podrían también inducir la expresión de *Cry61* (datos no mostrados), estos compuestos no están implicados en la expresión de *Cry61* inducida por FVIIa. No encontramos ninguna evidencia para la generación de trazas de factor Xa y trombina en nuestro sistema experimental. Además, un inhibidor específico de factor Xa y trombina no tuvo un efecto significativo en la expresión de *Cry61* inducida por FVIIa.

Cry61 es un gen temprano inmediato que es activado transcripcionalmente por factores de crecimiento del suero en fibroblastos. Codifica una proteína segregada de unión a la heparina y rica en cisteína de 40 kDa, que se asocia con la matriz extracelular y las superficies de la célula. *Cry61* es un elemento de una familia de genes emergente de proteínas conservadas y modulares caracterizado por la presencia de una señal secretora N-terminal, seguida de cuatro dominios modulares estructurales y 38 residuos de cisteína que son ampliamente conservados entre elementos de la familia. La familia de proteínas ahora consiste en seis elementos diferentes, incluyendo *Cry61*, factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) y una proto-oncoproteína aviar, Nov (llamada familia CCN) (la familia CCN está posteriormente descrita en Lau *et al.*, Exp. Cell Res 248: 44-57: 1999). La proteína *Cry61* está mostrada para (i) promover la fijación y extensión de células endoteliales de modo similar a aquel de la fibronectina, (ii) aumentar los efectos de bFGF y PDGF a nivel de la síntesis de ADN de fibroblastos y células endoteliales vasculares (iii) promueve la migración de la célula tanto en los fibroblastos como en las células endoteliales. Estudios recientes demuestran que *Cry61* actúa como un ligando para la integrina $\alpha_v\beta_3$, un receptor de adhesión conocido por estar implicado en la señalización que regula varios procesos celulares incluso la angiogénesis y la metástasis tumoral. La proteína *Cry61* purificada fue mostrada para estimular la migración dirigida de la célula endotelial microvascular humana en cultivo a través de una ruta dependiente de $\alpha_v\beta_3$ e induce la neovascularización en corneas de rata. Además, la expresión de *Cry61* en células tumorales promueve el crecimiento tumoral y la vascularización.

En base a los presentes datos que demuestran que FVIIa induce la expresión de *Cry61* e losn fibroblastos, se cree que *Cry61* inducido por FVIIa es responsable, actuando a través de integrina $\alpha_v\beta_3$, de la migración de la célula mediada por FVIIa y de la metástasis tumoral. Por lo tanto, *Cry61* une la señal proteolítica de FVIIa-TF a la ruta de señalización de integrina. Las observaciones de que se requiere actividad catalítica de VIIa para la migración de la célula del músculo liso y de células tumorales, y para la metástasis tumoral son consistentes con la otra observación de que la actividad catalítica de FVIIa es requerida para la inducción de *Cry61*.

Además de *Cry61*, VIIa podría también inducir otros reguladores que podrían mediar respuestas biológicas inducidas por FVIIa. Se demostró que la unión de FVIIa a la superficie celular de TF en células pancreáticas cancerosas sobre-expresaba selectivamente el gen uPAR. Anteriormente hemos demostrado, usando la técnica de presentación diferencial, la sobre-regulación de la transcripción de gen poli(A)polimerasa en fibroblastos expuestos a FVIIa. Aunque habría sido interesante averiguar si el biochip de ADNc también muestra expresión diferencial de PAP, el filtro no contenía el ADNc de PAP. Además de *Cry61*, nuestro biochip de ADNc también muestra expresión diferencial de otros cuatro genes (véase resultados), pero la proporción de la expresión diferencial fue muy próxima a la importancia dudosa. Puesto que en experimentos preliminares no podíamos confirmar su expresión diferencial por el análisis de transferencia de Northern y también la ausencia de cualquier dato sugestivo pertinente en la capacidad de estos productos genéticos para mediar respuestas biológicas inducidas por FVIIa, no analizamos su expresión adicional. No obstante, puesto que CTGF es una molécula estructuralmente relacionada con *Cry61* y suscita las mismas respuestas biológicas que *Cry61*, hemos examinado la expresión de CTGF aunque la proporción relativa de expresión de CTGF en la muestra tratada con FVIIa vs la muestra de control en el biochip de ADNc es 1.8 (2 es una estimación conservadora para ser una magnitud real en el ensayo). Los datos revelaron que FVIIa también indujo la expresión de CTGF y la cinética de la expresión inducida por VIIa de CTGF fue similar a aquella de *Cry61*.

Aunque CTGF se comporta de forma muy similar al *Cry61*, existen diferencias sutiles entre éstos. Por ejemplo, (a) CTGF ha demostrado ser mitogénico en sí mismo mientras que *Cry61* no tiene actividad intrínseca mitogénica pero aumenta la síntesis de ADN inducida por el factor de crecimiento (b) *Cry61* estimula la quimiotaxis mientras que CTGF estimula tanto la quimiotaxis como la quimioquinesis (c) aunque ambos *Cry61* y CTGF son moléculas de señalización asociadas a ECM, CTGF ha demostrado que se segrega en el medio de cultivo. De este modo, es posible que FVIIa regule las funciones celulares localmente por medio de *Cry61* mientras que actúa a una distancia desde su sitio a través de la secreción de CTGF.

El régimen para cualquier paciente que deba ser tratado con FVIIa u otro agonista de TF o FVIIai u otro antagonista de TF tal y como se menciona aquí debería ser determinado por los expertos en la técnica. La dosis diaria para ser administrada en la terapia puede ser determinada por un médico y dependerá del compuesto particular empleado, de la forma de administración y del peso y la condición del paciente. Una cantidad eficaz es de manera adecuada una dosificación diaria de aproximadamente 5 µg/kg/día a aproximadamente 500 µg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 10 µg/kg/día a 300 µg/kg/día, más preferido de aproximadamente 15 µg/kg/día a 200 µg/kg/día, de la forma más preferida de aproximadamente 20 µg/kg/día a 100 µg/kg/día.

El FVIIa u otro agonista de TF o FVIIai u otro antagonista de TF debería ser administrado en una dosis individual, pero también se puede dar en dosis múltiples preferiblemente con intervalos de 4-6-12 horas dependiendo de la dosis dada y de la condición del paciente.

El FVIIa u otro agonista de TF o FVIIai o otro antagonista de TF puede ser administrado por ruta intravenosa o puede ser administrado por infusión continua o pulsátil o puede ser administrado directamente al sitio pertinente tal como, por ejemplo, inyectado directamente en un tumor. FVIIa u otro agonista de TF o FVIIai u otro antagonista de TF es preferiblemente administrado por inyecciones intravenosas y en una cantidad de aproximadamente 100-100.000 unidades por kg masa corporal, y preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 250-25.000 unidades por kg de masa corporal correspondiente a aproximadamente 5-500 µg/kg, una dosis que puede tener que ser repetida 2-4 veces por 24 horas.

Técnicas convencionales para preparar composiciones farmacéuticas, que pueden ser usadas según la presente invención están, por ejemplo, descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985.

Las composiciones usadas según esta invención son preparadas por métodos conocidos *per se* por el experto en la técnica.

En resumidas cuentas, las preparaciones farmacéuticas adecuadas para el uso según la presente invención se hacen mezclando FVII, FVIIa u otro agonista de TF preferiblemente en forma purificada, con adyuvantes adecuados y un portador o diluyente adecuado. Los portadores o diluyentes fisiológicos adecuados aceptables incluyen agua estéril y solución salina. Los adyuvantes adecuados, a este respecto, incluyen calcio, proteínas (p. ej. albúminas), u otros péptidos inertes (p. ej. glicil-glicina) o aminoácidos (p. ej. glicina, o histidina) para estabilizar el factor VIIa purificado. Otros adyuvantes fisiológicos aceptables son azúcares no reducidos, polialcoholes (p. ej. sorbitol, manitol o glicerol), polisacáridos tales como dextrinas de peso molecular bajo, detergentes (p. ej. polisorbato) y antioxidantes (p. ej. bisulfito y ascorbato). Los adyuvantes están generalmente presentes en una concentración del 0,001 al 4% p/v. La preparación farmacéutica puede también contener inhibidores de proteasa, p. ej. apronitina, y agentes conservadores.

Las preparaciones pueden ser esterilizadas, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, incorporando agentes de esterilización en las composiciones, irradiando las composiciones, o calentando las composiciones. Éstas pueden también ser fabricadas en forma de composiciones sólidas estériles, que pueden ser disueltas en agua estéril, o algún otro medio estéril adecuado para la inyección antes de o inmediatamente antes del uso.

La presente invención está ilustrada con mayor detalle por los ejemplos siguientes que, no obstante, no deben ser interpretados como limitadores del objetivo de protección. Las características descritas en la descripción precedente y en los ejemplos siguientes pueden, tanto por separado como en cualquier combinación de las mismas, ser esenciales para realizar la invención en diversas formas de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Preparación de FVII

El factor VIIa humano purificado adecuado para el uso en la presente invención es realizado preferiblemente por tecnología de ADN recombinante, p. ej. como se describe por Hagen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2412-2416, 1986 o como se describe en la patente europea n°. 200.421 (ZymoGenetics). El factor VIIa producido por tecnología
10 recombinante puede ser auténtico factor VIIa o un factor VIIa menos modificado a condición de que tal factor VIIa tenga sustancialmente la misma actividad biológica para la coagulación sanguínea que el factor VIIa auténtico. Tal factor VIIa modificado puede ser producido modificando la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el factor VII bien alterando los codones de aminoácidos o eliminando algunos codones de aminoácidos en el ácido nucleico que codifica el FVII natural por medios conocidos, p. ej. por mutagénesis sitio específica.

15 El factor VII puede también ser producido por los métodos descritos por Broze y Majerus, J. Biol. Chem. 255 (4): 1242-1247, 1980 y Hedner y Kisiel, J. Clin. Invest. 71: 1836-1841, 1983. Estos métodos producen factor VII sin cantidades detectables de otros factores de coagulación sanguínea. Una preparación de factor VII aún más purificado puede ser obtenida mediante la inclusión de una filtración en gel adicional como la fase de purificación final. El factor
20 VII es luego convertido en FVIIa activado por medios conocidos, p. ej. por diferentes proteínas plasmáticas, tales como factor XIIa, IX a o Xa. De forma alternativa, como se describe por Bjoern *et al.* (Research Disclosure, 269 September 1986, pp. 564-565), el factor VII puede ser activado pasándolo a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, tal como mono Q® (Pharmacia fine Chemicals) o similares.

25 Ejemplo 2

Preparación de FVIIa

30 Factor VII modificado adecuado para el uso en la presente invención se hace, p. ej. como se describe en las Publicaciones Internacionales Nos. 92/15686, 94/27631, 96/12800 y 97/47651 ZymoGenetics/Novo Nordisk).

