



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 495**

51 Int. Cl.:
C07K 14/745 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03747838 .5**

96 Fecha de presentación : **26.09.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1549677**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54 Título: **Variantes de FVII o FVIIa que tienen actividad de coagulación mejorada.**

30 Prioridad: **30.09.2002 US 414836 P**
19.06.2003 US 479642 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.06.2011

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

72 Inventor/es: **Haaning, Jesper, Mortensen y**
Andersen, Kim, Vilbour

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 495 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

Variantes de FVII o FVIIa que tienen actividad de coagulación mejorada

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a variantes de FVII o FVIIa novedosas que comprenden L65Q de sustitución. Dichas variantes presentan actividad de coagulación mejorada. La presente invención se refiere también a uso de dichas variantes de polipéptido en terapia, en particular para el tratamiento de una variedad de trastornos relacionados con la coagulación.

Antecedentes de la invención

10 La coagulación de la sangre es un proceso que consiste en una interacción compleja de varios componentes de la sangre (o factores) que dan eventualmente como resultado un coágulo de fibrina. Por lo general, los componentes de la sangre que participan en lo que se ha denominado como "cascada de coagulación" son proenzimas o zimógenos, es decir, proteínas enzimáticamente inactivas que se convierten en una forma activa mediante la acción de un activador. Uno de estos factores de coagulación es FVII.

15 FVII es una proteína plasmática dependiente de la vitamina K sintetizada en el hígado y secretada en la sangre como una proteína monocatenaria con un peso molecular de 53 kDa (Broze y Majerus, J Biol Chem 1980; 255: 1242-1247). El zimógeno FVII se convierte en una forma activada (FVIIa) mediante escisión proteolítica en un único sitio, R152-I153, que da como resultado dos cadenas unidas por un único puente disulfuro. FVIIa en complejo con el factor tisular (FT), el complejo FVIIa, es capaz de convertir el factor IX y el factor X en sus formas activadas, seguido por las reacciones que conducen a una rápida producción de trombina y la formación de fibrina (Østerud y Rapaport, Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 5260-5264).

20 FVII experimenta modificaciones después de la traducción, incluyendo carboxilación dependiente de vitamina K, dando como resultado diez restos de ácido γ -carboxiglutámico en la región N-terminal de la molécula. De esta manera, los números de restos 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 y 35 que se muestran en la SEC DE ID N^o: 1 son restos de ácidos γ -carboxiglutámicos en el dominio Gla importantes para la actividad de FVII. Otras modificaciones después de la traducción incluyen la unión de un resto azúcar a dos sitios de N-glicosilación que se producen naturalmente en la posición 145 y 322, respectivamente, y a dos sitios de O-glicosilación que se producen naturalmente en la posición 52 y 60, respectivamente.

30 Se ha cartografiado el gen que codifica FVII humano (hFVII) hasta el cromosoma 13 en q34-qter 9 (de Grouchy y col., Hum Genet 1984; 66: 230-233). Contiene nueve exones y tiene una extensión de 12,8 kb (O'Hara y col., Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 5158-5162). Esta organización génica y estructura proteica de FVII son similares a las de otras proteínas procoagulantes dependientes de vitamina K, con exones la y 1b que codifican la secuencia señal, el exón 2 el propéptido y el dominio Gla; el exón 3 una corta región hidrófoba; los exones 4 y 5 los dominios del tipo del factor de crecimiento epidérmico, y del exón 6 al 8 en el dominio catalítico de la serina proteasa (Yoshitake y col., Biochemistry 1985; 24: 3736-3750).

35 Existen informes sobre estructuras tridimensionales experimentales de hFVIIa (Pike y col., PNAS USA 1999; 96: 8925-30 y Kemball-Cook y col., J Struct Biol 1999; 127: 213-223), de hFVIIa en complejo con factor tisular soluble usando procedimientos cristalográficos de rayos X (Banner y col., Nature 1996; 380: 41 y Zhang y col., J Mol Biol 1999; 285: 2089), y de fragmentos más pequeños de hFVII (Muranyi y col., Biochemistry 1998; 37: 10605 y Kao y col., Biochemistry 1999; 38: 7097).

40 Se ha informado de algunas variantes de proteínas FVII diseñadas (Dickinson y Ruf, J Biol Chem 1997; 272: 19875-19879; Kemball-Cook y col., J Biol Chem 1998; 273: 8516-8521; Bharadwaj y col., J Biol Chem 1996; 271: 30685-30691; Ruf y col., Biochemistry 1999; 38: 1957-1966, Documentos US 5.560.580; US 5.288.629; WO 01/83725; WO 02/22776; WO 02/077218; WO 03/027147; WO 02/38162; WO 03/037932; WO 99/20767; WO 00/66753 y WO 01/58935).

45 Existen informes sobre la expresión de FVII en BHK u otras células de mamíferos (documentos WO 92/15686, WO 91/11514 y WO 88/10295) y la expresión simultánea de FVII y la endoproteasa kex2 en células eucariotas (WO 00/28065).

Preparaciones comerciales de FVIIa recombinante humano se comercializan como NovoSeven®. NovoSeven® está indicado para el tratamiento de episodios de hemorragia en pacientes con hemofilia A o B. NovoSeven® es la única rFVIIa para el tratamiento eficaz y fiable disponible en el mercado para episodios de hemorragias.

50 Se ha informado en el documento WO 91/11514 de una forma inactiva de FVII en la cual la arginina 152 y/o la isoleucina 153 está/están modificadas. Estos aminoácidos están localizados en el sitio de inactivación. El documento WO 96/12800 describe la inactivación de FVIIa por un inhibidor de la serina proteasa. Petersen y col., Eur J Biochem 1999; 261: 124-129 han descrito la inactivación por carbamilación de FVIIa en el grupo α -amino ácido I153. La forma inactivada es capaz de

competir con las FVII o FVIIa naturales por la unión a TF e inhibir la actividad de coagulación. Se ha sugerido el uso de la forma inactivada de FVIIa para el tratamiento de pacientes que están en estados hipercoagulables, tales como pacientes con sepsis, en riesgo de infarto de miocardio o de apoplejía trombótica.

5 El documento WO 98/32466 sugiere que FVII, entre otras muchas proteínas, puede PEGilarse, pero no contiene ninguna información a este respecto.

El documento WO 01/58935 da a conocer una nueva estrategia para desarrollar moléculas de FVII o FVIIa que tienen, *entre otras*, una semivida aumentada.

10 Se ha informado de una semivida de rFVIIa en circulación de 2,3 horas en "Summary Basis for Approval for NovoSeven®", FDA número de referencia 96-0597. Son necesarias dosis relativamente elevadas y una administración frecuente para alcanzar y sostener el efecto terapéutico o profiláctico deseado. En consecuencia es difícil obtener una regulación de la dosis adecuada, y la necesidad de frecuentes administraciones intravenosas impone restricciones en el modo de vida del paciente

15 El tratamiento con rFVIIa podría volverse más eficaz si se pudiera usar una forma de FVIIa diseñada de tal modo que esté mejorada su unión al FT. Sin desear quedar vinculado a una teoría específica, dicha variante FVIIa podría mejorar el tratamiento mediante el siguiente mecanismo: una molécula de FVIIa modificada con afinidad aumentada por FT podría permitir un tratamiento más eficaz de la hemorragia debido a su capacidad de sustituir la FVII inactiva o la FVIIa inactivada en el FT mediando por ese medio una amplificación más fuerte de la ruta de la coagulación y aceleraría por tanto el proceso de formación del coágulo y mediaría incluso posiblemente la formación de un coágulo más fuerte. De esta manera, dicha FVIIa mejorada podría ser más eficaz en la detención de sangrados incontrolados, por ejemplo, en
20 pacientes con trauma.

25 Esta eficacia aumentada se localizará en lugares de tejido con daño debido a que este es el único lugar en el que están presentes las células (células endoteliales) que soportan el FT activo. De esta manera, además de la eficacia aumentada, una FVIIa modificada con afinidad aumentada por el FT constituirá un tratamiento procoagulante más seguro debido a la localización de la actividad en los sitios de lesión tisular, es decir, en las células que se exponen procedentes del endotelio, es decir, en los sitios en los que es deseable un aumento de actividad procoagulante.

30 De acuerdo con esto, el principal objeto de la presente invención es proporcionar variantes de FVII/FVIIa con una eficacia de coagulación mejorada, tal como una actividad de coagulación mejorada (tiempo de coagulación reducido) y/o una capacidad para generar coágulos más fuertes. Las variantes pueden diseñarse adicionalmente para obtener una afinidad de unión a la membrana de fosfolípidos aumentada. Dichas variantes aumentarán la eficacia de FVIIa incluso adicionalmente debido a que la molécula puede dirigir el FT presente en las plaquetas a través de su fusión con las así denominadas micropartículas germinadas procedentes por ejemplo de monocitos que producen FT. Este direccionamiento localizará simultáneamente el aumento en la generación de Factor X con el resto de la cascada de coagulación, es decir, en el sitio de formación de la trombina y la fibrina.

35 Otro problema con el tratamiento de rFVIIa actual es la relativa inestabilidad de la molécula frente a la degradación proteolítica. La degradación proteolítica es un obstáculo principal para obtener una preparación en disolución en oposición a un producto liofilizado. La ventaja de obtener una preparación soluble estable se basa en una manipulación más fácil para el paciente, y, en el caso de emergencias, una acción más rápida, que potencialmente puede llegar a salvar la vida. Se han dado a conocer intentos para evitar la degradación proteolítica mediante mutagénesis sitiodirigida en los principales sitios proteolíticos en el documento WO 88/10295. Se describe otro intento de preparar formulaciones líquidas estabilizadas de FVII/FVIIa en el documento WO 03/055512.

40 De esta manera, un objeto adicional de la presente invención es proporcionar variantes de FVII/FVIIa que, además de las propiedades mejoradas anteriormente mencionadas, sean más estables frente a la degradación proteolítica, es decir, posean sensibilidad reducida frente a la degradación proteolítica.

45 El documento WO 02/38162 se refiere a la modificación de FVIIa para aumentar la actividad amidolítica en ausencia de factor tisular y afinidad por factor tisular cuando se compara con el factor natural Vila, aunque sin alterar la actividad proteolítica cuando se une al factor tisular.

50 El documento WO 01/589 se refiere a conjugados del polipéptido FVII o FVIIa que comprenden al menos un resto no polipéptido unido covalentemente a un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido difiere de la del FVII o FVIIa naturales en que al menos se ha introducido o eliminado un resto aminoácido que comprende un grupo de unión de dicho resto no polipéptido.

Cheung Wing-Fai y col. (1995), Thrombosis Research, 80, 419-427, se refieren a la localización de un epítipo dependiente de metal en FVII.

Dickinson y col. (1996), Proc Natl Acad Sci USA. 93, 14379-14384, informan de un estudio que se refiere a la identificación

de restos superficiales implicados en la unión del factor tisular y la función catalítica de FVII. Dickinson *et al.*, informan que Gln-64, Ile-69, Phe-71, Arg-79, Arg-277, Met-306 y Asp-30 tienen una influencia energética.

5 Dickinson *et al.* (1997) *Journal of Biological Chemistry*, 272, 19875-19879, informan de un estudio de afinidades por zimógenos y especies de enzimas de FVII naturales y de mutantes y restos del dominio de la proteasa que entran en contacto con FT. Los autores concluyen que la unión de FT no está influenciada por la activación del zimógeno, y que existe una interdependencia conformacional bidireccional entre el resto Met306 y el sitio activo de FVII.

Petrovan *et al.*, (2001) *J Biol Chem*. 276, 6616-6620, informan que el resto Met 156 contribuye a la conformación lábil de la enzima del factor de coagulación VIIa.

10 Sridhara *et al.*, (1996), *Am J Hematol.*, 53, 66-71, es un estudio del efecto de las mutaciones R152Q y R79Q en un ensayo ELISA que concluye que ambos estados de activación del factor VII y la mutación de los restos aminoácidos en el interior del dominio tipo factor de crecimiento epidérmico pueden alterar la afinidad del factor VII por el factor tisular.

El documento WO 00/66753 se refiere a la afinidad de unión a la membrana de polipéptidos dependientes de la vitamina K entre los que se incluyen FVII. Se mencionan sustituciones de aminoácidos en el aminoácido 5, 9, 11, 12, 29, 33, 34, 35, o 36.

15 El documento US 5.580.560 se refiere a la modificación del factor VII/VIIa para la estabilización frente a la escisión proteolítica.

20 Una molécula con una semivida en circulación más larga disminuirá el número de administraciones necesarias. Dada la asociación del producto FVIIa actual con frecuentes inyecciones, y del potencial para obtener más niveles de FVIIa terapéuticos óptimos con efecto terapéutico potenciado simultáneo, existe una clara necesidad de moléculas de FVII o FVIIa con una semivida en circulación aumentada. Un medio de aumentar la semivida en circulación de una proteína es asegurar que se reduce el aclaramiento renal de la proteína. Esto se puede conseguir conjugando la proteína con un resto químico que sea capaz de conferir aclaramiento renal reducido a la proteína. Además, la unión de un resto químico a la proteína o la sustitución de los aminoácidos expuestos a proteólisis puede bloquear eficazmente una encima proteolítica del contacto que conduce a la degradación proteolítica de la proteína. El polietilenglicol (PEG) es uno de dichos restos químicos que se han usado en la preparación de productos terapéuticos de proteína.

25 De esta manera, un objetivo más adicional de la presente invención es proporcionar variantes de FVII/FVIIa que, además de las propiedades mejoradas anteriormente mencionadas, tengan una semivida funcional *in vivo* aumentada y una semivida en suero aumentada.

30 Los objetivos anteriormente mencionados se cumplen mediante las variantes de FVII/FVIIa dadas a conocer en el presente documento.

Breve divulgación de la invención

35 La presente invención proporciona variantes de FVII o FVIIa recombinantes mejoradas que comprenden la sustitución L65Q. Esta sustitución de aminoácido en el sitio de unión FT de la molécula de FVII da como resultado una actividad de coagulación mejorada. Las variantes de la invención difieren del Factor VII humano o del factor VIIa humano (SEQ ID NO: 1) en no más de 15 restos aminoácidos.

40 En formas de realización interesantes, se ha modificado adicionalmente la variante FVII o FVIIa de tal manera que la variante resultante tiene una afinidad de unión a la membrana de fosfolípidos potenciada, semivida funcional *in vivo* aumentada y/o semivida en plasma aumentada. En otras formas de realización adicionales, la variante se ha modificado adicionalmente de tal manera que posea biodisponibilidad aumentada y/o sensibilidad reducida a la degradación proteolítica. Consiguientemente, el tratamiento médico con dicha variante ofrece numerosas ventajas sobre el compuesto de rFVIIa actualmente disponible, tal como una dosificación inferior, acción más rápida en sangrados incontrolados y, opcionalmente, duración más larga entre inyecciones.

45 En un aspecto, la invención se refiere a una variante de polipéptido del Factor VII (FVII) o Factor VIIa (FVIIa) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende 1-15 modificaciones de aminoácidos con respecto al Factor VII humano (hFVII) o Factor VIIa humano (hFVIIa) que tiene la secuencia de aminoácido que se muestra en SEQ ID NO: 1, en el que dicha secuencia variante comprende la sustitución L65Q

con la condición que dicha variante no sea

[K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII o

[A 1Y+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII o

50 [A1Y+A3S+F4GK+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII o

[A1Y+L8F+R9V+P10Q+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII o

[A1Y+A3S+F4GK+L8F+R9V+P10Q+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII o

[A3S+F4GK+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII o

[A3S+F4GK+L8F+R9V+P10Q+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII o

5 [L8F+R9V+P10Q+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII o

[I42N]hFVII/hFVIIa o [I42S]hFVII/hFVIIa or [I42A]hFVII/hFVIIa o

[I42Q]hFVII/hFVIIa.

10 En un segundo aspecto, la invención se refiere a una variante de polipéptido del Factor VIIa (FVIIa) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende 1-15 modificaciones de aminoácidos con respecto al Factor VIIa humano (hFVIIa) que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1, en el que dicha secuencia variante comprende la sustitución. Las variantes de FVII que comprenden la mutación L39E dada a conocer por Cheung y Stafford en Throm Res 1995;79:199-206 no está, comprendidas en el alcance de la presente solicitud. Igualmente, las variantes de FVII/FVIIa que comprenden las mutaciones I42N/S/A/Q dadas a conocer en el documento US 5.580.560 no están comprendidas en el alcance de la presente solicitud.

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

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

En un aspecto más adicional, la invención se refiere a una célula huésped que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención o el vector de expresión de la invención.

20 En otro aspecto más adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la variante de la invención, y un vehículo o excipiente farmacéutico aceptable.

Otro aspecto más de la invención se refiere a la variante de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, para uso como medicamento.

25 Aspectos adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente memoria descriptiva así como de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

30 La Fig. 1 muestra el tiempo de coagulación frente a la concentración de [L65Q]rhFVIIa, [S43Q]rhFVIIa, [L39E]rhFVIIa y [E82Q]rhFVIIa cuando se ensayó en la "Prueba de Sangre Completa". Se incluyen para comparación los resultados de rhFVIIa (activado con OSII) y NovoSeven®. 0 rhFVIIa (activado con OSII); ♦ NovoSeven®; ● [L65Q]rhFVIIa; ▲ [S43Q]rhFVIIa; x [L39E]rhFVIIa; ○ [E82Q]rhFVIIa.

La Fig. 2 muestra el tiempo de coagulación frente a la concentración de [I42R]rhFVIIa y [L39Q]rhFVIIa cuando se ensayó en la "Prueba de Sangre Completa". Se incluye para comparación, el resultado de NovoSeven®. ♦ NovoSeven®; 0 [I42R]rhFVIIa; ● [L39Q]rhFVIIa.

35 La Fig. 3 muestra el tiempo de coagulación frente a la concentración de [F71D]rhFVIIa, [K62E]rhFVIIa, [F71Y]rhFVIIa, [L65S]rhFVIIa y [F71E]rhFVIIa cuando se ensayó en la "Prueba de Sangre Completa". Se incluye para comparación el resultado de NovoSeven®. ♦ NovoSeven®; ◇ [F71D]rhFVIIa; ● [K62E]rhFVIIa; o [F71Y]rhFVIIa; x [L65S]rhFVIIa; ▲ [F71E]rhFVIIa.

Divulgación detallada de la invención

Definiciones

40 En el contexto de la presente solicitud y de la invención, se aplican las siguientes definiciones:

45 El término "conjugado" (o indistintamente, "variante de polipéptido conjugado") se pretende que indique una molécula heterogénea (en el sentido de material compuesto o quimérico) formada por el enlace covalente de uno o más polipéptido(s) con uno o más restos no polipéptidos tales como moléculas poliméricas, compuestos lipófilos, restos azúcar o agentes de derivatización orgánicos. Preferiblemente, el conjugado es soluble a concentraciones y condiciones relevantes, es decir, soluble en fluidos fisiológicos tales como sangre. Los ejemplos de variantes de polipéptido conjugados de la invención incluyen polipéptidos glicosilados y/o PEGilados.

El término “enlace covalente” o “unido covalentemente” significa que la variante de polipéptido y el resto no polipéptido se unen tanto como covalentemente de manera directa entre sí, o bien se unen covalentemente de manera indirecta entre sí a través de un resto o restos de intervención, tales como puente, separador, o resto o restos de enlace.

5 Cuando se usa en el presente documento, el término “resto no polipéptido” significa una molécula que es capaz de conjugarse con un grupo de enlace de la variante del polipéptido de la invención. Los ejemplos preferidos de dichas moléculas incluyen moléculas de polímeros, restos azúcar, compuestos lipófilo, o agentes de derivatización orgánicos, en particular restos azúcar. Cuando se usa en el contexto de una variante de polipéptido de la invención que entenderá que el resto no polipéptido está unido a la parte del polipéptido de la variante de polipéptido a través de un grupo de enlace de la variante de polipéptido. Tal como se explicó anteriormente, se puede unir covalentemente de manera directa el resto no polipéptido con el grupo de enlace o se puede unir covalentemente de manera indirecta con el grupo de enlace a través de un resto o restos de intervención, tales como un puente, separador o resto o restos de enlace

15 Una “molécula de polímero” es una molécula formada por el enlace covalente de dos o más monómeros, en el que ninguno de los monómeros es un resto aminoácido. El término “polímero” se puede usar indistintamente con el término de “molécula de polímero”. Se pretende también que el término cubra las moléculas de carbohidrato unidas mediante glicosilación *in vitro*, es decir, una glicosilación sintética llevada a cabo *in vitro* normalmente que implica unir covalentemente una molécula de carbohidrato a un grupo de enlace de la variante de polipéptido, usando opcionalmente un agente de reticulación. Se describe además en detalle la glicosilación *in vitro* a continuación.

20 El término “resto azúcar” se pretende que indique una molécula que contiene carbohidrato que comprende uno o más restos monosacáridos, capaces de unirse a la variante de polipéptido (para producir un conjugado de la variante de polipéptido en la forma de una variante de polipéptido glicosilado) por medio de glicosilación *in vivo*. El término “glicosilación *in vivo*” se pretende que signifique cualquier enlace de un resto azúcar que se produce *in vivo*, es decir, durante el procesamiento postraduccional en una célula de glicosilación usada para la expresión de la variante de polipéptido, por ejemplo, por medio de glicosilación enlazada a N o enlazada a O. La estructura exacta del oligosacárido depende, en una gran extensión, en el organismo de glicosilación en cuestión.

25 Un “sitio de N-glicosilación” tiene la secuencia N-X-S/T/C, en la que X es cualquier resto aminoácido excepto prolina, N es asparagina y D/T/C es tanto serina, treonina o cisteína, preferiblemente serina o treonina, y lo más preferible treonina. Preferible, el resto aminoácido en posición +3 con respecto al resto asparagina no es un resto prolina.

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

30 Se pretende que la expresión “grupo de enlace” indique un grupo funcional de la variante de polipéptido, en particular de uno de sus restos aminoácidos o un resto carbohidrato, capaz de unirse a un resto no polipéptido tal como una molécula de polímero, una molécula lipófila, un resto azúcar o un agente de derivatización orgánico. Los grupos de enlace útiles y sus restos no polipéptidos correspondientes son evidentes a partir de la siguiente tabla.

Grupo de enlace	Aminoácido	Ejemplos de restos no polipéptidos	Procedimiento de conjugación (PEG activado)	Referencia
-NH ₂	Extremo N, Lys	Polímero, por ejemplo, PEG con grupo amida o imina	mPEG tresilado con mPEG-SPA	Shearwater Inc. Delgado y col., <i>Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems</i> 9 (3,4):249-304 (1992)
-COOH	Extremo C, Asp, Glu	Polímero, por ejemplo, PEG, resto carbohidrato con grupo éster o amida	Acoplamiento <i>in vitro</i> con mPEG-Hz	Shearwater Inc.

(continuación)

Grupo de enlace	Aminoácido	Ejemplos de restos no polipéptidos	Procedimiento de conjugación (PEG activado)	Referencia
-SH	Cys	Polímero, por ejemplo, PEG, resto	Acoplamiento <i>in vitro</i> de PEG maleimida y	Shearwater Inc. Delgado y col, critical

		carbohidrato con grupo disulfuro, maleimida o vinil sulfona	PEG-vinilsulfona	reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9 (3,4):249-304 (1992)
-OH	Ser, Thr, Lys, -OH	Resto azúcar PEG con éster, éter, carbamato, carbonato	Glicosilación enlazada con O <i>in vivo</i>	
-CONH ₂	Asn como parte de un sitio de N-glicosilación	Polímero con resto azúcar, por ejemplo, PEG	N-glicosilación <i>in vivo</i>	
Resto aromático	Phe, Tyr, Trp	Resto carbohidrato	Acoplamiento <i>in vitro</i>	
-CONH ₂	Gln	Resto carbohidrato	Acoplamiento <i>in vitro</i>	Yan y Wold, Biochemistry, 1984, Jul 31; 23(16): 3759-65
Aldehído cetona	Oligosacárido oxidado	Polímero, por ejemplo PEG, PEG-hidrazida	PEGilación	Andresz y co., 1978, Makromol. Chem. 179:301, WO 92/16555, WO 00/23114
Guanidino	Arg	Resto carbohidrato	Acoplamiento <i>in vitro</i>	Lundblad y Noyes, Chichal Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc., Florida, EE.UU.
Anillo de imidazol	His	Resto carbohidrato	Acoplamiento <i>in vitro</i>	Como para guanidina

5 Para la N-glicosilación *in vivo*, la expresión "grupo de enlace" se usa de una manera no convencional para indicar los restos aminoácidos que constituyen un sitio de N-glicosilación (con la secuencia N-X-S/T/C, en el que X es cualquier resto aminoácido excepto prolina, N es asparagina y S/T/C es cualquiera de serina, treonina o cisteína, preferiblemente serina o treonina, y lo más preferible treonina). Aunque es resto asparagina del sitio de la N-glicosilación es uno al cual se une el resto azúcar durante la glicosilación, dicha unión no se puede conseguir a no ser que estén presentes los otros restos aminoácidos del sitio de la N-glicosilación.

