



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 205**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03729912 .0**

96 Fecha de presentación : **20.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1517710**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2005**

54 Título: **Glicoformas del Factor VII PEGilado.**

30 Prioridad: **21.06.2002 DK 2002 00964**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.07.2011

73 Titular/es: **NOVO NORDISK HEALTH CARE AG.**
Andreasstrasse 15
8050 Zürich, CH

72 Inventor/es: **Klausen, Niels, Kristian;**
Bjorn, Sören;
Behrens, Carsten y
Garibay, Patrick, William

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

ES 2 363 205 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

Glicoformas del Factor VII PEGilado

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se relaciona con composiciones que comprenden conjugados del Factor VII que tienen patrones de glicosilación predeterminados.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] El Factor VII es una proteína plasmática dependiente de la vitamina K sintetizada en el hígado y secretada en la sangre como una glicoproteína de una sola cadena con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa. El zimógeno del FVII es convertido en una forma activada (FVIIa) por escisión proteolítica. El FVIIa en complejo con el factor tisular (TF) es capaz de convertir al Factor IX y al Factor X en sus formas activadas, seguido por reacciones que conducen a una generación rápida de trombina y formación de fibrina.

15 [0003] Las proteínas implicadas en la cascada de la coagulación, incluyendo, por ejemplo, el Factor VII, el Factor VIII, el Factor IX, el Factor X y proteína C, prueban ser agentes terapéuticos útiles para tratar una variedad de condiciones patológicas. En consecuencia, existe una necesidad creciente de formulaciones que comprendan esas proteínas que sean farmacéuticamente aceptables y exhiban una eficacia clínica uniforme y predeterminada.

20 [0004] Debido a las muchas desventajas de usar plasma humano como fuente de productos farmacéuticos, se prefiere producir esas proteínas en sistemas recombinantes. Las proteínas de la coagulación, sin embargo, son objeto de una variedad de modificaciones co y postraduccionales, incluyendo, por ejemplo, glicosilación ligada a asparagina (ligada a N); glicosilación ligada a O; y γ -carboxilación de los residuos de glu. Esas modificaciones pueden ser cualitativa y
25 cuantitativamente diferentes cuando son usadas células heterólogas como anfitriones para la producción a gran escala de las proteínas. En particular, la producción en células heterólogas con frecuencia da como resultado un arreglo diferente de glicoformas, los cuales son polipéptidos idénticos que tienen diferentes estructuras oligosacáridas ligadas covalentemente.

30 [0005] En diferentes sistemas, las variaciones en la estructura oligosacárida y las proteínas terapéuticas han sido ligadas a, inter alia, cambios en la inmunogenicidad y eliminación in vivo.

[0006] Además de la eliminación in vivo también la vida media funcional in vivo es de importancia para el periodo de tiempo durante el cual el compuesto está "terapéuticamente disponible" en el cuerpo.

35 [0007] La vida media en circulación del rFVIIa es de aproximadamente 2.3 horas ("Summary Basis for Approval for NovoSeven®", número de referencia de FDA 96-0597).

40 [0008] Las preparaciones comerciales de FVIIa recombinante humano son vendidas como NovoSeven®. NovoSeven® son el único rFVIIa para un tratamiento efectivo y confiable de episodios hemorrágicos disponible en el mercado. Son necesarias dosis relativamente altas y administración frecuente para lograr y sostener el efecto terapéutico y profiláctico deseado. Como consecuencia, la regulación adecuada de la dosis es difícil de obtener y la necesidad de administraciones intravenosas frecuentes impone restricciones sobre la forma de vida del paciente.

45 [0009] Una molécula con una vida media en circulación más prolongada haría disminuir el número de administraciones necesarias. Dada la asociación del producto de FVIIa actual con frecuentes inyecciones, existe una clara necesidad de moléculas de FVII mejoradas.

50 [0010] Una forma de mejorar la circulación es asegurar que la velocidad de eliminación del cuerpo se reduzca. Se dice que las variaciones en la estructura oligosacárida de las proteínas terapéuticas han sido ligadas a, inter alia, la eliminación in vivo. Además, la unión de una fracción química al polipéptido puede conferir una eliminación renal reducida al polipéptido.

55 [0011] Han sido reportadas formas inactivas del FVII. La forma inactivada es capaz de competir con el FVII tipo salvaje o el FVIIa por la unión al factor tisular e inhibir la actividad coagulante. Se sugiere que la forma inactivada del FVIIa sea usada para el tratamiento de pacientes que estén en estados hipercoagulables, como pacientes con sepsis, en riesgo de infarto de miocardio o de apoplejía trombótica.

[0012] La WO 98/32466 sugiere que el FVII, entre muchas otras proteínas, puede ser PEGilado pero no contiene ninguna información más a este respecto.

60 [0013] La WO 01/58935 reivindica conjugados de fracciones no polipeptídicas (por ejemplo PEG) con un polipéptido, donde la secuencia de aminoácidos difiere de la del FVII tipo salvaje en que al menos un aminoácido residual que comprende un

grupo de unión para una fracción no peptídica ha sido introducido o eliminado.

[0014] La US 4847325 sugiere que el factor 1 estimulante de colonias (CSF-1) podría ser unido al PEG haciendo reaccionar derivados de PEG con CSF-1 oxidado.

[0015] WI02/02764 divulga polipéptidos de FVII que han sido conjugados con PEG, donde el PEG es directamente unido al polipéptido de FVII.

[0016] De este modo, existe la necesidad en la técnica de composiciones y métodos que proporcionen preparaciones de proteína coagulante, particularmente preparaciones que comprendan Factor FVII humano recombinante mejorado, Factor VII modificado, o polipéptido relacionado con el Factor VII.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0017] Ha sido encontrado por los investigadores de la presente que preparaciones de polipéptidos del Factor VII que tienen patrones de glicofomas que contienen al menos un grupo oligosacárido ligado covalentemente a al menos un grupo polimérico exhiben propiedades funcionales mejoradas. En consecuencia, la presente invención se relaciona con métodos y composiciones que proporcionan esas preparaciones de proteína conjugada.

En consecuencia, la presente invención se relaciona en un primer aspecto con una preparación que comprende una pluralidad de polipéptidos del Factor VII, donde los polipéptidos comprenden cadenas oligosacáridas ligadas a asparagina y/o ligadas a serina, y donde al menos una fracción de ácido siálico situada en el extremo terminal de una cadena oligosacárida está unida covalentemente a al menos un polietilenglicol (PEG).

[0018] En una forma de realización de la misma, entre aproximadamente 94-100% de las cadenas oligosacáridas comprenden al menos una fracción de ácido siálico.

[0019] En una forma de realización de la misma, entre aproximadamente el 94-100% de las cadenas oligosacáridas comprenden al menos una fracción de ácido siálico y donde menos de aproximadamente 25% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos una antena descubierta.

[0020] En una forma de realización, menos de aproximadamente el 10% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos una antena descubierta.

[0021] En una forma de realización, menos de aproximadamente 5, preferiblemente menos de aproximadamente 2% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos una antena descubierta.

[0022] En una forma de realización, entre aproximadamente 96-100% de las cadenas oligosacáridas comprenden al menos una fracción de ácido siálico.

[0023] En una forma de realización, entre aproximadamente 98-100% de las cadenas oligosacáridas comprenden al menos una fracción de ácido siálico.

[0024] En una forma de realización, las cadenas oligosacáridas ligadas a asparagina se localizan en posiciones correspondientes a los aminoácidos residuales Asn-145 y Asn-322 del FVIIa humano tipo salvaje (FIG:1)

[0025] En una forma de realización, las cadenas oligosacáridas ligadas a serina se localizan en posiciones correspondientes a los aminoácidos residuales Ser-52 y Ser-60 del FVIIa humano tipo salvaje (FIG:1).

[0026] En una forma de realización, el polímero es un polietilenglicol (PEG); En una forma de realización, el polietilenglicol es PEG con un peso molecular de 300-100.000 Da, tal como aproximadamente 500-20.000 Da, o aproximadamente 500-15.000 Da, o 2-15 kDa, o 3-12 kDa, o aproximadamente 10kDa.

[0027] En una forma de realización, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos del Factor VII tipo salvaje (FIG:1). En una forma de realización, los polipéptidos son Factor VIIa tipo salvaje.

[0028] En una forma de realización, los polipéptidos del Factor VII son seleccionados del grupo que consiste en: S52A-Factor VII, S60A-Factor VII, Factor VII que ha sido escindido proteolíticamente entre los residuos 290 y 291; Factor VII que ha sido escindido proteolíticamente entre los residuos 315 y 316; Factor VII que ha sido oxidado, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L3051-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296W/M298Q-

F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, S52A-FactorVII, S60A-FactorVII; y P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; teniendo el FVII sustituciones, adiciones o supresiones en la secuencia de aminoácidos de 233Thr a 240Asn, teniendo el FVII sustituciones, adiciones o supresiones en la secuencia de aminoácidos de 304Arg a 329Cys, y teniendo el FVII sustituciones, supresiones, adiciones en la secuencia de aminoácidos de Ile53-Arg223.

[0029] En una forma de realización, los polipéptidos relacionados con el Factor VII son seleccionados del grupo que consiste en: R152E-Factor VII, S344A-Factor VII, FFR-Factor VII, y careciendo el Factor VIIa del dominio de Gla.

[0030] En una forma de realización, el polipéptido conjugado es producido por la modificación enzimática de fracciones siálicas o de galactosa en el polipéptido.

[0031] En un aspecto más, la invención se relaciona con un método para preparar la preparación de la reivindicación 1, el método comprende el paso de poner en contacto el polipéptido que contiene oligosacárido con una molécula de polímero bajo condiciones en las cuales al menos una molécula de polímero se une covalentemente a al menos una de las cadenas oligosacáridas de los polipéptidos.