Ejemplo 3

35 Efectos de FVIIa y FFR-FVIIa en la respuesta quimiotáctica de fibroblastos a PDGF-BB

Los fibroblastos que expresan TF activo (Fig. 1A y Fig. 1B) fueron incubados con 100 nM de FVIIa y sembrados en la parte superior de la cámara de Boyden modificada; mientras que los medios conteniendo el 10% de FBS y PDGF-BB en concentraciones diferentes fueron añadidos debajo del filtro micropore de 150 μ m. La migración de
40 las células bajo condiciones donde el medio conteniendo el 10% de FBS sin PDGF-BB fue añadido debajo del filtro fue usada como una medida de la migración aleatoria, y calculada como el 100% de migración. Una respuesta de migración significativa fue registrada a una concentración de 0,01 ng/ml de PDGF-BB en células estimuladas por FVIIa en comparación con 1 ng/ml de PDGF-BB para células no ligadas con FVIIa, es decir una diferencia de 100
45 veces en la concentración (Fig.2A). A 0,01-0,1 ng/ml de PDGF-BB, la respuesta de la migración a FVIIa aumentó la dosis de forma dependiente, empezando a 25 nM y con un efecto máximo de 50-100 nM FVIIa (Fig. 3A-D). No se observó ninguna intensificación de la migración aleatoria después de la activación con FVIIa. Para evaluar si el FVIIa proteolíticamente activo era obligatorio para la respuesta hiperquimiotáctica para PDGF-BB, los fibroblastos fueron también incubados con 100 nM de FFR-FVIIa y evaluados en la cámara de Boyden de la misma manera (Fig. 2A). La
50 quimiotaxis no aumentada fue observada con FFR-FVIIa a concentraciones bajas de PDGF-BB, 0.01-1 ng/ml. Por el contrario, una supresión pronunciada de quimiotaxis inducida por 10-50 ng/ml de PDGF-BB fue conseguida por 100 nM de FFR-FVIIa (Fig. 2A y 3A-D). Cuando los fibroblastos fueron preincubados con una mezcla de tres anticuerpos de TF diferentes y luego con FVIIa o FFR-FVIIa, la respuesta de migración para PDGF-BB fue idéntica a la respuesta de los fibroblastos sin la presencia de ligando enlazado a TF (Fig. 4A). Un anticuerpo IgG monoclonal irrelevante no
55 impidió la hiperquimiotaxis inducida por FVIIa ni la inhibición de la respuesta de migración inducida por FFR-FVIIa (datos no mostrados). La presencia de los anticuerpos IgG o los tres anticuerpos de TF no cambiaron la migración aleatoria de los fibroblastos (datos no mostrados).

60 Ejemplo 4

La respuesta hiperquimiotáctica no está mediada por FXa o por trombina

Puesto que la transducción de señales inducida por FVIIa conduciendo a la respuesta hiperquimiotáctica a PDGF-BB fue dependiente de la actividad catalítica de FVIIa, fue importante determinar si la señalización ocurría directamente o por medio de FXa o trombina generados por el complejo FVIIa/TF. La respuesta de migración mejorada transducida por FVIIa/TF no fue bloqueada por 0,2-10 μ M de péptido anticoagulante Tick (TAP), que bloquea específicamente el centro activo de FXa e impide otra activación de la cascada de coagulación conduciendo a la formación de

trombina (Fig. 5A,5B). Tampoco la adición de 5 U/ml de Hirudina, un inhibidor de trombina específico, tuvo ningún efecto en la hiperquimiotaxis inducida por FVIIa/TF (Fig. 6A). TAP e Hirudina no influyeron en la migración del fibroblasto en respuesta a PDGF sin la presencia del ligando FVIIa (Fig. 5A, 5B, 6A). Por lo tanto, es improbable que el efecto de FVIIa en la quimiotaxis sea mediado por medio de la activación de FX o trombina.

Ejemplo 5

La respuesta hiperquimiotáctica a PDGF-BB está influida por rutas dependientes de PLC, pero independientes de PI3'-quinasa

La activación de PI3'-quinasa ha demostrado recientemente que es importante para la quimiotaxis inducida por el receptor β de PDGF. En consecuencia, investigamos si LY294002, un inhibidor específico de la PI3'-quinasa, fue capaz de bloquear la respuesta quimiotáctica inducida por la señalización de FVIIa/TF. Los fibroblastos fueron pretratados con LY294002 a las concentraciones indicadas durante 30 minutos a 37°C antes de la adición de 100 nM de FVIIa y se evaluaron en la cámara de Boyden según se describe. La concentración de PDGF-BB fue mantenida constante a 0,1 ng/ml en todo el ensayo, es decir, una concentración muy baja en la que FVIIa/TF indujo una respuesta quimiotáctica significativa. LY294002 estuvo presente durante los experimentos enteros. Fig. 7A muestra que la respuesta de migración a PDGF-BB mediada por la señalización de FVIIa/TF no fue afectada por la inhibición de la PI3'-quinasa

Para investigar si la respuesta quimiotáctica inducida por FVIIa/TF implicaba la activación de fosfatidilinositol fosfolipasa C específica (PLC), preincubamos los fibroblastos con concentraciones diferentes de U73122, un inhibidor de PLC específico, durante 30 minutos a 37°C antes de añadir 100 nM de FVIIa; las células fueron luego sintetizadas al ensayo de quimiotaxis en presencia del inhibidor. Un análogo cercano, U73343, sin efectos en PLC fue usado como control negativo. La concentración de PDGF-BB fue mantenida constante a 0,1 ng/ml también en estos experimentos. El pretratamiento de las células con el inhibidor de PLC U73122 activo inhibió la respuesta hiperquimiotáctica a 0,1 ng/ml de PDGF-BB de una forma dependiente de la dosis, con una inhibición total a 1 μ M (Fig. 8A y 8B). No se observó ningún efecto en la quimiotaxis cuando se usó el análogo inactivo U73343.

Ejemplo 6

FVIIa/TF induce la activación de PLC

Para explorar adicionalmente la importancia de la actividad de PLC para la respuesta hiperquimiotáctica, también analizamos los efectos directos de FVIIa/TF en la actividad de PLC en los fibroblastos. La activación de PLC conduce a la producción de dos segundos mensajeros, inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol. Los fibroblastos fueron incubados con mio [3H] inositol durante toda la noche, y luego con 100 nM FVIIa o FFR-FVIIa durante 60 minutos, seguido de incubación con o sin PDGF-BB a las concentraciones indicadas. El tratamiento con 100 nM de FVIIa solo durante 60 minutos indujo la liberación de IP_3 en los fibroblastos al mismo nivel que lo hicieron 10 ng/ml y 100 ng/ml de PDGF-BB solo (Fig.9). Además, la combinación de 100 nM de FVIIa y 10 ng/ml o 100 ng/ml de PDGF-BB dobló la liberación de IP_3 . El FVIIa inhibido por el sitio activo no indujo la liberación de IP_3 . Estos resultados demuestran claramente que la PLC es activada tras la unión de FVIIa a TF.

Ejemplo 7

La fosforilación de PLC- γ 1 no es mejorada por la señalización de TF/FVIIa en los fibroblastos

Para determinar si la isoforma de PLC- γ 1, que es activada por ciertos receptores de la tirosina quinasa, era responsable de la actividad de la PLC aumentada inducida por FVIIa/TF, se estudió la fosforilación de tirosina de PLC- γ 1. Los fibroblastos fueron incubados en ausencia o presencia de 100 nM de FVIIa o FFR-FVIIa durante una hora, seguido de la estimulación con 0, 2, 10 o 100 ng/ml de PDGF-BB. Después de 5 minutos de incubación, las células fueron lisadas y PLC- γ 1 fue inmunoprecipitada, separada por SDS-PAGE e inmunotransferida con anticuerpos de antifosfotiroxina. Mientras que un aumento significativo en fosforilación de tirosina de PLC- γ 1 fue registrado con concentraciones en aumento de PDGF-BB, la adición de FVIIa solo a los fibroblastos no indujo ninguna fosforilación de tirosina de PLC- γ 1 (Fig. 10). Además, la combinación de FVIIa y PDGF-BB a concentraciones diferentes no indujo ninguna fosforilación adicional en comparación con la estimulación con PDGF-BB solo (Fig. 10). FFR-FVIIa no tuvo efecto en la fosforilación de PLC- γ 1 tirosina (Fig. 10). Por lo tanto, otras isoformas de PLC distintas de PLC- γ 1 son responsables de la actividad de la PLC aumentada después de la estimulación de FVIIa.

Ejemplo 8

Métodos

Cultivos de células. Los fibroblastos de prepucio humano, AG1518 y AG1523 crecieron hasta la confluencia en MEM de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Antes del uso, las células fueron despegadas por tripsinización (2,5 mg/ml durante 10 min a 37°C), lavadas en solución salina de Hank equilibrada, y resuspendidas en MEM de Eagle con 10% de FBS o en medio de Ham suplementado con el 0,1% de FBS.

Proteínas. FVIIa humano (Novo Nordisk NS, Gentofte, Dinamarca), fue expresado y purificado según está descrito²⁹. FFR-FVIIa (Novo Nordisk) se obtuvo por bloqueo de FVIIa en el centro activo con D-Phe-L-Phe-L-Arg clorometil cetona. El péptido anticoagulante Tick (TAP) recombinante fue gentilmente proporcionado por el Dr. P. Vlasuk, Corvas (San Diego, CA). La hirudina fue comprada a Sigma. LY294002, U73122 y U73343 fueron obtenidos de Biomol (Plymouth Meeting, PA). Los anticuerpos monoclonales anti-TF, TF8-5G9, TF9-5B7 y MTFH-1 (Morrissey, J.H., Fair, D.S., Edgington, T.S. Monoclonal antibody analysis of purified and cell-associated tissue factor. *Thromb. Res.* 52, 247-261 (1988)) fue un gentil regalo del Dr. James H. Morrissey, Oklahoma Medical Research Foundation. El anticuerpo de fosfotirosina, PY99 provino de Santa Cruz, California.

Citometría de flujo. La expresión en la superficie de TF fue analizada por Inmunofluorescencia con un citómetro de flujo (Coulter Epics XL-MCL, Beckman Coulter, Fullerton, CA, Coulter Electronics, USA). El instrumento fue calibrado a diario con microesferas de calibración Immuno-CheckTM o Flow CheckTM (Coulter). Para experimentos de inmunofluorescencia indirecta, los fibroblastos AG1518 o AG1523 fueron lavados dos veces con PBS conteniendo 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA), incubados durante 30 minutos en hielo con un anticuerpo monoclonal de TF anti-humano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (4508CJ, American Diagnostica, Greenwich, Ct. USA). IgG1 monoclonal de glucosa oxidasa anti-*Aspergillus Niger* (Dakopatts) fue usado como un control negativo. La intensidad de fluorescencia de canal media (MFI) y el porcentaje de células positivas fue determinado para cada muestra.

Determinación de la actividad de TF. La actividad procoagulante de TF fue determinada como se describe por Lindmark *et al.* (Lindmark, E., Tenno, T., Chen, J., Siegbahn, A. IL-10 inhibits LPS-induced human monocyte tissue factor expression in whole blood. *Br. J. Haematol.* 102: 597-604 (1998)). En breve, las partes alícuotas conteniendo 0,2 x 10⁵ fibroblastos AG1518 o AG1523 fueron lavadas dos veces con PBS, colocadas en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). La actividad procoagulante fue medida en un ensayo amidolítico de dos etapas en el que un sustrato cromogénico, S 2222 (Chromogenix, Mölndal, Suecia), es dividido por FXa, que a su vez es activado a partir de FX por el complejo TF/FVIIa. Una mezcla reactiva conteniendo concentraciones finales de 0,6 mM de S-2222, 2 mM de CaCl₂ y factores de coagulación del concentrado de factor Prothromplex-TTM TIM4 (Baxter, Viena, Austria) a una concentración final de 1 U/ml FVII y 1,2 U/ml FX, fue añadida a los pocillos, y el cambio en la absorbencia a 405 nm después de una incubación de 30 minutos a 37°C fue determinado. Las mediciones fueron hechas por triplicado.