10 De acuerdo con esto, cuando el resto no polipéptido es un resto azúcar y la conjugación es para conseguirse mediante N-glicosilación *in vivo*, debe entenderse que la expresión "resto aminoácido que comprende un grupo de enlace para el resto no polipéptido" tal como se usa junto con las alteraciones de la secuencia de aminoácidos de la variante de polipéptido significa que uno o más restos aminoácidos que constituyen un sitio de N-glicosilación *in vivo* se van a alterar de tal manera que cualquiera de un sitio de N-glicosilación funcional *in vivo* se introduce en la secuencia de aminoácidos o se elimina de dicha secuencia.

15 En la presente solicitud, se usan nombres de aminoácidos y nombres de átomos (por ejemplo, CA, CB, CD, CG, SG, NZ, N, O, C, etc) tal como se define por el Protein DataBank (PDB) (www.pdb.org) basado en la nomenclatura de la IUPAC (IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (nombres de restos, nombres de átomos, etc), Eur. J. Biochem., 138, 9-37 (1984) junto con sus correcciones en Eur. J. Biochem., 152, 1 (1985)).

20 El término "resto aminoácido" se pretende que indique un resto aminoácido contenido en el grupo que consiste en restos alanina (Ala o A), cisteína (Cys o C), ácido aspártico (Asp o D), ácido glutámico (Glu o E), fenilalanina (Phe o F), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), lisina (Lys o K), leucina (Leu o L), metionina (Met o M), asparagina (Asn o N), prolina (Pro o P), glutamina (Gln o Q), arginina (Arg o R), serina (Ser or S), treonina (Thr o T), valina (Val or V), triptófano (Trp or W), y tirosina (Tyr o Y).

25 La terminología usada para identificar posiciones de aminoácidos se ilustra de la siguiente forma: G124 indica que la posición 124 está ocupada por un resto glicina en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ NO: 1. G124R indica que el resto glicina de posición 124 se ha sustituido con un resto arginina. Se indican sustituciones alternativas con

un “/”, por ejemplo, N145S/T significa una secuencia de aminoácidos en la que la asparagina en la posición 145 está sustituida con cualquiera de serina o treonina. Se indican múltiples sustituciones con un “+”, por ejemplo K143N+N145S/T significa una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución del resto lisina en posición 143 con un resto asparagina y una sustitución del resto asparagina en posición 145 con un resto serina o un resto treonina. La inserción de un resto aminoácido adicional, tal como la inserción de un resto alanina después de G124 se indica mediante G124GA. La inserción de dos restos alanina adicionales después de G124 se indica mediante G124GAA, etc. Cuando se usa en el presente documento, el término “insertado en posición X” o “insertado en la posición X” significa que el(los) resto(s) aminoácido(s) está(n) insertado(s) entre el resto aminoácido X y el X+1. Una delección de un resto aminoácido se indica mediante un asterisco. Por ejemplo, la delección del resto glicina en posición 124 está indicada mediante G124*.

A no ser que se indique otra cosa, la numeración de los restos aminoácidos realizada en el presente documento se hace con respecto a la secuencia de aminoácidos de FVII/FVIIa natural (SEQ ID NO: 1).

El término “difere de”, tal como se usa junto con mutaciones específicas se pretende que permita que estén presentes diferencias adicionales aparte de la diferencia de aminoácido especificada. Por ejemplo, además de las sustituciones especificadas en las posiciones, 39, 42, 43, 62, 65, 71, 82 y/o 275, la variante del polipéptido FVII o FVIIa puede comprender otras sustituciones. Los ejemplos de dichas modificaciones o diferencias adicionales pueden incluir el truncamiento del extremo N y o el C por uno o más restos aminoácidos (por ejemplo, por 1-10 restos aminoácidos), o la adición de uno o más restos extra en el extremo N y o el C, por ejemplo, la adición de un resto metionina en el extremo N, así como, las “sustituciones conservativas de aminoácido”, es decir, las sustituciones llevadas a cabo en el interior de grupos de aminoácidos con características similares, por ejemplo, pequeños aminoácidos, aminoácidos ácidos, aminoácidos polares, aminoácidos básicos, aminoácidos hidrófobos y aminoácidos aromáticos.

En la siguiente tabla se muestran ejemplos de dichas sustituciones conservativas

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

Otros ejemplos más de modificaciones adicionales incluyen modificaciones que proporcionan un aumento en una semivida funcional *in vivo* aumentada o una semivida en suero aumentada. Se discuten adicionalmente a continuación ejemplos específicos de dichas modificaciones. Además, la variante de polipéptido de la invención puede contener modificaciones adicionales que proporcionan un aumento en la afinidad de unión en una membrana de fosfolípidos potenciada. Se proporcionan a continuación ejemplos específicos.

La expresión “secuencia de nucleótidos” se pretende que indique un tramo consecutivo de dos o más moléculas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, de ADNc, de ARN, semisintético, sintético, o cualquiera de sus combinaciones.

La expresión “reacción en cadena de la polimerasa” o “PCR” se refiere por lo general a un procedimiento de amplificación de una secuencia de nucleótidos deseada *in vitro*, tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 4.683.195. En general, el procedimiento de la PCR implica ciclos repetidos de síntesis de extensión del cebador, usando cebadores de oligonucleótidos capaces de hibridarse preferentemente con una plantilla de ácido nucleico.

El término “vector” se refiere a un plásmido u otras secuencias de nucleótidos que son capaces de replicarse en el interior de una célula huésped o de integrarse en el genoma de la célula huésped, y como tales, son útiles para llevar a cabo diferentes funciones junto con células huéspedes compatibles (un sistema vector-huésped): para facilitar la clonación de la secuencia de nucleótidos, es decir, para producir cantidades utilizables de la secuencia, para dirigir la expresión del producto génico codificado por la secuencia y para integrar la secuencia de nucleótidos en el genoma de la célula huésped. El vector contendrá diferentes componentes dependiendo de la función que éste lleve a cabo.

“Célula”, “célula huésped”, “línea celular” y “cultivo celular” se usan indistintamente en el presente documento y debe entenderse que todos estos términos incluyen la progenie resultante del crecimiento o el cultivo de una célula.

“Transformación” y “transfección” se usan indistintamente para referirse al proceso de introducir ADN en una célula.

“Unido de manera operable” se refiere a la unión covalente de dos o más secuencias de nucleótidos, por medio de ligadura enzimática u de otra manera, en una configuración relativa entre sí de tal manera que se puede llevar a cabo la función normal de las secuencias. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica una presecuencia o líder secretora se une de manera operable con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido si ésta se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido: un promotor o potenciador se une de manera operable con una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; un sitio de unión a ribosoma se une de manera operable con una secuencia de codificación si se sitúa de tal manera que facilita la traducción. Por lo general, “unido de manera operable” significa que las secuencias de nucleótidos que se unen son contiguas y, en el caso de la líder secretora, contiguas y en fase de lectura. La unión se lleva a cabo mediante ligadura en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan entonces oligonucleótidos adaptadores sintéticos, junto con procedimientos de ADN recombinante normalizados.

En el contexto de la presente invención, se pretende que los términos “modificación” o “modificación de aminoácidos” cubran la sustitución de una cadena lateral de aminoácido, la sustitución de un resto aminoácido, la delección de un resto aminoácido y/o la inserción de un resto aminoácido de interés.

Los términos “mutación” y “sustitución” se usan indistintamente en el presente documento.

El término “introduce” se refiere a la introducción de un resto aminoácido mediante la sustitución de un resto aminoácido existente, o alternativamente mediante la inserción de un resto aminoácido adicional.

El término “eliminar” se refiere a la eliminación de un resto aminoácido mediante la sustitución del resto aminoácido que se va a eliminar por otro resto aminoácido, o alternativamente mediante la delección (sin sustitución) del resto aminoácido que se va a eliminar.

El término “FVII” o “polipéptido FVII” se refiere a una molécula de FVII proporcionada en forma monocatenaria. Un ejemplo de un polipéptido FVII es el FVII humano natural (hFVII) que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1. Debe entenderse, sin embargo, que el término “polipéptido FVII” cubre también moléculas tipo hFVII, tales como fragmentos o variantes de SEQ ID NO: 1, en particular variantes en las que la secuencia comprende al menos una, tal como 1-15, preferiblemente 1-10, modificaciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 1.

El término “FVIIa” o “polipéptido FVIIa” se refiere a una molécula de FVIIa proporcionada en su forma bicatenaria activada. Cuando se usa la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: para describir la secuencia de aminoácidos de FVIIa se entenderá que se ha escindido el enlace peptídico entre R152 e I153 de la forma monocatenaria, y que una de las cadenas comprende los restos aminoácidos 1-152, la otra los restos aminoácidos 153-406.

Los términos “rFVII” y “rFVIIa” se refieren a moléculas de FVII y FVIIa producidas mediante técnicas recombinantes, respectivamente.

Los términos “hFVII” y “hFVIIa” se refieren a FVII y FVIIa humanos naturales, respectivamente, que tienen la secuencia de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 1.

Los términos “rhFVII” y “rhFVIIa” se refieren a FVII y FVIIa naturales humanos, que tienen la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1, producida por medios recombinantes. Un ejemplo de rhFVIIa es NovoSeven®.

Cuando se usa en el presente documento, se pretende que el término “dominio Gla” abarque los restos aminoácidos nº 1 a 45 de SEQ ID NO: 1. De acuerdo con esto, la expresión “posición localizada en el exterior del dominio Gla” abarca el resto aminoácido nº 46-406 de SEQ ID NO: 1.

Las abreviaturas “FX”, “TF” y “TFPI” significan Factor X, Factor Tisular e Inhibidor de la Ruta del Factor Tisular, respectivamente.

La expresión “dominio de la proteasa” se usa aproximadamente para los restos 153-406 contados desde el extremo N.

El término “sitio catalítico” se usa para significar la tríada catalítica constituida por S344, D242 y H193 de la molécula de FVII/FVIIa.

El término “parental” se pretende que indique la molécula que se va a modificar/mejorar de acuerdo con la presente invención. Aunque el polipéptido parental que se va a modificar mediante la presente invención puede ser cualquier polipéptido FVII o FVIIa, y de esta manera derivarse de cualquier origen, por ejemplo, un origen de mamífero no humano, se prefiere que el polipéptido parental sea hFVII o hFVIIa.

- Una "variante" es un polipéptido que difiere en uno o más restos aminoácidos de su polipéptido parental, normalmente en 1-15 restos aminoácidos (por ejemplo, en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 restos aminoácidos), tales como en 1-10 restos aminoácidos, por ejemplo, en 1-8, 1-6, 1-5 o 1-3 restos aminoácidos. Normalmente, el polipéptido parental es hFVII o hFVIIa. De esta manera, una "variante" contiene normalmente 1-15 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 modificaciones de aminoácidos), tales como 1-10 modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, 1-8, 1-6, 1-5 o 1-3 modificaciones de aminoácidos con respecto al polipéptido parental. Tal como se ha explicado anteriormente, el polipéptido parental es normalmente hFVII o hFVIIa. Se entenderá que una variante de polipéptido de acuerdo con la presente invención diferirá de la SEQ ID NO: 1 en al menos una de las siguientes posiciones: L39, I42, S43, K62, L65, F71, E82 y/o F275.
- En el presente contexto, el término "modificación" abarca sus inserciones, deleciones, sustituciones y combinaciones. Se entenderá que una variante de polipéptido de acuerdo con la presente invención se modificará en al menos una posición con respecto al polipéptido parental.
- El término "actividad amidolítica" se pretende que signifique la actividad medida en el "Ensayo Amidolítico" descrito en el presente documento. A objeto de presentar "actividad amidolítica" una variante de la invención, en su forma activada, deberá tener al menos un 10% de la actividad amidolítica de rhFVIIa cuando se ensaya en el "Ensayo Amidolítico" descrito en el presente documento. En una forma de realización preferida de la invención la variante, en su forma activada, tiene al menos un 20% de la actividad amidolítica de rhFVIIa, tal como al menos un 30%, por ejemplo, al menos un 40%, más preferiblemente al menos un 50%, tal como al menos un 60%, por ejemplo, al menos un 70%, incluso más preferiblemente al menos un 80%, tal como al menos un 90% de la actividad amidolítica de rhFVIIa cuando se ensaya en el "Ensayo Amidolítico" descrito en el presente documento. En una forma de realización interesante la variante, en su forma activada, tiene sustancialmente la misma actividad amidolítica que rhFVIIa, tal como una actividad amidolítica de 75-125% de la actividad amidolítica de rhFVIIa.
- El término "actividad de coagulación" se usa para significar la actividad medida en la "Prueba de Sangre Completa" descrita en el presente documento. Se entenderá que la actividad medida en la "Prueba de Sangre Completa" es el tiempo necesario para obtener la formación del coágulo. De esta manera, un tiempo de coagulación inferior corresponde a una mayor actividad de coagulación.
- La expresión "actividad de coagulación mejorada" se usa para indicar que el tiempo de coagulación de la variante de polipéptido disminuye de manera estadísticamente significativa con respecto al generado por rhFVIIa tal como se determinó en condiciones comparables y cuando se midió en la "Prueba de Sangre Completa" descrita en el presente documento.
- El término "inmunogenicidad" tal como se usa junto con una sustancia dada se pretende que indique la capacidad de la sustancia para inducir una respuesta procedente del sistema inmune. La respuesta inmune puede ser una respuesta mediada por célula o anticuerpo (véase, por ejemplo, Roitt: Essential Immunology (8ª Edición, Blackwell) para una definición adicional de inmunogenicidad). Normalmente, una reactividad reducida al anticuerpo será una indicación de inmunogenicidad reducida. La inmunogenicidad reducida puede determinarse mediante el uso de cualquier procedimiento adecuado conocido en la materia, por ejemplo *in vivo* o *in vitro*.
- La expresión "semivida funcional *in vivo*" se usa en su significado normal, es decir, el tiempo en el cual el 50% de la actividad biológica de la variante de polipéptido seguirá estando presente en el cuerpo/órgano diana, o el tiempo en el cual la actividad amidolítica o de coagulación de la variante de polipéptido es un 50% del valor inicial.
- Como alternativa a la determinación funcional de la semivida *in vivo*, se puede determinar la "semivida en suero", es decir, el tiempo en el cual el 50% de la variante de polipéptido circula en el plasma o en el torrente sanguíneo antes de aclararse. La determinación de la semivida en suero es a menudo más sencilla que la determinación de la semivida funcional *in vivo* y la magnitud de la semivida en suero es normalmente una buena indicación de la magnitud de la semivida funcional *in vivo*. Alternativamente, los términos para semivida en suero incluyen "semivida en plasma", "semivida en circulación", "aclaramiento del suero", "aclaramiento del plasma" y "semivida por aclaramiento". La variante de polipéptido se aclara por la acción de uno o más de los sistemas reticuloendoteliales (SER), riñón, bazo o hígado, por el factor tisular, eliminación mediada por el receptor SEC u otro receptor, o mediante proteólisis específica o no específica. Normalmente, el aclaramiento depende del tamaño (con respecto al corte de la filtración glomerular), la carga, las cadenas de carbohidrato unidas, y la presencia de receptores celulares de la proteína. La funcionalidad que se va a retener se selecciona normalmente de la actividad de unión al procoagulante, proteolítica o al receptor. La semivida funcional *in vivo* y la semivida en suero se pueden determinar mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la materia.
- El término "aumentada" tal como se usa con respecto a la semivida funcional *in vivo* o la semivida en suero se usa para indicar que la semivida relevante de la variante de polipéptido está aumentada de manera estadísticamente significativa con respecto a la de una molécula de referencia, tal como una hFVIIa o rhFVIIa (por ejemplo, NovoSeven®) tal como se

determina en condiciones comparables (determinada normalmente en un animal experimental, tal como ratas, conejos o cerdos).

5 La expresión "AUC_{IV}" o "Área bajo la curva cuando se administra intravenosamente" se usa en su significado normal, es decir, como el área bajo la actividad en la curva de suero-tiempo, en la que se ha administrado intravenosamente la variante de polipéptido, en particular, cuando se administra intravenosamente en ratas. Normalmente, la actividad medida es la "actividad de coagulación" tal como se define anteriormente en el presente documento. Una vez que se han determinado los puntos de actividad-tiempo experimentales, se puede calcular convenientemente la AUC_{IV} mediante un programa informático, tal como GraphPad Prism 3.01.

10 Se entenderá que con el fin de tener una comparación directa entre los valores de la AUC_{IV} de diferentes moléculas (por ejemplo, entre las variantes de la invención y rhFVIIa) se debe administrar la misma cantidad de actividad. Consiguientemente, los valores de la AUC_{IV} se normalizan usualmente (es decir, se corrigen las diferencias en la dosis inyectada) y se expresan como AUC_{IV}/dosis administrada.

15 La expresión "sensibilidad reducida frente a la degradación proteolítica" se pretende principalmente que signifique que la variante de polipéptido ha reducido la sensibilidad a la degradación proteolítica en comparación a hFVIIa o rhFVIIa (por ejemplo, NovoSeven®) tal como se determina en condiciones comparables. Preferiblemente, la degradación proteolítica se reduce en al menos un 10% (por ejemplo en un 10-25% o en un 10-50%), tal como al menos un 25% (por ejemplo, en un 25-50%, en un 25-75% o en un 25-100%), más preferiblemente en al menos un 35%, tal como al menos un 50% (por ejemplo, en un 50-75% o en un 50-100%), incluso más preferiblemente en al menos un 60%, tal como en al menos un 75% (por ejemplo en un 75-100%) o incluso al menos un 90%. Lo más preferible, la degradación proteolítica se reduce en al menos un 99%.

20 El término "aclaramiento renal" se usa en su significado normal para indicar cualquier aclaramiento que tiene lugar por los riñones, por ejemplo, mediante filtración glomerular, excreción o degradación tubular en las células tubulares. El aclaramiento renal depende de las características físicas del polipéptido, que incluyen el tamaño (diámetro), volumen hidrodinámico, simetría, forma/rigidez, y carga. Normalmente un peso molecular de aproximadamente 67 kDa se considera que es un valor de corte para el aclaramiento renal. Se puede establecer el aclaramiento renal mediante cualquier ensayo adecuado, por ejemplo, un ensayo establecido *in vivo*. Normalmente, se determina el aclaramiento renal administrando un polipéptido marcado (por ejemplo, radiomarcado o marcado con fluorescencia) a un paciente y midiendo la actividad de la marca en la orina recogida del paciente. El aclaramiento renal se determina con respecto al polipéptido de referencia correspondiente, por ejemplo, FVIIa natural humano, en condiciones comparables. Preferiblemente, la velocidad de aclaramiento renal de la variante de polipéptido se reduce en al menos un 50%, preferiblemente en al menos un 75%, y lo más preferible en al menos un 90% en comparación con hFVIIa o rhFVIIa (por ejemplo, NovoSeven®).

Las expresiones "al menos un 25%" de su cadena lateral expuesta a la superficie de la molécula" y "al menos un 50% de su cadena lateral expuesta a la superficie de la molécula" se definen con referencia al Ejemplo 1, en el que los cálculos, etc, se describen en detalle.

35 Debe señalarse que cuando las expresiones "al menos un 25%" de su cadena lateral expuesta a la superficie de la molécula" y "al menos un 50% de su cadena lateral expuesta a la superficie de la molécula" se usan junto con la introducción del sitio de N-glicosilación *in vivo*, estos términos se refieren a la accesibilidad superficial de la cadena lateral de aminoácidos en la posición en la que el resto azúcar se une realmente. En muchos casos, será necesario introducir un resto serina o uno treonina en la posición +2 con respecto al resto asparagina al cual se une realmente el resto azúcar (a no ser, por supuesto, que ésta posición esté ya ocupada por un resto serina o uno treonina) y estas posiciones, en las que se introducen restos serina o treonina, se permite que queden soterradas, es decir, tienen menos de un 25% o 50% de sus cadenas laterales expuestas a la superficie de la molécula.

40 En la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, cualquier referencia a "un" componente, por ejemplo, en el contexto de un resto no polipéptido un resto aminoácido, una sustitución, un tampón, etc, se pretende que se refiera a uno o más de dichos componentes, a no ser que se defina de otra manera o a no ser que resulte claro del contexto particular si este no es el caso. Por ejemplo, la expresión "un componente seleccionado entre el grupo que consiste en A, B y C" se pretende que incluya todas las combinaciones de A, B y C, es decir, A, B, C, A+B, A+C, B+C o A+B+C.

45 Un polipéptido, secuencia de nucleótidos u otro componente está "aislado" cuando está parcial o completamente separado de los componentes con los cuales está normalmente asociado (otros péptidos, polipéptidos, proteínas (incluyendo complejos, por ejemplo, polimerasas y ribosomas que pueden acompañar una secuencia natural), ácidos nucleicos, células, reactivos sintéticos, contaminantes celulares, componentes celulares, etc), por ejemplo, tal como de otros componentes con los cuales se asocia normalmente en la célula de la cual se deriva originalmente. Un polipéptido, secuencia de nucleótidos u otro componente está aislado cuando se recupera o separa parcial o completamente de otros componentes de su entorno natural de tal manera que es la especie predominante presente en una composición, mezcla, o conjunto de componentes (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En algunos ejemplos, la preparación consiste en más de aproximadamente un 60%, más de

aproximadamente un 70%, o más de aproximadamente un 75%, normalmente más de aproximadamente un 80%, o preferiblemente más de aproximadamente un 90% de las especies aisladas.

Las expresiones "sitio de unión al factor tisular", "región de sitio activo" y "borde de la hendidura de unión del sitio activo" se definen con referencia al Ejemplo 1, en el que se determinan los sitios/regiones anteriormente mencionados.

- 5 La expresión "resto aminoácido hidrófobo" incluye los siguientes restos aminoácidos: Ile, Leu, Met, Val, Phe, Tyr y Trp.
 La expresión "resto aminoácido cargado" abarca los siguientes restos aminoácidos: Lys, Arg, His, Asp y Glu.
 La expresión "resto aminoácido cargado negativamente" incluye los siguientes restos aminoácidos: Asp y Glu.
 La expresión "resto aminoácido cargado positivamente" incluye los siguientes restos aminoácidos: Lys, Arg e His.
 La expresión "resto aminoácido polar" abarca los siguientes restos aminoácidos: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn y Gln.
- 10 El término "mamífero" tal como se usa en el presente documento incluye seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, babuinos, orangutanes, monos), ratones, cerdos, vacas, cabras, gatos, conejos, ratas, cobayas, hámsters, caballos, monos, ovejas, u otros mamíferos no humanos.

El término "cantidad eficaz" significa una dosificación o cantidad suficiente para producir un resultado deseado. El resultado deseado puede comprender una mejora objetiva o subjetiva en el receptor de la dosificación o cantidad

15 **Variantes de la invención**

En un aspecto, la presente invención se refiere a una variante de polipéptido del Factor VII (FVII) o del Factor VIIa (FVIIa) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende 1-15 modificaciones de aminoácidos con respecto al Factor VII humano (hFVII) o al Factor VIIa humano (hFVIIa) que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1, en la que dicha secuencia variante comprende la sustitución L65Q,

- 20 con la condición de que dicha variante no sea
 [K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII/hFVIIa o
 [A1Y+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII/hFVIIa o
 [A1Y+A3S+F4GK+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII/hFVIIa o
 [A1Y+L8F+R9V+P10Q+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII/hFVIIa o
- 25 [A1Y+A3S+F4GK+L8F+R9V+P10Q+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII/hFVIIa o
 [A3S+F4GK+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII/hFVIIa o
 [A3S+F4GK+L8F+R9V+P10Q+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII/hFVIIa o
 [LBF+R9V+P10Q+K32E+D33N+A34T+K38T+L39E]hFVII/hFVIIa o
 [142N]hFVU//hFVHa o [142S]hFVII/hFVIIa or [142A]hFVII/hFVIIa o
- 30 [142Q]hFVII/hFVIIa.

En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución L39E.

En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución L39Q.

- 35 En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución L39H.

En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución I42R.

- 40 En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución S43Q.

En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución K62E.

En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución K62R.

En todas las formas de realización de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución L65/Q.

5 En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución L65S.

En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución F71D.

En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución F71Y.

10 En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución F71E.

En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución F71Q.

15 En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución F71N.

En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución E82Q.

En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución E82N

20 En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa comprende la sustitución F275H.

En una forma de realización muy interesante de la invención, la variante de FVII o FVIIa de la invención comprende una sustitución seleccionada entre el grupo que consiste en F71Y, K62E y S43Q, en particular, seleccionada entre el grupo que consiste en K62E y S43Q.