[0032] En un aspecto adicional, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una preparación como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y un portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En un aspecto adicional, la invención se relaciona con el uso de una preparación que comprende una pluralidad de polipéptidos del Factor VII, como se define en las reivindicaciones 1-15 para la fabricación de un medicamento para tratar un síndrome que responde al Factor VII, para la prevención de coagulación sanguínea indeseada o para prevenir reacciones mediadas por el factor tisular, caracterizado porque (1) el síndrome es seleccionado de un grupo que consiste de hemofilia A, hemofilia B, deficiencia de Factor XI, deficiencia de Factor VII, trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand, presencia de un inhibidor de factor de la coagulación, cirugía, trauma, terapia anticoagulante, incluyendo coagulopatía dilucional, hemorragia intracraneal, trasplante de células madre, hemorragias gastrointestinales superiores, y enfermedad hepática; (2) la coagulación sanguínea indeseada asociada con una condición seleccionada del grupo que consiste en: angioplastia, trombosis de las venas profundas, embolismo pulmonar, apoplejía, coagulación intravascular diseminada (DIC), deposición de fibrina en los pulmones y riñones asociada con endotoxemia gram negativa, e infarto al miocardio, y (3) las reacciones mediadas por el factor tisular están asociadas con una condición seleccionada del grupo que consiste en inflamación, cáncer, crecimiento tumoral, metástasis, angiogénesis, SIRS, ALI, ARDS, MOF, HUS, y TTP.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

[0033] Los inventores de la presente han descubierto que preparaciones de proteínas de la coagulación que tienen patrones de glicofomas donde al menos un grupo oligosacárido está ligado covalentemente a al menos un grupo polimérico, como por ejemplo, el PEG, exhiben propiedades funcionales mejoradas. En consecuencia, la presente invención se relaciona con métodos y composiciones que proporcionan esas preparaciones de proteína conjugada. En particular, la invención se relaciona con preparaciones que comprenden polipéptidos del Factor VII y polipéptidos relacionados con el Factor VII que tienen patrones de oligosacáridos ligados a asparagina (ligados a N) y ligados a serina (ligados a O) unidos covalentemente a al menos un grupo polimérico. Las preparaciones de la invención exhiben propiedades alteradas, incluyendo, sin limitación, propiedades farmacocinéticas mejoradas, y eficiencia clínica mejorada. La invención también abarca formulaciones farmacéuticas que comprenden esas preparaciones, así como métodos terapéuticos que utilizan las formulaciones.

[0034] Como se usa en el contexto de la presente, el significado del término "unión covalente" abarca la fracción oligosacárida y la molécula polimérica que están unidas de manera directa covalentemente entre sí, o también están unidas de manera indirecta covalentemente entre sí a través de una fracción o fracciones intervinientes, como la fracción o fracciones formadoras de puentes, separadoras o de enlace.

[0035] El término "conjugado" o de manera intercambiable "polipéptido conjugado" pretende indicar una molécula heterogénea (en el sentido de compuesta o quimérica) formada por la unión covalente de uno o más polipéptidos a una o

más moléculas poliméricas.

- 5 [0036] El término “molécula polimérica”, o de manera intercambiable “grupo polimérico” o “fracción polimérica” o “molécula polimérica” abarca una molécula que es capaz de conjugarse a un grupo de unión del polipéptido. Cuando se usa en el contexto de un conjugado de la invención deberá comprenderse que la molécula (o fracción) polimérica está ligada a la parte polipeptídica del conjugado a través de un grupo de unión de una cadena oligosacárida de la glicoproteína; preferiblemente, la molécula polimérica está unida a una fracción de ácido siálico que cubre el oligosacárido (“grupo cubridor de ácido siálico”) o a una fracción de galactosa.
- 10 [0037] La molécula polimérica es una molécula formada por el enlace covalente de dos o más monómeros donde ninguno de los monómeros es un residuo de aminoácido. Los polímeros preferidos son moléculas poliméricas seleccionadas del grupo que consiste en óxido de polialquileno (PAO), incluyendo polialquilenglicol (PAG), como el polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), PEG ramificados, alcohol polivinílico (PVA), policarboxilato, poli vinilpirrolidona, anhídrido de ácido polietilén-co-maléico, anhídrido de ácido poliestiren-co-maléico, y dextrano, incluyendo carboximetil-dextrano, siendo el PEG particularmente preferido.
- 15 [0038] El término “grupo de unión” pretende indicar un grupo funcional de la fracción oligosacárida capaz de unirse a una molécula polimérica. Los grupos de unión útiles son, por ejemplo, amina, hidroxilo, carboxilo, aldehído, sulfhidrilo, succinimidilo, maleimida, vinilsufona o haloacetato.
- 20 [0039] El grupo de unión sobre la fracción oligosacárida puede ser activado antes de la reacción con el polímero. De manera alternativa, un grupo presente sobre el polímero puede ser activado antes de la reacción con la fracción oligosacárida. El grupo activado, si está presente sobre el oligosacárido o fracción polimérica puede estar en forma de un grupo saliente activado.
- 25 [0040] El término grupo saliente activado incluye aquellas fracciones que son desplazadas fácilmente en reacciones de sustitución reguladas de manera orgánica o enzimática. Los grupos salientes activados conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Voadlo et al., *En Carbohydrate Chemistry and Biology*, Vol 2, Wiley-VCH Verlag, Alemania (2000); Kodama et al., *Tetrahedron Letters* 34: 6419 (1993); Loughheed et al., *J. Biol. Chem.* 274: 37717 (1999).
- 30 [0041] Los métodos y química para la activación de los polímeros son descritos en la literatura. Los métodos comúnmente usados para la activación de polímeros incluyen la activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepóxidos, epiclorhidrina, divinilsulfona, carbodiimida, haluros de sulfonilo, triclorotriacina, etc. (véase, por ejemplo, Taylor (1991), *Protein Immobilization, Fundamental and Applications*, Marcel Dekker, N. Y.; Wong (1992), *Chemistry of protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press, Boca Raton; Hermanson et al., (1993), *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, N. Y.; Dunn et al., Eds. *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, 1991.)
- 35 [0042] Los grupos reactivos y clases de reacciones útiles para practicar la presente invención son, de manera general, aquellos producidos bajo condiciones relativamente moderadas. Estos incluyen, pero no se limitan a sustituciones nucleofílicas, (por ejemplo, reacción de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrofílicas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a los enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Esas y otras reacciones útiles son descritas en, por ejemplo, March, *Advanced Organic Chemistry*, 3a edición, JohnWiley & Sons, N. Y. 1985; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996; Feeney et al, *Modifications of Proteins, Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, 1982.
- 40 [0043] Los grupos funcionales reactivos pueden ser elegidos de modo que no participen en, o interfieran con, las reacciones necesarias para montar el oligosacárido y la fracción polimérica. De manera alternativa, un grupo funcional reactivo puede ser protegido para participar en la reacción por la presencia de un grupo reactivo. Para los ejemplos de grupos protectores útiles, véase, por ejemplo Greene et al., *Protective groups in Organic Synthesis*, JohnWiley & Sons, N. Y., 1991.
- 45 [0044] Los métodos generales para enlazar carbohidratos a otras moléculas son conocidos en la literatura (véase, por ejemplo, Lee et al., *Biochemistry* 28:1856 (1989); Bhatia et al., *Anal. Biochem.* 178:408 (1989); Janda et al., *J. Am. Chem. Soc.* 112:8886 (1990); y Bednarski et al., WO 92/18135.
- 50 [0045] Se pretende que el término “sitio de glicosilación de origen natural” indique los sitios de glicosilación en las posiciones Asn-145 (N145), Asn-322 (N322), Ser-52 (S52), y Ser-60 (S60). En una forma similar, el término “sitio de O-glicosilación in vivo natural” incluye las posiciones S52 y S60, mientras que el término “sitio de N-glicosilación in vivo de origen natural” incluye las posiciones N145 y N322.
- 55
- 60

[0046] El término “vida media in vivo funcional” se usa en su significado normal, es decir, el tiempo al cual el 50% de la actividad biológica del polipéptido o conjugado aún está presente en el cuerpo/órgano blanco, o el tiempo al cual la actividad del polipéptido o conjugado es el 50% de su valor inicial. Como una alternativa para determinar la vida media in vivo funcional, puede ser determinada la “vida media en suero”, es decir, el tiempo al cual el 50% de las moléculas polipeptídicas o conjugadas circulan en el plasma o la corriente sanguínea antes de ser eliminadas. La determinación de la vida media en suero es con frecuencia más simple de determinar que la vida media funcional y la magnitud de la vida media en suero es usualmente una buena indicación de la magnitud de la vida media in vivo funcional. Términos alternativos a la vida media en suero incluyen la vida media en plasma, vida media en circulación, vida media circulatoria, eliminación del suero, eliminación del plasma y vida media de eliminación. El polipéptido o conjugado es eliminado por la acción de uno o más del sistema retículo-endotelial (RES), riñón, bazo o hígado, por el factor tisular, receptor de SEC, u otra eliminación mediada por el receptor, o por proteólisis específica o no específica. Normalmente, la eliminación depende del tamaño (en relación al corte para la filtración glomerular), carga, cadenas de carbohidrato unidas, y la presencia de receptores celulares para la proteína. La funcionalidad a ser retenida es normalmente seleccionada de la actividad procoagulante, proteolítica, de unión de cofactor o unión al receptor. La vida media funcional in vivo y la vida media en suero pueden ser determinadas por cualquier método adecuado conocido en la técnica como se discute más adelante (véase sección Propiedades Funcionales de Preparaciones de Factor VII).