Ensayo de quimiotaxis. La respuesta de la migración de fibroblastos fue evaluada mediante la técnica anterior principal en una cámara de Boyden modificada, tal y como se ha descrito anteriormente (Siegbahn, A., Hanimacher, A., Westermarck, B., Heldin, C-H. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J. Clin. Invest.* 85, 916-920 (1990) y Nistér, M., Hammacher, A., Mellström, K., Siegbahn, A., Rönstrand, L., Westermarck, B., Heldin, C-H. A glioma-derived PDGF A chain homodimer has different functional activities from a PDGF AB heterodimer purified from human platelets. *Cell* 52: 791-799 (1988)). Filtros Micropore (tamaño de poro de 8 µm) fueron revestidos con una solución de colágeno tipo-1 a la temperatura ambiente durante la noche. Los filtros fueron secados al aire durante 30 minutos inmediatamente antes del uso. Los fibroblastos de prepuccio humano AG1523, fueron crecidos hasta la confluencia en MEM de Eagle suplementado con 10% de FBS. Las células fueron despegadas por tripsinización (2,5 mg/ml durante 10 minutos a 37°C) y suspendidas en MEM de Eagle con el 10% de FBS. Los fibroblastos fueron incubados durante 10 minutos con o sin FVIIa o FFR-FVIIa antes del ensayo. Cien microlitros de la suspensión celular (2x 10⁵ células/ml) fueron añadidos sobre el filtro de la cámara de Boyden. PDGF-BB fue diluido en medios de ensayo (MEM de Eagle con el 10% de FBS) y añadido debajo del filtro en la cámara. Las células fueron incubadas durante 6 horas a 37°C en una cámara humedecida conteniendo el 95% de aire/5% de CO₂. FVIIa o FFR-FVIIa estuvieron presentes durante todo el experimento. Los filtros fueron luego eliminados, fijados en etanol, coloreados con Hemalun de Mayer, y montados. La migración fue medida como la distancia de los dos núcleos de fibroblastos migratorios más alejados de un campo de alta potencia (12,5x 24) enfocado. La distancia de migración en cada filtro fue calculada como la media de las lecturas de al menos tres partes diferentes del filtro. Los experimentos fueron realizados con dos a cuatro filtros separados para cada concentración de quimioatrayente. Para cada grupo de experimentos, la migración de fibroblastos hacia los medios de ensayo sirvió como control.

En los casos en los que los anticuerpos monoclonales anti-TF o inhibidores para factores de coagulación, TAP e Hirudina, fueron usados, las células fueron preincubadas durante 10 minutos con estos agentes, luego con o sin FVIIa o FFR-FVIIa antes de que el ensayo de quimiotaxis fuese realizado. Los anticuerpos, TAP o Hirudina estuvieron también presentes durante todo el experimento de quimiotaxis. En los experimentos donde los efectos en la respuesta de migración de diferentes inhibidores, LY294002, U73122 o U73343, fueron evaluados, las células fueron preincubadas durante 30 minutos con los inhibidores a las concentraciones indicadas, y los inhibidores estuvieron también presentes durante todos los experimentos.

Ensayo para la emisión de inositol trisfosfato (IP₃). Placas de seis pocillos con cultivos semiconfluentes de fibroblastos AG1518 humanos, fueron incubadas durante la noche (aprox. 20 horas) con 2 pCi de mio(³H) inositol (Amersham) en 2 ml de Ham F12 con el 0,1% de FBS. El medio fue cambiado a Ham F12 con el 0,1% de FBS (conteniendo 2 mM de CaCl₂) y 20 mM de LiCl y las células fueron incubadas durante 15 minutos a 37°C. Las células fueron luego incubadas en ausencia o presencia de 100 nM de FVIIa o 100 nM de FFR-FVIIa durante una hora. PDGF-BB (0, 10 o 100 ng/ml) fue añadido y la incubación fue continuada durante 10 minutos a 37°C. El ensayo de IP₃ fue realizado tal y como se ha descrito anteriormente por Eriksson *et al.* (Eriksson, A., Nånberg, E., Rönstrand, L.,

Engström, U., Hellman, U., Rupp, E., Carpenter, G., Heldin, C-H., Claesson-Welsh, L. Demonstration of functionally different interactions between phospholipase C- γ and the two types of platelet-derived growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 270: 7773-7781 (1995)).

- 5 *Ensayo para fosforilación de PLC- γ 1 inducida por agonistas.* Cultivos semiconfluentes de AG1518 fueron privados de suero durante toda la noche (aprox. 20 horas) en un medio conteniendo el 0,1% de FBS, y luego incubados en ausencia o presencia de 100 nM de FVIIa o FFR-FVIIa durante una hora seguido de incubación con 0, 2, 10 o 100 ng/ml de PDGF-BB durante 5 minutos a 37°C. Las células fueron lisadas y PLC- γ 1 fue precipitada, esencialmente tal y como se ha descrito anteriormente (Hansen, K., Johnell, M., Siegbahn, A., Rorsman, C., Engstrom, U., Wernstedt, C., Heldin, C-H., Ronnstrand, L. Mutation of a Src phosphorylation site in the PDGF β -receptor leads to increased PDGF-stimulated chemotaxis but decreased mitogenesis. *EMBO J.* 15, 5299-5313 (1996)) con antisuero anti-PLC- γ 1 generado inmunizando conejos con un péptido correspondiente al carboxitérmino de PLC- γ 1 bovina (Arteaga, C.L., Johnson, M.D., Todderud, G., Coffey, R.J., Carpenter, G., Page, D.L. Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- γ 1 in primary human breast carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10435-10439 (1991)). Las muestras fueron separadas por SDS-PAGE e inmunotransferidas con el anticuerpo PY99 de fosfotirosina.

20 *Análisis estadístico.* Los datos fueron analizados usando Statistica TM para el paquete Windows (StatSoft, Tulsa, Okla. USA). Se usó una prueba T de Student para muestras dependientes para determinar la significación estadística entre diferentes conjuntos de datos. Valores de P de <0,05 fueron considerados estadísticamente significantes.

- 25 Proteínas. VIIa recombinante humano, una donación de Novo Nordisk (Gentofte, Dinamarca), fue reconstruida en agua estéril a una concentración de 1 a 1,3 mg/ml. Las soluciones madres de VIIa fueron controladas para la contaminación de niveles de trazas de endotoxina usando un lisado de amebocitos limulus (Bio Whittaker) y no se detectó ninguna (nivel de detección 30 μ g). Proteína anticoagulante tick (TAP) recombinante fue gentilmente proporcionada por Jorge Vlasuk (Corvas, San Diego, CA) e hirudina recombinante se obtuvo de Sigma (St.Louis, MO) o de Calbiochem (San Diego, CA). Factor Xa humano purificado y trombina fueron obtenidos de Enzyme Research Laboratories (Southbend, IN).

- 30 *Biochip de ADNc.* Células WI-38 fueron cultivadas hasta una confluencia del 80% y privadas de suero durante 24 horas para entrar en un estado quiescente como se ha descrito anteriormente. El medio de cultivo fue sustituido con DMEM fresco sin suero (suplementado con 5 mM de CaCl_2) y dejado estabilizarse durante 2 h en una incubadora de cultivo. Luego, las células fueron tratadas con VIIa recombinante purificado (5 μ g/ml) durante 90 min. Transcurridos 90 min de tratamiento, el ARN total fue aislado de las células no tratadas (control) y tratadas con VIIa usando Trizol (Gibco BRL). ARN Poli (A) fue purificado por una pasada doble por columnas de aislamiento de ARNm Oligo Tex como se describe en el boletín técnico del fabricante (Qiagen). Ochocientos ng (800 ng) de ARN poli (A) altamente purificado del control y las células tratadas con VIIa fueron enviados a un servicio de análisis de biochips de ADNc (Human UniGEM V microarray, Genome Systems Inc, St. Louis, MO).

- 40 *Análisis de transferencia de Northern.* El ARN total fue preparado usando reactivo TRIZOL de monocapa quiescente de células WI-38 que fueron expuestas a VIIa y otros materiales como se describe en resultados. El análisis de transferencia de Northern se efectuó usando un procedimiento estándar. En breve, 10 μ g de ARN total fueron fraccionados por tamaños por electroforesis en gel en 1% agarosa/6% geles de formaldehído y transferidos sobre la membrana de nitrocelulosa por un método de transferencia capilar. Las transferencias de Northern fueron prehibridizadas a 42°C con una solución conteniendo el 50% de formamida, 5 X SSC, 50 mM de Tris.HCl, pH 7.5, 0,1% pirofosfato de sodio, 1% SDS, 1% olivinilpirrolidona, 1% Ficoll, 25 mM EDTA, 100 μ g/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y 1% BSA e hibridizadas con una sonda de ADNc de *Cry61* marcada en 32P (106 cpm/ml). Las membranas hibridadas fueron expuestas a una película de rayos X de Dupont NEF o Fuji RX. Para fines de cuantificación, las membranas fueron expuestas a una pantalla de fósforo durante 1 a 4 h, y las pantallas expuestas fueron analizadas en un PhosphorImager (Molecular Dynamics) usando el software "Image-quant". Para obtener valores medios, las unidades (cuentas) obtenidas de distintos experimentos fueron normalizadas para un control interno (cuentas presentes en la muestra tratada con control).

- 50 *Ensayo cromogénico.* Las células WI-38 fueron cultivadas en una placa de cultivo de 96 pocillos y hechas quiescentes como se ha descrito anteriormente. Después de lavar las células, FVIIa (5 μ g/ml) en 1,00 μ g de tampón con calcio fue añadido a los pocillos de cultivo que contenían células o pocillos revestidos con tampón (sin células). Después de 30 min de incubación, 25 μ g de sustratos cromogénicos para factor Xa y trombina, es decir, Cromozima X y Cromozima T fueron añadidos a los pocillos. Después de 3 h de desarrollo de color, la placa fue leída en un lector de microplacas. Como controles, las células fueron incubadas con concentraciones de trazas de Factor Xa (50 a 0,1 ng/ml) o trombina (0,1 a 0,002 U/ml). No se encontraron diferencias en absorbencia a 450 nm entre VIIa añadido a células, o VIIa añadido a pocillos que no contenían células. La lectura fue inferior a las lecturas obtenidas con concentración mínima de Factor Xa o trombina y representa actividad cromogénica de VIIa.

Ejemplo 9

- 65 *Biochip de ADNc.* Fibroblastos quiescentes fueron expuestos a un medio de control sin suero o el medio sin suero suplementado con VIIa (5 μ g/ml) durante 90 min (tres matraces T-75 para cada tratamiento). Después del tratamiento, el ARN total fue cosechado y ARN poli (A) fue aislado. Seiscientos ng de ARNm fueron marcados con fluorescencia Cy3 o Cy5 y luego hibridizados al chip UniGem Human V que contiene 8.000 secuencs verificados ESTs, represen-

tando hasta 5.000 genes humanos conocidos (servicio realizado por Genome System Inc por una tasa). La placa de control, donde las concentraciones conocidas de ADNc de referencia fue clavado en la reacción de generación de la sonda para medir la sensibilidad y controlar la reacción de transcripción inversa, purificación, determinar la eficiencia de hibridación y vista global de la calidad y rendimiento del ensayo indicó el éxito del proceso de hibridación. El análisis global de datos experimentales reveló diferencias mínimas en señales de hibridación entre el control y las muestras tratadas con VII- Sólo un pequeño número de genes mostró una expresión diferencial moderada. Encontramos que la regulación en exceso de 5 genes (3,5 a 2 veces más alto en tratamiento de VIIa) mientras que un gen fue infra-regulado tras el tratamiento con VIIa (2,4 veces inferior) (+/-2 es una estimación conservadora para determinar la magnitud mínima de proporciones reales). La identidad del gen sobre-regulado 3,5 veces no fue revelada debido a la naturaleza propia. Otros genes sobre-regulados por VIIa son *Cry61* (2,5 veces), receptor de dopamina D2 (2,2 veces), EST Incyte PD 395116 (2 veces) y receptor del nucleótido P2U (2 veces). Es interesante destacar que CTGF, un gen perteneciente a la familia de *Cry61*, fue 1.8 veces más alto en células tratadas con VIIa en comparación con células de control. El transcrito infra-regulado en células tratadas con VIIa fue EST PD674714. Nosotros seleccionamos *Cry61* para un análisis adicional.