25 Se entenderá que puede ser ventajoso combinar una o más de las sustituciones anteriormente mencionadas. De acuerdo con esto, en una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante comprende al menos dos (tal como dos) sustituciones en posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L39,I142,S43, K62, L65, F71, E82 y F275, tales como sustituciones en posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L39+I42, L39+S43, L39+K62, L39+L65, L39+F71, L39+E82, L39+F275, I42+S43, I42+K62, I42+L65, I42+F71, I42+E82, I42+F275, S43+K62, S43+L65, S43+F71, S43+E82, S43+F275, K62+L65, K62+F71, K62+E82, K62+F275, L65+F71, L65+E82, L65+F275, F71+E82, F71+F275 y E82+F275. De acuerdo con esta forma de realización de la invención, se prefiere que la variante comprende al menos dos (tal como dos) sustituciones en posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L65+F71, L65+K62, L65+S43, F71+K62, F71+S43 y K62+S43, en particular al menos dos (tales como dos) sustituciones en posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L65+K62, L65+S43 y K62+S43. Más particularmente, la variante de la invención puede comprender al menos dos (tales como dos) sustituciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L39E, L39Q, L39H, I42R, S43Q, K62E, K62R, L65Q, L65S, F71D, F71Y, F71E, F71Q, F71N, E82Q, E82N y F275H, preferiblemente al menos dos (tales como dos) sustituciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L65Q, F71Y, K62E y S43Q, más preferiblemente al menos dos (tales como dos) sustituciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L65Q, K62E y S43Q. Los ejemplos específicos incluyen L65Q+F71 Y, L65Q+K62E, L65Q+S43Q, F71Y+K62E, F71Y+S43Q y K62E+S43Q, en particular L65Q+K62E, L65Q+S43Q y K62E+S43Q.

30

35

40

En formas de realización más adicionalmente interesantes de la invención, la variante comprende al menos tres (tales como tres) sustituciones en posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L39, I42, S43, K62, F71, E82 and F275, tales como sustituciones en posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L39+I42+S43, L39+I42+K62, L39+I42+L65, L39+I42+F71, L39+I42+E82, L39+I42+F275, L39+543+K62, L39+S43+L65, L39+S43+F71, L39+K62+E82, L39+S43+F275, L39+K62+L65, L39+K62+F71, L39+K62+E82, L39+K62+F275, L39+L65+F71, L39+L65+E82, L39+L65+F275, L39+F71+E82, L39+F71+F275, L39+E82+F275, I42+S43+K62, I42+S43+L65, I42+S43+F71, I42+S43+E82, I42+S43+F275, I42+K62+L65, I42+K62+F71, I42+K62+E82, I42+K62+F275, I42+L65+F71, I42+L65+E82, I42+L65+F275, I42+F71+E82, I42+F71+F275, I42+E82+F275, S43+K62+L65, S43+K62+F71, S43+K62+E82, S43+K62+F275, S43+L65+F71, S43+L65+E82, S43+L65+F275, S43+F71+E82, S43+F71+F275, S43+E82+F275, K62+L65+F71, K62+L65+E82, K62+L65+F275, K62+F71+E82, K62+F71 F275, K62+E82+F275, L65+F71+E82, L65+F71+F275, L65+E82+F275 y F71+E82+F275, preferiblemente, sustituciones en posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en K62+L65+F71, S43+L65+F71, S43+K62+L65 y S43+K62+F71, en particular S43+K62+L65.

45

50

Más particularmente, la variante de la invención puede comprender al menos tres (tales como tres) sustituciones seleccionadas entre el grupo que consiste en F71Y, K62E y S43Q. Los ejemplos específicos incluyen L65Q+F71Y+K62E, L65Q+F71Y+S43Q, L65Q+K62E+S43Q y F71Y+K62E+S43Q, en particular L65Q+K62E+S43Q.

5 Las variantes de la invención poseen una actividad de coagulación mejorada (o un tiempo de coagulación reducido) en comparación con hFVIIa o rhFVIIa. En una forma de realización preferida de la invención, la relación entre el tiempo para alcanzar la formación del coágulo de la variante (t_{variante}) y el tiempo para alcanzar la formación del coágulo de hFVIIa o rhFVIIa (t_{wt}) es mayoritariamente de 0,9 cuando se ensaya en la "Prueba de Sangre Completa" descrita en el presente documento. Más preferiblemente, la relación ($t_{\text{variante}/t_{\text{wt}}}$) es mayoritariamente de 0,75, tal como de 0,7, incluso más preferiblemente, la relación ($t_{\text{variante}/t_{\text{wt}}}$) es mayoritariamente de 0,6, más preferiblemente la relación ($t_{\text{variante}/t_{\text{wt}}}$) es mayoritariamente de 0,5 cuando se ensaya en la "Prueba de Sangre Completa" descrita en el presente documento.

10 En una forma de realización adicionalmente interesante de la invención, la variante comprende 1-10 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo sustituciones), tales como 1-5 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), por ejemplo, 1-3 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) con respecto a SEQ ID NO: 1.

15 Por ejemplo, la variante puede contener al menos una modificación de aminoácidos realizada en el dominio Gla tal como se explica en la sección titulada "Modificaciones en el dominio Gla" a continuación, y/o al menos una modificación de aminoácidos que conduce a la introducción de un sitio de N-glicosilación, tal como se explica en la sección titulada "introducción de restos azúcar adicionales" a continuación, y/o al menos una modificación de aminoácidos que disminuye la afinidad de unión a TFPI. Se describen ejemplos de las últimas modificaciones en la sección titulada "Otras modificaciones" a continuación.

20 Otras modificaciones

Tal como se ha indicado anteriormente, la variante de FVII o FVIIa de la invención puede comprender modificaciones adicionales, en particular, modificaciones adicionales que confieren propiedades ventajosas adicionales a la molécula de FVII o FVIIa. De esta manera, además de una o más de las sustituciones mencionadas anteriormente, es decir, una sustitución en una o más de las posiciones L39,142, S43, K62, L65, F71, E82, F275H, la variante puede comprender al menos una modificación de aminoácidos adicional, en particular, al menos una sustitución de aminoácidos adicional

25 Con el fin de evitar demasiada perturbación de la estructura y la función del polipéptido FVII o FVIIa, la variante del polipéptido FVII o FVIIa de la invención comprende normalmente una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, tal como al menos un 96% de identidad con SEQ ID NO: 1, por ejemplo, al menos un 97% de identidad con SEQ ID NO: 1, al menos un 98% de identidad con SEQ ID NO: 1, o al menos un 99% de identidad con SEQ ID NO: 1. La identidad de la secuencia de aminoácidos se determina convenientemente a partir de las secuencias alineadas, usando, por ejemplo, el programa ClustalW, versión 1.8, Junio de 1999, usando parámetros por defecto (Thompson y col., 1994, ClustalW: Mejorando la sensibilidad de la alineación progresiva de múltiples secuencias a través de la ponderación de la secuencia, la penalización por huecos específica de la posición y elección de la matriz de ponderación, Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680) o a partir de la base de datos de familias PFAM versión 4.0 (http://H12fam.wustl.edu/) (Nucleic Acids Res. 1 de Enero de 1999 ; 27(1): 260-2) mediante el uso de GENEDOC versión 2.5 (Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., y Deerfield, D.W. II. 1997 GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, EMBNEW.NEWS 4:14; Nicholas, K.B. y Nicholas H.B. Jr. 1997 GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation).

35 Modificaciones en el dominio Gla

40 En una forma de realización interesante de la invención, la variante comprende adicionalmente al menos una modificación de aminoácidos (tal como al menos una sustitución y/o inserción de aminoácidos) en el dominio Gla. Preferiblemente, no se realizan modificaciones en la posición 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 y 35.

45 Sin desear quedar vinculado a alguna teoría concreta, se cree actualmente que puede conseguirse un aumento de la actividad de coagulación mediante una afinidad de unión potenciada de la molécula de FVIIa a las membranas de fosfolípidos presentes en la superficie de las plaquetas activadas. Se cree que esta afinidad potenciada da como resultado una mayor concentración local de polipéptido FVIIa activado en estrecha proximidad con los diferentes factores de coagulación, particularmente FX. De esta manera, la velocidad de activación de FX a Fxa será mayor, debido sencillamente a una mayor relación molar del polipéptido FVII activado a FX. El aumento de la velocidad de activación de FX da como resultado a continuación una mayor cantidad de trombina activa, y de esta manera una mayor velocidad de reticulación de la fibrina.

50 De esta manera, en una forma de realización preferida de acuerdo con este aspecto de la invención, la variante de polipéptido tiene, en su forma activada, una afinidad de unión a una membrana de fosfolípidos potenciada con respecto a la del polipéptido rhFVIIa. Se puede medir la afinidad de unión a la membrana de fosfolípidos mediante procedimientos conocidos en la materia, tal como mediante los ensayos descritos en Nelsestuen y col., Biochemistry 1977; 30: 10819-10824 o como se describen en el Ejemplo 1 en el documento US 6.017.882.

Se han descrito en la materia modificaciones en el dominio Gla de FVII que conducen a una afinidad de unión a la membrana de fosfolípidos aumentada (véanse, por ejemplo, documentos WO 99/20767 y WO 00/66753). Las posiciones particularmente interesantes en el dominio Gla que se van a modificar son las posiciones P10, K32, D33, A34 así como la inserción de un resto aminoácido entre A3 y F4.

5 De esta manera, en una forma de realización preferida de la invención, la variante comprende, además de una o más de las modificaciones mencionadas anteriormente, una sustitución en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en P10, K32, D33 y A34 y sus combinaciones.

En otra forma de realización interesante, al menos una de dichas sustituciones se combina con una inserción de un resto aminoácido entre la posición A3 y F4.

10 Las posiciones particularmente preferidas son P10 y K32, es decir, en una forma de realización particularmente interesante de la invención, se realizan sustituciones en las posiciones P10 y K32, preferiblemente P10Q+K32E.

Preferiblemente, la sustitución que se va a hacer en la posición 32 es K32E, la sustitución que se va a hacer en la posición 10 es P10Q, la sustitución que se va a hacer en la posición 33 es D33F, y la sustitución que se va a hacer en la posición 34 es A34E. El resto aminoácido que se va a insertar entre la posición A3 y F4 es preferiblemente un resto aminoácido hidrófobo, en concreto, la inserción es A3AY. En una forma de realización interesante de la invención, la variante comprende al menos una de las siguientes modificaciones adicionales: A3AY, P10Q, K32E, D33F, A34E o sus combinaciones. Lo más preferible, la variante comprende una de las siguientes modificaciones adicionales: K32E, P10Q+K32E, A3AY+P10Q+K32E, A3AY+P10Q+K32E+D33F, A3AY+P10Q+K32E+A34E o A3AY+P10Q+K32E+D33F+A34E.

20 **Modificaciones fuera del dominio Gla**

Se ha informado de una semivida de rhFVIIa en circulación de 2,3 horas en "Summary Basis for Approval for NovoSeven®", FDA número de referencia 96-0597. Son necesarias dosis relativamente elevadas y una administración frecuente para alcanzar y sostener el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Como consecuencia, es difícil obtener una regulación adecuada de la dosis y la necesidad de frecuentes administraciones intravenosas impone restricciones en el modo de vida del paciente.

25 Una molécula con una semivida en circulación más larga y/o una biodisponibilidad aumentada (tal como un Área bajo la Curva Aumentada en comparación con rhFVIIa cuando se administra intravenosamente) disminuiría el número necesario de administraciones. Dada la asociación del producto de rhFVIIa actual con frecuentes inyecciones, y el potencial para obtener más niveles de FVIIa terapéuticos óptimos con efecto terapéutico potenciado simultáneo, existe una clara necesidad de moléculas tipo FVII o FVIIa mejoradas.

30 De acuerdo con esto, un objeto adicional de la presente invención es proporcionar moléculas de FVII o FVIIa (variantes de FVII o FVIIa) con una semivida aumentada y/o una biodisponibilidad aumentada (tal como un Área Bajo la Curva aumentada en comparación con rhFVIIa, cuando se administra intravenosamente) y que tengan una actividad de coagulación mejorada.

35 De acuerdo con esto, en una forma de realización interesante de la invención, la variante de la invención comprende además al menos un grupo de enlace introducido para un resto no polipéptido, en el que dicho grupo de enlace se ha introducido en una posición localizada en el exterior del dominio Gla.

40 De esta manera, una variante interesante de la invención es una variante que, en su forma activada y cuando se compara con rhFVIIa, genera un Área Bajo la Curva aumentada cuando se administra intravenosamente (AUC_{IV}), en particular, cuando se administra intravenosamente a ratas. Más particularmente, las variantes interesantes de la presente invención son las mencionadas variantes en las que la relación entre la AUC_{IV} de dicha variante, en su forma activada, y la AUC_{IV} de rhFVIIa es al menos de 1,25, tal como al menos de 1,5, por ejemplo, de al menos 1,75, más preferiblemente de al menos 2, tal como de al menos 3, incluso más preferiblemente de al menos 4, tal como de al menos 5, en particular cuando se administra (intravenosamente) en ratas.

45 Este efecto puede corresponder a una semivida funcional *in vivo* aumentada y/o a una semivida en suero aumentada en comparación con rhFVIIa. De acuerdo con esto, en otra forma de realización interesante de la invención, la relación entre la semivida funcional *in vivo* o la semivida en suero de la variante, en su forma activada, y la semivida funcional *in vivo* o la semivida en suero de rhFVIIa es al menos de 1,25. Más preferiblemente, la relación entre la semivida relevante de la variante, en su forma activada, y la semivida relevante de rhFVIIa es al menos de 1,5, tal como al menos de 1,75, por ejemplo al menos de 2, incluso más preferiblemente al menos de 3, tal como al menos de 4, por ejemplo, al menos de 5.

50 Una manera de aumentar la semivida en circulación de una proteína es asegurar que el aclaramiento renal de la proteína se reduce. Se puede conseguir esto conjugando la proteína con un resto químico, que sea capaz de conferir aclaramiento renal reducido a la proteína.

Además, la unión de un resto químico a la proteína o la sustitución de los aminoácidos expuestos a la proteólisis pueden bloquear eficazmente una enzima proteolítica del contacto que conduce a la degradación proteolítica de la proteína. El polietilenglicol (PEG) es uno de dichos restos químicos que se ha usado en la preparación de productos terapéuticos de proteínas. El documento WO 98/32466 sugiere que FVII, entre otras muchas proteínas, puede PEGilarse, pero no contiene ninguna información adicional a este respecto. El documento WO 01/58935 da a conocer una nueva estrategia para desarrollar moléculas de FVII o FVIIa que tienen *entre otras* una semivida aumentada.

Numerosas modificaciones adecuadas conducen a un aumento en la AUC_{IV}, en el documento WO 01/58935 se dan a conocer la semivida funcional in vivo y/o la semivida en suero. Las variantes dadas a conocer en el documento WO 01/58935 son el resultado de una estrategia por lo general nueva para desarrollar moléculas de FVII o FVIIa mejoradas. Las modificaciones específicas descritas en el documento WO 01/58935 pueden combinarse ventajosamente con las modificaciones descritas anteriormente en el presente documento.

Se puede unir también la variante del polipéptido a un inhibidor de la serina proteinasa para inhibir el sitio catalítico de la variante de polipéptido. Alternativamente, se pueden mutar uno o más de los restos aminoácidos presentes en el sitio catalítico (S344, D242 y H193) con el fin de volver inactiva la variante resultante. Un ejemplo de dicha mutación incluye S344A.

El resto aminoácido introducido que comprende un grupo de enlace para un resto no polipéptido se selecciona sobre la base de la naturaleza del resto no polipéptido de elección, en la mayor parte de ejemplos, sobre la base del procedimiento en el que se va a conseguir la conjugación entre la variante de polipéptido y el resto no polipéptido. Por ejemplo, cuando el resto no polipéptido es una molécula de polímero tal como polietilenglicol o una molécula derivada de óxido de polialquileno, se pueden seleccionar los restos aminoácidos que comprenden un grupo de enlace entre el grupo que consiste en lisina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, y tirosina, preferiblemente lisina, cisteína, ácido aspártico y ácido glutámico, más preferiblemente lisina y cisteína, en particular cisteína.

Cuando se va a introducir un grupo de enlace de un resto no polipéptido en el polipéptido parental, la posición del resto aminoácido que se va a modificar se localiza preferiblemente en la superficie del polipéptido FVII o FVIIa parental, y más preferiblemente ocupada por un resto aminoácido que tiene al menos un 25% de su cadena lateral expuesto a la superficie (tal como se define en el Ejemplo 1, en el presente documento), preferiblemente al menos un 50% de su cadena lateral expuesto a la superficie (tal como se define en el Ejemplo 1, en el presente documento). Se han identificado dichas posiciones sobre la base de un análisis de una estructura 3D de la molécula de hFVII o hFVIIa tal como se describe en la sección de Materiales y Procedimientos en el presente documento.

Además, la posición que se va a modificar de acuerdo con este aspecto de la invención se selecciona preferiblemente entre una parte de la molécula de FVII o FVIIa que se localiza en el exterior del sitio de unión al factor tisular, y/o en el exterior de la región del sitio activo, y en el exterior del borde de la hendidura de unión al sitio activo. Estos sitios/regiones se identifican en el Ejemplo 1 en el presente documento. Debe enfatizarse, sin embargo, que en algunas situaciones, por ejemplo, en el caso de que se desee una variante de polipéptido inactivada, puede ser ventajoso llevar a cabo modificaciones en o cerca de dichas regiones. Por ejemplo, se contempla que se pueden introducir uno o más grupos de enlace de los restos no polipéptidos, tales como los grupos de enlace para los sitios de N-glicosilación, en la región del sitio activo o en el borde de la hendidura del sitio activo de la molécula de FVII o FVIIa. La región del sitio activo, el sitio de unión al factor tisular y el borde de la hendidura del sitio activo se definen en el Ejemplo 1 y están constituidos por los siguientes restos:

I153, Q167, V168, L169, L170, L171, Q176, L177, C178, G179, G180, T181, V188, V189, S190, A191, A192, H193, C194, F195, D196, K197, I198, W201, V228, I229, I230, P231, S232, T233, Y234, V235, P236, G237, T238, T239, N240, H241, D242, I243, A244, L245, L246, V281, S282, G283, W284, G285, Q286, T293, T324, E325, Y326, M327, F328, D338, S339, C340, K341, G342, D343, S344, G345, G346, P347, H348, L358, T359, G360, I361, V362, S363, W364, G365, C368, V376, Y377, T378, R379, V380, Q382, Y383, W386, L387, L400 y F405 (region del sitio activo);

L13, K18, F31, E35, R36, L39, F40, I42, S43, S60, K62, D63, Q64, L65, I69, C70, F71, C72, L73, P74, F76, E77, G78, R79, E82, K85, Q88, I90, V92, N93, E94, R271, A274, F275, V276, R277, F278, R304, L305, M306, T307, Q308, D309, Q312, Q313, E325 y R379 (region de union al factor tisular); y

N173, A175, K199, N200, N203, D289, R290, G291, A292, P321 y T370 (el borde de la hendidura de unión al sitio activo).

Con el fin de determinar una distribución óptima de los grupos de enlace, se calcula la distancia entre los restos aminoácidos localizados en la superficie del polipéptido FVII o FVIIa sobre la base de una estructura 3D del polipéptido hFVII o hFVIIa. Más específicamente, se determinan la distancia entre los CB de los restos aminoácidos que comprenden dichos grupos de enlace, o la distancia entre el grupo funcional (NZ para lisina, CG para ácido aspártico, CD para ácido glutámico, SG para cisteína) de uno y el CB de otro resto aminoácido que comprende un grupo de enlace. En el caso de glicina, se usa CA en vez de CB. En la parte de FVII o FVIIa de la variante de polipéptido de la invención, cualquiera de dichas distancias tiene preferiblemente más de 8Å, en particular más de 10 Å, con el fin de evitar o reducir una

conjugación heterogénea.

En el caso de la introducción de un grupo de enlace, se introduce un resto aminoácido que comprende dicho grupo en la posición, preferiblemente mediante sustitución del resto aminoácido que ocupa dicha posición.

5 El número exacto de grupos de enlace presentes y disponibles para la conjugación en el polipéptido FVII o FVIIa es dependiente del efecto deseado que se va a conseguir mediante la conjugación. El efecto que se va a obtener es, por ejemplo, dependiente de la naturaleza y el grado de conjugación (por ejemplo, la identidad del resto no polipéptido, el número de restos no polipéptidos deseables o posibles para conjugar la variante de polipéptido, en el que deberían conjugarse, o en el que debería evitarse la conjugación, etc).

10 La semivida funcional *in vivo* es, *entre otros*, dependiente del peso molecular de la proteína, y el número de grupos de enlace necesarios para proporcionar una semivida aumentada depende por tanto del peso molecular del resto no polipéptido en cuestión. En una forma de realización, la variante de polipéptido de la invención tiene un peso molecular de al menos 67 kDa, en particular al menos 70 kDa, por ejemplo, tal como se midió mediante SDS-PAGE de acuerdo con Laemmli, U.K., Nature Vol 227 (1970), p680-85. La propia FVII tiene un peso molecular de aproximadamente 53 kDa, y por tanto se requieren 10-20 kDa adicionales para obtener el efecto deseado. Esto puede, por ejemplo, proporcionarse conjugando 2-4 moléculas de PEG de 10 kDa o como se describe de otra forma en el presente documento.

15 El número total de restos aminoácidos que se va a modificar en el exterior del dominio Gla en el polipéptido FVII o FVIIa parental (en comparación con la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1) no excederá normalmente de 10. Preferiblemente, la variante de FVII o FVIIa comprende una secuencia de aminoácidos que difiere en 1-10 restos aminoácidos de los restos aminoácidos 46-406 que se muestran en SEQ ID NO: 1, normalmente en 1-8 o en 2-8 restos aminoácidos, por ejemplo, en 1-5 o en 2-5 restos aminoácidos, tal como en 1-4 o en 1-3 restos aminoácidos, por ejemplo, en 1, 2 o 3 restos aminoácidos de los restos aminoácidos 46-406 que se muestran en SEQ ID NO: 1.

20 Análogamente, la variante de polipéptido de la invención puede contener 1-10 restos no polipéptidos (adicionales), normalmente 1-8 o 2-8 restos no polipéptidos (adicionales), preferiblemente 1-5 o 2-5 restos no polipéptidos (adicionales) tales como 1-4 o 1-3 restos no polipéptidos (adicionales), por ejemplo, 1, 2 o 3 restos no polipéptidos (adicionales) se entenderá que dichos restos no polipéptidos adicionales están unidos covalentemente a un grupo de enlace localizado en el exterior del dominio Gla.

Introducción de restos azúcar adicionales

30 En una forma de realización preferida de la invención, se ha introducido un grupo de enlace de un resto azúcar, tal como un sitio de glicosilación, en particular un sitio de glicosilación *in vivo*, tal como un sitio de N-glicosilación, en una posición localizada en el exterior del dominio Gla.

Cuando se usa en el presente contexto, el término "sitio de glicosilación que se produce naturalmente" cubre los sitios de glicosilación en las posiciones N145, N322, S52 y S60. De una manera similar, el término "sitio de O-glicosilación que se produce naturalmente" incluye las posiciones S52 y S60, mientras que el término "sitio de N-glicosilación que se produce naturalmente" incluye las posiciones N145 y N322.

35 De esta manera, en una forma de realización muy interesante de la invención, el resto no polipéptido es un resto azúcar y el grupo de enlace introducido es un sitio de glicosilación, preferiblemente un sitio de glicosilación *in vivo*, tal como un sitio de O-glicosilación o un sitio de N-glicosilación, en particular un sitio de N-glicosilación. Normalmente, se han introducido 1-10 sitios de glicosilación, en particular sitios de N-glicosilación, preferiblemente 1-8, 1-6, 1-4 o 1-3 sitios de glicosilación, en particular, se han introducido sitios de N-glicosilación en una(s) posición(es) localizada(s) en el exterior del dominio Gla. Por ejemplo 1, 2 o 3 sitios de glicosilación, en particular, se pueden haber introducido sitios de N-glicosilación en el exterior del dominio Gla, preferiblemente mediante sustitución. Análogamente, la variante puede comprender 1-10 restos azúcar introducidos, preferiblemente 1-8, 1-6, 1-4 o 1-3 restos azúcar introducidos. Por ejemplo, la variante puede contener 1, 2 o 3 restos azúcar introducidos.

45 Se entenderá que con el fin de preparar una variante de polipéptido, en la que la variante de polipéptido comprenda uno o más sitios de glicosilación, debe expresarse la variante de polipéptido en una célula huésped capaz de unirse a restos azúcar (oligosacáridos) en el(los) sitio(s) de glicosilación o someterse alternativamente a la glicosilación *in vitro*. Se proporcionan ejemplos de células huéspedes glicosilantes en la siguiente sección adicional titulada "Acoplamiento a un resto azúcar".