[0047] El término “incrementada” como se usa acerca de la vida media in vivo funcional o la vida media en plasma se usa para indicar que la vida media relevante del polipéptido o conjugado está incrementada de manera estadísticamente significativa en relación a la de una molécula de referencia, como el Factor VIIa no conjugado (por ejemplo, FVIIa tipo salvaje) de acuerdo a lo determinado bajo condiciones comparables. Por ejemplo la vida media relevante puede incrementarse en al menos aproximadamente 25%, como al menos aproximadamente 50%, por ejemplo, al menos aproximadamente el 100%, 150%, 200%, 250% ó 500%.

[0048] La “inmunogenicidad” de una preparación se refiere a la capacidad de la preparación, cuando se administra a un humano, para producir una respuesta inmune dañina, ya sea humoral, celular o ambas. Se sabe que los polipéptidos del Factor VIIa y los polipéptidos relacionados con el Factor VIIa producen respuestas inmunes detectables en humanos. No obstante, en cualquier subpoblación humana, pueden existir individuos que exhiban sensibilidad a proteínas administradas particulares. La inmunogenicidad puede ser medida cuantificando la presencia de anticuerpos anti-Factor VII y/o células T que responden al Factor VII en un individuo sensible, usando métodos convencionales conocidos en la técnica. En algunas formas de realización, las preparaciones de la presente invención exhiben una disminución en la inmunogenicidad en un individuo sensible de al menos aproximadamente el 10%, preferiblemente al menos aproximadamente el 25%, de manera más preferible al menos aproximadamente 40% y de manera más preferible al menos aproximadamente 50%, en relación a la inmunogenicidad para ese individuo de una preparación de referencia.

[0049] El término “residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos de aminoácidos S52, S60, N145, N322 de la FIG: 1 (FVII nt.)” pretende indicar los residuos de aminoácidos Asn y Ser correspondientes a la secuencia del factor VII tipo salvaje (FIG:1) cuando las secuencias están alineadas. La homología/identidad de la secuencia de aminoácidos es determinada convenientemente de secuencias alineadas, usando un programa informático adecuado para la alineación de secuencias, como, por ejemplo, el programa ClustalW, versión 1.8, 1999 (Thompson et al., 1994, Nucleic Acid Research, 22:4673-4680).

Polipéptidos del Factor VII y Polipéptidos relacionados con el Factor VII

[0050] La presente invención abarca polipéptidos del Factor VII, como, por ejemplo, aquellos que tienen la secuencia de aminoácidos descrita en la Patente Estadounidense No. 4,784,950 (Factor VII tipo salvaje). Como se usa aquí, “Factor VII” o “polipéptido del Factor VII” abarca el Factor VII tipo salvaje, así como variantes del Factor VII que exhiben sustancialmente la misma o actividad biológica mejorada en relación al Factor VII tipo salvaje. Se pretende que el término “Factor VII” abarque los polipéptidos del Factor VII en su forma no escindida (zimógeno), así como aquellos que han sido procesados proteolíticamente para producir las formas bioactivas respectivas, las cuales pueden ser el Factor VII designado. Típicamente, el Factor VII es escindido entre los residuos 152 y 153 para producir el Factor VIIa.

[0051] Como se usa aquí, “péptidos relacionados con el Factor VII” abarca polipéptidos, incluyendo variantes, en las cuales la actividad biológica del Factor VIIa ha sido modificada o reducida sustancialmente en relación a la actividad del Factor VIIa tipo salvaje. Esos polipéptidos incluyen, sin limitación, Factor VII o Factor VIIa que ha sido modificado químicamente y variantes del Factor VII en las cuales han sido introducidas alteraciones de las secuencias de aminoácidos específicas que modifican o perturban la bioactividad del polipéptido.

[0052] La actividad biológica del Factor VIIa en la coagulación de la sangre se deriva de su capacidad para (i) unirse al factor tisular (TF) y (ii) catalizar la escisión proteolítica del Factor IX o el Factor X para producir el Factor IX o X activado (Factor IXa, o Xa, respectivamente). Para los propósitos de la invención, la actividad biológica del Factor VIIa puede ser

cuantificada midiendo la capacidad de una preparación para promover la coagulación sanguínea usando plasma deficiente en el Factor VII y tromboplastina, como se describe, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 5,997,864. En este ensayo, la actividad biológica se expresa como la reducción en el tiempo de coagulación en relación a una muestra control y es convertida a "unidades de Factor VII" por comparación con un estándar de suero humano reunido que contiene 1 unidad/ml de actividad del Factor VII. De manera alternativa, la actividad biológica del Factor VIIa puede ser cuantificada (i) midiendo la capacidad del Factor VII para producir Factor Xa en un sistema que comprende TF incluido en una membrana lipídica y Factor X (Persson et al., J. Biol. Chem. 272:19919-19924, 1997); (ii) midiendo la hidrólisis del Factor X en un sistema acuoso (véase, el Ejemplo 5 más adelante); (iii) midiendo la unión física a TF usando un instrumento basado en resonancia plasmódica superficial (Persson, FEBS Letts. 413:359-363, 1997) (iv) midiendo la hidrólisis de un sustrato sintético (véase, el Ejemplo 4 más adelante); y (v) midiendo la generación de trombina en un sistema in vitro independiente del TF.

[0053] Las variantes del Factor VII que tienen sustancialmente la misma o actividad biológica mejorada en relación al Factor VIIa tipo salvaje abarcan aquéllas que exhiben al menos aproximadamente 25%, de manera preferible al menos aproximadamente 50%, de manera más preferible al menos aproximadamente 75% y de manera aún más preferible al menos aproximadamente 90% de la actividad específica del factor VIIa tipo salvaje que ha sido producido en el mismo tipo de célula, cuando se prueba en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis, o ensayo de unión de TF como se describió anteriormente. Las variantes del Factor VII que tienen actividad biológica sustancialmente reducida en relación al Factor VIIa tipo salvaje son aquellas que exhiben menos de aproximadamente 25%, de manera preferible menos de aproximadamente 10%, de manera más preferible menos de aproximadamente 5% y de manera aún más preferible menos de aproximadamente 1% de la actividad específica del Factor VIIa tipo salvaje que ha sido producido en el mismo tipo de célula cuando se probó en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis o ensayo de unión de TF como se describió anteriormente. Las variantes del Factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente modificada en relación al Factor VII tipo salvaje incluyen, sin limitación, variante del Factor VII que exhiben actividad proteolítica del Factor X independiente del TF y aquellas que se unan al TF pero no escinden el Factor X.

[0054] Las variantes del Factor VII, ya sea que exhiban sustancialmente la misma o una mejor bioactividad del Factor VII tipo salvaje, o, de manera alternativa, que exhiban bioactividad sustancialmente modificada o reducida en relación al Factor VII tipo salvaje, incluyen, sin limitación, polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia del Factor VII tipo salvaje por la inserción, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos.

[0055] Los ejemplos no limitantes de los polipéptidos relacionados con el Factor VII que tienen sustancialmente la misma o actividad biológica mejorada como Factor VII tipo salvaje incluyen al S52A-FVII, S60A-FVII (Iino et al., Arch. Biochem. Biophys. 352:182-192, 1998); L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, y S336G-FVII; las variantes del FVIIa que exhiben estabilidad proteolítica incrementada como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,580,560; Factor VIIa que ha sido escindido proteolíticamente entre los residuos 290 y 291 o entre los residuos 315 y 316 (Mollerup et al., Biotechnol. Bioeng. 48:501-505,1995); formas oxidadas del Factor VIIa (Kornfelt et al., Arch. Biochem. Biophys. 363: 43-54,1999), variantes de la secuencia del Factor VII donde el aminoácido residual en las posiciones 290 y/o 291 (de la FIG:1), preferiblemente 290, han sido reemplazados, y variantes de la secuencia del Factor VII donde el residuo de aminoácido en las posiciones 315 y/o 316 (de la FIG:1), preferiblemente 315, han sido reemplazadas.

[0056] Los ejemplos no limitantes de los polipéptidos relacionados con el Factor VII que tienen sustancialmente la misma o actividad biológica mejorada como Factor VII tipo salvaje incluyen además: variantes del FVII que tiene una actividad biológica incrementada en comparación con el FVIIa tipo salvaje como se describe en las WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/77218, WO 03/27147, y WO 03/37932, incluyendo sin limitación, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, and S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-

FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316HN158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-
 FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316QN158T-
 FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII,
 S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII,
 5 S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII,
 S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII,
 S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,
 S314E/L305VN158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305VN158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-
 FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 10 S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII,
 K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII,
 K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII,
 K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII,
 K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII,
 15 K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-
 FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII,
 K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-
 FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII,
 K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII,
 20 K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII,
 K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII,
 K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-
 FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII,
 K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 25 K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII,
 F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII,
 F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII,
 F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII,
 F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII,
 30 F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII,
 F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII,
 F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII,
 F374Y/L305VN158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII,
 35 F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII,
 F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314EN158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII,
 F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII,
 F374Y/K337A/E296VN158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII,
 40 F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII,
 F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E- FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-
 FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 45 F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-
 FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E- FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-
 FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E- FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-
 FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E- FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,
 50 F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-
 FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E- FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII,
 55 F374Y/L305V/M298Q/K337AN158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337AN158T/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,

F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A-Factor VII, S60A-Factor VII; y P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; FVII que tiene sustituciones, adiciones o supresiones en la secuencia de aminoácidos de 233Thr a 240Asn, FVII que tiene sustituciones, adiciones o supresiones en la secuencia de aminoácidos de 304Arg a 329Cys, y FVII que tiene sustituciones, supresiones, adiciones en la secuencia de aminoácidos Ile 153-Arg223.

[0057] Los ejemplos no limitantes de los polipéptidos relacionados con el Factor VII que tienen actividad biológica sustancialmente reducida o modificada en relación al Factor VII tipo salvaje incluyen R152E-FVIIa (Wildgoose et al., *Biochem* 29:3413-3420, 1990), S344A-FVIIa (Kazama et al., *J. Biol. Chem.* 270:66-72, 1995), FFR-FVIIa (Holst et al., *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 15:515-520, 1998), Factor VIIa que carece del dominio de Gla (Nicolaisen et al., *FEBS Letts.* 317:245-249, 1993), y el Factor VII donde Lys341 ha sido reemplazado por Ala. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos de Factor VII modificados químicamente y variantes de la secuencia se describen, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 5,997,864.