Ejemplo 10

Confirmación de expresión diferencial de *Cry61*. Para convalidar los datos obtenidos en biochip, hemos sintetizado las muestras de ARN del control y las células tratadas con VIIa (las mismas muestras de ARN que han sido usadas para preparar ARN poli (A) para la generación de la sonda en el biochip) para el análisis de transferencia de Northern y evaluado con ADNc de *Cry61* radiomarcado. Los datos muestran que la sonda de ADNc de *Cry61* se hibrida a un único transcrito (aproximadamente 2,0 kb) de ARN aislado del control y de las células tratadas con VIIa. No obstante, la intensidad de la señal de hibridación fue mucho más alta en ARN aislado de células tratadas con VIIa (Fig. 1). La cuantificación de la señal de hibridación reveló que la expresión de *Cry61* fue 2,8 veces mayor en células expuestas a VIIa sobre las células tratadas con control.

Ejemplo 11

Cinética de la expresión inducida por VIIa de Cry61. Para determinar la cinética de expresión de *Cry61*, los fibroblastos quiescentes fueron tratados para variar períodos de tiempo con 5 µg/ml de VIIa. El ARN total fue extraído y sintetizado para análisis de transferencia de Northern. Como se muestra en Fig. 2. La expresión de *Cry61* fue aumentada de manera dependiente del tiempo en células tratadas con VIIa. La expresión alcanzó el punto más alto a aproximadamente 45 min y luego declinó hacia el nivel de base en 2 a 3 h. Puesto que se ha informado que la expresión de *Cry61* en fibroblastos de ratón después de la estimulación con suero y factor de crecimiento fue mantenida durante varias horas (hasta 8 a 10 h) antes de que ocurriera la represión, hemos examinado el efecto del suero y PDGF en la cinética de la expresión de *Cry61* en fibroblastos de humano quiescentes, WI-38. Como se muestra en la Fig. 2B, *Cry61* es expresado sólo transitoriamente tras la estimulación con PDGF y se vuelve completamente reprimido 2 h después de la adición de estímulos. Resultados similares se obtuvieron con la expresión inducida con suero de *Cry61* (datos no mostrados).

Ejemplo 12

Expresión inducida dependiente de la dosis de Factor VIIa de Cry61. Para determinar la dependencia de la dosis de VIIa, los fibroblastos quiescentes fueron tratados con dosis variables de FVIIa (0,1 a 5 µg/ml) durante 45 min y luego muestras de ARN total de las células fueron sintetizadas para el análisis de transferencia de Northern. Como se muestra en la Fig. 3, el tratamiento de fibroblastos con tan poco como 0,1 µg/ml de FVIIa fue suficiente para inducir la expresión de *Cry61* y una concentración de plasma de FVII(a) (0,5 µg/ml, 10 nM resultó en una respuesta prominente, cerca del maximal).

Ejemplo 13

Actividad catalítica de factor VIIa es requerida para la inducción de Cry61. Para probar si la actividad catalítica VIIa es requerida para la inducción de *Cry61*, se trataron células WI-38 con VIIa y FVIIa con el sitio activo inactivado (FVIIai) durante 45 min y la expresión de *Cry61* fue evaluada por análisis de transferencia de Northern. Como se muestra en la Fig. 4, FVIIai fracasó en inducir la expresión de *Cry61* sugiriendo el requisito de actividad proteolítica de FVIIa. En este contexto, puede ser importante advertir que FVIIai fue mostrado para enlazarse a TF de la superficie celular con la misma afinidad o más alta que FVIIa. Es improbable que la expresión inducida por VIIa de *Cry61* en nuestros experimentos fuera el resultado de la generación de factores de coagulación descendente, FXa y trombina. Usando ensayos cromogénicos sensibles, no encontramos evidencia para la generación de Factor Xa y trombina en nuestro sistema experimental (sensibilidad de detección 10 µg). Además, los inhibidores específicos de Factor Xa y trombina, es decir, proteína anticoagulante tick e hirudina, respectivamente, fracasó en suprimir la expresión inducida por VIIa de *Cry61* (Fig. 5).

Ejemplo 14

Implicación del mecanismo transcripcional para la inducción de niveles de estado estacionario de ARNm de Cry61 por VIIa. Para investigar si la transcripción está implicada en el aumento mediado por VIIa en los niveles del estado estacionario de ARNm de *Cry61*, células WI-38 quiescentes fueron incubadas con actinomicina-D (10 µg/ml) durante 30 min antes de la adición de VIIa durante 45 min. Como se muestra en la Fig. 6, actinomicina-D inhibió el efecto estimulador de VIIa. Este resultado indica un mecanismo transcripcional para la inducción de *Cry61*.

Para investigar si la síntesis de proteína de novo es requerida para la inducción de ARNm de *Cry61* por VIIa, las células WI-38 fueron pretratadas con la cicloheximida del inhibidor de la síntesis de la proteína antes de que las células fueran expuestas a VIIa durante 45 min. Como se muestra en la Fig. 6, el efecto estimulador de VIIa no fue bloqueado por cicloheximida. De hecho, la cicloheximida aumentó marcadamente los niveles de ARNm de estado estacionario de *Cry61* inducido por VIIa.

Referencias citadas en la descripción

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

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 200421 A [0093]
- WO 9215686 A [0095]
- WO 9427631 A [0095]
- WO 9612800 A [0095]
- WO 9747651 A [0095]

Bibliografía distinta de patente citada en la descripción

- LAU *et al. Exp. Cell Res.*, 1999, vol. 248, 44-57 [0081]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences* 1985. [0088]
- HAGEN *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 2412-2416 [0093]
- BROZE MAJERUS *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, no. 4, 1242-1247 [0094]
- HEDNER KISIEL *J. Clin. Invest.*, 1983, vol. 71, 1836-1841 [0094]
- BJOERN *et al. Research Disclosure*, 1986, vol. 269, 564-565 [0094]
- MORRISSEY, J.H. FAIR, D.S. EDGINGTON, T.S. Monoclonal antibody analysis of purified and cell-associated tissue factor *Thromb. Res.*, 1988, vol. 52, 247-261 [0103]
- LINDMARK, E. TENNO, T. CHEN, J. SIEGBAHN, A. IL-10 inhibits LPS-induced human monocyte tissue factor expression in whole blood *Br. J. Haematol.*, 1998, vol. 102, 597-604 [0105]
- SIEGBAHN, A. HANIMACHER, A. WESTERMARK, B. HELDIN, C-H. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes *J. Clin. Invest.*, 1990, vol. 85, 916-920 [0106]
- NISTÉR, M. HAMMACHER, A. MELLSTRÖM, K. SIEGBAHN, A. RÖNNSTRAND, L. WESTERMARK, B. HELDIN, C-H. A glioma-derived PDGF A chain homodimer has different functional activities from a PDGF AB heterodimer purified from human platelets *Cell*, 1988, vol. 52, 791-799 [0106]
- ERIKSSON, A. NANBERG, E. RÖNNSTRAND, L. ENGSTRÖM, U. HELLMAN, U. RUPP, E. CARPENTER, G. HELDIN, C-H. CLAESSON-WELSH, L. Demonstration of functionally different interactions between phospholipase C-γ and the two types of platelet-derived growth factor receptors *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 7773-7781 [0108]

• **HANSEN, K. JOHNELL, M. SIEGBAHN, A. RORSMAN, C. ENGSTRÖM, U. WERNSTEDT, C. HEL-DIN, C-H. RÖNNSTRAND, L.** Mutation of a Src phosphorylation site in the PDGF [3-receptor leads to increased PDGF-stimulated chemotaxis but decreased mitogenesis *EMBO J*, 1996, vol. 15, 5299-5313 [0109]

5 • **ARTEGA, C.L. JOHNSON, M.D. TODDERUD, G. COFFEY, R.J. CARPENTER, G. PAGE, D.L.** Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- γ 1 in primary human breast carcinomas *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 10435-10439 [0109]

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un agonista de factor tisular para la producción de un medicamento para el tratamiento terapéutico de condiciones patológicas que puede ser relacionado con la migración de la célula o tratado por regulación específica de la migración de la célula o quimiotaxis, dicha condición patológica siendo seleccionada de la lista que consiste en aterosclerosis, angiogénesis, cicatrización de una herida incluyendo regeneración de paredes vasculares, quemaduras, e inflamación, donde dicho agonista de factor tisular induce la transducción de señales por enlace directo a TF y donde dicho agonista de factor tisular es FVII o FVIIa o una combinación de los mismos.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde dicha célula es una célula humana que expresa el factor tisular, incluyendo fibroblasto, células del músculo liso, células tumorales, células hematopoyéticas, monocito, macrófagos y células epiteliales.
- 15 3. Uso según la reivindicación 2, donde dicha célula además expresa PDGF y receptores de PDGF, especialmente receptores beta del PDGF.
- 20 4. Agonista del factor tisular para tratar condiciones patológicas que puede ser relacionado con la migración de la célula o tratado por regulación específica de la migración de la célula o quimiotaxis, dicha condición patológica siendo seleccionada de la lista que consiste en aterosclerosis, angiogénesis, cicatrización de una herida incluyendo regeneración de paredes vasculares, quemaduras, e inflamación, donde dicho agonista de factor tisular induce transducción de señales por unión directa a TF y donde dicho agonista de factor tisular es FVII o FVIIa o una combinación de los mismos.
- 25 5. Agonista del factor tisular según la reivindicación 4, donde dicha célula es una célula humana que expresa el factor tisular incluyendo fibroblastos, células del músculo liso, células tumorales, células hematopoyéticas, monocitos, macrófagos y células epiteliales.
- 30 6. Agonista del factor tisular según la reivindicación 5, donde dicha célula además expresa PDGF y receptores de PDGF especialmente receptores beta de PDGF.
- 35 7. Método para la modulación o la regulación de la migración de la célula *in vitro* en una célula humana o tejido que expresa factor tisular, dicho método comprendiendo la fase de contactar dicha célula o tejido con un agonista de factor tisular o un antagonista de factor tisular.
- 40 8. Método según la reivindicación 7, donde dicho agonista de factor tisular es FVII o FVIIa o una combinación de los mismos.
9. Método según la reivindicación 7, donde dicho antagonista de factor tisular es FVII modificado.
- 45 10. Método según la reivindicación 7, donde dicha célula es una célula humana que expresa el factor tisular, incluyendo fibroblastos, células del músculo liso, células tumorales, células hematopoyéticas, monocitos, macrófagos y células epiteliales.
- 50 11. Método de detección de candidatos farmacológicos seleccionados de agonistas del factor tisular y antagonistas del factor tisular que regulan la migración de la célula, dicho método comprendiendo
 - a) cultivo de una célula que expresa TF;
 - b) medición de la migración de la célula;
 - c) incubación de la célula con un candidato farmacológico, y
 - d) medición de la migración de la célula incubada y determinación de cualquier cambio en el nivel de migración en comparación con la migración medida en la fase b, tal cambio siendo indicativo de un candidato farmacológico biológicamente activo en dicha célula.