50 Los ejemplos de posiciones en las que se pueden introducir sitios de glicosilación, en particular sitios de N-glicosilación, incluyen, pero no se limitan a, posiciones que comprenden un resto aminoácido que tiene un resto aminoácido que tiene al menos un 25% de su cadena lateral expuesta a la superficie (tal como se define en el Ejemplo 1 en el presente documento), tal como en una posición que comprende un resto aminoácido que tiene al menos un 50% de su cadena lateral expuesta a la superficie (tal como se define en el Ejemplo 1 en el presente documento). La posición se selecciona preferiblemente a partir de una parte de la molécula que se localiza en el exterior de sitio de unión al factor tisular y/o la

región del sitio activo y/o el exterior del borde de la hendidura del sitio activo. Estos sitios/regiones se identifican en el Ejemplo 1 en el presente documento. Debe entenderse que cuando se usa el término “al menos un 25% (o al menos un 50%) de su cadena lateral expuesta a la superficie” junto con la introducción de un sitio de N-glicosilación, este término se refiere a la accesibilidad superficial de la cadena lateral de aminoácidos en la posición en la que el resto azúcar se une realmente. En muchos casos será necesario introducir un resto serina o un resto treonina en la posición +2 con respecto al resto asparagina al cual se une realmente el resto azúcar (a no ser, por supuesto, que esta posición esté ya ocupada por un resto serina o un resto treonina) y se permite soterrar estas posiciones en las que se introducen los restos serina o treonina, es decir, que tienen menos de un 25% de sus cadenas laterales expuestas a la superficie.

Los ejemplos específicos y preferidos de dichas sustituciones que crean un sitio de N-glicosilación incluyen una sustitución seleccionada entre el grupo que consiste en A51N, G58N, G58N+S60T, T106N, K109N, G124N, K143N+N145T, A175T, I205S, I205T, V253N, T267N, T267N+S269T, S314N+K316S, S314N+K316T, R315N+V317S, R315N+V317T, K316N+G318S, K316N+G318T, G318N, D334N y sus combinaciones. Más preferiblemente, se introduce el sitio de N-glicosilación mediante una sustitución seleccionada entre el grupo que consiste en A51N, G58N+S60T, T106N, K109N, G124N, K143N+N145T, A175T, I205T, V253N, T267N+S269T, S314N+K316T, R315N+V317T, K316N+G318T, G318N, D334N y sus combinaciones. Incluso más preferiblemente, se introduce el sitio de N-glicosilación mediante una sustitución seleccionada entre el grupo que consiste en T106N, A175T, I205T, V253N, T267N+S269T y sus combinaciones. Lo más preferible, se introduce el sitio de N-glicosilación mediante una sustitución seleccionada entre el grupos constituido por T106N, I205T, V253N, T267N+S269T y sus combinaciones.

En una forma de realización, únicamente se ha introducido un sitio de N-glicosilación mediante sustitución. En otra forma de realización, se han introducido dos o más (tales como dos) sitios de N-glicosilación mediante sustitución. Los ejemplos de sustituciones preferidas que crean dos sitios de N-glicosilación incluyen sustituciones seleccionadas entre el grupo que consiste en A51N+G58N, AS1N+G58N+S60T, A51N+T106N, AS1N+K109N, A51N+G124N, A51N+K143N+N145T, A51N+A175T, AS1N+I205T, A51N+V253N, A51N+T267N+S269T, AS1N+S314N+K316T, A51N+R315N+V317T, A51N+K316N+G318T, A51N+G318N, AS1N+D334N, G58N+T106N, G58N+K109N, G58N+G124N, G58N+K143N+N145T, G58N+A175T, G58N+I205T, G58N+V253N, G58N+T267N+S269T, G58N+S314N+K316T, G58N+R315N+V317T, G58N+K316N+G318T, G58N+G318N, G58N+D334N, G58N+S60T+T106N, G58N+S60T+K109N, G58N+S60T+G124N, G58N+S60T+K143N+N145T, G58N+S60T+A175T, G58N+S60T+I205T, G58N+S60T+V253N, G58N+S60T+ T267N+S269T, G58N+S60T+S314N+K316T, G58N+S60T+R315N+V317T, G58N+S60T+K316N+G318T, G58N+S60T+G318N, G58N+S60T+D334N, T106N+K109N, T106N+G124N, T106N+K143N+N145T, T106N+A175T, T106N+I205T, T106N+V253N, T106N+T267N+S269T, T106N+S314N+K316T, T106N+R315N+V317T, T106N+K316N+G318T, T106N+G318N, T106N+D334N, K109N+G124N, K109N+K143N+N145T, K109N+A175T, K109N+I205T, K109N+V253N, K109N+T267N+S269T, K109N+S314N+K316T, K109N+R315N+V317T, K109N+K316N+G318T, K109N+G318N, K109N+D334N, G124N+K143N+N145T, G124N+A175T, G124N+I205T, G124N+V253N, G124N+T267N+S269T, G124N+S314N+K316T, G124N+R315N+V317T, G124N+K316N+G318T, G124N+G318N, G124N+D334N, K143N+N145T+A175T, K143N+N145T+I205T, K143N+N145T+V253N, K143N+N145T+T267N+S269T, K143N+N145T+S314N+K316T, K143N+N145T+R315N+V317T, K143N+N145T+K316N+G318T, K143N+N145T+G318N, K143N+N145T+D334N, A175T+I205T, A175T+V253N, A175T+T267N+S269T, A175T+S314N+K316T, A175T+R315N+V317T, A175T+K316N+G318T, A175T+G318N, A175T+D334N, I205T+V253N, I205T+T267N+S269T, I205T+S314N+K316T, I205T+R315N+V317T, I205T+K316N+G318T, I205T+G318N, I205T+D334N, V253N+T267N+S269T, V253N+S314N+K316T, V253N+R315N+V317T, V253N+K316N+G318T, V253N+G318N, V253N+D334N, T267N+S269T+S314N+K316T, T267N+S269T+R315N+V317T, T267N+S269T+K316N+G318T, T267N+S269T+G318N, T267N+S269T+D334N, S314N+K316T+R315N+V317T, S314N+K316T+G318N, S314N+K316T+D334N, R315N+V317T+K316N+G318T, R315N+V317T+G318N, R315N+V317T+D334N y G318N+D334N. Más preferiblemente, las sustituciones se seleccionan entre el grupo que consiste en T106N+A175T, T106N+I205T, T106N+V253N, T106N+T267N+S269T, A175T+I205T, A175T+V253N, A175T+T267N+S269T, I205T+V253N, I205T+T267N+S269T y V253N+T267N+S269T, incluso más preferiblemente entre el grupo que consiste en T106N+I205T, T106N+V253N, T106N+T267N+S269T, I205T+V253N, I205T+T267N+S269T y V253N+T267N+S269T.

En una realización incluso más adicional, se han introducido tres o más (tales como tres) sitios de N-glicosilación mediante sustitución. Los ejemplos de sustituciones preferidas que crean tres sitios de N-glicosilación incluyen las sustituciones seleccionadas entre el grupo que consiste en T106N+A175T+I205T, T106N+A175T+V253N, T106N+A175T+T267N+S269T, T106N+I205T+V253N, T106N+I205T+T267N+S269T, T106N+V253N+T267N+S269T, A175T+I205T+V253N, A175T+I205T+T267N+S269T, A175T+V253N+T267N+S269T e I205T+V253N+T267N+S269T. Más preferiblemente, las sustituciones se seleccionan entre el grupo que consiste en T106N+I205T+V253N, T106N+I205T+T267N+S269T, T106N+V253N+T267N+S269T y I205T+V253N+T267N+S269T.

Tal como se discute anteriormente, se prefiere que el sitio de N-glicosilación se introduzca en una posición que ni forme parte del sitio de unión al factor tisular ni forme parte de la región del sitio activo y del borde de la hendidura de unión del sitio activo tal como se define en el presente documento. Se prevé que dichas variantes de glicosilación pertenezcan

principalmente a la clase de variantes activas de polipéptidos tal como se ha definido anteriormente en el presente documento.

Se entenderá que se pueden combinar cualquiera de las modificaciones mencionadas en las secciones anteriores.

Otras modificaciones

5 En una forma de realización adicional de la presente invención, la variante de FVII o FVIIa puede, además de las modificaciones descritas en las secciones anteriores, contener también mutaciones, que se sabe que aumentan la actividad intrínseca del polipéptido, por ejemplo, tal como las descritas en el documento WO 02/22776.

10 Los ejemplos de sustituciones preferidas incluyen las sustituciones seleccionadas entre el grupo que consiste en V158D, E296D, M298Q, L305V y K337A. Más preferiblemente, dichas sustituciones se seleccionan entre el grupo que consiste en V158D+E296D+M298Q+L305V+K337A, V158D+E296D+M298Q+K337A, V158D+E296D+M298Q+L305V, V158D+E296D+M298Q, M298Q, L305V+K337A, L305V y K337A.

15 En una forma de realización adicional de la presente invención, la variante de FVII o FVIIa puede, además de las modificaciones descritas en las secciones anteriores, contener también mutaciones, que producen una disminución de la inhibición por TFPI. Un ejemplo incluye la sustitución K341Q dada a conocer por Neuenschwander y col., Biochemistry 1995; 34: 8701-8707. Otros ejemplos incluyen D196K, D196N, G237L, G237GAA y sus combinaciones.

Como ya se ha indicado anteriormente, la variante puede contener también sustituciones conservativas de aminoácidos.

Ejemplos específicos de la mayoría de las variantes preferidas de la invención

20 Se proporcionan a continuación ejemplos específicos de la mayoría de variantes preferidas de FVII o FVIIa: S43Q, K62E, L65Q, S43Q+K62E, S43Q+L65Q, K62E+L65Q, S43Q+K62E+L65Q, P10Q+K32E+S43Q, P10Q+K32E+K62E, P10Q+K32E+L65Q, P10Q+K32E+S43Q+K62E, P10Q+K32E+S43Q+L65Q, P10Q+K32E+K62E+L65Q, P10Q+K32E+S43Q+K62E+L65Q

25 Se entenderá que se puede combinar cualquiera de las variantes preferidas anteriormente mencionadas con al menos una modificación adicional llevada a cabo fuera del dominio Gla. En particular, cualquiera de las variantes preferidas anteriormente mencionadas se puede combinar con una(s) sustitución(es) seleccionada(s) entre el grupo que consiste en T106N, I205T, V253N, T267N+S269T, T106N+I205T, T106N+V253N, T106N+T267N+S269T, I205T+V253N, I205T+T267N+S269T, V253N+T267N+S269T, T106N+I205T+V253N, T106N+I205T+T267N+S269T, T106N+V253N+T267N+S269T e I205T+V253N+T267N+S269T.

El resto no polipéptido

30 Basándose en la presente divulgación, la persona experta entenderá que se pueden introducir restos aminoácidos que comprendan otros grupos de enlace mediante sustitución en el polipéptido parental, usando el mismo enfoque que el ilustrado anteriormente con los sitios de N-glicosilación. Por ejemplo, se pueden introducir uno o más restos aminoácidos que comprendan un grupo ácido (ácido glutámico o ácido aspártico), tirosina o lisina, en las posiciones discutidas anteriormente. En particular, se pueden introducir uno o más restos cisteína en las posiciones discutidas anteriormente.

35 Ta como se indica además anteriormente, el resto no polipéptido de la variante conjugada se selecciona preferiblemente entre el grupo que consiste en una molécula de polímero, un compuesto lipófilo, un resto azúcar (por medio de glicosilación *in vivo*) y un agente orgánico de derivatización. Todos estos agentes pueden conferir propiedades deseables a la variante de polipéptido, en particular AUC_{IV} aumentada, semivida funcional *in vivo* aumentada y/o semivida en plasma aumentada. La variante de polipéptido se conjuga normalmente con solo un tipo de resto no polipéptido, pero puede conjugarse también con dos o más tipos diferentes de restos no polipéptidos, por ejemplo, con una molécula de polímero y un resto azúcar, con un grupo lipófilo y un resto azúcar, con un agente orgánico de derivatización y un resto azúcar, con un grupo lipófilo y una molécula de polímero, etc. La conjugación de dos o más restos no polipéptidos diferentes puede llevarse a cabo simultánea o secuencialmente.

Procedimientos de preparación de una variante conjugada de la invención

45 En las secciones siguientes "Conjugación con una molécula de polímero", "Conjugación con un resto azúcar", "Conjugación con un agente orgánico de derivatización" y "Conjugación con un compuesto lipófilo", se describe la conjugación con tipos específicos de restos no polipéptidos. En general, se puede producir una variante conjugada de acuerdo con la invención cultivando una célula huésped apropiada en condiciones conducentes para la expresión de la variante de polipéptido, y recuperar la variante de polipéptido, en la que a) la variante de polipéptido comprende al menos un sitio de N u O-glicosilación y en la célula huésped es una célula huésped eucariota capaz de glicosilación *in vivo*, y/o b) la variante de polipéptido se somete a conjugación con un resto no polipéptido *in vitro*.

Se entenderá que la conjugación debe diseñarse de tal manera que produzca la molécula óptima con respecto al número de restos no polipéptidos unidos, el tamaño y la forma de dichas moléculas (por ejemplo, si son lineales o ramificadas), y el sitio(s) de unión en el polipéptido. El peso molecular del resto no polipéptido que se va a usar puede, por ejemplo, escogerse sobre la base del efecto deseado que se va a conseguir. Por ejemplo, si el objetivo principal de la conjugación es conseguir una variante conjugada que tenga un elevado peso molecular (por ejemplo, para reducir el aclaramiento renal) es normalmente deseable conjugar unos pocos restos no polipéptidos de elevado peso molecular como sea posible para obtener el peso molecular deseado. Cuando es deseable un elevado grado de protección, este puede obtenerse mediante el uso de un número suficientemente elevado de restos no polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo con un peso molecular de entre aproximadamente 300 Da a aproximadamente 5 kDa, tal como un peso molecular de entre 300 Da a 2 kDa.

Conjugación con una molécula de polímero

La molécula de polímero que se va a acoplar con la variante de polipéptido puede ser cualquier molécula de polímero adecuada, tal como un homopolímero o heteropolímero natural o sintético, normalmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 300-100.000 Da, tal como aproximadamente 500-20.000 Da, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 500-15.000 Da, incluso más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 2-12 kDa, tal como en el intervalo de aproximadamente 3-10 kDa. Cuando el término "aproximadamente" se usa en el presente documento junto con algún peso molecular, la palabra "aproximadamente" indica un peso molecular promedio aproximado y refleja el hecho de que existirá normalmente alguna distribución de peso molecular en una preparación de polímero dado.

Los ejemplos de homopolímeros incluyen un poliol (es decir, poli-OH), una poliamina (es decir, poli-NH₂) y un ácido policarboxílico (es decir, poli-COOH). Un heteropolímero es un polímero que comprende diferentes grupos de acoplamiento, tales como un grupo hidroxilo y un grupo amina.

Los ejemplos de moléculas de polímeros adecuadas incluyen moléculas de polímeros seleccionadas entre el grupo que consiste en óxido de polialquileno (PAO), que incluye polialquilenglicol (PAG), tal como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), PEG ramificados, poli-vinil alcohol (PVA), poli-carboxilato, poli-(vinilpirrolidona), polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico, dextrano, que incluye carboximetil-dextrano, o cualquier otro biopolímero adecuado para reducir la inmunogenicidad y/o aumentar la semivida funcional in vivo, y/o la semivida en suero. Otro ejemplo de una molécula de polímero es la albúmina humana u otra proteína abundante en plasma. Por lo general son biocompatibles polímeros derivados de polialquilenglicol, no tóxicos, no antigénicos, no inmunógenos, tienen diversas propiedades de solubilidad en agua, y se excretan fácilmente de organismos vivos.

PEG es la molécula de polímero preferida debido a que tiene solo pocos grupos reactivo capaces de reticulación en comparación con, por ejemplo, polisacáridos tales como dextrano. En particular, PEG monofuncional, por ejemplo, metoxipolietilenglicol (mPEG), es de interés debido a que su química de acoplamiento es relativamente sencilla (únicamente un grupo reactivo está disponible para conjugarse con los grupos de enlace en el polipéptido, Consiguientemente, como se elimina el riesgo de reticulación, las variantes conjugadas resultantes son más homogéneas y la reacción de la moléculas de polímero con la variante de polipéptido es más fácil de controlar.

Para llevar a cabo el enlace covalente de la(s) molécula(s) de polímero(s) con la variante del polipéptido, los grupos extremo hidroxilo de la molécula de polímero deben proporcionarse en forma activada, es decir, con grupos reactivo funcionales (ejemplos de los cuales incluyen grupos amino primarios, hidrazida (HZ), tio, succinato (SUC), succinimidil succinato (SS) succinimidil succinamida (SSA) succinimidil propionato (SPA), succinimidil butirato (SBA), succinimidil carboximetilato (SCM), carbonato de benzotriazol (BTC), N-hidroxisuccinimida (NHS), aldehído, nitrofenilcarbonato (NPC), y tresilato (TRES)). Las moléculas de polímero activado adecuadas están comercialmente disponibles, por ejemplo de Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL, USA, o de PolyMASC Pharmaceuticals plc, UK.

Alternativamente, se pueden activar las moléculas de polímero mediante procedimientos convencionales conocidos en la materia, por ejemplo, como se da a conocer en el documento WO 90/13540. Los ejemplos específicos de moléculas de polímeros lineales o ramificados activados para uso en la presente invención se describen en los Shearwater Polymers, Inc. 1997 and 2000 Catalogs (Functionalized Biocompatible Polymers for Research and pharmaceuticals, Polyethylene Glycol and Derivatives).

Los ejemplos específicos de polímeros PEG incluyen los siguientes PEG lineales: NHS-PEG por ejemplo, SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG, y SCM-PEG), y NOR-PEG, BTC-PEG, EPOXPEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO-PEG, y MAL-PEG, y los PEG ramificados tales como PEG2-NHS y los datos a conocer en los documentos US 5.932,462 y US 5.643.575

Además, las siguientes publicaciones dan a conocer moléculas de polímero útiles y/o químicas de PEGilación; documentos US 5.824.778, US 5.476.653, WO 97/32607, EP 0 229 108, EP 0 402 378, US 4.902.502, US 5.281.698, US 5.122.614, US 5.219.564, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 0 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 0 921 131, US 5.736.625, WO 98/05363, EP 0 809 996, US 5.629.384, WO 96/41813, WO 96/07670, US 5.473.034, US 5.516.673, EP 0 605 963, US 5.382.657, EP 0 510 356, EP 0 400 472, EP 0 183 503 y EP 0 154 316.

Los ejemplos preferidos de polímeros PEG activados particularmente preferidos para el acoplamiento a restos de cisteína incluyen los siguientes PEG lineales: vinilsulfona-PEG (VS-PEG), preferiblemente vinilsulfona-mPEG (VS-mPEG); maleimida-PEG (MAL-PEG), preferiblemente maleimida -mPEG (MAL-mPEG) y ortopiridil-disulfuro-PEG (OPSS-PEG), preferiblemente ortopiridil-disulfuro-mPEG (OPSS-mPEG). Normalmente, dichos polímeros PEG o mPEG tendrán un tamaño de aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 12 kDa o aproximadamente 20 kDa.

La conjugación de la variante de polipéptido y de las moléculas activadas de polímero se lleva a cabo mediante el uso de cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, tal como se describe en las siguientes referencias (que describen también los procedimientos adecuados para la activación de las moléculas de polímero): Harris y Zalipsky, eds., Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications, AZC, Washington; R.F. Taylor, (1991), "Protein immobilisation. Fundamental and applications", Marcel Dekker, N.Y.; S.S. Wong, (1992), "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Raton; G.T. Hermanson y col., (1993), "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, N.Y.).

La persona experta será consciente de que el procedimiento de activación y/o la química de conjugación que se van a usar dependen del(de los) grupo(s) de enlace de la variante de polipéptido (ejemplo de los cuales se proporcionan de manera adicional anteriormente), así como de los grupos funcionales del polímero (por ejemplo, que son amina, hidroxilo, carboxilo, aldehído, sulfhidrilo, succinimidilo, maleimida, vinilsulfona o haloacetato). La PEGilación puede dirigirse hacia la conjugación de todos los grupos de enlace disponibles en la variante de polipéptido (es decir, dichos grupos de enlace que se exponen en la superficie del polipéptido) o se puede dirigir hacia uno o más grupos de enlace específicos, por ejemplo, el grupo amino del extremo N que se describe en el documento US 5.985.265 o a los restos de cisteína. Además, se puede conseguir la conjugación en una etapa o en una manera por etapas (por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 99/55377).

Para la PEGilación con restos cisteína (véase anteriormente) la variante FVII o FVIIa se trata usualmente con un agente reductor, tal como ditiotreitól (DDT) antes de la PEGilación. El agente reductor se elimina posteriormente mediante cualquier procedimiento convencional, tal como mediante desalación. La conjugación de PEG a un resto cisteína tiene lugar normalmente en un tampón adecuado a pH 6-9 a temperaturas que varían desde 4°C a 25°C durante periodos de hasta 16 horas.

Se entenderá que la PEGilación se diseña de tal manera que produzca la molécula óptima con respecto al número de moléculas de PEG unidas, el tamaño y la forma de dichas moléculas (por ejemplo, si son lineales o ramificadas) y el(los) sitio(s) de unión en la variante de polipéptido. El peso molecular del polímero que se va a usar puede, por ejemplo, escogerse sobre la base del efecto deseado que se va a conseguir.

Junto con la conjugación con únicamente un único grupo de enlace en la proteína (por ejemplo, el grupo amino del extremo N), puede ser ventajoso que la molécula de polímero, que puede ser lineal o ramificada, tenga un peso molecular elevado, preferiblemente de aproximadamente 10-25 kDa, tal como aproximadamente de 15-25 kDa, por ejemplo, aproximadamente 20 kDa.

Normalmente, la conjugación del polímero se lleva a cabo en las condiciones destinadas para que reaccionen la mayoría de los grupos de enlace del polímero disponibles con las moléculas de polímero. Se consigue esto por medio de un exceso molar adecuado del polímero con respecto al polipéptido. Normalmente, las relaciones molares de las moléculas de polímero activadas con el polipéptido son hasta de aproximadamente 1000-1, tal como hasta de aproximadamente 200-1, o hasta de aproximadamente 100-1. En algunos casos la relación puede ser ligeramente inferior, sin embargo, tal como hasta de aproximadamente 50-1, 10-1, 5-1, 2-1 o 1-1, con el fin de obtener una reacción óptima.

Se contempla de acuerdo con la invención acoplar las moléculas de polímero con el polipéptido mediante un enlazante. La persona experta conoce bien los enlazantes adecuados. Un ejemplo preferido es cloruro cianúrico (Abuchowski y col., J Biol Chem 1977; 252: 3578-3581; documento US 4.179.337; Shafer y col., J Polym Sci Polym Chem Ed 1986; 24: 375-378).

Inmediatamente después de la conjugación, las moléculas residuales de polímero activado se bloquean de acuerdo a los procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la adición de una amina primaria a la mezcla de reacción, y las moléculas de polímero inactivado resultantes se eliminan mediante un procedimiento adecuado.

5 Se entenderá que dependiendo de las circunstancias, por ejemplo, de la secuencia de aminoácidos de la variante de polipéptido, de la naturaleza del compuesto PEG activado que se está usando y de las condiciones específicas de PEGilación, que incluyen la relación molar de PEG a polipéptido, se pueden obtener grados variables de PEGilación, obteniéndose un grado mayor de PEGilación por lo general con una relación mayor de PEG a variante de polipéptido. Los polipéptidos de la variante PEGilada que son el resultado de cualquier procedimiento de PEGilación dado, comprenderán, sin embargo, normalmente, una distribución estocástica de las variantes de polipéptido conjugados que tienen grados
10 ligeramente diferentes de PEGilación.

Conjugación con un resto azúcar

Con el fin de conseguir la glicosilación *in vivo* de una molécula de FVII que comprende uno o más sitios de glicosilación, se debe insertar la secuencia de nucleótidos que codifica la variante de polipéptido en un huésped glicosilante de expresión eucariota. Se puede seleccionar la célula huésped de expresión de hongos (hongos filamentosos o levaduras),
15 células de insectos o animales o de células de plantas transgénicas. En una forma de realización, la célula huésped es una célula de mamífero, tal como una célula CHO, BHK o HEK, por ejemplo, una célula HEK 293, o una célula de insecto, tal como una célula SF9, o una célula de levadura, por ejemplo, *S. cerevisiae* o *Pichia pastoris*, o cualquiera de las células huéspedes mencionadas a partir de ahora en el presente documento.