Glicosilación

[0058] Como se usa aquí, un "patrón" de glicosilación o un "patrón", "distribución" o "espectro" de glicoforma se refiere a la representación de estructuras oligosacáridas particulares dentro de una población dada del polipéptido del Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII. Los ejemplos no limitantes de esos patrones incluyen la fracción relativa de cadenas oligosacáridas que (i) tienen al menos un residuo de ácido siálico; (ii) carecen de cualesquiera residuos de ácido siálico (es decir, son neutros en carga); (iii) tienen al menos un residuo de galactosa terminal; (iv) tienen al menos un residuo de N-acetilgalactosamina terminal; (v) tienen al menos una antena "descubierta", es decir, tienen al menos un residuo de galactosa o N-acetilgalactosamina terminal; (vi) tienen al menos una fucosa ligada α 1->3 a un residuo de N-acetilglucosamina antenaria.

[0059] Como se usa aquí, una "cadena oligosacárida" se refiere a toda la estructura oligosacárida que está ligada covalentemente a un solo aminoácido residual. El factor VII es normalmente glicosilado en Asn 145 y Asn 322 (glicosilación ligada en N) y Ser-52 y Ser-60 (glicosilación ligada a O). Una cadena oligosacárida ligada en N presente sobre el Factor VII producido en un humano in situ puede ser bi-, tri- o tetraantenaria, con cada antena teniendo la estructura Neu5Ac(α 2->3 o α 2->6)(Gal(β 1->4)GlcNAc ligada a (β 1->2,4 ó 6) a un residuo de Man que está ligado a (α 1->3 ó 6) a Man (β 1->4)GlcNAc(β 1->4)GlcNAc-Asn. (Neu5Ac significa ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), Gal significa galactosa, GlcNAc significa N-acetilglucosamina, y Man significa manosa). Las cadenas oligosacáridas también pueden comprender residuos de fucosa, que pueden estar ligados de α 1->6 a GlcNAc.

[0060] Una cadena oligosacárida ligada en O presente en el Factor VII producido en un humano in situ es monoantenaria con la antena del Ser-52 teniendo la estructura Xyl-Xyl-Glc-Ser o Glc-Ser, y la antena de Ser-60 teniendo la estructura Neu5A(α 2->3 o α 2->6)Gal(β 1->4)GlcNAc-Fuc-Ser o Fuc-Ser (Fuc significa fucosa, Glc significa glucosa y Xyl significa xilosa).

[0061] Cuando el Factor VII es producido en un humano in situ, algunas de las cadenas oligosacáridas ligadas a N carecen de residuos de fucosa centrales; todas las cadenas carecen de residuos de fucosa antenarios; y ambas de las cadenas ligadas a N son casi completamente sialiladas, es decir, que el azúcar terminal de cada antena es ácido N-acetilneuramínico ligado a galactosa vía un enlace α 2->3 o α 2->6.

[0062] Cuando se produce en otras circunstancias, sin embargo, el Factor VII puede contener cadenas oligosacáridas que tienen diferentes estructuras terminales sobre una o más de sus antenas como, por ejemplo, que carecen de residuos de ácido siálico; que contienen residuos de ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc); que contienen un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) terminal en lugar de la galactosa; y similares. Cuando se producen, por ejemplo, células BHK cultivadas en presencia de suero de ternero, las preparaciones de Factor VII exhiben los siguientes patrones oligosacáridos: 87-93% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos un residuo de ácido siálico solo; 7-13% son neutras (carecen de cualquier ácido siálico); 9-16% contienen al menos un residuo de galactosa terminal; 19-29% contienen al menos un residuo de N-acetilgalactosamina terminal; y 30-39% contienen al menos una antena descubierta, es decir, contienen al menos un residuo de galactosa o N-acetilgalactosamina terminal.

[0063] Cuando se producen en otros tipos de células o bajo otras condiciones de cultivo (en un medio químico completamente definido, libre de suero), una preparación del Factor VII puede exhibir los siguientes patrones oligosacáridos (como se describe en la WO 02/29025);

(i) Entre aproximadamente 94-100% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos un residuo de ácido siálico, como,

por ejemplo, entre aproximadamente 94-99%, entre aproximadamente 95-98%, o entre aproximadamente 96-97%. En diferentes formas de realización, al menos aproximadamente 94%, 95%, 96% ó 97% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos un residuo de ácido siálico.

5 (ii) 6% o menos de las cadenas oligosacáridas son neutras, como, por ejemplo, entre aproximadamente 1.5-6% o entre aproximadamente 2-4%.

(iii) Menos de aproximadamente 16%, preferiblemente menos de aproximadamente 10% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos una galactosa terminal, como, por ejemplo, entre aproximadamente el 6-10% o entre aproximadamente el 8-9%;

10 (iv) Menos de aproximadamente 25%, preferiblemente menos de aproximadamente el 10% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos un residuo de GalNAc terminal, como, por ejemplo, entre aproximadamente 6-9% o entre aproximadamente 7-8%;

(v) Menos de aproximadamente 30, preferiblemente menos de aproximadamente 25% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos una antena descubierta como, por ejemplo, entre aproximadamente 11-23% o entre aproximadamente 12-18%; y

15 (vi) Al menos aproximadamente 2%, de manera preferible al menos aproximadamente 5%, de manera más preferible, al menos aproximadamente 10% ó 20%; y de manera más preferible, al menos aproximadamente 40%, de las cadenas oligosacáridas que contienen al menos una fucosa ligada α 1->3 a un residuo de N-acetilglucosamina antenaria (es decir, un residuo de N-acetilglucosamina que está ligado β 1->2,4 ó 6 a un residuo de Man).

20 [0064] Además, el grado de sialilación (es decir el número de residuos de ácido siálico unidos a cada cadena oligosacárida) puede ser mejorado sometiendo el Factor VII expresado o la preparación de polipéptido relacionado con el Factor VII a un tratamiento enzimático in vitro con una sialiltransferasa y una molécula donadora de ácido siálico, por ejemplo, como se describe en la US 6,399,336. De esta manera, sustancialmente todas las antenas sobre las cadenas oligosacáridas pueden ser sialiladas (es decir, "cubiertas" con un residuo de ácido siálico). En algunos casos, los N-glucanos sobre el FVII o polipéptido relacionado con el FVII tampoco son completamente galactosilados, y un paso de galactosilación que implique la galactosiltransferasa y un sustrato donador de UDP-galactosa antes del paso de sialilación mejorará el contenido de ácido siálico del producto.

25

30 [0065] Los inventores de la presente han producido preparaciones del Factor VII que contienen patrones de oligosacárido que contienen al menos un grupo polimérico unido covalentemente a al menos un grupo oligosacárido. En una forma de realización de las mismas, las preparaciones comprenden polipéptidos del Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII que exhiben uno o más de los siguientes patrones de glicofomas:

(i) Entre aproximadamente 94-100% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos un residuo de ácido siálico, como, por ejemplo, entre aproximadamente 94-99%, entre aproximadamente 95-98%, o entre aproximadamente 96-97%. En diferentes formas de realización, al menos aproximadamente 94%, 95%, 96%, 97%, 98 ó 99% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos un residuo de ácido siálico.

35

(ii) 6% o menos de las cadenas oligosacáridas son neutras, como, por ejemplo, entre aproximadamente 0.5-6% o entre 1.5-6%, entre aproximadamente 2-4% o entre 0.5-4% o entre 0.5-2%;

40 (iii) Menos de aproximadamente 16%, preferiblemente menos de aproximadamente 10% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos una galactosa terminal, como, por ejemplo, entre aproximadamente el 6-10% o entre aproximadamente el 8-9%;

(iv) Menos de aproximadamente 25%, preferiblemente menos de aproximadamente el 10% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos un residuo de GalNAc terminal, como, por ejemplo, entre aproximadamente 6-9% o entre aproximadamente 7-8%;

45 (v) Menos de aproximadamente 30, preferiblemente menos de aproximadamente 25% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos una antena descubierta como, por ejemplo, entre aproximadamente 11-23% o entre aproximadamente 12-18%; y

50 (vi) Al menos aproximadamente 2%, de manera preferible al menos aproximadamente 5%, de manera más preferible, al menos aproximadamente 10% ó 20%; y de manera más preferible, al menos aproximadamente 40%, de las cadenas oligosacáridas que contienen al menos una fucosa ligada α 1->3 a un residuo de N-acetilglucosamina antenaria (es decir, un residuo de N-acetilglucosamina que está ligado β 1->2,4 ó 6 a un residuo de Man).

[0066] Deberá comprenderse que cada uno de (i)-(vi) puede representar un patrón de glicofoma distinto que es abarcado por formas de realización de la presente invención, es decir, el patrón de glicofoma de una preparación de acuerdo con la presente invención donde al menos un grupo polimérico que está unido covalentemente a al menos un polisacárido puede ser descrito únicamente por uno de (i)-(vi). De manera alternativa, el patrón de glicofoma de una preparación abarcada por la invención puede ser descrito por más de uno de (i)-(vi).