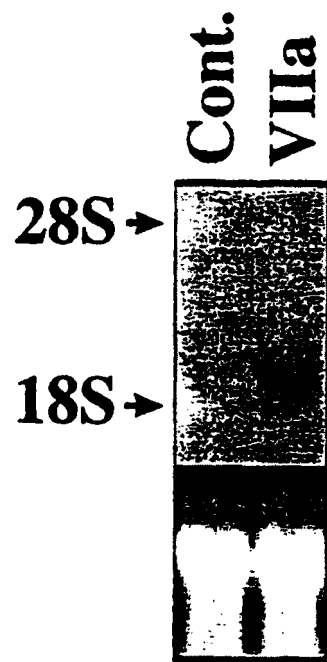


Fig. 1

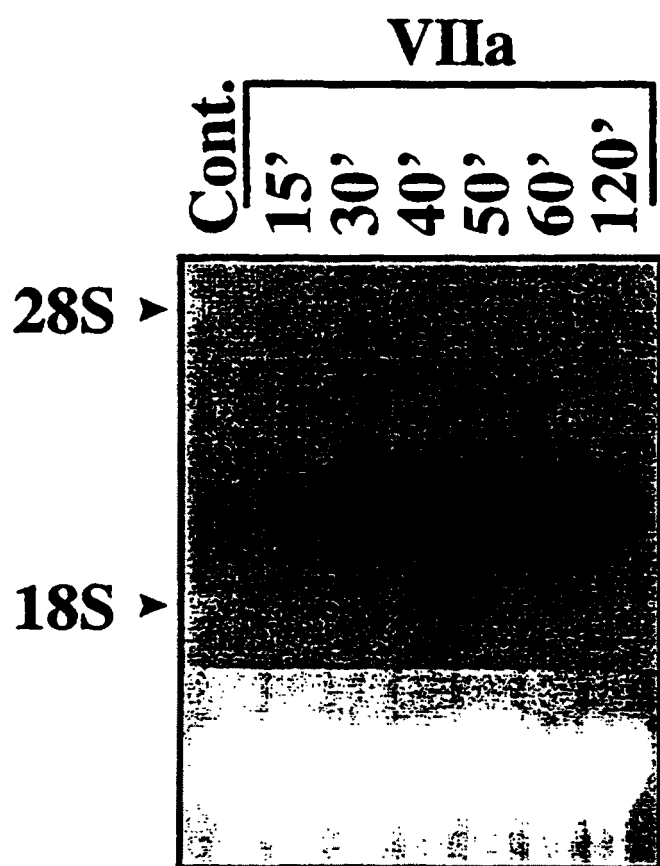


Fig. 2

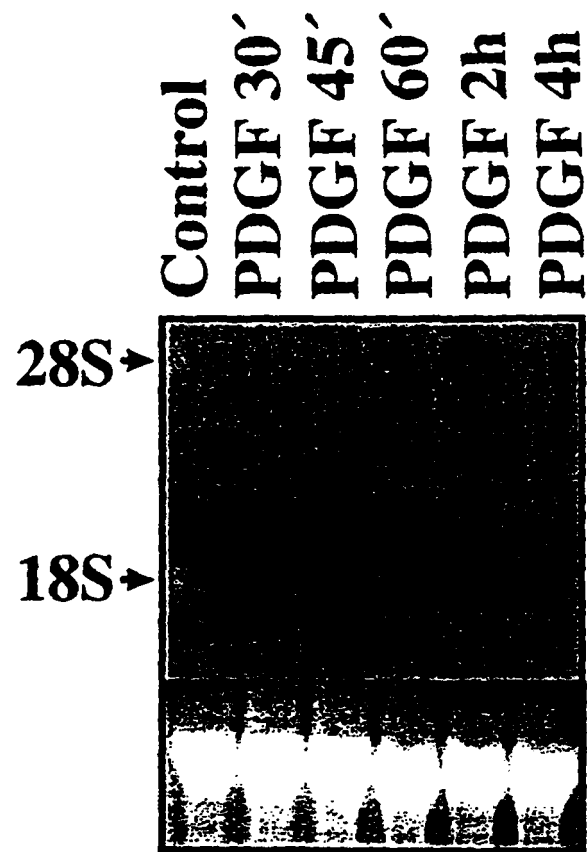


Fig. 2B

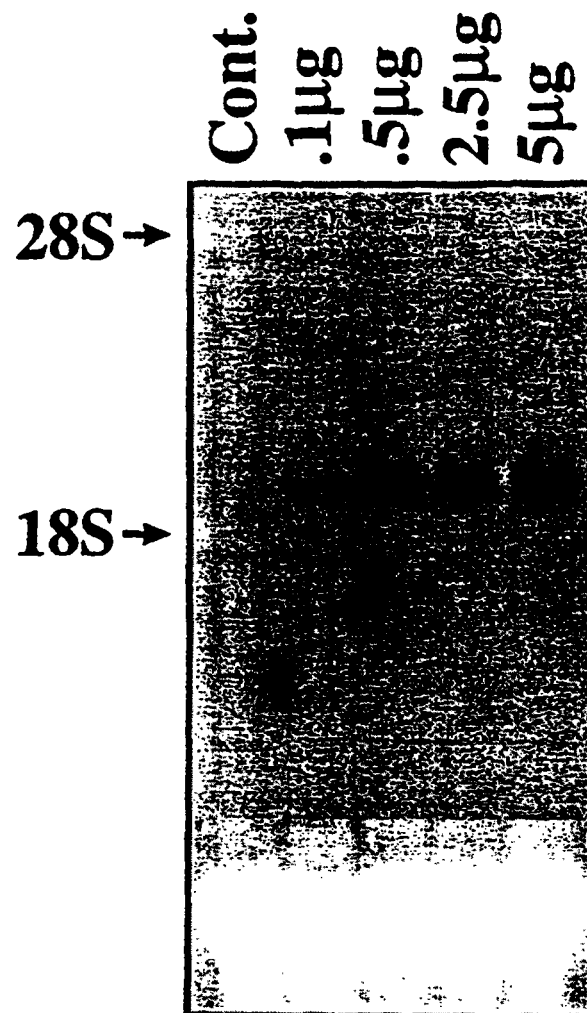


Fig. 3

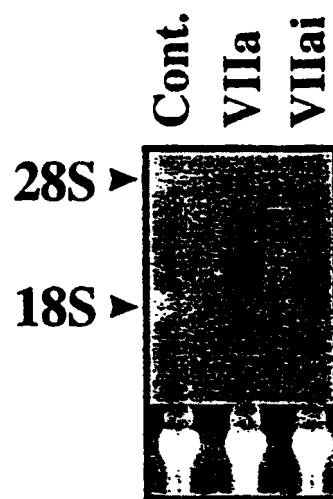


Fig. 4

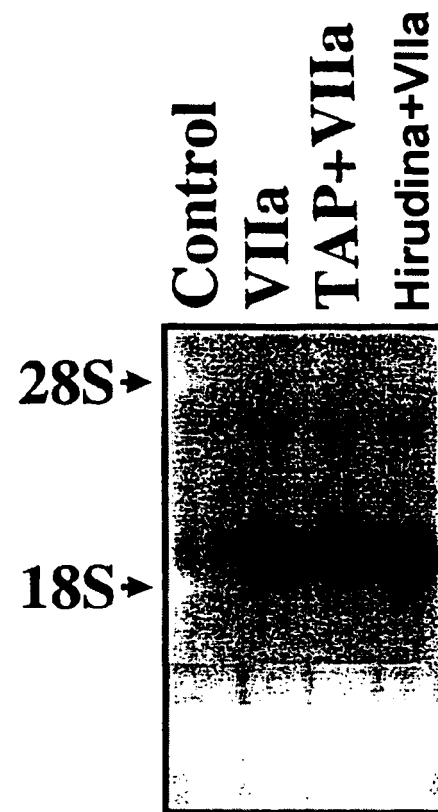


Fig. 5

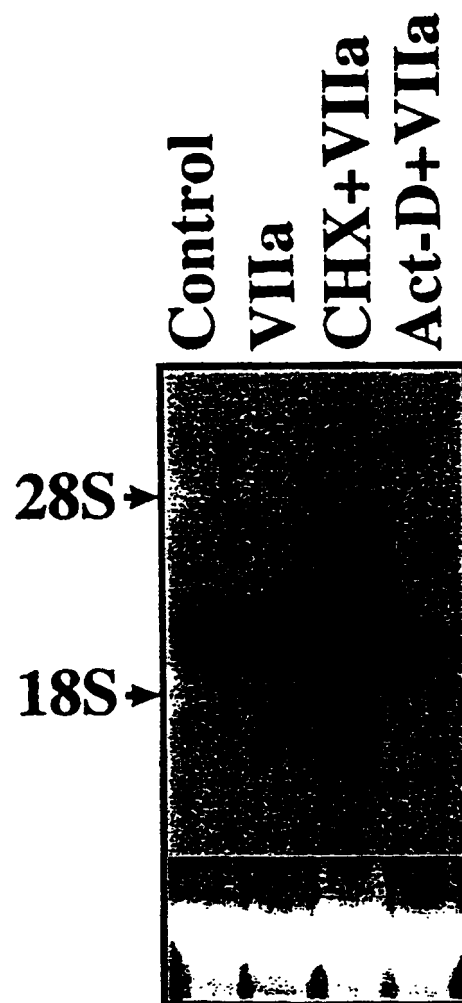


Fig. 6