Se puede usar también el acoplamiento covalente *in vitro* de restos azúcar (tales como dextrano) con restos aminoácidos de la variante de polipéptido, por ejemplo, tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 y en Aplin y col., CRC Crit Rev. Biochem 1981; 259-306. El acoplamiento *in vitro* de los restos azúcar de PEG con restos Gln unidos a proteínas y péptidos se puede llevar a cabo mediante transglutaminasas (TGasas). Las transglutaminasas catalizan la transferencia de grupos amina donantes con restos Gln unidos a proteínas y péptidos en una reacción de reticulación así denominada. Los grupos amina donantes pueden estar unidos a proteínas o péptidos tales como el grupo ϵ -amino en restos lisina o pueden ser parte de una molécula orgánica pequeña o grande. Un ejemplo de una pequeña molécula orgánica que funciona como amino donante en reticulación catalizada por TGasa es Putrescina (1,4-diaminobutano). Un ejemplo de una pequeña molécula orgánica que funciona como amino donante en reticulación catalizada por TGasa es una PEG que contiene amina (Sato y col., Biochemistry 1996; 35; 13072-13080).
20

Las TGasas, en general, son enzimas muy específicas, y no todos los restos Gln expuestos en la superficie de una proteína son accesibles a reticulación catalizada por TGasa con sustancias que contienen amino. Por el contrario, únicamente unos pocos restos Gln funcionan naturalmente como sustratos TGasa pero los parámetros exactos que determinan cuáles de dichos restos Gln son buenos sustratos TGasa, siguen siendo desconocidos. De esta manera, con el fin de volver una proteína susceptible a reacciones de reticulación catalizadas por TGasa es a menudo un prerrequisito añadir tramos en las posiciones convenientes de la secuencia de aminoácidos conocida que funcionan muy bien como sustratos TGasa. Se sabe que algunas secuencias de aminoácidos son o contienen excelentes sustratos TGasa naturales, por ejemplo, la sustancia P, la elafina, el fibrinógeno, la fibronectina, el inhibidor de la α_2 -plasmina, las α -caseínas, y las β -caseínas.
30

Conjugación con un agente orgánico de derivatización de la técnica

Se puede llevar a cabo una modificación covalente de la variante de polipéptido haciendo reaccionar uno o más grupos de enlace de la variante de polipéptido con un agente orgánico de derivatización. Los agentes y procedimientos de derivatización adecuados son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, se hacen reaccionar más comúnmente restos de cisteinilo con α -haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Se derivatizan también restos de cisteinilo mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(4-imidozoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol. Se derivatizan restos histidilo mediante reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico de la cadena lateral de histidilo. Es también útil el bromuro de para-bromofenacilo. La reacción se lleva a cabo preferiblemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0. Se hacer reaccionar restos lisinilo y del extremo amino con anhídridos de ácido succínico u otro carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los restos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar restos que contienen α -amino incluyen imidóesteres tales como metil picolinimidato, piridoxal fosfato, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y la reacción catalizada con transaminasa con glioxilato. Se modifican restos arginilo mediante reacción con uno o algunos reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. La derivatización de restos arginina requiere que la reacción se lleve a cabo en condiciones alcalinas debido al elevado pKa del grupo funcional de la guanidina.
40
45
50
55

Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo guanidino de la arginina. Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidias (R-N=C=N-R'), en las que R y R' son grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los restos aspartilo y glutamilo se convierten en asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

Conjugación con un compuesto lipófilo

Se pueden conjugar entre sí la variante de polipéptido y el compuesto lipófilo, tanto directamente como mediante el uso de un enlazante. El compuesto lipófilo puede ser un compuesto natural tal como un ácido graso saturado o insaturado, una dicetona de ácido graso, un terpeno, una prostaglandina, una vitamina, un carotenoide o esteroide, o un compuesto sintético tal como un ácido carbónico, un alcohol, una amina y un ácido sulfónico con uno o más compuestos alquilo, arilo, alquenilo u otros múltiples insaturados. La conjugación entre la variante de polipéptido y el compuesto lipófilo, opcionalmente a través de un enlazante se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos conocidos en la materia, por ejemplo, tal como se describe por Bodanszky en Peptide Synthesis, John Wiley, Nueva York, 1976 y en el documento WO 96/12505.

Unión de un inhibidor de la serina proteasa

Se puede llevar a cabo la unión de un inhibidor de la serina proteasa de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 96/12800

Conjugación de un polipéptido etiquetado

En una forma de realización alternativa, la variante de polipéptido se expresa como una proteína de fusión con una etiqueta, es decir, una secuencia de aminoácidos o un tramo de péptido preparado normalmente con 1-30, tal como con 1-20 restos aminoácidos. A la vez que permite una purificación rápida y sencilla, la etiqueta es una herramienta conveniente para conseguir la conjugación entre la variante del polipéptido etiquetado y el resto no polipéptido. En particular, la etiqueta se puede usar para conseguir la conjugación en placas de microvaloración u otros vehículos, tales como perla paramagnéticas, a las cuales se puede inmovilizar la variante del polipéptido etiquetado mediante la etiqueta. La conjugación con la variante del polipéptido etiquetado en, por ejemplo, placas de microvaloración, tiene la ventaja de que la variante del polipéptido etiquetado se puede inmovilizar en las placas de microvaloración directamente del caldo de cultivo (en principio sin ninguna purificación) y someterse a conjugación. Por tanto, el número total de etapas de procedimiento (desde expresión a conjugación) se puede reducir. Además, la etiqueta puede funcionar como una molécula separador, asegurando una accesibilidad mejorada a la variante de polipéptido inmovilizada que se va a conjugar. La conjugación usando una variante de polipéptido etiquetada puede ser con cualquiera de los restos no polipéptidos dados a conocer en el presente documento, por ejemplo con una molécula de polímero tal como PEG.

La identidad de la etiqueta específica que se va a usar no es crítica siempre que la etiqueta sea capaz de expresarse con la variante de polipéptido y sea capaz de inmovilizarse sobre una superficie adecuada o material portador. Están disponibles numerosas etiquetas adecuadas, por ejemplo, de Unizyme Laboratories, Dinamarca. Se puede conseguir la posterior escisión de la etiqueta de la variante de polipéptido mediante el uso de enzimas comercialmente disponibles.

Inactivación de las variantes de FVII/FVIIa de la invención

En otra forma de realización interesante de la invención, se pueden inactivar las variantes dadas a conocer en el presente documento. La forma inactivada es capaz de competir con FVII o FVIIa naturales para la unión con FT y la inhibición de la actividad de coagulación, y se prevé que dichas variantes inactivadas serán antagonistas muy potentes del factor tisular. De esta manera, en otro aspecto, la presente invención se refiere a las variantes de FVII/FVIIa descritas en el presente documento en sus formas inactivadas así como a dichas variantes de FVII/FVIIa inactivadas para uso como medicamentos. Más particularmente, la variante inactivada de la invención se puede usar para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o trastorno relacionado con FVIIa/FT en un mamífero. Por ejemplo, se puede usar la variante inactivada de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de enfermedades en las que es deseable una actividad anticoagulante, tal como la profilaxis o tratamiento de pacientes que están en estados hipercoagulables, tales como pacientes con sepsis, trombosis de las venas profundas, pacientes en riesgo de infecciones de miocardio o apoplejía trombótica, embolismo pulmonar, pacientes con síndromes coronarios agudos (infarto de miocardio y angina de pecho inestable), pacientes que experimentan cardiopatías coronarias, prevención de episodios cardíacos y restenosis en pacientes que reciben angioplastia, pacientes con enfermedades vasculares periféricas. Se puede usar también la variante inactivada de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades respiratorias, crecimiento tumoral y metástasis. Análogamente, se puede usar la variante inactivada de la invención en un procedimiento para tratar un mamífero que tiene una enfermedad o trastorno relacionado con FVIIa/FT (tal como una o más de las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente), que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad eficaz de dicho conjugado o composición inactivada.

Tal como se usa en el presente documento, el término “inactivada”, cuando se usa junto con las variantes de la invención, se pretende que signifique una variante que tiene menos del 5% de la actividad de coagulación de hFVIIa o rhFVIIa cuando se mide en la “Prueba de Sangre Completa” descrita en el presente documento.

Las variantes descritas en el presente documento pueden estar inactivadas mediante procedimientos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, un polipéptido FVII o FVIIa activo puede volverse inactivo carbamiloando el grupo α -amino I153 o complejando el polipéptido con un inhibidor de la serina proteasa, de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 96/12800. Una proteína inhibidora de la serina adecuada se selecciona, por ejemplo, entre el grupo que consiste en un compuesto organofosforado, un sulfanilfluoruro, una halometilcetona de péptido, preferiblemente una Dansil-Phe-Pro-Arg clorometilcetona, Dansil-Glu-Glu-clorometilcetona, Dansil-Phe-Phe-Arg clorometilcetona o una Phe-Phe-Arg clorometilcetona, o un azapéptido.

Alternativamente, las variantes de la invención se pueden volver inactivas eliminando al menos un resto aminoácido que ocupa una posición seleccionada entre el grupo que consiste en R152, I153, S344, D242 y H193. Se puede efectuar la eliminación mediante una sustitución o deleción de uno o más de los restos de aminoácidos anteriormente identificados. Preferiblemente, la eliminación se efectúa mediante sustitución, en particular mediante sustitución conservativa. De acuerdo con esto, el polipéptido FVII o FVIIa inactivado usado en el presente documento puede comprender una o más de las siguientes sustituciones: R152X, I153X, S344X, D242X o H193X, en las que X es cualquier resto aminoácido, preferiblemente uno que conduce a una sustitución conservativa. Por ejemplo, el polipéptido FVII o FVIIa inactivado comprende las mutaciones R152X, en la que X es cualquier resto aminoácido diferente de lisina (debido a que lisina forma parte de un sitio de escisión de la proteasa). Otros ejemplos de sustituciones específicas incluyen I153AV/L; S344T/A/G/Y, preferiblemente S344A; D242E/A y/o H193R/A.

Otra solución incluye llevar a cabo modificaciones en o cerca de la región del sitio activo. Por ejemplo, se contempla que se pueden introducir ventajosamente uno o más grupos de enlace de los restos no polipéptidos, tales como los grupos de enlace de los sitios de N-glicosilación, en la región del sitio activo o en el borde de la hendidura de unión del sitio activo de la variante de FVII o FVIIa. La región del sitio activo, el sitio de unión al factor tisular y el borde de la hendidura de unión del sitio activo se definen en el Ejemplo I en el presente documento.

De esta manera, los ejemplos específicos de sustituciones que crean dicho sitio de N-glicosilación incluyen las sustituciones seleccionadas entre el grupo que consiste en I153N+G155S/T, Q167N+L169S/T, V168N+L170S/T, L169N+L171S/T, L170N+V172S/T, L171N+N173S/T, A175S/T, A175N+L177S/T, L177N+G179S/T, G179N, G180N+L182S/T, T181N+I183S/T, V188N, V189N+A191S/T, S190N+A192S/T, A191N+H193S/T, H193N+F195S/T, F195N+K197S/T, D196N+I198S/T, K197N+K199S/T, I198N+N200S/T, K199N+W201S/T, W201N+N203S/T, R202S/T, I205S/T, V228N+I230S/T, I229N+P231S/T, I230N, P231N, S232N+Y234S/T, T233N+V235S/T, Y234N+P236S/T, V235N+G237S/T, P236N, G237N, T238N+N240S/T, T239N+H241S/T, H241N+I243S/T, D242S/T, I243N+L245S/T, A244N+L246S/T, L245N+R247S/T, L246N+L246S/T, V281N+G283S/T, S282N+W284S/T, G283N+G285S/T, W284N+Q286S/T, G285N+L287S/T, Q286N+L288S/T, D289N+G291S/T, R290N+A292S/T, G291N, A292N+A294S/F, T293N+L295S/T, P321N+I323S/T, T324N+Y326S/T, Y326N+F327S/T, F328N+A330S/T, S339N+K341S/T, K341N+D343S/T, G342N+S344S/T, D343N+G345S/T, S344N+G346S/T, G345N+P347S/T, P347N+A349S/T, H348N, L358N+G360S/T, T359N+I361S/T, G360N+V362S/T, I361N, V362N+W364S/T, S363N+G365S/T, W364N+Q366S/T, G365N+G367S/T, T370N+G372S/T, V376N, Y377N+R379S/T, T378N+V380S/T, V380N+Q382S/T, Q382N+I384S/T, Y383N+E385S/T, W386N+Q388S/T, L387N+K389S/T, L400N+R402S/T y sus combinaciones. Preferiblemente, la sustitución se selecciona entre el grupo que consiste en D289N+G291S/T, R290N+A292S/T, G291N, A292N+A294S/T, T293N+L295S/T, S339N+K341S/T, K341N+D343S/T, G342N+S344S/T, D343N+G345S/T, y sus combinaciones. Más preferiblemente, la sustitución se selecciona entre el grupo que consiste en D289N+G291T, R290N+A292T, G291N, A292N+A294T, T293N+L295T, S339N+K341T, K341N+D343T, G342N+S344T, D343N+G345T, y sus combinaciones, en particular G291N.

Normalmente, una variante inactivada tiene una actividad de coagulación significativamente reducida en comparación con hFVIIa o rhFVIIa natural. Preferiblemente, la variante inactivada tiene menos del 4% de la actividad de coagulación de hFVIIa o rhFVIIa cuando se ensaya en la Prueba de Sangre Completa descrita en el presente documento. Más preferiblemente, la variante inactivada tiene menos del 3% de la actividad de coagulación, tal como menos del 2% de la actividad de coagulación, por ejemplo, menos del 1% de la actividad de coagulación de hFVIIa o rhFVIIa cuando se ensaya en el Ensayo de Sangre Completa descrito en el presente documento.

Como se entenderá, los detalles y particularidades que se refieren a las variantes inactivadas de la invención (por ejemplo, las sustituciones preferidas, la formulación de las variantes, etc) serán iguales o análogos a la variante (activa) aspecto de la invención, cuando sea apropiado. De esta manera, las definiciones y detalles que se refieren a las variantes inactivadas de la invención se aplicarán cambiando lo que se deba cambiar a las variantes activas dadas a conocer en el presente documento, cuando sea apropiado.

Procedimientos de preparación de una variante de polipéptido de la invención

Las variantes de polipéptido de la presente invención, opcionalmente en forma glicosilada se pueden producir mediante cualquier procedimiento conocido en la materia. Dichos procedimientos incluyen construir una secuencia de nucleótidos que codifica la variante de polipéptido y expresa la secuencia en un huésped transformado o transfectado adecuado.

5 Preferiblemente, la célula huésped es una célula huésped gammacarboxilante tal como una célula de mamífero. Sin embargo, se pueden producir las variantes de polipéptido de la invención, aunque menos eficazmente, mediante síntesis química o una combinación de síntesis química o una combinación de síntesis química y tecnología de ADN recombinante.

10 Se puede construir una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de polipéptido de la invención aislando o sintetizando una secuencia de nucleótidos que codifica un FVII natural humano y a continuación cambiando la secuencia de nucleótidos de tal manera que efectúe la introducción (es decir, la inserción o la sustitución) o la eliminación) del(de los) resto(s) aminoácido(s) relevante(s).

15 La secuencia de nucleótidos se modifica convenientemente mediante mutagénesis sitiodirigida de acuerdo con procedimientos convencionales. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos se prepara mediante síntesis química, por ejemplo, usando un sintetizador de oligonucleótidos, en el que los oligonucleótidos se diseñan basándose en la secuencia de aminoácidos de la variante de polipéptido deseada, y seleccionando preferiblemente aquellos codones que está favorecidos en la célula huésped en los que se producirá la variante de polipéptido recombinante. Por ejemplo se pueden sintetizar algunos pequeños oligonucleótidos que codifican porciones de la variante de polipéptido deseada y ensamblarse mediante PCR, ligadura o reacción en cadena de ligadura (LCR) (Barany, PNAS 88: 189-193, 1991). Los oligonucleótidos individuales contienen normalmente 5' o 3' salientes para el ensamblaje complementario.

20 Están disponibles procedimientos alternativos de modificación de secuencias de nucleótidos para producir variantes de polipéptido para un cribado de elevado rendimiento, procedimientos, por ejemplo, que implican retrocruzamiento homólogo tal como el dado a conocer en el documento US 5.093.257, y procedimientos que implican reordenación génica, es decir recombinación entre dos o más secuencias de nucleótidos homólogas que dan como resultado nuevas secuencias de nucleótidos que tienen numerosas alteraciones de nucleótidos cuando se comparan con las secuencias de nucleótidos de partida. La reordenación génica (conocida también como reordenación del ADN) implica uno o más ciclos de fragmentación aleatoria y reensamblaje de las secuencias de nucleótidos, seguido por cribado para seleccionar las secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos con propiedades deseadas. Con el fin de que tenga lugar la reordenación del ácido nucleico basándose en la homología, las partes relevantes de las secuencias de nucleótidos son preferiblemente al menos un 50% idénticas, tal como al menos un 60% idénticas, más preferiblemente al menos un 70% idénticas, tal como al menos un 80% idénticas. Se puede llevar a cabo la recombinación *in vitro* o *in vivo*.

30 Ejemplos de procedimientos de reordenación génica *in vitro* adecuados se dan a conocer en Stemmer y col. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA; vol. 91, pp. 10747-10751; Stemmer (1994), Nature, vol. 370, pp. 389-391; Smith (1994), Nature vol. 370, pp. 324-325; Zhao y col., Nat. Biotechnol., marzo de 1998; 16(3): 258-61; Zhao H. y Arnold, FB, Nucleic Acids Research, 1997, Vol. 25. No. 6 pp. 1307-1308; Shao y col., Nucleic Acids Research, 15 de enero de 1998; 26(2): pp. 681-83; y documento WO 95/17413.

35 Un ejemplo de procedimiento de reordenación *in vivo* adecuado se da a conocer en el documento WO 97/07205. Se dan a conocer otras técnicas para la mutagénesis de secuencias de ácido nucleico mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en el documento WO 97/20078, y en el documento US 5.837.458. Los ejemplos de técnicas de reordenación específicas incluyen "reordenación de familias", reordenación sintética" y "reordenación *in silico*"

40 La reordenación de familias implica someter una familia de genes homólogos de diferentes especies a uno o más ciclos de reordenación y posterior cribado o selección. Se dan a conocer técnicas de reordenación de familias, por ejemplo, en Cramer y col. (1998), Nature, vol. 391, pp. 288-291; Christians y col. (1999), Nature Biotechnology, vol. 17, pp. 259-264; Chang y col. (1999), Nature Biotechnology, vol. 17, pp. 793-797; y Ness y col. (1999), Nature Biotechnology, vol. 17, 893-896.

45 La reordenación sintética implica proporcionar bibliotecas de oligonucleótidos sintéticos solapantes basándose, por ejemplo en una alineación de secuencias de los genes homólogos de interés. Los oligonucleótidos generados sintéticamente se recombinan, y las secuencias de ácidos nucleicos recombinantes resultantes se criban y si se desea, se usan para ciclos adicionales de reordenación. Se dan a conocer técnicas de reordenación sintética en el documento WO 00/42561.

50 La reordenación *in silico* se refiere a un procedimiento de reordenación del ADN, que se lleva a cabo o se modela usando un sistema informático, evitando por tanto parcial o completamente, la necesidad de manipular físicamente los ácidos nucleicos. Se dan a conocer técnicas para la reordenación *in silico* en el documento WO 00/42560.

Una vez ensamblada (mediante síntesis, mutagénesis sitodirigida u otro procedimiento), la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se inserta en un vector recombinante y se une de manera operable para controlar las secuencias necesarias para la expresión de FVII en la célula huésped transformada deseada.

[0227] Debe entenderse por supuesto que no todos los vectores y las secuencias control de la expresión funcionan igualmente bien para expresar la secuencia de nucleótidos que codifica las variantes de polipéptido descritas en el presente documento. Ninguno de los huéspedes funcionará igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la materia puede hacer una selección entre estos vectores, secuencias control de la expresión y huéspedes sin experimentación innecesaria. Por ejemplo, en la selección de un vector, se debe considerar el huésped debido a que el vector debe replicarse en éste o ser capaz de integrarse en el cromosoma. Deben considerarse también el número de copias del vector, la capacidad de controlar este número de copias, y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores de antibióticos. En la selección de una secuencia control de la expresión, deben considerarse también una variedad de factores. Estos incluyen, por ejemplo, la fuerza relativa de la secuencia, su controlabilidad, y su compatibilidad con la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, particularmente con respecto a las estructuras secundarias potenciales. Deben seleccionarse huéspedes en consideración a su compatibilidad con el vector escogido, la toxicidad del producto codificado por la secuencia de nucleótidos, sus características de secreción, su capacidad para plegar la variante de polipéptido correctamente, sus requerimientos de fermentación o de cultivo, y la facilidad de purificación de los productos codificados por la secuencia de nucleótidos.

El vector recombinante puede ser un vector que se replica autónomamente, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es dependiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector es uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado.

El vector es preferiblemente un vector de expresión, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la variante de polipéptido de la invención se une de manera operable con los segmentos adicionales requeridos para la transcripción de la secuencia de nucleótidos. El vector se deriva normalmente de ADN plásmido o vírico. Están comercialmente disponibles o se describen en la bibliografía numerosos vectores de expresión adecuados para la expresión en las células huéspedes mencionadas en el presente documento. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas, incluyen, por ejemplo, los vectores que comprenden secuencias control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores específicos son, por ejemplo, pCDNA3.1(+)-Hyg (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y pCI-neo (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). Los vectores de expresión útiles para células de levadura incluyen el plásmido 2 μ y sus derivados, el vector POT1 (documento US 4.931.373), el vector pJSO37 descrito en Okkels, Ann. Nueva York Acad. Sci. 782, 202-207, 1996, y pPICZ A, B o C (Invitrogen). Los vectores útiles para células de insecto incluyen pVL941, pBG311 (Cate y col., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance And Expression of the Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, pp. 685-98 (1986), pBluebac 4.5 y pMelbac (ambos disponibles de Invitrogen). Los vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *E. coli*, que incluyen pBR322, pET3a y pET12a (ambos de Novagen Inc., WI, EE.UU.), plásmidos con un intervalo más amplio de huéspedes, tales como RP4, ADN de fagos, por ejemplo, los numerosos derivados del fago lambda, por ejemplo NM989, y otros fagos de ADN, tales como M13 y fagos de ADN monocatenario filamentosos.

Otros vectores para uso en esta invención incluyen los que permiten la secuencia de nucleótidos que codifica la variante de polipéptido que se va a amplificar en el número de copias. Dichos vectores amplificables son bien conocidos en la materia. Incluyen, por ejemplo, vectores capaces de amplificarse mediante amplificación DHFR (véanse por ejemplo, Kaufman, Patente de los Estados Unidos N°. 4.470.461, Kaufman y Sharp, "Construction Of A Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis Of Signals Utilized For Efficient Expression", Mol. Cell. Biol., 2, pp. 1304-19 (1982)) y amplificación mediante glutamina sintetasa ("GS") (véanse, por ejemplo, documentos US 5.122.464 y EP 338.841).

El vector recombinante puede comprender además una secuencia de ADN que permita al vector replicarse en la célula huésped en cuestión. Un ejemplo de dicha secuencia (cuando la célula huésped es una célula de mamífero) es el origen de replicación de SV40. Cuando la célula huésped es una célula de levadura, las secuencias adecuadas que permiten al vector replicarse son las de los genes REP 1-3 de replicación del plásmido 2 μ de levadura y el origen de replicación.

El vector puede comprender también un marcador seleccionable, por ejemplo el producto de un gen del cual complementa un defecto en la célula huésped, tal como un gen que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) o el gen TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (descrito por P.R. Russell, Gene 40, 1985, pp. 125-130), o uno que confiere resistencia a un fármaco, por ejemplo, ampicilina, kanamicina tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato. Para *Saccharomyces cerevisiae*, los marcadores seleccionables incluyen *ura3* y *leu2*. Para los hongos filamentosos, los marcadores seleccionables incluyen *amdS*, *pyrG*, *arcS*, *niaD* y *sC*.

El término "secuencias control" se define en el presente documento para incluir todos los componentes, que son necesarios o ventajosos para la expresión de la variante de polipéptido de la invención. Cada secuencia control puede ser natural o extraña a la secuencia de ácido nucleico que codifica la variante de polipéptido. Dichas secuencias control

incluyen, pero no se limitan a, una secuencia líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia propéptido, un promotor, una secuencia potenciadora o de activación en la dirección 5', una secuencia del péptido señal, y un terminador de la transcripción. Como mínimo. Las secuencias control incluyen un promotor.

5 Se pueden usar una amplia variedad de secuencias control de la expresión en la presente invención. Dichas secuencias control de la expresión útiles incluyen las secuencias control de la expresión asociadas con genes estructurales de los vectores de expresión anteriores así como cualquier secuencia conocida que controle la expresión de los genes de células procariontas o eucariotas o sus virus, y sus diversas combinaciones.