55

[0069] Además, una preparación abarcada por la invención puede ser descrita por uno o más de (i)-(vi), en combinación con una o más de otras características estructurales. Por ejemplo, la invención abarca preparaciones que comprenden polipéptidos del Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII en los cuales los residuos de ácido siálico (Neu5Ac o

60

Neu5Gc) están ligados a galactosa exclusivamente en una configuración $\alpha 2 \rightarrow 3$. La invención también abarca preparaciones que comprenden polipéptidos del Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII que contienen fucosa ligada a $\alpha 1 \rightarrow 6$ a una N-acetilglucosamina y/o fucosa central ligada a $\alpha 1 \rightarrow 3$ a una N-acetilglucosamina antenaria. En una serie de formas de realización, las preparaciones de la invención abarcan el Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII en los cuales más del 99% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos un residuo de ácido siálico y (a) los residuos de ácido siálico están ligados exclusivamente en una configuración $\alpha 2 \rightarrow 3$ y/o (b) existen residuos de fucosa ligados a N-acetilglucosamina centrales y/o (c) un número detectable de antenas terminan en N-acetilgalactosamina. En una forma de realización, la invención abarca preparaciones que comprenden Factor VIIa tipo salvaje en las cuales más del 99% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos un residuo de ácido siálico y los residuos de ácido siálico están ligados a galactosa exclusivamente en una configuración $\alpha 2 \rightarrow 3$. En otra forma de realización, la invención abarca preparaciones que comprenden Factor VIIa tipo salvaje en las cuales más del 99% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos un residuo de ácido siálico y al menos alguna de las cadenas oligosacáridas comprenden N-acetilgalactosamina.

[0068] El patrón de oligosacáridos ligados en N y/o ligados en O puede ser determinado usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación: cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC); electroforesis capilar (EC); resonancia magnética nuclear (RMN); espectrometría de masas (MS) usando técnicas de ionización como el bombardeo atómico rápido, electrorroció, desorción con láser ayudada con una matriz (MALDI); cromatografía de gases (CG); y tratamiento con exoglicosidasas en conjunto con HPLC de intercambio aniónico (AIE), cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), espectroscopía de masas (MS), electroforesis sobre gel (SDS-PAGE, CE-PAGE), geles de enfoque isoelectrico, o electroforesis capilar de enfoque isoelectrico (CE-IEF) Véase, por ejemplo, Weber et al., Anal. Biochem 225:135 (1995); Klausen et al., J. Chromatog. 718:195(1995); Morris et al., en Mass Spectrometry of Biological Materials, McEwen et al., eds., Marcel Dekker, (1990), pág 137-167; Conboy et al., Biol. Mass Spectrom. 21:397, 1992; Hellerqvist, Meth. Enzymol. 193:554 (1990); Sutton et al., Anal. Biochem. 318:34 (1994); Harvey et al., Organic Mass Spectrometry 29:752 (1994).

[0069] Después de la resolución de las cadenas oligosacáridas derivadas del Factor VII usando cualquiera de los métodos anteriores (o cualquier otro método que resuelva las cadenas oligosacáridas que tienen diferentes estructuras), las especies resueltas se asignaron, por ejemplo, a uno de los grupos (i)-(vi). El contenido relativo de cada uno de (i)-(vi) es calculado como la suma de los oligosacáridos asignados a ese grupo en relación al contenido total de cadenas oligosacáridas en la muestra.

[0070] Por ejemplo, usando AIE-HPLC, 13 o más picos oligosacáridos ligados en N pueden ser resueltos de una preparación de Factor VII recombinante producida en células BHK (véase, por ejemplo, Klausen et al., Mol. Biotechnol. 9:195, 1998). Cinco de los picos (designados como 1-5 en Klausen et al.) no contienen ácido siálico, mientras que ocho de los picos (designados como 6, 7 y 10-15) contienen ácido siálico.

[0071] Deberá comprenderse que, en un análisis dado, el número y distribución de cadenas que contienen ácido siálico y que carecen de ácido siálico puede depender de (a) el polipéptido que esté siendo expresado; (b) el tipo de célula y condiciones de cultivo; (c) cualquier modificación del patrón de glicofoma por tratamiento químico y/o enzimático después de la expresión, y (d) el método de análisis que se ha empleado, y que los patrones resultantes puedan variar en consecuencia.

[0072] En cualquier caso, una vez que los oligosacáridos que contienen ácido siálico han sido resueltos de los oligosacáridos que contienen ácido no siálico, son usados programas de análisis de datos convencionales para calcular el área bajo cada tipo; el área total de los picos; y el porcentaje del área total de los picos representada por un pico particular. De esta manera, para una preparación dada, la suma de las áreas de los picos que contienen ácido siálico/área total de los picos por 100 produce el valor del % de sialilación para la preparación de acuerdo a la presente invención (es decir, la fracción de cadenas oligosacáridas que tienen al menos un residuo de ácido siálico). En una forma similar, el % de las cadenas que no tienen ácido siálico o al menos una galactosa o N-acetilglucosamina puede ser calculado.

50 Polímeros

[0073] La molécula polimérica para ser acoplada al polipéptido puede ser cualquier molécula adecuada, como un homopolímero o heteropolímero natural o sintético, típicamente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 300-100,000 Da, como de aproximadamente 500-20,000 Da, o aproximadamente 500-15,000 Da, o 2-15 kDa, o 3-15 kDa, o 3-15 kDa, o 3-12 kDa, o aproximadamente 10 kDa. Cuando es usado el término "aproximadamente" aquí en relación con un cierto peso molecular la palabra "aproximadamente" indica una distribución de peso molecular promedio aproximada en una preparación polimérica dada.

[0074] Los ejemplos de homopolímeros incluyen polialcoholes (es decir, poli-OH), poliaminas (es decir, poli-NH₂) y ácidos policarboxílicos (es decir, poli-COOH). Un heteropolímero es un polímero que comprende diferentes grupos de acoplamiento como un grupo hidroxilo y un grupo amina.

[0075] Los ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas del grupo que consiste de óxido de polialquileno (PAO), incluyendo polialquilenglicol (PAG), como el polietilenglicol (PEG), y polipropilenglicol (PPG); PEG ramificados, alcohol polivinílico (PVA), policarboxilato, poli-vinilpirrolidona, anhídrido de ácido polietilen-co-maleico, anhídrido de ácido poliestiren-co-maleico, dextrano, incluyendo carboximetil-dextrano, poliuretano, poliéster y poliamida, o cualquier otro polímero adecuado para reducir la inmunogenicidad y/o incrementar la vida media in vivo funcional y/o vida media en suero. Generalmente, los polímeros derivados de polialquilenglicol son biocompatibles, no tóxicos, no antigénicos y no inmunogénicos, tienen varias propiedades de solubilidad en agua, y son fácilmente secretados de organismos vivos.

[0076] El PEG es la molécula polimérica preferida, puesto que tiene solo unos cuantos grupos reactivos capaces de reticular en comparación con, por ejemplo polisacáridos como el dextrano. En particular, el PEG monofuncional, por ejemplo, metoxipolietilenglicol (mPEG) es de interés debido a que su química de acoplamiento es relativamente simple (únicamente está disponible un grupo reactivo para conjugarse con grupos de unión sobre el oligosacárido). En consecuencia, el riesgo de reticulación es eliminado, los conjugados de polipéptidos resultantes son más homogéneos y la reacción de las moléculas poliméricas con el polipéptido es más fácil de controlar.

[0077] Para efectuar la unión covalente de las moléculas poliméricas al polipéptido, los grupos finales hidroxilo de la molécula polimérica deben ser proporcionados en forma activa, es decir con grupos funcionales reactivos (ejemplos de los cuales incluyen grupos amino primarios, hidrazida (HZ), tiol, succinato (SUC), succinato de succinimidilo (SS), succinimidil succinamida (SSA), propionato de succinimidilo (SPA), carboximetilato de succinimidilo (SCM), carbonato de benzotriazol (BTC), N-hidroxisuccinimida (NHS), aldehído, nitrofenilcarbonato (NPC), y tresilato (TRES)). Las moléculas poliméricas activadas adecuadas se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo de Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL, EUA, o de PolyMASC Pharmaceuticals plc, RU. De manera alternativa, las moléculas poliméricas pueden ser activadas por métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la WO 90/13540. Los ejemplos específicos de moléculas poliméricas lineales o ramificadas activadas para usarse en la presente invención se describen en Shearwater Polymers, Inc. 1997 y 2000 Catalogs (Functionalized Biocompatible Polymers for Research and pharmaceuticals, Polyethylene Glycol and Derivatives, incorporados aquí como referencia).

[0078] Los ejemplos específicos de polímeros de PEG activados 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, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO-PEG, y MAL-PEG, y PEG ramificados como el PEG2-NHS y aquellos descritos en las Patentes Estadounidenses US 5,932, 462 y US 5,643, 575, ambas de las cuales se incorporan aquí como referencia. Además, las siguientes publicaciones, incorporadas aquí como referencia, describen moléculas poliméricas útiles y/o químicas de PEGilación: US 5,824,778, US 5,476,653, WO 97/32607, EP 229,108, EP 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 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, US 5,736,625, WO 98/05363, EP 809 996, US 5,629,384, WO 96/41813, WO 96/07670, US 5,473,034, US 5,516,673, EP 605 963, US 30 5,382, 657, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 y EP 154 316.

[0079] La conjugación de las cadenas oligosacáridas del polipéptido y las moléculas poliméricas activadas es conducida mediante el uso de cualquier método convencional. Los métodos convencionales son conocidos por los expertos.

[0080] El experto estará conciente de que el método de activación y/o química de conjugación para ser usada depende de los grupos de unión de los oligosacáridos así como los grupos funcionales de la molécula polimérica (por ejemplo, que son amina, hidroxilo, carboxilo, aldehído, cetona, sulfhidrilo, succinimidilo, maleimida, vinilsulfona o haloacetato).