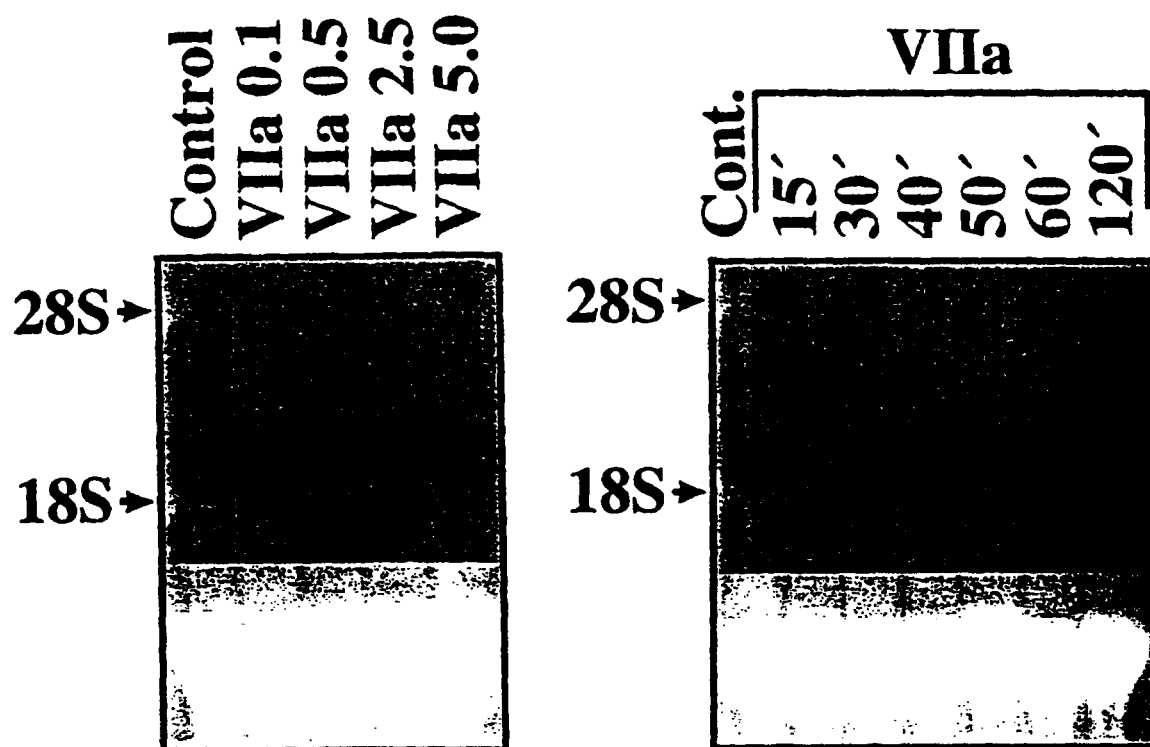


Fig. 7

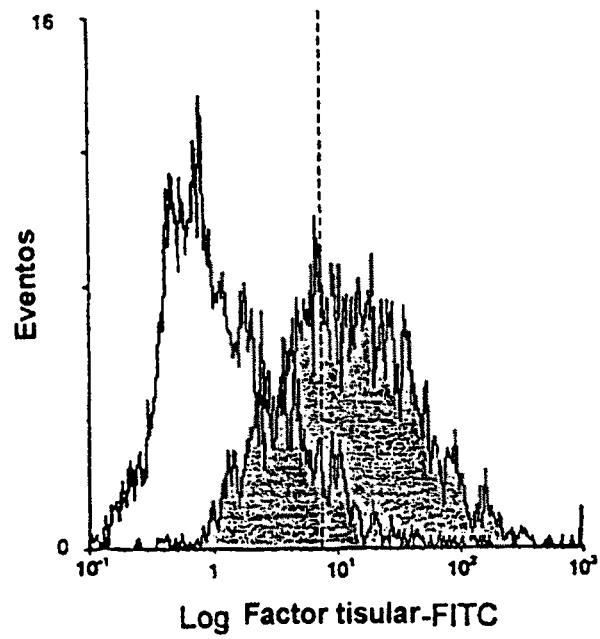


Fig. 1A

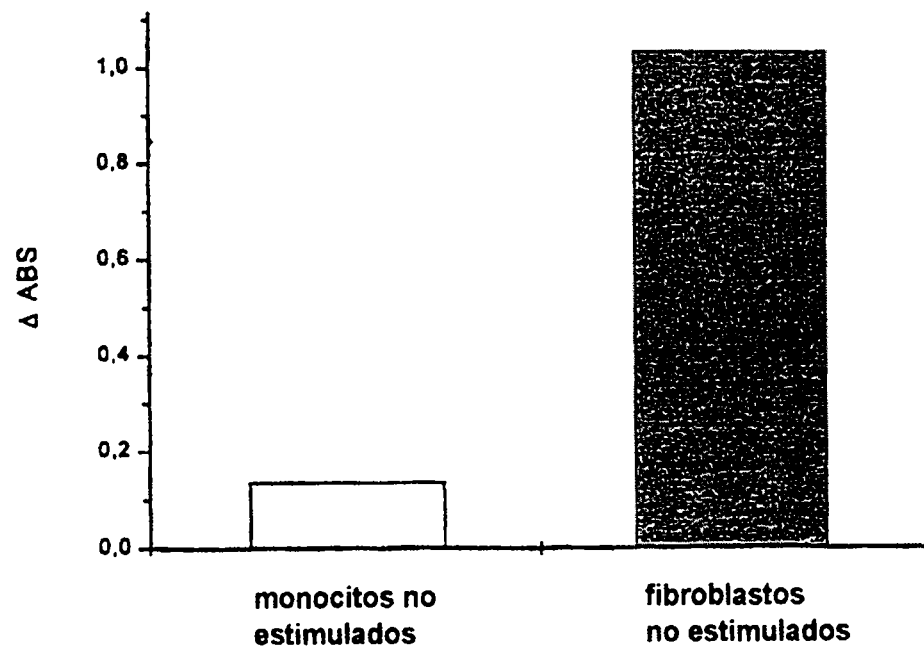


Fig. 1B

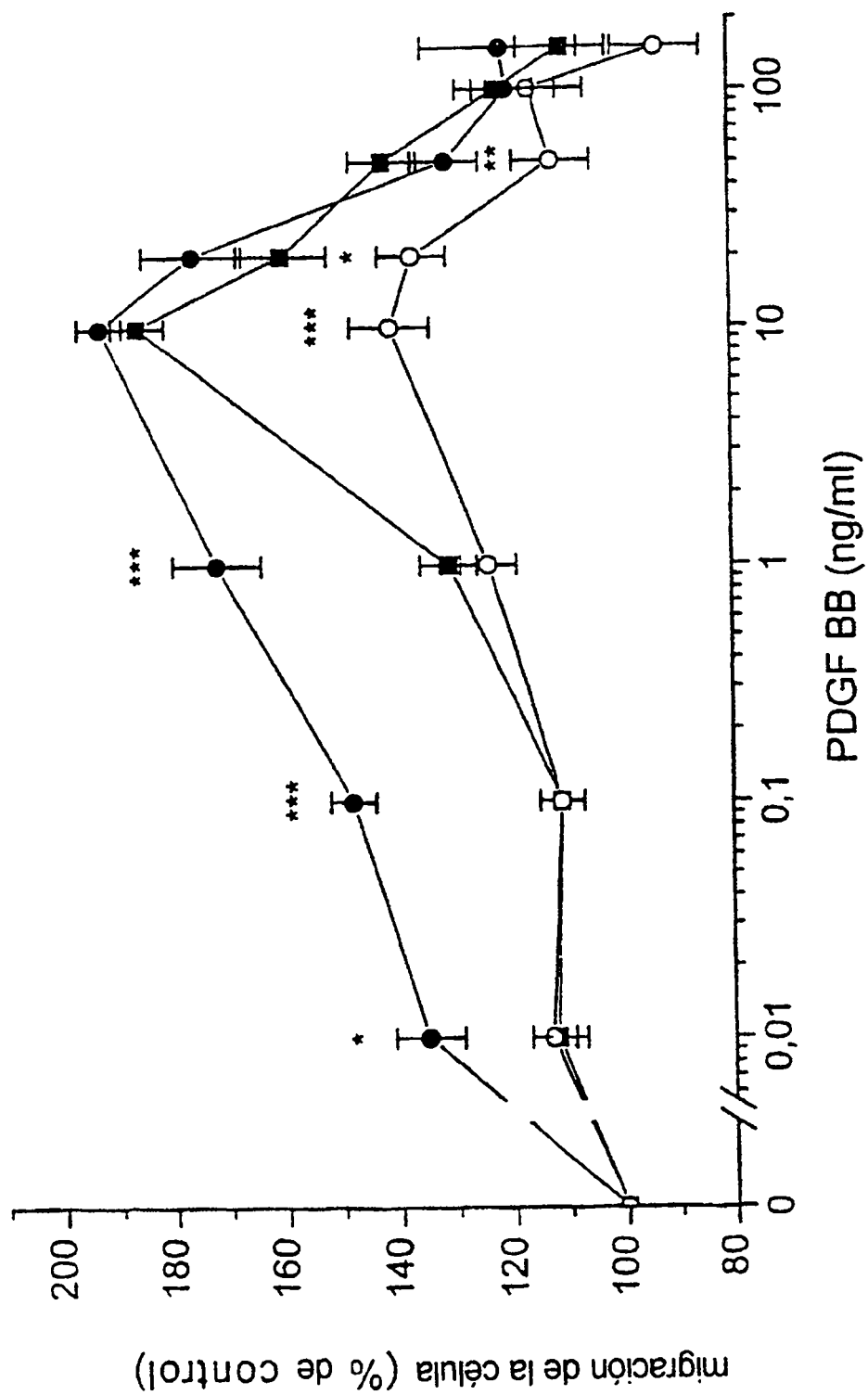
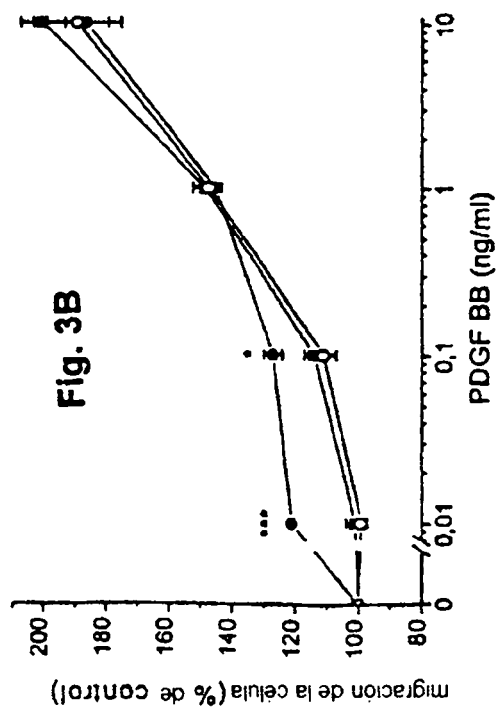
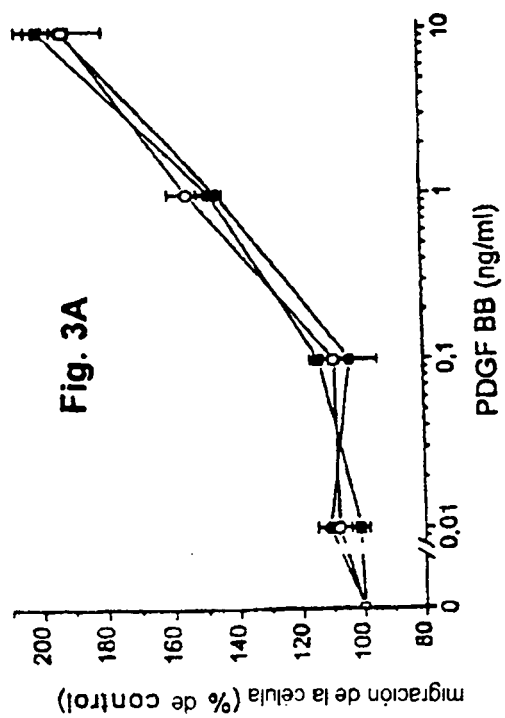
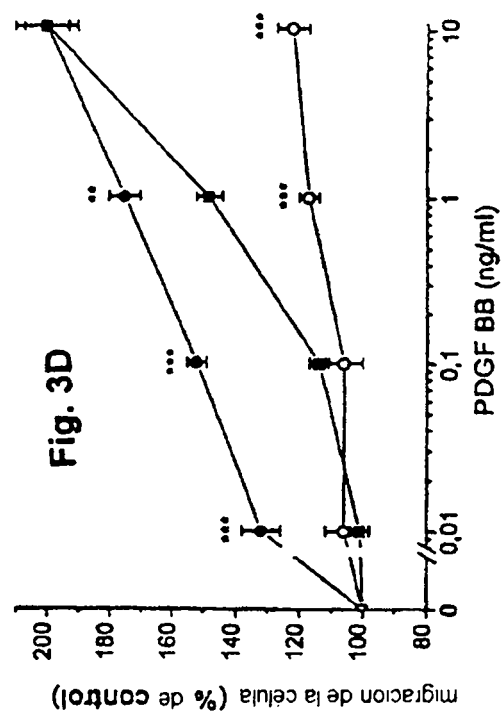
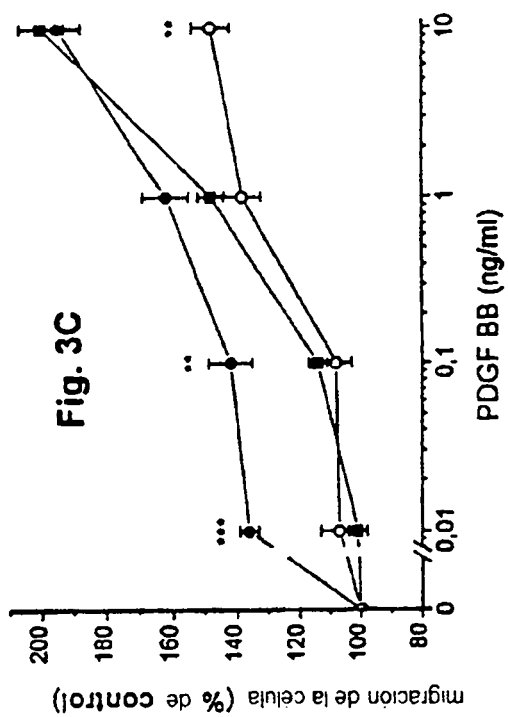