10 Los ejemplos de secuencias control adecuadas para dirigir la transcripción en células de mamíferos incluyen los promotores temprano y tardío de SV40 y adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío mayor de adenovirus 2, el promotor MT-1 (gen de la metalotioneína), el promotor del gen inmediato-temprano de citomegalovirus humano (CMV), el promotor del factor α de elongación humano (EF-1 α), el promotor de la proteína 70 de choque térmico mínimo de *Drosophila*, el promotor de Virus del Sarcoma de Rous (VSR), el promotor de la ubiquitina C humana (UbC), el terminador de la hormona de crecimiento humana, las señales de poliadenilación de la región Elb de SV40 o adenovirus y la secuencia consenso de Kozak (Kozak, M. J Mol Biol 20 de agosto de 1987 ;196(4): 947-50).

15 Con el fin de mejorar la expresión en células de mamíferos, se puede insertar un intrón sintético en la región 5' sin traducir de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Un ejemplo de un intrón sintético es el intrón sintético procedente del plásmido pCl-Neo (disponible de Promega Corporation, WI, EE.UU.).

20 Los ejemplos de secuencias control adecuadas para dirigir la transcripción en células de insectos incluyen el promotor de la polihedrina, el promotor P10, el promotor de la proteína básica del virus de la poliedrosis de *Autographa californica*, y la secuencia de poliadenilación de SV40. Los ejemplos de secuencias control adecuadas para el uso en células huéspedes de levadura incluyen los promotores del sistema de α -emparejamiento de levaduras, el promotor de la triosa isomerasa fosfato (TPI) de levadura, los promotores de los genes glicolíticos de levadura o los genes de la alcohol deshidrogenasa, el promotor ADH2-4c, y el promotor GAL inducible. Los ejemplos de secuencias control adecuadas para uso en las células huéspedes fúngicas filamentosas incluyen el promotor y el terminador ADH3, un promotor derivado de los genes que codifican la amilasa triosa fosfato isomerasa TAKA o la alcalino proteasa de *Aspergillus oryzae*, una α -amilasa de *A. niger*, una glucoamilasa de *A. niger* o *A. nidulans*, una acetamidasa de *A. nidulans*, una aspártico proteinasa o lipasa de *Rhizomucor miehei*, el terminador TPI1 y el terminador ADH3. Los ejemplos de secuencias control adecuadas para uso en células huéspedes bacterianas incluyen promotores del sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *TAC* o *TRC*, y las regiones promotoras mayores del fago lambda.

30 La presencia o ausencia de un péptido señal dependerá, por ejemplo de la expresión de la célula huésped usad para la producción de la variante de polipéptido que se va a expresar (si es un polipéptido intracelular o extracelular) y si es deseable obtener la secreción. Para uso en hongos filamentosos, el péptido señal puede derivarse convenientemente de un gen que codifica una amilasa o glucoamilasa de *Aspergillus* sp., un gen que codifica una lipasa o proteasa de *Rhizomucor miehei* o una lipasa de *Humicola lanuginosa*. El péptido señal se deriva preferiblemente de un gen que codifica la amilasa TAKA de *A. oryzae*, la α -amilasa neutra de *A. niger*, la amilasa estable a ácido de *A. niger*, o la glucoamilasa de *A. niger*. Para uso en células de insectos, se puede derivar convenientemente el péptido señal de un gen de insecto (compárese con el documento WO 90/05783), tal como el precursor de la hormona adipocinética de *Lepidopteran manduca sexta*, (compárese con el documento US 5.023.328), la melitina de la miel de abeja (Invitrogen), la UDP glucosiltransferasa ecdisteroide (egt) (Murphy y col., Protein Expression and Purification 4, 349-357 (1993) o la lipasa pancreática humana (hpl) (Methods in Enzymology 284, pp. 262-272, 1997). Un péptido señal preferido para uso en células de mamíferos es el de hFVII o el péptido señal de la cadena ligera kappa de la Ig de murino (Coloma, M (1992) J. Imm. Methods 152: 89-104). Se ha encontrado que péptidos señal adecuados para uso en células de levaduras son el péptido señal del factor α de *S. cerevisiae* (compárese con el documento US 4.870.008), un péptido señal de la carboxipeptidasa modificada (compárese con L.A. Valls y col., Cell 48, 1987, pp. 887-897), el péptido señal BAR1 de levadura (compárese con el documento WO 87/02670), el péptido señal de la aspártico proteasa 3 de levadura (YAP3) (compárese con M. Egel-Mitani y col., Yeast 6, 1990, pp. 127-137), y la secuencia líder sintética TA57 (documento WO 98/32867). Se ha encontrado que el péptido señal adecuado para uso en células de *E. coli* es el péptido señal *ompA* (documento EP 581821).

50 La secuencia de nucleótidos de la invención que codifica una variante de polipéptido, si se prepara mediante mutagénesis sitiodirigida, síntesis, PCR u otros procedimientos, puede incluir opcionalmente una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal. El péptido señal está presente cuando se va a secretar la variante de polipéptido de las células en que se expresa. Dicho péptido señal, si está presente, debe ser uno reconocido por la célula seleccionada para la expresión de la variante de polipéptido. El péptido señal será normalmente uno asociado con FVII natural humano.

55 Se puede usar cualquier huésped adecuado para producir la variante de polipéptido, incluyendo bacterias (aunque no particularmente preferidas), hongos (incluyendo levaduras), plantas, insectos, mamíferos, u otras células o líneas de células animales apropiadas, así como animales o plantas transgénicos. Los ejemplos de células huéspedes bacterianas

incluyen bacterias gram positivas tales como cepas de *Bacillus*, por ejemplo, *B. brevis* o *B. subtilis*, o *Streptomyces*, o bacterias gram negativas, tales como cepas de *E. coli*. La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, efectuarse mediante transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), que usa células competentes (véanse, por ejemplo, Young y Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5771-5278). Los ejemplos de células huéspedes fúngicas filamentosas adecuadas incluyen cepas de *Aspergillus*, por ejemplo, *A. oryzae*, *A. niger*, o *A. nidulans*, *Fusarium* o *Trichoderma*. Se pueden transformar células fúngicas mediante un procedimiento que implica formación de protoplastos, transformación de los protoplastos, y regeneración de la pared celular de manera conocida per se. En los documentos EP 238 023 y US 5.679.543 se describen los procedimientos adecuados de transformación de células huéspedes de *Aspergillus*. En Malardier y col., 1989, Gene 78: 147-156 y en el documento WO 96/00787 se describen los procedimientos adecuados para transformar especies de *Fusarium*. Los ejemplos de células huéspedes de levadura adecuadas incluyen cepas de *Saccharomyces*, por ejemplo, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, tales como *P. pastoris* o *P. methanolica*, *Hansenula*, tal como *H. Polymorpha* o *Yarrowia*. La levadura puede transformarse usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, En Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito y col., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; Hinnen y col., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920; y se dan a conocer en Clontech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA, USA (en el protocolo del producto del Kit del Sistema de Transformación de Levadura Yeastmaker™). Los ejemplos de células huéspedes de insectos adecuadas incluyen una línea celular de *Lepidoptera*, tal como *Spodoptera frugiperda* (Sf9 o Sf21) o células de *Trichoplusia ni* (High Five) (documento US 5.077.214). Se puede llevar a cabo la transformación de células de insectos y la producción de polipéptidos heterólogos de las anteriores tal como se describe por Invitrogen. Los ejemplos de células huéspedes de mamíferos adecuadas incluyen líneas de células de ovario de hámster chino (CHO), (por ejemplo, CHO-K1; ATCC CCL-61), líneas de células de mono verde (COS) (por ejemplo, COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); células de ratón (por ejemplo NS/O), líneas de células de riñón de cría de hámster (BHK) (por ejemplo, ATCC CRL-1632 o ATCC CCL-10), y células humanas (por ejemplo, HEK 293 (ATCC CRL-1573)), así como células vegetales en cultivos de tejidos. Se conocen en la materia líneas celulares adecuadas adicionales y están disponibles de depositarios públicos tales como la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. También se pueden modificar las células de mamíferos, tales como una célula CHO para expresar la sialiltransferasa, por ejemplo, 1,6-sialiltransferasa, por ejemplo, tal como se describe en el documento US 5.047.335, con el fin de proporcionar la glicosilación mejorada de la variante de polipéptido.

Puede ser de particular interés a fin de aumentar la secreción, producir la variante de polipéptido de la invención junto con una endoproteasa, en particular una PACE (enzima que convierte el aminoácido básico en emparejado) (por ejemplo, tal como se describe en el documento US 5.986.079), tal como la endoproteasa Kex2 (por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 00/28065).

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en células huéspedes de mamíferos incluyen transfección mediada por fosfato de calcio, electroporación, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas, vectores víricos y el procedimiento de transfección descrito por Life Technologies Ltd, Paisley, Reino Unido, que usa Lipofectamina 2000. Estos procedimientos son bien conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en Ausebel y col. (eds.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, USA. El cultivo de células de mamíferos se lleva a cabo de acuerdo con los procedimientos establecidos, por ejemplo, tal como se da a conocer en Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Editado por Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc, Totowa, New Jersey, USA y Harrison MA y Rae IF, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997.

En los procedimientos de producción de la presente invención, se cultivan las células en un medio nutriente adecuado para la producción de la variante de polipéptido usando procedimientos conocidos en la materia. Se puede cultivar la célula, por ejemplo, mediante cultivo en matraz con agitación, fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentaciones continua, discontinua, alimentación discontinua, o fermentación en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales llevados a cabo en un medio adecuado y en condiciones que permitan expresarse y/o aislarse al polipéptido: El cultivo tiene lugar en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la materia. Los medios adecuados están disponibles de suministradores comerciales o se pueden preparar de acuerdo a composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si se secreta la variante del polipéptido en el medio nutriente, se puede recuperar el polipéptido directamente del medio. Si no se secreta la variante del polipéptido, se puede recuperar de los lisados celulares.

La variante de polipéptido resultante se puede recuperar mediante procedimientos conocidos en la materia. Por ejemplo, la variante de polipéptido se puede recuperar del medio nutriente mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, filtración, extracción, secado mediante pulverización, evaporación, o precipitación.

5 Se pueden purificar los polipéptidos mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, por afinidad, hidrófoba, cromatofocalización, y exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, focalización isoelectrica preparativa), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), HPLC, o extracción (véase, *por ejemplo* Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

10 Se pueden purificar variantes de polipéptido monocatenarios de la invención y activarse para variantes de polipéptido bicatenarios mediante numerosos procedimientos tal como se describe en la bibliografía (Broze y Majerus, 1980, J. Biol. Chem. 255: 1242-47 y Hedner y Kisiel, 1983, J. Clin. Invest. 71: 1836-41). Otros procedimiento en el que se pueden purificar variantes de polipéptido monocatenarios es mediante incorporación de iones Zn durante la purificación tal como se describe en el documento US 5.700.914.

En una forma de realización preferida la variante de polipéptido se purifica como una variante de polipéptido monocatenario, que además, se PEGila opcionalmente. La variante de polipéptido monocatenario opcionalmente PEGilada se activa tanto mediante el uso de una enzima inmovilizada (por ejemplo, factores IIa, IXa, Xa y XIIa) como mediante autoactivación usando una matriz de intercambio iónico positivamente cargada o similar.

15 Es ventajoso purificar en primer lugar la variante de polipéptido en su forma monocatenaria, PEGilarla a continuación y en último lugar activarla mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente o mediante autoactivación tal como se describe por Pedersen y col, 1989, Biochemistry 28: 9331-36. La ventaja de llevar a cabo la PEGilación antes de la activación es que se evita la PEGilación del nuevo extremo amino formado por la escisión de R 152-1153. La PEGilación de este nuevo extremo amino volvería la molécula inactiva debido a la formación de un enlace hidrogeno entre D242 y el grupo amino de I153 es necesario para la actividad

20 **Composición farmacéutica de la invención y su uso**

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

25 La variante de polipéptido o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se pueden usar como un medicamento.

30 Debido a la elevada eficacia de coagulación, la variante de polipéptido de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, es particularmente útil para el tratamiento de hemorragias, incluyendo episodios de hemorragias incontrolables, tales como episodios de hemorragia incontrolable junto con trauma, trombocitopenia, pacientes en tratamiento anticoagulante, y pacientes con cirrosis, tales como pacientes con cirrosis con varices hemorrágicas, u otras hemorragias gastrointestinales y en pacientes que experimentan trasplante ortotópico de hígado, o resección de hígado (que permite cirugía exenta de transfusión).

El trauma se define como una lesión en un tejido vivo producida por un agente extrínseco. Es la 4ª causa que produce la muerte en los Estados Unidos y supone una gran carga financiera en la economía.

35 El trauma se clasifica como trauma contundente o penetrante El trauma contundente da como resultado una compresión interna, un daño de órgano y una hemorragia interna mientras que el trauma penetrante (como consecuencia de un agente que penetra en el cuerpo y destruye el tejido, los vasos y los órganos) da como resultado una hemorragia externa.

40 La hemorragia, como resultado de trauma, puede dar lugar a una cascada de problemas. Por ejemplo, se inician mecanismos fisiológicos de compensación con vasoconstricción periférica y mesentérica inicial para derivar la sangre a la circulación central. Si no se restablece la circulación, viene a continuación un shock hipovolémico (fallo orgánico múltiple debido a una perfusión inadecuada). Debido a que los tejidos a través del cuerpo llegan a carecer de oxígeno, comienza el metabolismo anaerobio. Además, el ácido láctico simultáneo da lugar a que baje el pH de la sangre y se desarrolla una acidosis metabólica. Si la acidosis es grave y no se corrige, el paciente puede desarrollar una insuficiencia multiorgánica y morir.

45 Aunque la mayoría de los pacientes de trauma sufren hipotermia a la llegada a la sala de urgencias debido a las condiciones ambientales en el quirófano, una protección inadecuada, la administración intravenosa de fluido, y la pérdida continua de sangre que empeora el estado hipotérmico. Pueden aparecer deficiencias en los factores de coagulación debido a la pérdida de sangre o a las transfusiones. Mientras tanto, la acidosis y la hipotermia interfieren con los mecanismos de coagulación de la sangre. De esta manera, se desarrolla una coagulopatía, que a la vez, puede enmascarar los sitios de hemorragia e impedir el control mecánico de la hemorragia. La hipotermia, la coagulopatía y la acidosis se caracterizan a menudo como la "tríada traumática de la muerte".

50 El trauma puede estar producido por diversos sucesos, por ejemplo, accidentes de tráfico en carreteras que dan como resultado muchos tipos diferentes de trauma. Mientras que algunos accidentes de tráfico en carretera dan probablemente

- 5 como resultado un trauma penetrante, muchos accidentes de tráfico en carretera es probable que produzcan un trauma contundente en la cabeza y el cuerpo. Sin embargo, estos diversos tipos de trauma pueden dar todos como resultado una coagulopatía en el paciente. Los accidentes de tráfico en carretera son la principal causa de muerte por accidente en los EE.UU. Hay unas 42.000 muertes producidas por los mismos en los Estados Unidos cada año. Muchos pacientes de trauma mueren en el lugar del accidente, mientras se están tratando por personal sanitario auxiliar, antes de llegar o estar en tránsito a la sala de urgencias.
- 10 Otro ejemplo incluye las heridas por arma de fuego. Las heridas por arma de fuego son traumas que dan como resultado una hemorragia masiva. Son penetrantes y destruyen tejido a medida que la bala atraviesa el cuerpo, si están en el torso o en una extremidad. En los Estados Unidos, aproximadamente unas 40.000 personas al año mueren por heridas por arma de fuego.
- 15 Un ejemplo adicional incluye las caídas. Las caídas dan como resultado un perfil similar al del tipo trauma por accidente de tráfico en carretera. Caer sobre un objeto sólido o al suelo desde una altura puede producir trauma penetrante y contundente decelerativo. En los Estados Unidos, las caídas son causa común de muerte por accidente, en un número aproximado de 13.000.
- Otro ejemplo adicional incluye accidentes con maquinaria. Un pequeño número de personas mueren en los Estados Unidos por muertes relacionadas con accidentes con máquinas, ya sea por una herida o por quedar atrapado en la maquinaria. Las cifras son pequeñas pero significativas – aproximadamente 2.000.
- 20 Un ejemplo más adicional incluye heridas por objetos punzantes. Las heridas por objetos punzantes son lesiones penetrantes que pueden producir también hemorragia masiva. Los órganos que quedan dañados con más probabilidad en una herida por objeto punzante son el hígado, el intestino delgado y el colon.
- 25 La cirrosis hepática es la secuela terminal de una lesión repetida prolongada en el parénquima hepático. El resultado final es la formación de amplias bandas de tejido fibroso que separa nódulos regenerativos que no mantienen la organización normal de los lóbulos hepáticos y originan de esta manera una función hepática deteriorada. Los pacientes tienen tiempos de protombina prolongados como resultado del agotamiento de los factores de coagulación dependientes de la vitamina K. Patológicamente, la cirrosis hepática debería contemplarse como la ruta común final de la lesión hepática crónica, que puede ser el resultado de cualquier forma de lesión celular hepática prolongada repetida intensa. La cirrosis hepática puede estar producida por lesión directa del hígado, que incluye alcoholismo crónico, hepatitis vírica crónica (tipos B, C, y D), y hepatitis autoinmune así como lesión indirecta debida a daño en el conducto biliar, que incluye cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y atresia biliar. Causas menos comunes de cirrosis incluyen lesión directa del hígado producida por enfermedad heredada tal como fibrosis quística, deficiencia en alfa-1-antitripsina, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, galactosemia, y enfermedad producida por almacenamiento de glucógeno.
- 30 El trasplante se reserva principalmente a los pacientes cirróticos en última etapa, en los que es la intervención clave para tratar la enfermedad. Para ser elegible para trasplante, un paciente debe clasificarse como B o C pediátrico, así como cumplir criterios adicionales de selección. El último año, solo en los Estados Unidos, se llevaron a cabo 4.954 trasplantes.
- 35 Se ha estimado que existen 6.000 episodios de hemorragias asociados con pacientes que experimentan resección cada año. Esto se correlaciona con la posición cautelosa de este procedimiento aunque parece ligeramente elevado en comparación con el número de trasplantes.
- 40 Son difíciles de obtener datos fiables sobre la incidencia de hemorragias varicosas. Los hechos clave conocidos son que en el momento del diagnóstico, las varices están presentes en aproximadamente un 60% de pacientes descompensados y un 30% de pacientes compensados y que aproximadamente un 30% de estos pacientes con varices experimentarán una hemorragia y que cada episodio de hemorragia varicosa está asociado con un 30% de riesgo de mortalidad.
- 45 La trombocitopenia está producida por uno de tres mecanismos, disminución de la producción de médula ósea, aumento del secuestro esplénico, o destrucción acelerada de plaquetas. La trombocitopenia es un factor de riesgo de las hemorragias, y la transfusión de plaquetas reduce la incidencia de la hemorragia. El umbral de transfusión profiláctica de plaquetas es de 10.000/ μ l. En pacientes sin fiebre o infecciones, un umbral de 5000/ μ l puede ser suficiente para evitar una hemorragia espontánea. Para procedimientos invasivos, 50.000 plaquetas/ μ l es el nivel objetivo usual. En pacientes que desarrollan anticuerpos a las plaquetas tras repetidas transfusiones, puede ser extremadamente difícil controlar la hemorragia.
- 50 De esta manera, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una variante de polipéptido de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o trastornos en los que es deseable la formación de coágulo. Un aspecto más adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar a un mamífero que tiene una enfermedad o trastorno en el que es deseable la formación de coágulo, que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad eficaz de una variante de polipéptido o de la composición farmacéutica de la invención.

Los ejemplos de enfermedades/trastornos en los que es deseable la formación de coágulo incluyen, pero no se limitan a, hemorragias, que incluyen hemorragias cerebrales, así como hemorragias incontroladas, tales como trauma. Los ejemplos adicionales incluyen pacientes que experimentan trasplantes vivos, pacientes que experimentan resección, pacientes trombocitopénicos, pacientes cirróticos, pacientes con hemorragias varicosas, hemofilia A, hemofilia B y enfermedad de von Willebrands.

La variante de polipéptido de la invención se administra a pacientes en una dosis terapéuticamente eficaz, normalmente, una aproximadamente en paralelo a la empleada en terapia con rFVII tal como NovoSeven®, o a una dosificación inferior. Por “dosis terapéuticamente eficaz” en el presente documento se entiende que es suficiente para producir los efectos deseados en relación con la dolencia para la cual se administra. La dosis exacta dependerá de las circunstancias, y será comprobable por un experto en la materia usando técnicas conocidas. Normalmente, la dosis debe ser capaz de evitar o disminuir la gravedad o la propagación de la dolencia o indicación que se está tratando. Será evidente para el experto en la materia que una cantidad eficaz de una variante o composición de polipéptido de la invención depende, entre otras, de la enfermedad, la dosis, el calendario de administración, de si la variante o la composición de polipéptido se administra sola o junto con otros agentes terapéuticos, de la semivida en plasma de las composiciones, y de la salud general del paciente. Preferiblemente, la variante o composición de polipéptido se administra en una dosis eficaz, en particular una dosis que es suficiente para normalizar el trastorno de coagulación.

La variante de polipéptido de la invención se administra preferiblemente en una composición que incluye un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. “Farmacéuticamente aceptable” significa un vehículo o excipiente que no produce ningún efecto desfavorable en pacientes a los cuales se administra. Dichos vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer y L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]).

La variante de polipéptido de la invención se puede formular en composiciones farmacéuticas mediante procedimientos bien conocidos. Se describen formulaciones adecuadas en Remington’s Pharmaceutical Sciences por E.W. Martin (Mark Publ. Co., 16ª Ed., 1980).

Las variantes de polipéptido de la invención se pueden usar “como son” y/o en forma de sus sales. Las sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales con metales alcalinos o metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, calcio y magnesio, así como, por ejemplo, sales de cinc. Estas sales o complejos pueden estar presentes como una estructura cristalina y/o amorfa.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar sola o junto con otros agentes terapéuticos. Se pueden incorporar estos agentes como parte de la misma composición farmacéutica o se pueden administrar separadamente de la variante de polipéptido de la invención, tanto de manera simultánea como de acuerdo con otros calendarios de tratamiento. Además, la variante de polipéptido o la composición farmacéutica de la invención se pueden usar como un adyuvante en otras terapias.

Un “paciente”, para los objetivos de la presente invención, incluye seres humanos y otros mamíferos. De esta manera, los procedimientos son aplicables a la terapia en seres humanos y a aplicaciones veterinarias. Se puede formular la composición farmacéutica que comprende la variante de polipéptido de la invención en una variedad de formas, por ejemplo, como un líquido, gel, liofilizada, o como un sólido comprimido. La forma preferida dependerá de la indicación concreta que se está tratando y será evidente para un experto en la materia.

En particular, la composición farmacéutica que comprende la variante de polipéptido de la invención se puede formular en forma liofilizada o soluble estable. Se puede liofilizar la variante de polipéptido mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia. La variante de polipéptido puede estar en forma soluble estable mediante la eliminación o la protección de los sitios de degradación proteolítica, tal como se describe en el presente documento. La ventaja de obtener una preparación soluble estable estriba en una manipulación más fácil para el paciente y, en el caso de emergencias, una acción más rápida, que puede, potencialmente, llegar a salvar una vida. La forma preferida dependerá de la indicación concreta que se está tratando y será evidente para un experto en la materia.

Se puede llevar a cabo la administración de las formulaciones de la presente invención de una variedad de maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, oral, subcutánea, intravenosa, intracerebral, intranasal, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal, intraocular, o de cualquier otra manera aceptable. Se pueden administrar las formulaciones continuamente mediante infusión, aunque es aceptable la inyección de bolo, usando técnicas bien conocidas en la materia, tales como bombas o implante, en algunos ejemplo, las formulaciones se pueden aplicar directamente como una disolución o pulverización.

Disoluciones parenterales

Un ejemplo preferido de composición farmacéutica es una disolución, especialmente una disolución acuosa, diseñada para administración parenteral. Aunque en muchos casos las formulaciones farmacéuticas en disolución se proporcionan en forma líquida, apropiada para un uso inmediato, dichas formulaciones parenterales se pueden proporcionar también en forma congelada o liofilizada. En el primer caso, se debe descongelar la composición antes del uso. La última forma se usa a menudo para aumentar la estabilidad del compuesto activo contenido en la composición a una variedad más amplia de condiciones de almacenamiento, según reconocen los expertos en la materia que las preparaciones liofilizadas son por lo general más estables que sus equivalentes líquidas. Dichas preparaciones liofilizadas se reconstituyen antes del uso mediante la adición de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

En el caso de las disoluciones parenterales, se preparan para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas mezclando, según sea apropiado, la variante de polipéptido que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables empleados normalmente en la técnica (todos los cuales se denominan "excipientes"), por ejemplo, agentes tamponantes, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicantes, tensioactivos no iónicos o detergentes, antioxidantes y/u otros aditivos variados.