[0081] Se comprenderá que la conjugación polimérica está diseñada para producir la molécula óptima con respecto al número de moléculas de polímero unidas, el tamaño y forma de las moléculas (por ejemplo, si son lineales o ramificadas), y los sitios de unión en las cadenas oligosacáridas. El peso molecular del polímero para ser usado puede, por ejemplo, ser elegido sobre la base del efecto deseado para ser logrado. Por ejemplo, si el propósito primario de la conjugación es lograr un conjugado que tenga un peso molecular alto (por ejemplo, para reducir la eliminación renal) usualmente es deseable conjugar tan pocas moléculas de polímero de peso molecular alto como sea posible para obtener el peso molecular deseado. También se contempló, de acuerdo a la invención, acoplar las moléculas poliméricas al polipéptido a través de un enlazante. Los enlazantes adecuados son conocidos por los expertos. Un ejemplo preferido es el cloruro cianúrico (Abuchowski et al., (1977), J. Biol. Chem. , 252, 3578-3581; US 4,179,337; Shafer et al., (1986), J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed., 24,375-378). Después de la conjugación, las moléculas poliméricas activadas residuales son bloqueadas de acuerdo a métodos conocidos en la técnica, por ejemplo por la adición de amina primaria a la mezcla de reacción, y las moléculas poliméricas inactivadas resultantes son eliminadas por un método adecuado. Esos métodos son bien conocidos

por los expertos; véase, por ejemplo, March, *Advanced Organic Chemistry*, 3ra edición, John Wiley & Sons, N. Y. 1985; Greene et al., *Protective groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, N. Y., 1991; Taylor(1991), *Protein Immobilization, Fundamentals and Applications*, Marcel Dekker, N. Y.; Wong (1992), *Chemistry of protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press, Boca Raton; Hermanson et al., (1993), *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, N. Y.; Dunn et al., Eds. *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, 1991.)

[0082] Se comprenderá que dependiendo de las circunstancias, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del polipéptido, la naturaleza del compuesto de PEG activado que esté siendo usado y las condiciones de PEGilación específicas, incluyendo la profracción molar del PEG al polipéptido, pueden ser obtenidos grados variables de PEGilación, con un grado mayor de PEGilación siendo obtenido generalmente con una profracción mayor de PEG a polipéptido. Los polipéptidos PEGilados resultantes de cualquier proceso de PEGilación dado, sin embargo, normalmente, comprenderán una distribución estocástica de conjugados polipeptídicos que tienen grados ligeramente diferentes de PEGilación.

[0083] En una forma de realización interesante de la invención el conjugado polipeptídico de la presente invención comprende una molécula polimérica unida covalentemente a uno de los grupos de ácido siálico localizados en el extremo terminal de un grupo oligosacárido de un polipéptido del Factor VII, donde la molécula polimérica es la única molécula polimérica unida al polipéptido. En otra forma de realización, dos moléculas poliméricas son unidas covalentemente a uno o más grupos oligosacáridos del polipéptido del Factor VII; en otras formas de realización, son unidas covalentemente tres, cuatro, cinco, seis, o siete moléculas poliméricas al polipéptido del Factor VII.

[0084] En una forma de realización, el polipéptido del Factor VII es el FVII tipo salvaje o el polipéptido del FVIIa mostrado en la Figura 1; en otra forma de realización, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido relacionado con el Factor VII; en una forma de realización del mismo, el polipéptido relacionado con el Factor VII es una variante de la secuencia de aminoácidos del Factor VII.

[0085] Preferiblemente, esos conjugados polipeptídicos son aquellos que comprenden una sola molécula de PEG. En particular, se prefiere una molécula de PEG lineal o ramificada con un peso molecular de al menos aproximadamente 5 kDa, en particular aproximadamente 10-25 kDa, de aproximadamente 15-25 kDa, por ejemplo de aproximadamente 20 kDa o aproximadamente 10 kDa.

[0086] Preferiblemente, en un conjugado de la invención el número y peso molecular de la molécula polimérica se elige de modo que el peso molecular total agregado por la molécula polimérica está en el intervalo de 5-25 kDa, como por ejemplo, en el intervalo de 10-25 kDa, aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 15 kDa, o aproximadamente 20 kDa.

Métodos para Producir preparaciones de Factor VII Unido a Polímero que Tienen un Patrón Predeterminado de Oligosacáridos

[0087] *Métodos para producir preparaciones de Factor VII*: el Factor VII, variantes del Factor VII, o polipéptidos relacionados con el Factor VII, pueden ser producidos usando cualquier célula huésped apropiada que exprese Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII glicosilado (es decir, células huésped capaces de unirse a grupos oligosacáridos en los sitios de glicosilación del polipéptido). El Factor VII también puede ser aislado del plasma de humanos u otras especies.

[0088] En algunas formas de realización, las células huéspedes son células humanas que expresan un gen del Factor VII endógeno. En esas células, el gen endógeno puede estar en contacto o pudo haber sido modificado in situ, o una secuencia fuera del gen del Factor VII pudo haber sido modificada in situ para alterar la expresión del gen del Factor VII endógeno. Puede ser usada cualquier célula humana capaz de expresar un gen del Factor VII endógeno.

[0089] En otras formas de realización, son programadas células heterólogas huéspedes para expresar el Factor VII humano de un gen recombinante. Las células huéspedes pueden ser células de vertebrado, insecto u hongo. Preferiblemente, las células son células de mamífero con un espectro completo de glicosilación ligada a N; glicosilación ligada a O; y γ -carboxilación. Véanse, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 4,784,950. Las líneas celulares de mamífero preferidas incluyen las líneas celulares CHO (ATCC CCL 61), COS-1 (ATCC CRL 1650), riñón de hámster bebé (BHK) y HEK293 (ATCC CRL 1573; Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36: 59-72,1977). Una línea celular BHK preferida es la línea celular tk⁺ts13 BHK (Waechter and Baserga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1106-1110, 1982), aquí posteriormente referida como células BHK 570. La línea celular BHK 570 está disponible de la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, bajo el número de acceso ATCC CRL 10314. Una línea celular tk⁺ts13 BHK también está disponible de la ATCC bajo el número de acceso CRL 1632. Además, pueden ser usadas numerosas otras líneas celulares, incluyendo Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), Human lung (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) y células DUKX (línea celular CHO) (Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 1980). (Las células DUKX también son conocidas como células CXB11), y DG44 (línea

celular CHO) (Cell, 33:405, 1983, y Somatic Cell and Molecular Genetics 12:555, 1986). También útiles son las células 3T3, células de Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células. En una forma de realización particularmente preferida, las células huéspedes son células BHK 21 que han sido adaptadas para crecer en ausencia de suero y han sido programadas para expresar el Factor VII. En algunas formas de realización, las células pueden ser células mutantes o recombinantes que expresan un espectro cualitativo o cuantitativamente diferente de enzimas de glicosilación (como, por ejemplo, glicosil transferasas y/o glicosidasas) del tipo de célula del cual se derivaron. Las células también pueden ser programadas para expresar otros péptidos o proteínas heterólogas, incluyendo, por ejemplo, formas truncadas del Factor VII. En una forma de realización, las células huéspedes son células CHO que han sido programadas para coexpresar tanto el polipéptido del Factor VII de interés (es decir, el Factor VII o un polipéptido relacionado con el Factor VII) como otro péptido o polipéptido heterólogo como, por ejemplo, una enzima modificadora o un fragmento del Factor VII.

[0090] Los métodos para producir una preparación de Factor VII que comprenden cualesquiera de los patrones de glicofomas descritos anteriormente como (i)-(vi) y métodos para optimizar la distribución de glicofomas del Factor VII y polipéptidos relacionados con el Factor VII pueden ser llevados a cabo por los pasos de:

(a) cultivar una célula que exprese el Factor VII o un polipéptido relacionado con el Factor VII bajo un primer conjunto de condiciones de cultivo predeterminadas;

(b) recuperar el Factor VII o los polipéptidos relacionados con el Factor VII del cultivo para obtener una preparación que comprende los polipéptidos; y

(c) analizar la estructura de los oligosacáridos ligados a los polipéptidos para determinar un patrón de glicofoma.

[0091] Los métodos pueden comprender además:

(d1) alterar las condiciones de cultivo del paso (a) para lograr un segundo conjunto de condiciones de cultivo predeterminadas;

(e1) repetir los pasos (b)-(d1) hasta que se logre un patrón de glicofoma deseado;

(f1) poner en contacto el Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII con una molécula polimérica bajo condiciones en las cuales la molécula polimérica se una covalentemente al grupo oligosacárido del polipéptido.

[0092] De manera alternativa, los métodos pueden comprender además

(d2) tratar la preparación químicamente y/o enzimáticamente para alterar la estructura oligosacárida; y

(e2) repetir los pasos (b)-(d2) hasta que se logre un patrón de glicofoma deseado.

[0093] Esos métodos pueden comprender además el paso de someter las preparaciones que tienen patrones de glicofomas predeterminados a al menos una prueba de bioactividad (incluyendo, por ejemplo, coagulación, proteólisis del Factor X o unión de TF) u otra funcionalidad (como, por ejemplo, perfil farmacocinético o estabilidad), y correlacionar patrones de glicofomas particulares con perfiles de bioactividad o funcionalidad particulares para identificar un patrón de glicofoma deseado.

[0094] Las variables en las condiciones de cultivo que pueden ser alteradas en el paso (1) incluyen, sin limitación: la célula de origen, como, por ejemplo, una célula derivada de una especie diferente a la originalmente usada; o una célula mutante o recombinante que tenga alteraciones en una o más glicosiltransferasas o glicosidasas u otros componentes del aparato de glicosilación (véase, Grabenhorst et al., Glycoconjugate J. 16:81, 1999; Bragonzi et al., Biochem. Biophys. Acta 1474:273, 2000; Weikert, Nature Biotechnol. 17:1116, 1999); el nivel de expresión del polipéptido; las condiciones metabólicas como, por ejemplo, concentración de glucosa o glutamina; la ausencia o presencia de suero, la concentración de vitamina K, hidrolizado de proteína, hormonas, trazas de metales, sales, así como parámetros de proceso como la temperatura, nivel de oxígeno disuelto y pH.