Fig. 2A



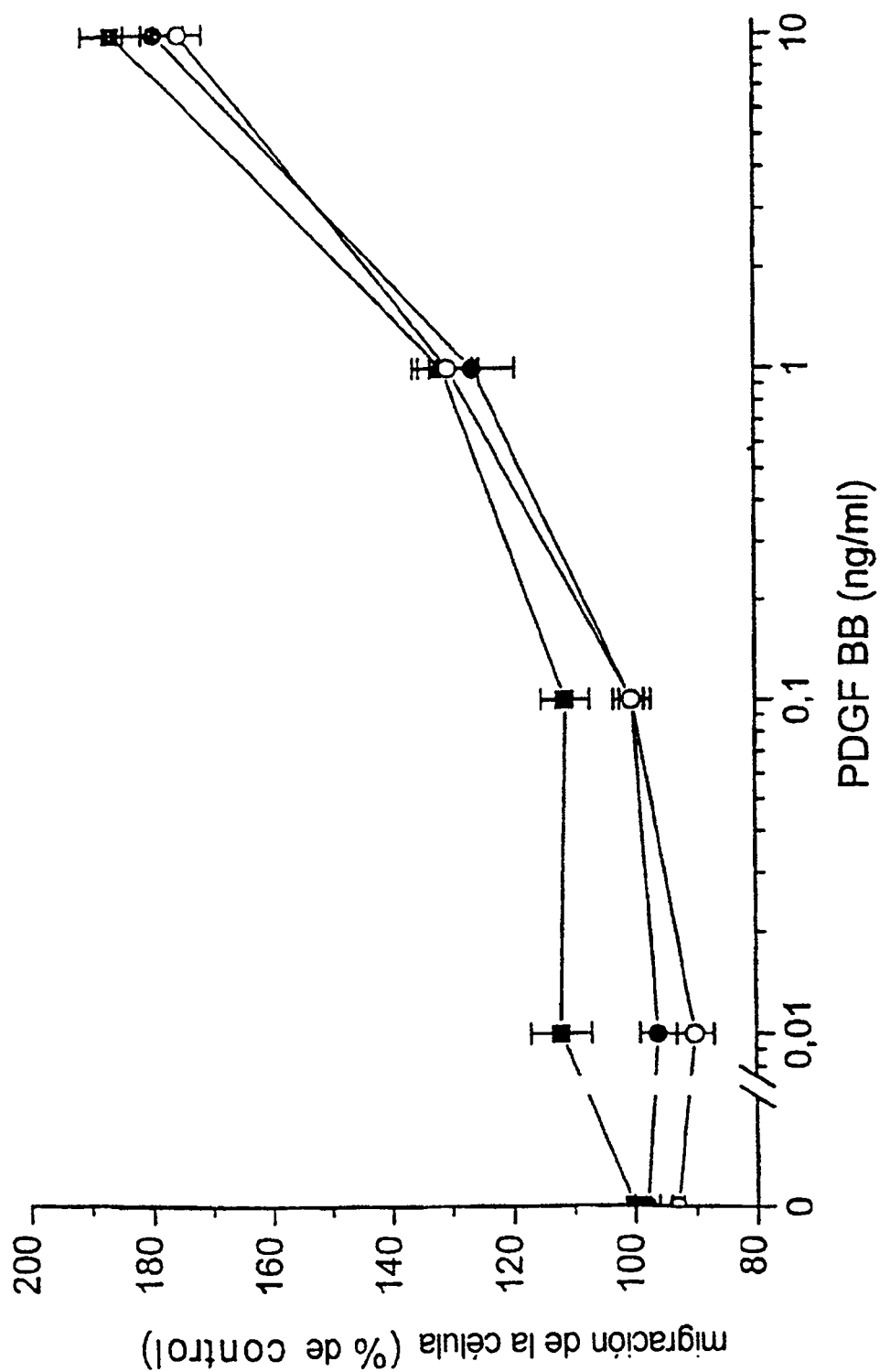


Fig. 4A

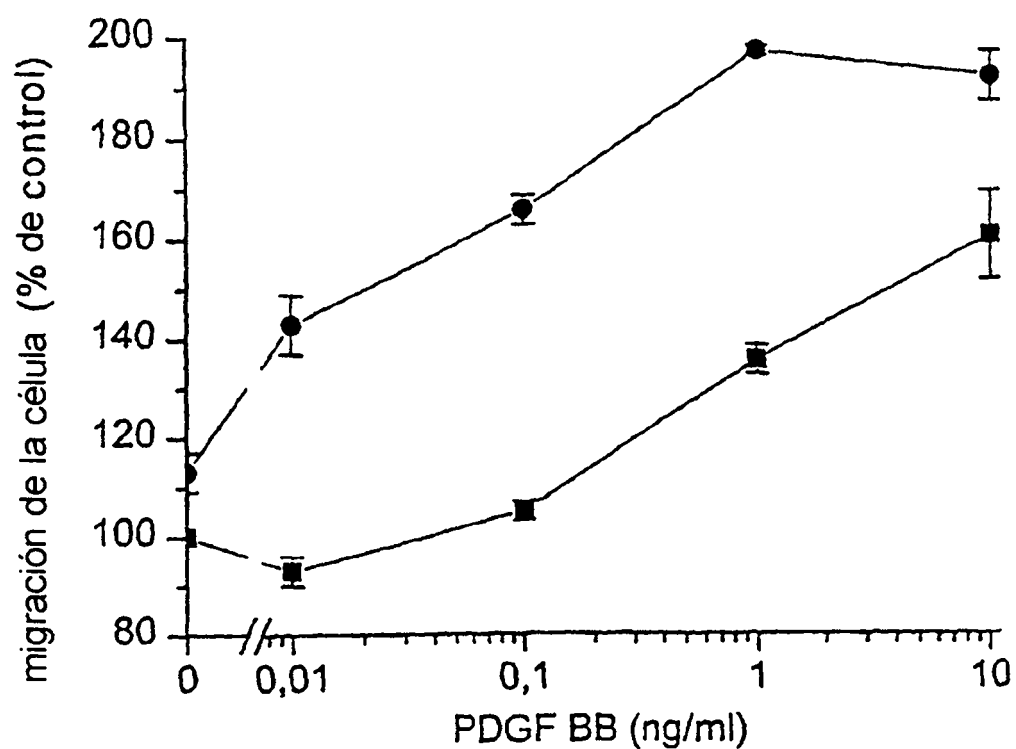


Fig. 5A

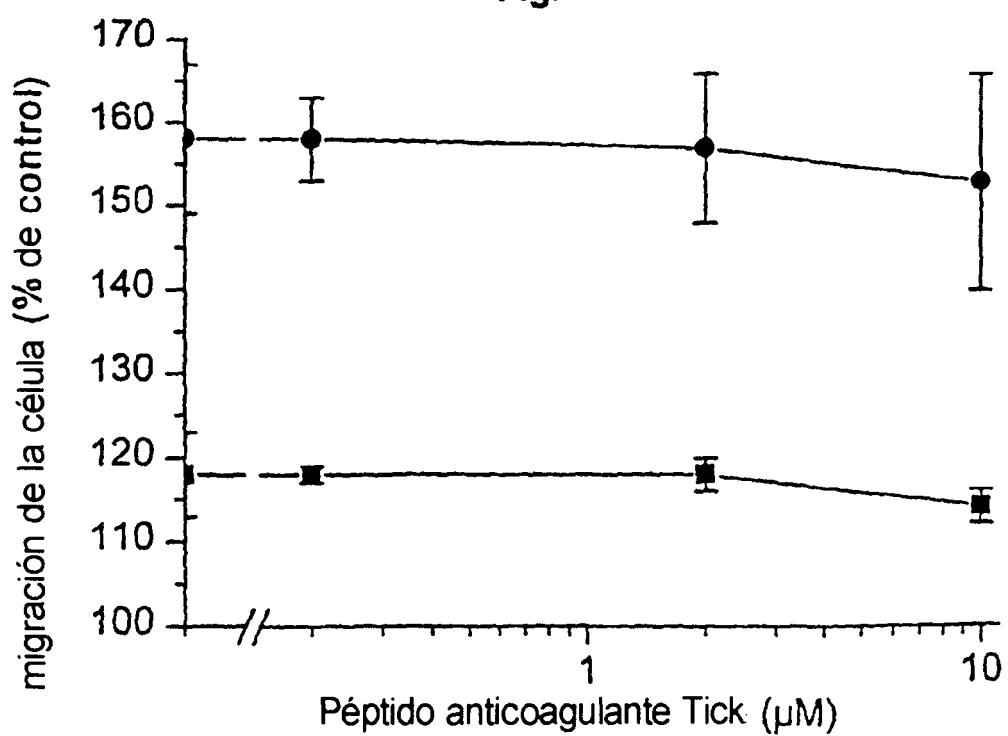


Fig. 5B

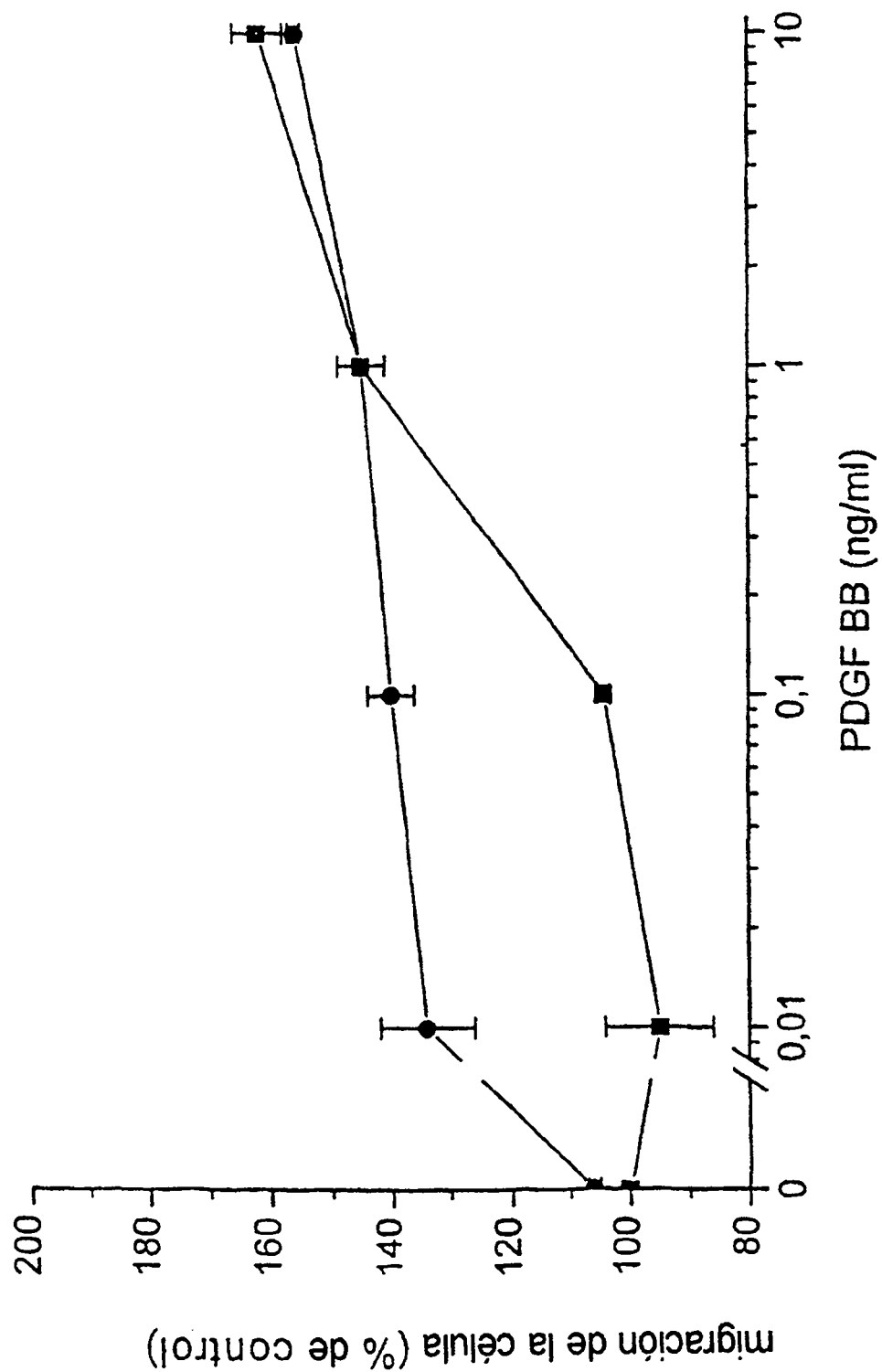


Fig. 6A