Los agentes tamponantes ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Están normalmente presentes a una concentración que varía entre aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes tamponantes adecuados para uso en la presente invención incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos y sus sales tales como tampones citrato (por ejemplo, una mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, una mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, una mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico, etc.), tampones succinato (por ejemplo, una mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, una mezcla de ácido succínico-hidróxido de sodio, una mezcla de ácido succínico-succinato disódico, etc.), tampones tartrato (por ejemplo, una mezcla de ácido tartárico-tartrato de sodio, una mezcla de ácido tartárico-tartrato potásico, una mezcla de ácido tartárico-hidróxido de sodio, etc.), tampones fumarato (por ejemplo, una mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, una mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, una mezcla de fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), tampones gluconato (por ejemplo, una mezcla de ácido glucónico, gluconato de sodio, una mezcla de ácido glucónico-hidróxido de sodio, una mezcla de ácido glucónico-gluconato de potasio, etc.), tampón oxalato (por ejemplo, una mezcla de ácido oxálico-oxalato de sodio, una mezcla de ácido oxálico-hidróxido de sodio, una mezcla de ácido oxálico-oxalato de potasio, etc.), tampones lactato (por ejemplo, una mezcla de ácido láctico-lactato de sodio, una mezcla de ácido láctico-hidróxido de sodio, una mezcla de ácido láctico-lactato de potasio, etc.) y tampones acetato (por ejemplo, una mezcla de ácido acético-acetato de sodio, una mezcla de ácido acético-hidróxido de sodio, etc.). Posibilidades adicionales son los tampones fosfato, tampones histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

Los estabilizantes se refieren a una amplia categoría de excipientes, que puede variar en su función desde un agente de carga hasta un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a evitar la desnaturalización o la adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes azucarados polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes azucarados, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol y similares, que incluyen ciclitoles tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (es decir < 10 restos), proteínas tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina e inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; monosacáridos tales como xilosa, manosa, fructosa y glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa y sacarosa; trisacáridos tales como rafinosa, y polisacáridos tales como dextrano. Están presentes normalmente estabilizantes en el intervalo de entre 0,1 a 10.000 partes en peso basado en el peso en el peso de la proteína activa.

Se añaden conservantes para retardar el crecimiento microbiano, y se añaden normalmente en cantidades de aproximadamente 0,2%-1% (p/v). Los conservantes adecuados para uso con la presente invención incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, metil parabeno, propil parabeno, cloruro de octadecilmetilbencil amonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro o yoduro de benzalconio), cloruro de hexametonio, alquil parabenos tal como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol.

Se añaden isotonicantes para asegurar la isotonicidad de las composiciones líquidas e incluyen alcoholes azucarados polihídricos, preferiblemente alcoholes azucarados trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Pueden estar presentes alcoholes polihídricos en una cantidad entre 0,1% y 25% en peso, normalmente 1% a 5%, teniendo en cuenta las cantidades relativas del resto de ingredientes.

5 Pueden estar presentes tensioactivos o detergentes no iónicos (conocidos también como “agentes humectantes”) para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger el polipéptido terapéutico frente a la agregación inducida por agitación, lo que permite también a la formulación exponerse a la tensión de cizalladura superficial sin producir la desnaturalización del polipéptido. Los tensioactivos no iónicos incluyen polisorbatos (20, 80, etc), polioxámeros (184, 188, etc), polioles Pluronic®, monoéteres de polioxietilensorbitán (Tween®-20, Tween®-80, etc.).

Entre los excipientes adicionales variados se incluyen agentes de carga o de relleno (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E) y cosolventes.

10 El ingrediente activo también se puede atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa, gelatina o poli-(metilmetacrilato), en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Se dan a conocer dichas técnicas en Remington's Pharmaceutical Sciences, *más arriba*.

Las formulaciones parenterales que se van a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

15 **Preparaciones de liberación continua**

Los ejemplos de preparaciones de liberación continua incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la variante de polipéptido, teniendo las matrices una forma adecuada tal como una película o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación continua incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato) o poli (alcohol vinílico)), poliláctidos, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como la tecnología ProLease® o Lupron Depot® (microesferas inyectables compuestas de copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Mientras que polímeros tales como acetato de etilen-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante largos períodos tales como de hasta a o durante 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los polipéptidos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de exposición a la humedad a 37°C, lo que da como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales de estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación del enlace S-S intermolecular a través del intercambio tio-disulfuro, se puede conseguir la estabilización modificando restos sulfidrílo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones específicas de matrices poliméricas.

La invención se describe además en los siguientes ejemplos no limitantes.

Materiales y procedimientos

Área superficial accesible (ASA)

35 El programa informático Access (B. Lee y F. M. Richards, J. Mol. Biol. 55: 379-400 (1971)) versión 2 (© 1983 Universidad de Yale) se usa para calcular el área superficial accesible (ASA) de los átomos individuales en la estructura. Este procedimiento usa normalmente un tamaño de sonda de 1,4 Å y define el Área Superficial Accesible (ASA) como el área formada por el centro de la sonda. Antes de este cálculo, deben eliminarse todas las moléculas de agua y todos los átomos de hidrógeno del conjunto de coordenadas, así como el resto de átomos no directamente relacionados con la proteína.

ASA fraccional de cadena lateral

45 Se calculó el ASA fraccional de los átomos de cadena lateral mediante división de la suma del ASA de los átomos en la cadena lateral por un valor que representa el ASA de los átomos de cadena lateral de este tipo de resto en un tripéptido Ala-X-Ala extendido (Véase Hubbard, Campbell y Thomson (1991) J. Mol. Biol. 220 ,507-530). Para este ejemplo se consideró el átomo CA como parte de la cadena lateral de restos de glicina pero no de los restos restantes. Se usó la siguiente tabla como un patrón del 100% de ASA para la cadena lateral:

Ala	69,23 Å ²		Leu	140,76 Å ²
Arg	200,35 Å ²		Lys	162,50 Å ²
Asn	106,25 Å ²		Met	156,08 Å ²

Asp	102,06 Å ²		Phe	163,90 Å ²
Cys	96,69 Å ²		Pro	119,65 Å ²
Gln	140,58 Å ²		Ser	78,16 Å ²
Glu	134,61 Å ²		Thr	101,67 Å ²
Gly	32,28 Å ²		Trp	210,89 Å ²

(continuación)

His	147,00 Å ²		Tyr	176,61 Å ²
Ile	137,91 Å ²		Val	114,14 Å ²

5 Los restos no detectados en la estructura se definen como que tienen un 100% de exposición ya que se piensa que residen en regiones flexibles. Los ácidos gamma-carboxiglutámicos en las posiciones 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 y 35 se definen todos como que tienen una exposición del 100%.

Determinación de las distancias entre átomos

La distancia entre átomos se determina más fácilmente usando un programa informático de gráficos moleculares, por ejemplo, InsightII® v. 98.0, MSI INC.

10 **Región del sitio activo**

La región del sitio activo se define como cualquier resto que tiene al menos un átomo en 10Å a la redonda de cualquier átomo en la tríada catalítica (restos H193, D242, S344).

Determinación del sitio de unión al factor tisular

15 El sitio de unión al FT se define como el punto que comprende todos los restos que han experimentado un cambio en su área superficial accesible tras la unión a FT. Esto se determinó mediante dos cálculos de ASA; uno en el(los) ligando(s) aislado(s) en el complejo ligando(s)/receptor(es) y uno en complejo ligando(s)/receptor(es) completo.

Medida de la sensibilidad reducida a la degradación proteolítica

Se puede medir la degradación proteolítica usando el ensayo descrito en el documento US 5.580.560, Ejemplo 5, en el que la proteólisis es autoproteólisis.

20 Además, se puede probar la proteólisis reducida en un modelo *in vivo* usando muestras radiomarcadas y comparando la proteólisis de rhFVIIa y la variante del polipéptido de la invención extrayendo muestras de sangre y sometiendo a SDS-PAGE y autorradiografía.

25 Sin tener en cuenta la prueba usada para determinar la actividad proteolítica, se pretende que "degradación proteolítica reducida" signifique una reducción medible en la escisión en comparación con la obtenida por rhFVIIa tal como se midió mediante barrido en gel de los geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie, HPLC o tal como se midió mediante la actividad catalítica conservada en comparación con la natural usando la prueba de actividad independiente del factor tisular descrita a continuación.

Determinación del peso molecular de las variantes de polipéptido

30 Se determinó el peso molecular de las variantes de polipéptido mediante cualquiera de SDS-PAGE, filtración en gel, transferencias Western, espectrometría de masas de desorción de matriz asistida por láser o centrifugación en equilibrio, por ejemplo SDS-PAGE según Laemmli, Reino Unido, Nature Vol 227 (1970), pp. 680-85.

Determinación de la afinidad de unión al factor tisular

35 Se puede evaluar la capacidad de las variantes de unirse al factor tisular usando una o más de las tres pruebas BIAcore® descritas en Dickinson y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93: 14379-14384; Roberge y col. Biochemistry 2001, 40: 9522-9531; y Ruf y col. Biochemistry 1999, 38(7): 1957-1966.

Determinación de la inhibición por el TFPI

Se puede vigilar la inhibición de FVII por TFPI en el ensayo amidolítico descrito en Chang y col. Biochemistry 1999, 38: 10940-10948.

Determinación de la afinidad por el TFPI

- 5 Se evaluó la capacidad de las variantes de unirse a TFPI usando una o más de las tres pruebas BIAcore® descritas en Dickinson y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93: 14379-14384; Roberge y col. Biochemistry 2001, 40: 9522-9531; y Ruf y col. Biochemistry 1999, 38(7): 1957-1966.

Determinación de la afinidad de unión a la membrana de fosfolípidos

- 10 Se puede determinar la afinidad de unión a la membrana de fosfolípidos tal como se describe en Nelsestuen y col., Biochemistry, 1977; 30; 10819-10824 o como se describe en el Ejemplo 1 en el documento US 6.017.882.

Ensayo de activación del factor X independiente de FT

Se ha descrito este ensayo en detalle en la página 39826 de Nelsestuen y co., J Biol Chem, 2001; 276: 39825-39831.

- 15 De manera breve, la molécula que a evaluar (cualquiera de hFVIIa, rhFVIIa o la variante del polipéptido de la invención en su forma activada) se mezcló con una fuente de fosfolípidos (preferiblemente fosfatidilcolina y fosfatidilserina en una relación de 8:2) y se relipidizó el Factor X en tampón TRIS que contenía BSA. Tras un tiempo de incubación especificado, se detuvo la reacción mediante la adición de EDTA en exceso. A continuación se midió la concentración del factor Xa a partir del cambio de absorbancia a 405 nm tras la adición de un sustrato cromogénico (S-222, Chromogenix). Tras la corrección del fondo, se determinó la actividad independiente del factor tisular de rhFVIIa (a_{wt}) como el cambio de la absorbancia tras 10 minutos y se determinó también la actividad independiente del factor tisular de la variante de polipéptido de la invención ($a_{variante}$) como el cambio de la absorbancia después de 10 minutos. La relación entre la actividad de la variante de polipéptido, en su forma activada, y la actividad de rhFVIIa se define como $a_{variante}/a_{wt}$.
- 20

Ensayo de coagulación

- 25 Se midieron la actividad de coagulación de FVIIa y sus variantes en ensayos en una etapa y se registraron los tiempos de coagulación en un coagulómetro Thrombotrack IV (Medinor): Se reconstituyó plasma humano con Factor VII agotado (American Diagnostica) y se equilibró a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. A continuación se transfirieron 50 microlitros de plasma a las copas del coagulómetro.

Se diluyeron FVIIa y sus variantes en tampón Glixalina (barbiturato 5,7 mM, citrato de sodio 4,3 mM, NaCl 117 mM, 1 mg/ml de BSA, pH 7,35). Se añadieron las muestras a la copa en 50 μ l y se incubaron a 37°C durante 2 minutos.

- 30 Se reconstituyó tromboplastina (Medinor) con agua y se añadió $CaCl_2$ hasta una concentración final de 4,5 mM. Se inició la reacción añadiendo 100 μ l de tromboplastina.

Para medir la actividad de coagulación en ausencia de FT se usó la misma prueba sin adición de tromboplastina. Se analizaron los datos usando software PRISM.

Ensayo de sangre completa

- 35 Se midió la actividad de coagulación de FVIIa y sus variantes en ensayos en una etapa y se registraron los tiempos de coagulación en un coagulómetro Thrombotrack IV (Medinor). Se diluyeron 100 μ l de FVIIa o de sus variantes en un tampón que contenía glicilglicina 10 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 37,5 mM, pH 7,35 y se transfirieron a la copa de reacción. Se inició la reacción de coagulación mediante la adición de 50 μ l de sangre que contenían citrato trisódico 0,13 M al 10% como anticoagulante. Se analizaron los datos usando software Excel o PRISM.

Ensayo amidolítico

- 40 Se puede medir la capacidad de las variantes para escindir pequeños sustratos de péptidos usando el sustrato cromogénico S-2288 (D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida). Se diluyó FVIIa hasta aproximadamente 10-90 nM en tampón de ensayo (Na-Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 5 mM, BSA al 0,1%, UI/ml de Heparina). Además, se diluyó FT soluble (FTs) hasta 50-450 nM en tampón de ensayo: Se mezclaron 120 μ l de tampón de ensayo con 20 μ l de la muestra de FVIIa y 20 μ l de FTs. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, seguidos de 10 min de incubación a 37°C, se inició la reacción mediante la adición del sustrato S-2288 a 1 mM y se determinó la absorción a 405 nM en diversos puntos temporales.
- 45

Ensayo ELISA

Se determinaron las concentraciones de FVII/FVIIa (o la variante) mediante ELISA. Se revistieron los pocillos de una placa de microvaloración con un anticuerpo dirigido contra el dominio de la proteasa usando una disolución de 2 µg/ml en PBS (100 µl por pocillo). Tras el revestimiento durante la noche a T. A. se lavaron los pocillos 4 veces con tampón THT (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,3 Tween-20 al 0,05%). Posteriormente, se añadieron 200 µl de caseína al 1% (diluida a partir de una disolución madre al 2,5% usando NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,2) por pocillo para el bloqueo. Tras 1 h de incubación a T. A., se vaciaron los pocillos, y se añadieron 100 µl de muestra (diluida opcionalmente en tampón de dilución (THT + caseína al 0,1%)). Tras otra incubación de 1 h a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos 4 veces con tampón THT, y se añadieron 100 µl de un anticuerpo marcado con biotina dirigido contra el dominio tipo EGF (1 µg/ml). Tras otra incubación de 1 h a T. A. seguida por 4 lavados más con tampón THT, se añadieron 100 µl estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca, diluido 1/10000). Tras otra incubación de 1 h a T. A., seguida por 4 lavados más con tampón THT, se añadieron 100 µl de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Kem-en-Tech A/S, Dinamarca). Tras 30 min. de incubación a T. A. en la oscuridad, se añadieron 100 µl de H₂SO₄ 1 M y se determinó la DO_{450nm}. Se preparó una curva patrón usando rhFVIIa (NovoSeven®).

Alternativamente, se pueden cuantificar FVII/FVIIa o las variantes a través del dominio Gla más bien que a través del dominio de la proteasa. En esta configuración de ELISA, se revistieron los pocillos durante la noche con un anticuerpo dirigido contra el dominio tipo EGF y para la detección, se usó un anticuerpo monoclonal marcado con biotina dependiente de calcio contra el dominio Gla (2 µg/ml, 100 µl por pocillo). En esta configuración, se añadió CaCl₂ 5 mM a los tampones THT y de dilución.

Ejemplos**Ejemplo 1**

Se usó para este ejemplo la estructura de rayos X de hFVIIa en complejo con un factor tisular soluble por Banner y col., J Mol Biol, 1996; 285: 2089 Se señala que la numeración de restos en la referencia no sigue la secuencia. Aquí, los inventores han usado la numeración secuencial de acuerdo con SEQ ID NO: 1. Los ácidos gamma-carboxiglutámicos en las posiciones 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 y 35 se denominan todos aquí Glu (abreviatura de tres letras) o E (abreviatura de una letra). Los restos 143-152 no están presentes en la estructura.

Exposición superficial

Llevando a cabo los cálculos del ASA fraccional en los fragmentos de FVII solos en combinación con la definición de las accesibilidades de los restos no normalizados y/o desaparecidos descritos en los procedimientos, dieron como resultado los siguientes restos que tenían más de un 25% de su cadena lateral expuesta a la superficie: A1, N2, A3, F4, L5, E6, E7, L8, R9, P10, S12, L13, E14, E16, K18, E19, E20, Q21, S23, F24, E25, E26, R28, E29, F31, K32, D33, A34, E35, R36, K38, L39, W41, I42, S43, S45, G47, D48, Q49, A51, S52, S53, Q56, G58, S60, K62, D63, Q64, L65, Q66, S67, I69, F71, L73, P74, A75, E77, G78, R79, E82, T83, H84, K85, D86, D87, Q88, L89, 90, V92, N93, E94, G97, E99, S103, D104, H105, T106, G107, T108, K109, S111, R113, E116, G117, S119, L120, L121, A122, D123, G124, V125, S126, T128, P129, T130, V131, E132, I140, L141, E142, K143, R144, N145, A146, S147, K148, P149, Q150, G151, R152, G155, K157, V158, P160, K161, E163, L171, N173, G174, A175, N184, T185, I186, H193, K197, K199, N200, R202, N203, I205, S214, E215, H216, D217, G218, D219, S222, R224, S232, T233, V235, P236, G237, T238, T239, N240, H249, Q250, P251, V253, T255, D256, E265, R266, T267, E270, R271, F275, V276, R277, F278, L280, L287, L288, D289, R290, G291, A292, T293, L295, E296, N301, M306, T307, Q308, D309, L311, Q312, Q313, R315, K316, V317, G318, D319, S320, P321, N322, T324, E325, Y326, Y332, S333, D334, S336, K337, K341, G342, H351, R353, G354, Q366, G367, T370, V371, G372, R379, E385, Q388, K389, R392, S393, E394, P395, R396, P397, G398, V399, L400, L401, R402, P404 y P406.

Los siguientes restos tenían más de un 50% de su cadena lateral expuesta a la superficie: A1, A3, F4, L5, E6, E7, L8, R9, P10, E14, E16, K18, E19, E20, Q21, S23, E25, E26, E29, K32, A34, E35, R36, K38, L39, I42, S43, G47, D48, A51, S52, S53, Q56, G58, S60, K62, L65, Q66, S67, I69, F71, L73, P74, A75, E77, G78, R79, E82, H84, K85, D86, D87, Q88, L89, 90, V92, N93, E94, G97, T106, G107, T108, K109, S111, E116, S119, L121, A122, D123, G124, V131, E132, L141, E142, K143, R144, N145, A146, S147, K148, P149, Q150, G151, R152, G155, K157, P160, N173, G174, A175, K197, K199, N200, R202, S214, E215, H216, G218, R224, V235, P236, G237, T238, H249, Q250, V253, D256, T267, F275, R277, F278, L288, D289, R290, G291, A292, T293, L295, N301, M306, Q308, D309, L311, Q312, Q313, R315, K316, G318, D319, N322, E325, D334, K341, G354, G367, V371, E385, K389, R392, E394, R396, P397, G398, R402, P404 y P406.

Sitio de unión al factor tisular

Llevando a cabo los cálculos del ASA, los siguientes restos en el FVII humano cambian su ASA en el complejo. Estos restos se definieron como constituyendo el sitio de unión al factor tisular: L13, K18, F31, E35, R36, L39, F40, I42, S43, S60, K62, D63, Q64, L65, I69, C70, F71, C72, L73, P74, F76, E77, G78, R79, E82, K85, Q88, I90, V92, N93, E94, R271, A274, F275, V276, R277, F278, R304, L305, M306, T307, Q308, D309, Q312, Q313, E325 y R379.

Región del sitio activo

Se definió la región del sitio como cualquier resto que tenía al menos un átomo dentro de una distancia de 10 Å de cualquier átomo en la tríada catalítica (restos H193, D242, S344): I153, Q167, V168, L169, L170, L171, Q176, L177, C178, G179, G180, T181, V188, V189, S190, A191, A192, H193, C194, F195, D196, K197, I198, W201, V228, I229, I230, P231, S232, T233, Y234, V235, P236, G237, T238, T239, N240, H241, D242, I243, A244, L245, L246, V281, S282, G283, W284, G285, Q286, T293, T324, E325, Y326, M327, F328, D338, S339, C340, K341, G342, D343, S344, G345, G346, P347, H348, L358, T359, G360, I361, V362, S363, W364, G365, C368, V376, Y377, T378, R379, V380, Q382, Y383, W386, L387, L400 y F405.

El borde de la hendidura de unión del sitio activo

Se definió la región del borde de la hendidura de unión del sitio activo mediante la inspección visual de la estructura 1FAK.pdb de FVIIa como: N173, A175, K199, N200, N203, D289, R290, G291, A292, P321 y T370.

Ejemplo 2**Diseño de un casete de expresión para la expresión de rhFVII en células de mamíferos**

Se sintetizó la secuencia de ADN que se muestra en SEQ ID NO: 2, que abarca la forma corta del ADNc de longitud completa que codifica el factor VII de coagulación de la sangre humana con su péptido señal corto natural (Hagen y col., 1986. PNAS 83: 2412), con el fin de facilitar una expresión elevada en células de mamíferos. En primer lugar, se modificó el contexto del codón de inicio ATG de acuerdo con la secuencia consenso de Kozak (Kozak, M. J Mol Biol 20 de agosto de 1987; 196(4): 947-50), de tal manera que existe una perfecta correspondencia con la secuencia consenso en la dirección 5' del codón de inicio ATG. En segundo lugar, se modificó el marco de lectura abierto del ADNc del factor del factor de coagulación de la sangre humana natural haciendo un sesgo en la utilización del codón hacia los codones frecuentemente usados en genes humanos muy expresados. Además, se insertaron dos codones de detención de la traducción al final del marco de lectura abierto con el fin de facilitar una eficaz detención de la traducción. Se ensambló el gen FVII humano de expresión optimizada y completamente sintético entre los oligonucleótidos de ADN de 70-mer y se amplificó finalmente usando cebadores finales insertando los sitios *Bam*HI e *Hind*III en los extremos 5' y 3' respectivamente usando técnicas de la PCR normalizadas.

Se preparó un vector para la clonación del producto de la PCR generado que abarcaba el casete de expresión del factor VII clonando el intrón procedente de pCINeo (Promega). El intrón sintético procedente de pCI-Neo se amplificó usando condiciones de PCR normalizadas y los cebadores:

CBProFpr174: AGCTGGCTAGCCACTGGGCAGGTAAGTATCA (SEQ ID NO:3) y

35 CBProFpr175: TGGCGGGATCCTTAAGAGCTGTAATTGAACT (SEQ ID NO:4)

dando como resultado un fragmento de la PCR de 332 pb. Se cortó el fragmento con *Nhe*I y *Bam*HI antes de clonar en pCDNA3.1/HygR (obtenido de Invitrogen) dando como resultado PF n° 34

Se clonó el casete de expresión del factor VII humano entre los sitios *Bam*HI e *Hind*III de PF n° 34, dando como resultado el plásmido PF n° 226.

40 Con el fin de permitir la clonación de los genes de la variante FVII entre los sitios *Nhe*I y *Pme*I del plásmido CET720 de expresión basado en UCOE, se creó un derivado de PF n° 226 que carecía del sitio *Nhe*I. Usando PF n° 226 como plantilla, se preparó un fragmento de ADN mediante la PCR usando los cebadores CBProFpr219 (SEQ ID NO: 5) y CBProFpr499 (SEQ ID NO: 6). Se cortó este fragmento con *Xba*I y *Xho*I y se clonó entre los sitios *Xba*I y *Xho*I de PF n° 226 dado como resultado el plásmido PF n° 444. Se construyeron plásmidos derivados de PF n° 444 que codificaban variantes de la invención mediante mutagénesis sitiodirigida basada en PCR normalizada usando PF n° 444 como plantilla y cebadores sintetizados de manera personalizada. Se generaron plásmidos de expresión específicos basados en CET720 mediante escisión de la variante génica del derivado de PF n° 444 correspondiente mediante *Nhe*I y *Pme*I y a continuación se clonaron en CET720 cortado con *Nhe*I y *Pme*I. Por ejemplo, se preparó el derivado pB0088 de CET720 que codificaba la variante S43Q de FVII mediante escisión de la variante génica mediante *Nhe*I y *Pme*I procedente a partir de pB0075 y se clonó en CET720 cortado con *Nhe*I y *Pme*I.