[0095] Los tratamientos enzimáticos que pueden ser usados en el paso (d2) para modificar el patrón oligosacárido de una preparación incluyen, sin limitación, tratamiento con una o más de sialidasa (neuraminidasa), galactosidasa, fucosidasa; galactosil transferasa, fucosil transferasa; y/o sialiltransferasa, en una secuencia y bajo condiciones que logren una modificación deseada en la distribución de las cadenas oligosacáridas que tengan estructuras terminales particulares. Las glicosil transferasas se encuentran comercialmente disponibles de Calbiochem (La Jolla, CA), y las glicosidasas se encuentran comercialmente disponibles de Glyko, Inc., (Novato, CA).

[0096] En una serie de formas de realización, las células huéspedes que expresan Factor VII o un polipéptido relacionado son sometidas a condiciones de cultivo específicas en las cuales secretan polipéptidos del Factor VII glicosilados que tienen el patrón deseado de estructuras oligosacáridas descritas anteriormente como cualquiera de (i)-(vi). Esas condiciones de cultivo, incluyen sin limitación, una reducción en, o ausencia completa de, suero. Preferiblemente, las células huéspedes son adaptadas para crecer en ausencia de suero y son cultivadas en ausencia de suero tanto en la fase de crecimiento como en la fase de producción. Esos procedimientos de adaptación son descritos, por ejemplo, en Scharfenberg, et al., Animal Cell Technology Developments towards the 21st Century, E. C. Beuvery et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, pp. 619-623, 1995 (células BHK y CHO); Cruz, Biotechnol. Tech. 11: 117-120, 1997 (células de insecto); Keen, Cytotechnol. 17: 203-211,

1995 (células de mieloma); Berg et al., Biotechniques 14: 972-978, 1993 (células 293 de riñón humano). En una forma de realización preferida, el medio de crecimiento que es agregado a las células no contiene proteína u otro componente que fuese aislado de un tejido animal o cultivo de células animales. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 1 más adelante. Típicamente, además de los componentes convencionales, un medio adecuado para producir Factor VII contiene vitamina K a una concentración entre 0.1-50 mg/litro, la cual se requiere para la γ -carboxilación de residuos de glutamina en el Factor VII.

En otra serie de formas de realización, las glicofomas son producidas sometiendo una preparación de Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII a modificación enzimática y/o química de los oligosacáridos ligados a N y/o ligados a O contenidos en ella, como someter la preparación a modificación por medio de una sialiltransferasa o una galactosiltransferasa, como se describe, por ejemplo en la Patente Estadounidense No. 6,399,336. Preferiblemente, los oligosacáridos ligados a N están modificados. Una sialiltransferasa es capaz de sialilar un alto porcentaje de grupos receptores (por ejemplo, galactosa terminal) sobre una glicoproteína. El resultado deseado usualmente se obtiene usando aproximadamente 50 mU de sialiltransferasa por mg de glicoproteína o menos. Típicamente, las cadenas oligosacáridas sobre una glicoproteína que tienen sus patrones glicofomes alterados por este método, tendrán como resultado un mayor porcentaje de residuos de galactosa terminal sialilados que el polipéptido no alterado. Esencialmente, el 100% de los residuos de galactosa terminal pueden estar sialilados después del uso de esos métodos. Los métodos son capaces, típicamente, de alcanzar el nivel deseado de sialilación en aproximadamente 48 horas o menos. Preferiblemente, para la glicosilación de carbohidratos ligados en N de glicoproteínas la sialiltransferasa será capaz de transferir ácido siálico a la secuencia Gal(β 1-<4)GlcNAc-, la penúltima secuencia más común subyacente al ácido siálico terminal sobre las estructuras carbohidratadas completamente sialiladas. Los ejemplos de sialiltransferasa que usa Gal(β 1->4)GlcNAc- como un grupo receptor son ST3Gal III, ST3Gal IV, y ST3Gal V (unión de NeuAc por un enlace α 2->3) y ST6Gal I y ST6Gal II (unión de NeuAc por un enlace α 2->6) (véase la US 6,399,336). (La nomenclatura de la sialiltransferasa es descrita en Tsuji et al., Glycobiology 6:v-xiv (1996)).

[0097] De este modo, una mezcla de las dos enzimas puede ser de valor si ambos enlaces son deseados en el producto final. De manera breve, la sialilación de la glicoproteína es efectuada usando, por ejemplo, un ciclo de sialiltransferasa, el cual incluye una CMP-ácido siálico sintetasa. El sistema de regeneración de CMP en este ciclo comprende monofosfato de citidina (CMP), un nucleósido trifosfato, un donador de fosfato y una quinasa capaz de transferir fosfato del donador de fosfato a los nucleósido difosfatos y una monofosfato nucleósido quinasa capaz de transferir el fosfato terminal de un nucleósido trifosfato al CMP. El sistema regenerador también emplea CMP-ácido siálico sintetasa, la cual transfiere ácido siálico al CMP. En el ciclo de sialilación, el CMP es convertido a CDP por la monofosfato nucleósido quinasa en presencia de ATP agregado. El ATP es regenerado catalíticamente a partir de su subproducto, ADP, por la piruvato quinasa (PK) en presencia de fosfoenolpiruvato (PEP) agregado. El CDP es convertido además a CTP, conversión la cual es catalizada por PK en presencia de PEP. El CTP reacciona con el ácido siálico para formar el pirofosfato inorgánico (PPi) y CMP-ácido siálico, siendo la última reacción catalizada por la CMP-ácido siálico sintetasa. Después de la sialilación del galactosil glucósido, el CMP liberado entra nuevamente al sistema de regeneración para formar CDP, CTP y CMP-ácido siálico. El PPi formado es depurado y forma fosfato inorgánico como subproducto. El piruvato también es un subproducto. Debido al carácter autónomo y cíclico del método, una vez que todos los reactivos y enzimas están presentes, la reacción continúa hasta que es consumido el primero de los sustratos (por ejemplo, NeuAc libres y PEP, o el aceptor). Los ciclos de sialiltransferasa son descritos por ejemplo, en US 5,374,541 y US 6,399,336.

[0098] Los aceptores para la sialiltransferasa estarán presentes sobre la glicoproteína a ser modificada. Los receptores adecuados incluyen, por ejemplo, Gal(β 1->4)GlcNAc-, Gal(β 1->4)GalNAc-, Gal(β 1->3)GlcNAc-, Gal(β 1->3)GlcNAc-, Gal(β 1->6)GlcNAc-, Gal(β 1->4)GlcNAc- y otros receptores conocidos por aquellos expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Paulson et al. (1978) J. Biol. Chem. 253:5617-5624). Típicamente, los receptores están incluidos en las cadenas oligosacáridas que están unidas a residuos de asparagina, serina o treonina presentes en un polipéptido.

[0099] La glicoproteína puede ser "cortada", toda o en parte, para exponer un aceptor para la sialiltransferasa, o una fracción a la cual pueda agregarse uno o más residuos apropiados para obtener un aceptor adecuado. Enzimas como las glicosiltransferasas y endoglicosidasas son útiles para las reacciones de unión y corte. Por ejemplo, la glicoproteína puede ser "cortada" tratando ésta con sialidasa para crear grupos galactosa terminales antes de someter la proteína a una ciclo de sialiltransferasa, o aún a un nivel más bajo a N-acetil-glucosamina por tratamiento adicional con galactosidasas. Véase por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,272,066 para métodos de obtención de polipéptidos que tienen receptores adecuados para la sialilación.

Métodos para unir covalentemente moléculas poliméricas a los polipéptidos del Factor VII:

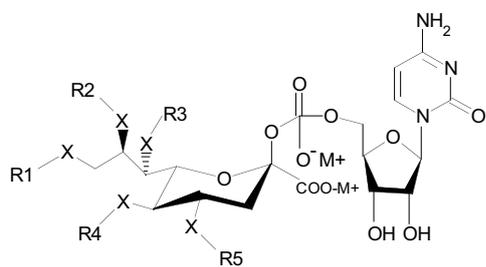
[0100] Varias fracciones químicas como las moléculas poliméricas usadas en el trabajo de la presente invención pueden ser unidas covalentemente a los oligosacáridos sobre el polipéptido del Factor VII por síntesis química o tratamiento enzimático del polipéptido con, por ejemplo, ácido siálico modificado. La molécula polimérica también puede ser acoplada al

oligosacárido a través de un enlazante. Los enlazantes adecuados son bien conocidos por los expertos. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a N-(4-acetilfenil)malimida, derivados de malimido activados con éster de succimidilo como el 4-malimidobutanoato de succimidilo, 1,6-bismalimidohexanos comercialmente disponibles.

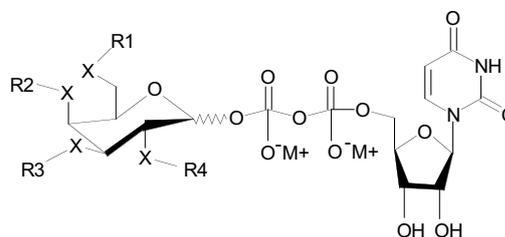
5 [0101] Varias fracciones químicas como las moléculas poliméricas usadas en el trabajo de la presente invención pueden ser unidas covalentemente al ácido siálico y el ácido siálico así "modificado" (o conjugado) posteriormente incorporado en el ciclo de sialil transferasa da como resultado que la molécula polimérica se una covalentemente a la glicoproteína. El ácido siálico conjugado puede ser producido por métodos convencionales conocidos por los expertos. La molécula polimérica también puede ser acoplada al ácido siálico a través de un enlazante.

10 Derivación quimioenzimática de FVII y análogos del FVII

[0102] Los azúcares fosfo nucleótidos modificados de uso para practicar la presente invención pueden estar sustituidos de acuerdo a las fórmulas generales I y II:



Fórmula General I



Fórmula General II

Donde

- X son miembros seleccionados independientemente de S, O, NH, o un enlace de valencia;
- R1, R2, R3, R4 y R5 son miembros seleccionados independientemente de H, un polímero y una molécula enlazante unida covalentemente en polímero, acilo (incluyendo acetilo e hidroxiacetilo), y alquilo;
- M+ es un catión seleccionado de Na+, K+, Li+, tetrabutyl amonio o catión similar.