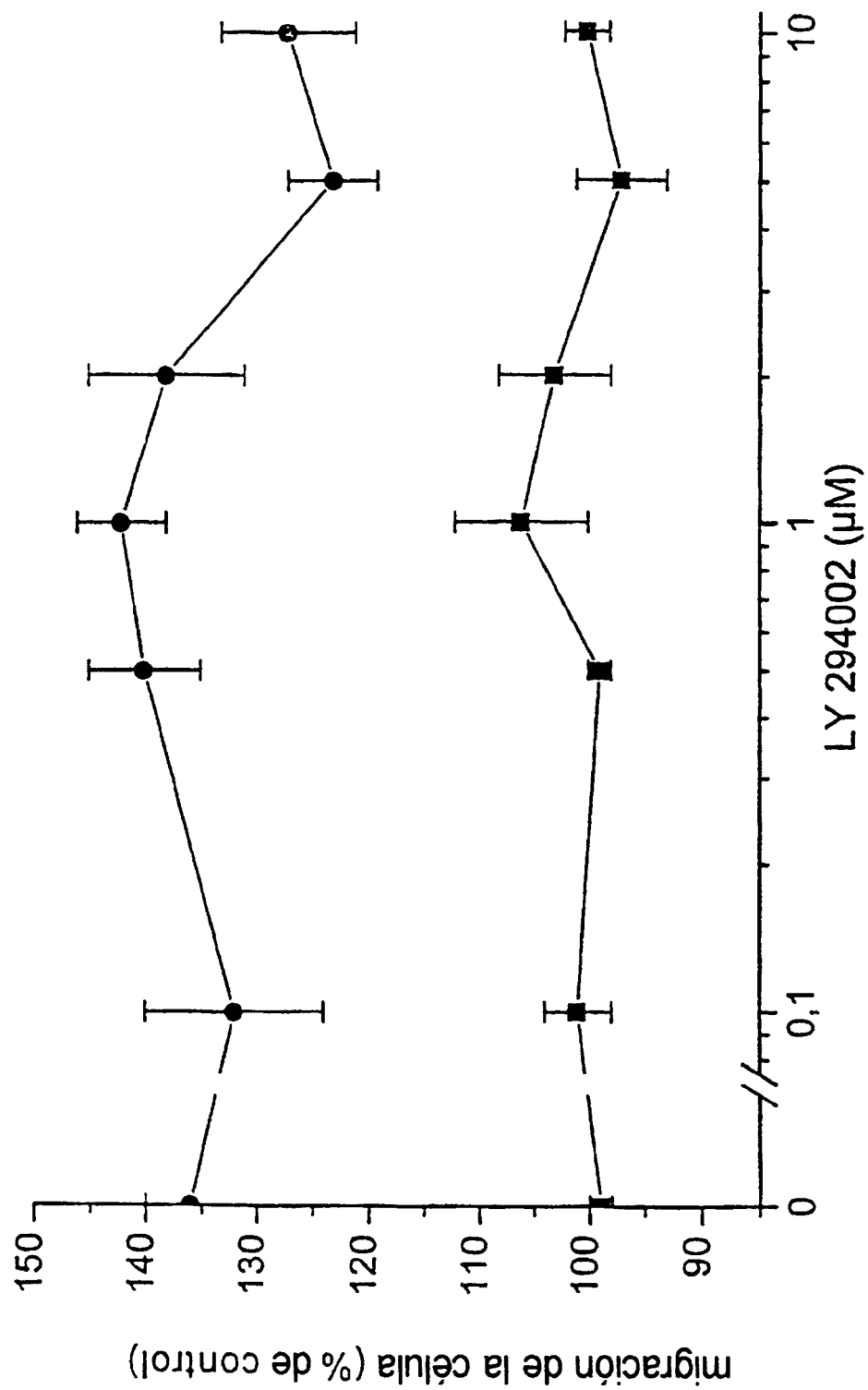


Fig. 7A

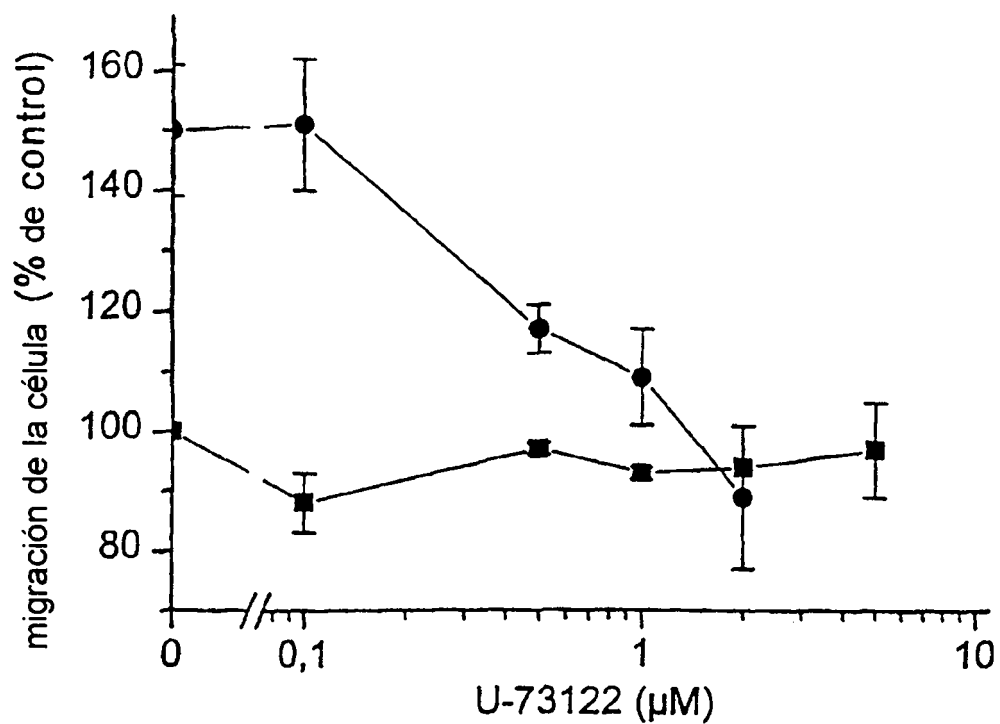


Fig. 8A

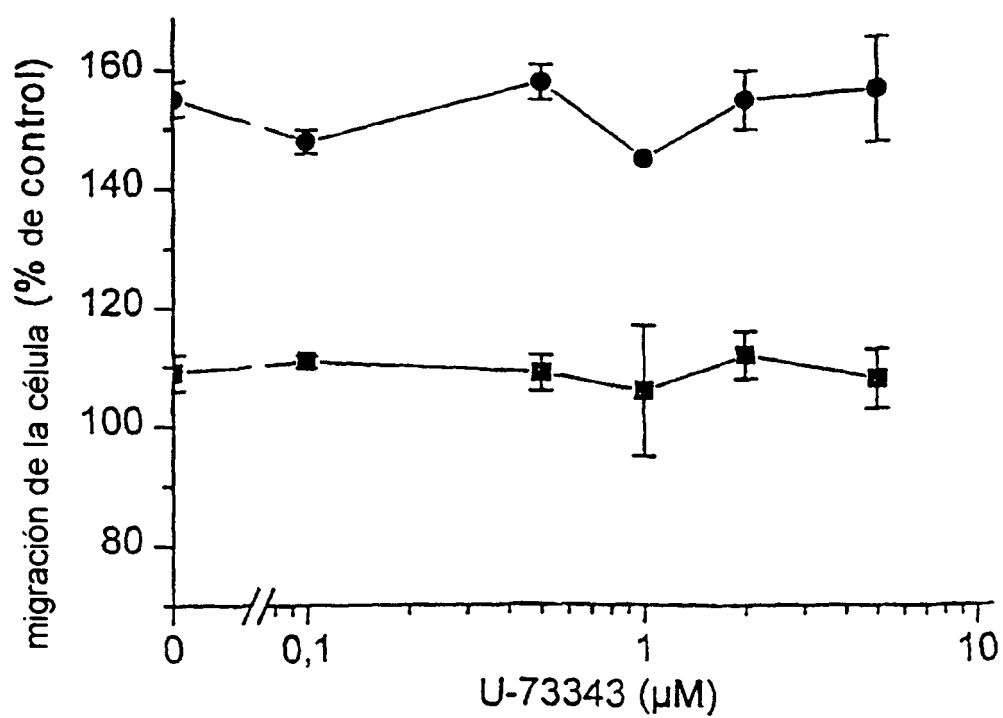


Fig. 8B

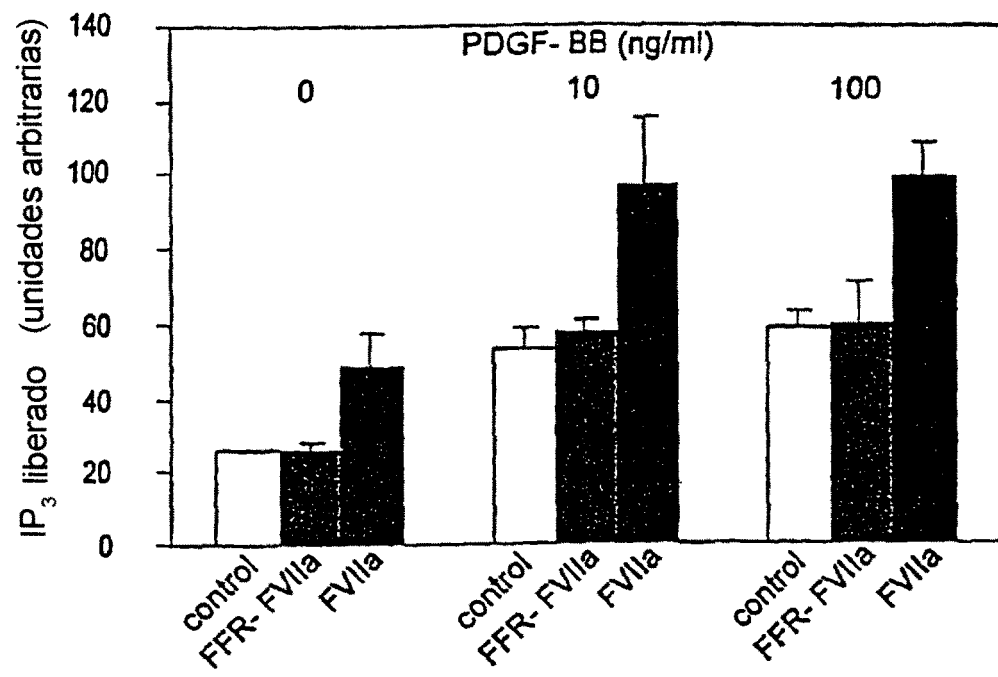


Fig. 9

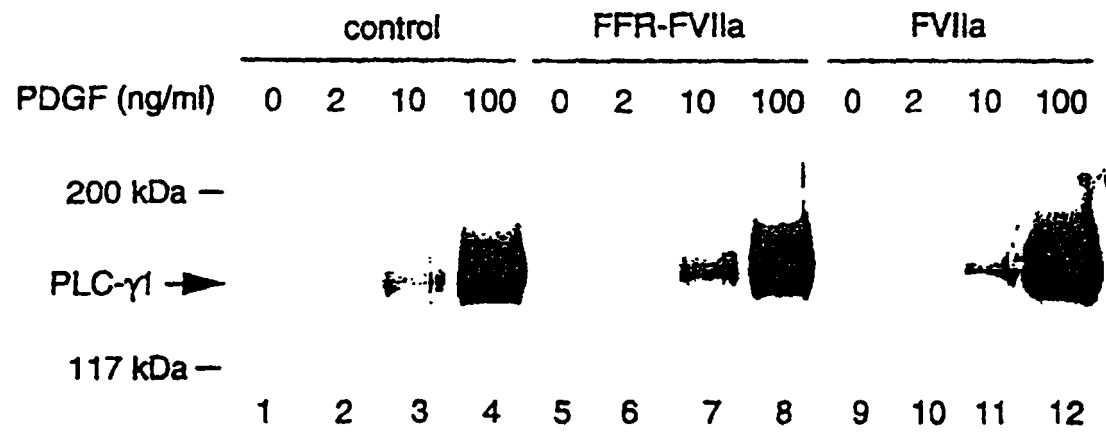


Fig. 10