Ejemplo 3**Construcción de vectores de expresión que codifican las variantes de polipéptido de la invención**

Se usaron los siguientes cebadores por defecto para las PCR primarias:

[L39H]rhFVII

5 CBProFpr526: GCTGAGCGGACCAAACACTTTTGGATTAGC (SEQ ID NO: 7 – cebador directo)

CBProFpr527: GCTAATCCAAAAGTGTTTGGTCCGCTCAGC (SEQ ID NO: 8 – cebador inverso)

[I42R]rhFVII

CBProFpr530: CCAAAGTGTGGCGCAGCTATAGCGATG (SEQ ID NO: 9 – cebador directo)

CBProFpr531: CATCGCTATAGCTGCGCCAAAACAGTTTGG (SEQ ID NO: 10 – cebador inverso)

10 [S43Q]rhFVII

CBProFpr534: AACTGTTTTGGATTCAGTATAGCGATGGCG (SEQ ID NO: 11 – cebador directo)

CBProFpr535: CGCCATCGCTATACTGAATCCAAAACAGTT (SEQ ID NO: 12 – cebador inverso)

[K62E]rhFVII

CBProFpr536: AACGGGGGCTCCTGCGAGGACCAGCTGCAG (SEQ ID NO: 13 – cebador directo)

15 CBProFpr537: CTGCAGCTGGTCCTCGCAGGAGCCCCCGTT (SEQ ID NO: 14 – cebador inverso)

[K62R]rhFVII

CBProFpr538: GGGGGCTCCTGCCGCGACCAGCTGCAGAGC (SEQ NO: 15 - cebador directo)

CBProFpr539: GCTCTGCAGCTGGTCGCGGCAGGAGCCCC (SEQ ID NO: 16 - cebador inverso)

[F71E]rhFVII

20 CBProFpr540: GAGCTATATCTGCGAGTGCCTGCCTGCCTT (SEQ ID NO: 17 - cebador directo)

CBProFpr541: AAGGCAGGCAGGCACTCGCAGATATAGCTC (SEQ DI NO: 18 - cebador inverso)

[E82O]rhFVII

CBProFpr542: GGGGCGCAATTGCCAGACCCATAAGGATGA (SEQ NO: 19 - cebador directo)

CBProFpr543: TCATCCTTATGGGTCTGGCAATTGCGCCCC (SEQ ID NO: 20 - cebador inverso)

25 [L39E]rhFVII

LoB069: GAGCGGACCAAAGAGTTTTGGATTAGC (SEQ NO: 21 - cebador directo)

LoB070: GCTAATCCAAAACACTTTTGGTCCGCTG (SEQ DOD NO: 22 - cebador inverso)

[L39Q]rhFVII

LoB071: GAGCGGACCAAACAGTTTTGGATTAGC (SEQ ID NO: 23 - cebador directo)

30 LoB072: GCTAATCCAAAACACTTTTGGTCCGCTC (SEQ ID NO: 24 - cebador inverso)

[L65Q]rhFVII

LoB075: CTGCAAAGACCAGCAGCAGAGCTATATCTGC (SEQ ID NO: 25 - cebador directo)

LoB076: GCAGATATAGCTCTGCTGCTGGTCTTTGCAG (SEQ ID NO: 26 - cebador inverso)

[L65S]rhFVII

35 LoB077: CTGCAAAGACCAGTCCCAGAGCTATATCTGC (SEQ ID NO: 27 - cebador directo)

LoB078: GCAGATATAGCTCTGGGACTGGTCTTTGCAG (SEQ ID NO: 28 - cebador inverso)

[F71D]rhFVII

LoB079: CAGAGCTATATCTGCGACTGCCTGCCTGCC (SEQ ID NO: 29 - cebador directo)

LoB080: GGCAGGCAGGCAGTCGCAGATATAGCTCTG (SEQ ID NO: 30 - cebador inverso)

[F71Y]rhFVII

5 LoB081: CAGAGCTATATCTGCTACTGCCTGCCTGC (SEQ ID NO: 31 - cebador directo)

LoB082: GCAGGCAGGCAGTAGCAGATATAGCTCTG (SEQ ID NO: 32 - cebador inverso)

[K62E+L65Q]rhFVII

CBProFpr703: GAACGGGGGCTCCTGCGAGGACCAGCAGCAGAGCTATATCTGC (SEQ NO: 33 - cebador directo)

CBProFpr704: GCAGATATAGCTCTGCTGCTGGTCTCGCAGGAGCCCCCGTTC (SEQ ID NO:34 – cebador inverso)

10 **Ejemplo 4****Expresión de FVII o de variantes de FVII en células CHO K1**

Se sembró la línea celular CHO K1 (ATCC n° CCL-61) a una confluencia del 50% en matraces T-25 usando MEM α , FCS al 10% (GibcoBRL n° de Cat. 10091), P/S y 5 Pg/ml filoquinona, y se dejó crecer hasta confluencia. La monocapa de células confluentes se transfectó con 5 μ l/g del plásmido relevante descrito anteriormente usando el agente de transfección Lipofectamina 2000 (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección se retiró una muestra y se cuantificó usando por ejemplo un ELISA que reconoce el dominio EGF1 del factor VII humano. En este punto temporal, se puede aplicar una selección relevante (por ejemplo Higromicina B) a las células, con el objetivo de generar una combinación de transfectantes estables. Cuando se usan células CHO K1 y el gen de resistencia a la Higromicina B como marcador seleccionable en el plásmido, se consigue esto usualmente en una semana.

Ejemplo 5**Generación de variantes de polipéptido que expresan células CHO-K1 de manera estable**

Se descongeló un vial de la combinación CHO-K1 transfectante y se sembraron las células en un matraz para cultivo de tejido de 175 cm² que contenía 25 ml de MEM α , FCS al 10%, filoquinona (5 μ g/ml), 100 U/l de penicilina, 100 μ g/l de estreptomina y se hicieron crecer durante 24 horas. Se cosecharon las células, se diluyeron y se plaquearon en placas de microvaloración de 96 pocillos a una densidad celular de 1/2-1 células/pocillo. Tras una semana de crecimiento, estuvieron presentes colonias de 20-100 células en los pocillos y se marcaron aquellos pocillos que contenían solo una colonia. Después de dos semanas más, los medios en todos los pocillos que contenían solo una colonia se sustituyeron con 200 μ l de medio reciente. Tras 24 horas, se retiró una muestra de medio y se analizó mediante por ejemplo, ELISA. Se seleccionaron clones de alta producción y se usaron para producir FVII o sus variantes.

Ejemplo 6**Purificación a pequeña escala de las variantes de polipéptido y posterior activación con el activador de la protrombina**

Se purificaron FVII y sus variantes y se activaron de la siguiente forma. Se llevó a cabo el procedimiento a 4°C. Se añadieron NaCl 100 mM y CaCl₂ 10 mM a 1200 ml de medios de cultivo cosechados seguido por un ajuste del pH a 7,5 y filtración estéril. Se preparó una columna de afinidad acoplado un anticuerpo monoclonal dependiente de calcio contra el dominio Gla a la Sefarosa FF activada con CNBr usando aproximadamente 5,5 mg de anticuerpo acoplado por ml de resina. Se aplicaron los medios de cultivo preparados durante la noche a 2 ml de anticuerpo monoclonal en una columna de afinidad preequilibrada con Tris 10 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 35 mM, pH 7,5. La matriz de afinidad del anticuerpo monoclonal con FVII unido se desempaquetó posteriormente transfiriendo el material de la columna desde la columna a un tubo vacío.

Se activaron FVII o sus variantes a FVIIa mediante incubación con activador de protrombina procedente de *Oxyuranus scutellatus* (OSII) uniéndose aún más a la matriz de afinidad. Se recuperó FVIIa reempaquetando el material de la columna seguido por la elución usando Tris 10 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM pH 8,6.

45 El eluato procedente de la primera etapa cromatográfica se introdujo directamente en una segunda y final columna cromatográfica, que estaba constituida por una columna POROS HQ50 preequilibrada con Tris 10 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 8,6. Se eluyó FVIIa a partir de la columna POROS HQ50 usando Tris 10 mM, NaCl 25 mM, CaCl₂ 35

mM, pH 7,5 tras lavar la columna con Tris 10 mM, NaCl 25 mM, pH 8,6. El FVIIa eluido procedente de la columna POROS HQ50 se almacenó a -80°C sin modificación adicional.

Ejemplo 7

Purificación a gran escala de las variantes de polipéptido y posterior activación

5 Se purificaron FVII y las variantes de FVII de la siguiente forma. Se llevó a cabo el procedimiento a 4°C. Los medios de cultivo cosechados a partir de una producción a gran escala se ultrafiltraron usando un sistema Millipore TFF con membranas Pellicon con un corte de 30 Kda, Tras la concentración del medio, se añadió citrato a 5 mM y se ajustó el pH a 8,6. Si fue necesario, se disminuyó la conductividad por debajo de 10 mS/cm. Posteriormente, se aplicó la muestra a una columna Q-sefarosa FF, equilibrada con NaCl 50 mM, Tris 10 mM pH 8,6. Tras lavar la columna con NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 8,6, seguido por NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 8,6, se eluyó FVII usando Tris 10 mM, NaCl 25 mM, CaCl₂ 35 mM, pH 8,6.

15 Para la segunda etapa cromatográfica, se preparó una columna de afinidad acoplado un anticuerpo monoclonal dependiente de calcio contra el dominio Gla a la Sefarosa FF activada con CNBr. Se acoplaron aproximadamente 5,5 mg de anticuerpo por ml de resina. Se equilibró la columna con Tris 10 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 35 mM, pH 7,5. Se añadió NaCl a la muestra a una concentración de NaCl 100 mM y se ajustó el pH a 7,4 – 7,6. Tras la aplicación O/N de la muestra, se lavó la columna con NaCl 100 mM, CaCl₂ 35 mM, Tris 10 mM pH 7,5, y se eluyó la proteína FVII con NaCl 100 mM, citrato 50 mM, Tris 75 mM pH 7,5.

20 Para la tercera etapa cromatográfica, se disminuyó la conductividad de la muestra por debajo de 10 mS/cm, si fue necesario, y se ajustó el pH a 8,6. A continuación se aplicó la muestra a una columna Q-sefarosa (equilibrada con NaCl 50 mM, Tris 10 mM pH 8,6) a una densidad alrededor de 3-5 mg de proteína por ml de gel para obtener una activación eficaz. Tras la aplicación, se lavó la columna con NaCl 50 mM, Tris 10 mM pH 8,6 durante aproximadamente 4 horas con un flujo de 3-4 volúmenes de columna (vc) por hora. Se eluyó la proteína FVII usando un gradiente de 0-100% de NaCl 500 mM, Tris 10 mM pH 8,6 en 40 vc. Se combinaron las fracciones que contenían FVII.

25 Para la etapa cromatográfica final, se disminuyó la conductividad por debajo de 10 mS/cm. Posteriormente, se aplicó la muestra a una columna Q-sefarosa (equilibrada con NaCl 140 mM, glicilglicina 10 mM pH 8,6) a una concentración de 3-5 mg de proteína por ml de gel. A continuación se lavó la columna con NaCl 140 mM, glicilglicina 10 mM pH 8,6, y se eluyó FVII con NaCl 140 mM, CaCl₂ 15 mM, glicilglicina 10 mM pH 8,6. Se diluyó el eluato en CaCl₂ 10 mM y se ajustó el pH a 6,8-7,2. Finalmente, se añadió Tween 80 al 0,01% y se ajustó el pH a 5,5 para el almacenamiento a -80°C.

Ejemplo 8

Resultados experimentales

30 El sometimiento de las variantes de la invención (purificadas tal como se describe en el Ejemplo 6 anterior) a la “Prueba de Sangre Completa” desveló que las variantes presentaban un significativo aumento en la actividad de coagulación (o un reducido tiempo de coagulación) en comparación a rhFVIIa. En las Figs. 1-3 se muestran los resultados experimentales.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Maxygen ApS; Maxygen Holdings
 <120> Variantes de FVII o FVIIa que tienen actividad de coagulación mejorada
 <130> 0267wo310
 <140>
 <141>
 40 <160> 34
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 406
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens

<400> 1

	Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
	1				5					10					15	
	Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys
			20						25					30		
5	Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp
		35						40					45			
	Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln
	50						55					60				
	Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn
	65					70					75					80
	Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly
				85						90					95	
10	Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys
			100						105					110		
	Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr
			115					120					125			
	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg
		130					135					140				
	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro
	145				150						155					160
15	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln
				165					170					175		
	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala
			180					185					190			
	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu
		195					200					205				
	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg
	210						215					220				
20	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn
	225				230						235					240
	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	
				245					250					255		
	His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr
			260						265					270		
	Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu
		275					280						285			
25	Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg
	290					295						300				
	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser
	305				310						315					320
	Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser
				325						330					335	
30	Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr
			340						345					350		
	Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys
			355					360					365			
	Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile
		370					375					380				
	Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu
	385				390						395					400
35	<210> 2	Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro									
	<211> 1					405										
	<212> ADN															

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (115)..(1335)

5 <400> 2

atggtcagcc aggccctccg cctcctgtgc ctgctcctgg ggctgcaggg ctgcctggct 60

gccgtcttcg tcaccagga ggaagcccat ggcgtcctgc atcgccggcg ccgg gcc 117
Ala
1

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

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

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

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

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

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

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

tgc cac gaa ggc tat agc ctc ctg gct gac ggg gtg tcc tgc acg ccc 501
Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro

ES 2 361 495 T3

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

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 6
 cccattctag aaaagcggaa cgccagcaaa ccccaggg 28

5 <210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 7
 gctgagcgga ccaaacactt ttggattagc 30
 <210> 8
 <211> 30

15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 8

20 gctaatacaa aagtgttgg tccgctcagc 30
 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 9
 ccaaactgtt ttggcgcagc tatagcgatg 30
 <210> 10

30 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

35 <400> 10
 catcgctata gctgcgcaa aacagtttgg 30
 <210> 11

<211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 11
 aactgttttg gattcagtat agcgatggcg 30
 <210> 12
 <211> 30
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 12
 15 cgccatcgct atactgaatc caaaacagtt 30
 <210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 13
 aacgggggct cctgcgagga ccagctgcag 30
 <210> 14
 25 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 30
 <400> 14
 ctgcagctgg tcctcgagg agcccccgtt 30
 <210> 15
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 15
 gggggctcct gcccgacca gctgcagagc 30
 <210> 16
 5 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 10 <400> 16
 gctctgcagc tggctgcggc aggagcccc 30
 <210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 17
 gagctatc tgcgagtgcc tgctgcctt 30
 20 <210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 18
 aaggcaggca ggcactcgca gatatagctc 30
 <210> 19
 <211> 30
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 19
 35 ggggcgcaat tgccagacc ataaggatga 30
 <210> 20
 <211> 30

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 5 <400> 20
 tcataccttat gggctctggcaa ttgcgcccc 30
 <210> 21
 <211> 26
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 21
 gagcggacca aagagttttgg attagc 26
 15 <210> 22
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 22
 gctaataccea aactctttggt ccgctg 26
 <210> 23
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 23
 30 gagcggacca aacagttttgg attagc 26
 <210> 24
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 24

gctaatcaa aactgtttggc cgcctc 26
 <210> 25
 <211> 30
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 25
 ctgcaaagac cagcagcagag ctatatctgc 30
 10 <210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 26
 gcagatatag ctctgctgctg gtctttgcag 30
 <210> 27
 <211> 30
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 27
 25 ctgcaaagac cagtcccagag ctatatctgc 30
 <210> 28
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 28
 gcagatatag ctctgggactg gtctttgcag 30
 <210> 29
 35 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 29
 cagagctata tctgcgactgc ctgcctgcc 29

5 <210> 30
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 30
 ggcaggcagg cagtcgcagat atagctctg 29
 <210> 31
 <211> 28

15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 31

20 cagagctata tctgctactgc ctgcctgc 28
 <210> 32
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 32
 gcaggcaggc agtagcagata tagctctg 28
 <210> 33

30 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 33

35 gaacgggggc tctgcgagga ccagcagcag agctatatct gc 42
 <210> 34

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 34

gcagatatag ctctgctgctg gtcctgcag gagccccgt tc 42

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una variante de polipéptido del Factor VII o Factor VIIa, teniendo dicha variante una secuencia de aminoácidos que difiere del Factor VII humano o del Factor VIIa humano que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1 en no más de 15 restos aminoácidos, en la que dicha secuencia variante comprende la sustitución L65Q y posee actividad de coagulación mejorada o tiempo de coagulación reducido en comparación con hFVIIa o rhFVIIa.
- 2.- La variante según la reivindicación 1, que comprende además al menos una sustitución seleccionada entre el grupo que consiste en L39E, L39Q, L39H, 142R, S43H, S43Q, K62E, K62R, L65S, F71 D, F71 Y, F71E. F71 Q, F71 N, E82Q, E82N, E82K y F275H.
- 3.- La variante según la reivindicación 2, en la que dicha al menos una sustitución es F71Y, K62E o S43Q.
- 10 4.- La variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha variante comprende al menos una sustitución de aminoácido en el dominio Gla.
- 5.- La variante según la reivindicación 4, en la que al menos dicha una sustitución en el dominio Gla comprende una sustitución en al menos una posición seleccionada entre el grupo que consiste en P10, K32, D33 y A34
- 15 6.- La variante según la reivindicación 5, en el que dicha variante comprende además una inserción de al menos un resto de aminoácido entre la posición A3 y F4.
- 7.- La variante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que se ha introducido al menos un resto aminoácido que comprende un grupo de unión de un resto no polipeptídico en una posición localizada en el exterior del dominio Gla.
- 8.- La variante según la reivindicación 7, en la que dicho grupo de unión es un sitio de glicosilación *in vivo*.
- 20 9.- La variante según la reivindicación 8, en la que dicho sitio de glicosilación *in vivo* es un sitio de N-glicosilación introducido por una sustitución seleccionada entre el grupo que consiste en A51 N, G58N, G48N+S60T, T106N, K109N, G124N, K143N+N145T, A175T, 1205S, 1205T, V253N, T267N, T267N+S269T, S314N+K316S, S314N+K316T, R315N+V317S, R315N+V317T, K316N+G318S, K316N+G318T, G318N, y D334N.
- 25 10.- La variante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha variante comprende además al menos una sustitución en la posición seleccionada entre el grupo que consiste en 157, 158, 296, 298, 305, 334, 336, 337 y 374.
- 11.- La variante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha variante comprende además al menos una sustitución seleccionada entre el grupo que consiste en K341 Q, D196K, D196N, G237L y G237GAA.
- 30 12.- La variante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha variante está en su forma activada.
- 13.- Una secuencia de nucleótidos que codifica una variante tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 14.- Un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se define en la reivindicación 13.
- 35 15.- Una célula hospedadora que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se define en la reivindicación 13 o un vector de expresión tal como se define en la reivindicación 14.
- 16.- La célula hospedadora según la reivindicación 15, en la que dicha célula hospedadora es una célula gamma carboxilante capaz de glicosilación *in vivo*.
- 17.- Una composición farmacéutica que comprende una variante tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-12, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40 18.- Una variante según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o una composición farmacéutica tal como se define en la reivindicación 17 para uso como un medicamento.
- 19.- Uso de una variante según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno en la que es deseable la formación de coágulo.

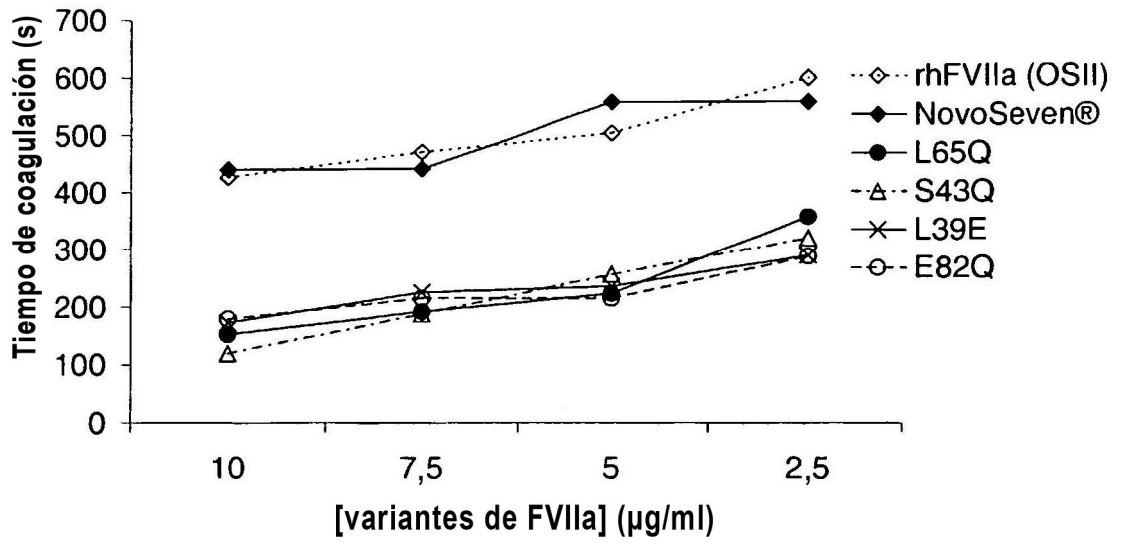


Fig. 1

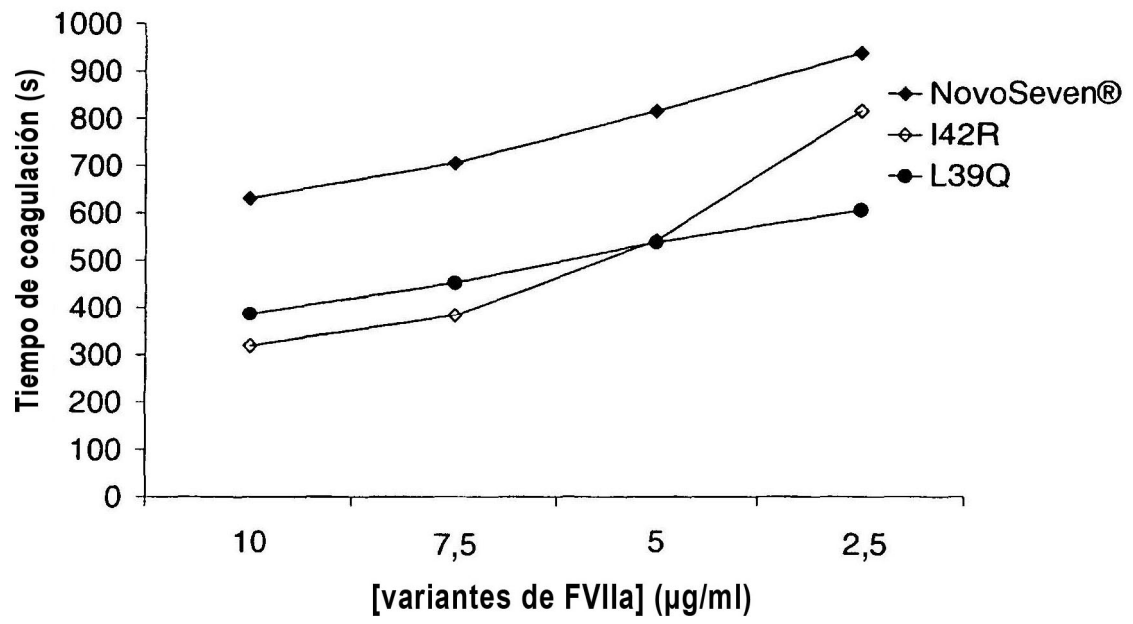


Fig. 2

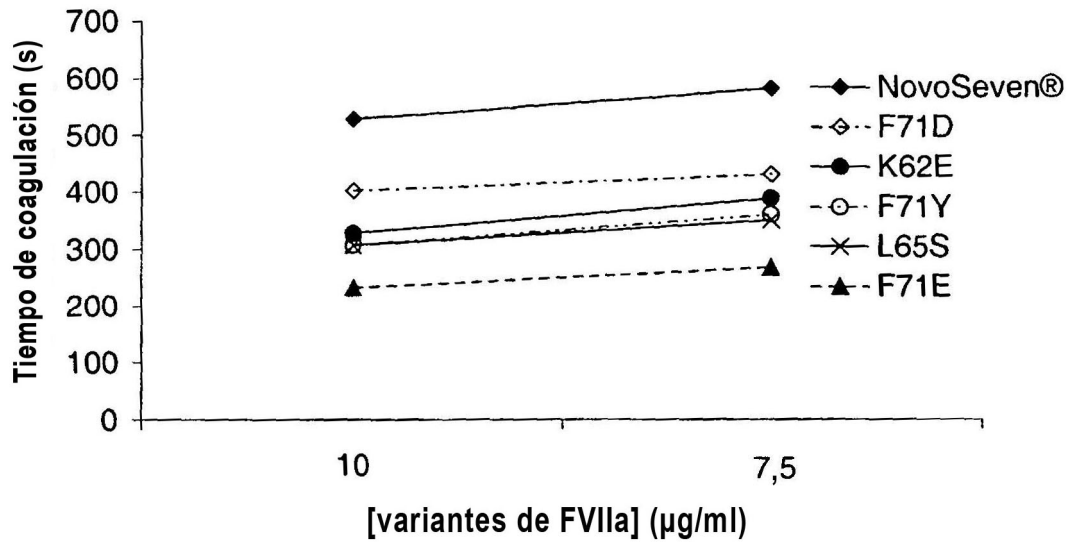


Fig. 3