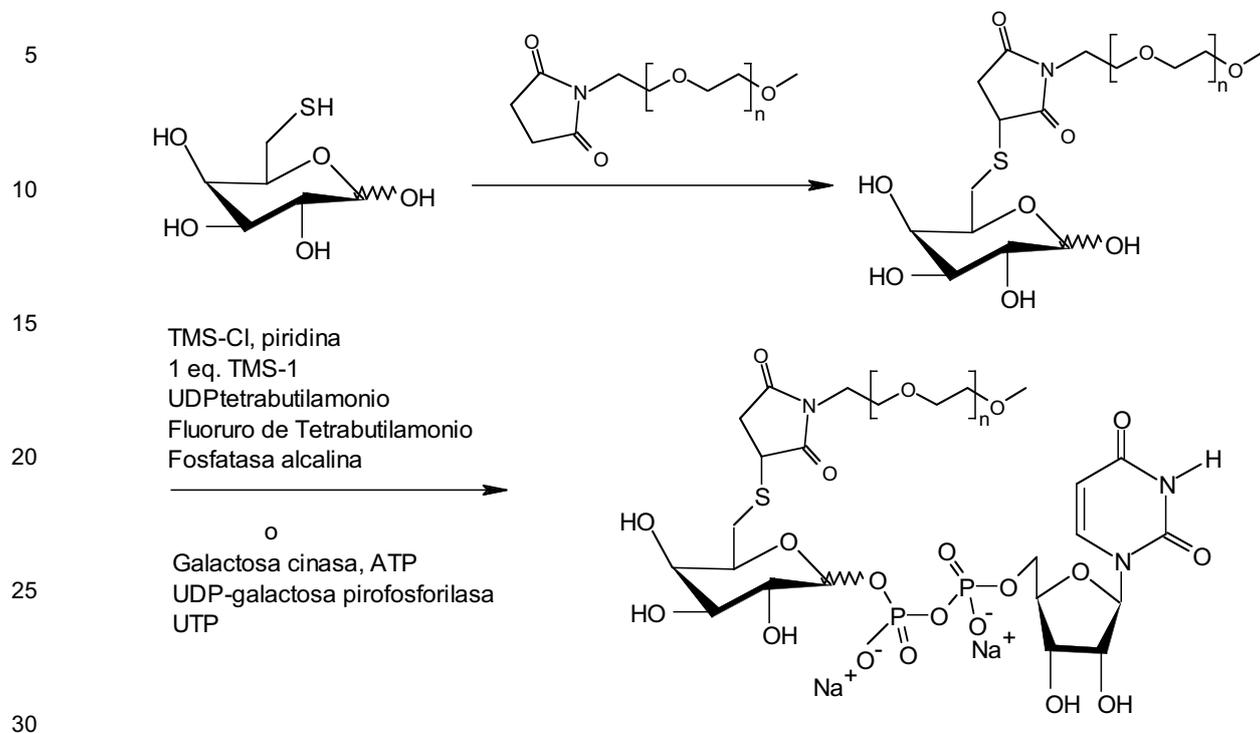
35 [0103] En una forma de realización preferida, R1 y R2 es independientemente un polímero basado en PEG con una masa de 1-40.000 kDa.

[0104] En una forma de realización más preferida, R1 es independientemente un polímero basado en PEG con una masa de 1-40.000 kDa.

40 [0105] En una forma de realización ejemplar, expuesta en el Esquema 1, inicialmente es convertido ácido neuráminico protegido con amina 2-hidroxi y carboxilo en su derivado 9-amino de acuerdo con Isecke, R.; Brossmer, R., Tetrahedron 1994, 50(25), 7445-7460 el cual es derivado adicionalmente con PEG-COOH usando condiciones de acoplamiento estándares. El producto derivado de PEG es entonces desprotegido bajo condiciones ácidas moderadas, y convertido
45 enzimáticamente al azúcar nucleotídico correspondiente.

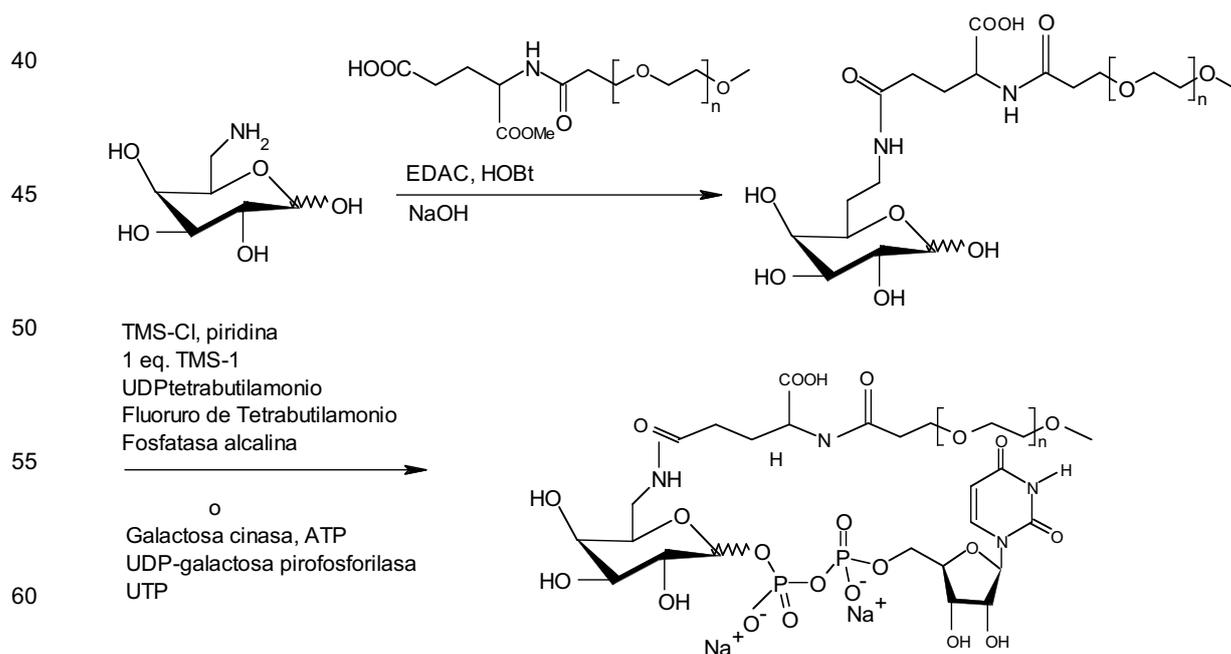
Esquema 1:

Esquema 3



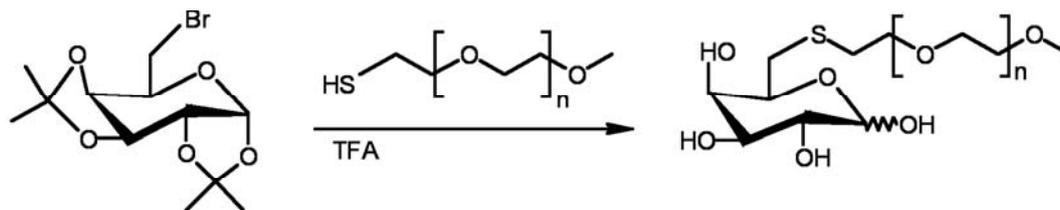
[0108] En otra forma de realización ejemplar expuesta en el Esquema 4, la 6-amino galactosa (Fernandez, J. et al., J. Org. Chem. 1993, 58(19), 5192-5199) reacciona con un PEG que contiene una fracción de aminoácido protegida. El metil éster es saponificado. El compuesto de PEG galactosa puede ser entonces convertido al azúcar nucleotídico correspondiente por métodos enzimáticos o químicos.

Esquema 4



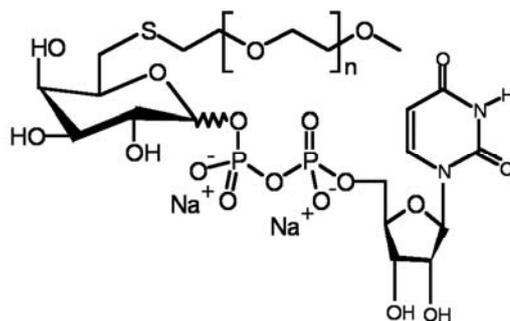
[0109] En otra forma de realización ejemplar expuesta en el Esquema 5, una 6-bromo-galactosa protegida (Hodosi, G., Podanyi, B. y Kuszmann, J., Carbohydr. Res., 1992, 230(2), 327-342) reacciona con un PEG que contiene una fracción de tiol. Los grupos isopropilideno son eliminados bajo condiciones ácidas. El compuesto de PEG-galactosa puede entonces ser convertido al azúcar nucleotídico correspondiente por métodos enzimáticos o químicos.

Esquema 5



TMS-Cl, piridina
 1 eq. TMS-1
 UDPtetrabutilamonio
 Fluoruro de tetrabutilamonio
 Fosfatasa alcalina

Galactosa quinasa, ATP
 UDP-galactosa pirofosforilasa
 UTP



10

[0110] En otra forma de realización ejemplar expuesta en el Esquema 6, un ácido galacturónico protegido (Godage, Y.S. y Fairbanks, A.J., Tetrahedron Lett., 2000, 41(39), 7589-7594) reacciona con un PEG que contiene una fracción amino. Los grupos isopropilideno son removidos bajo condiciones ácidas. El compuesto de PEG-galactosa puede entonces ser convertido al azúcar nucleotídico correspondiente por métodos enzimáticos o químicos.

15

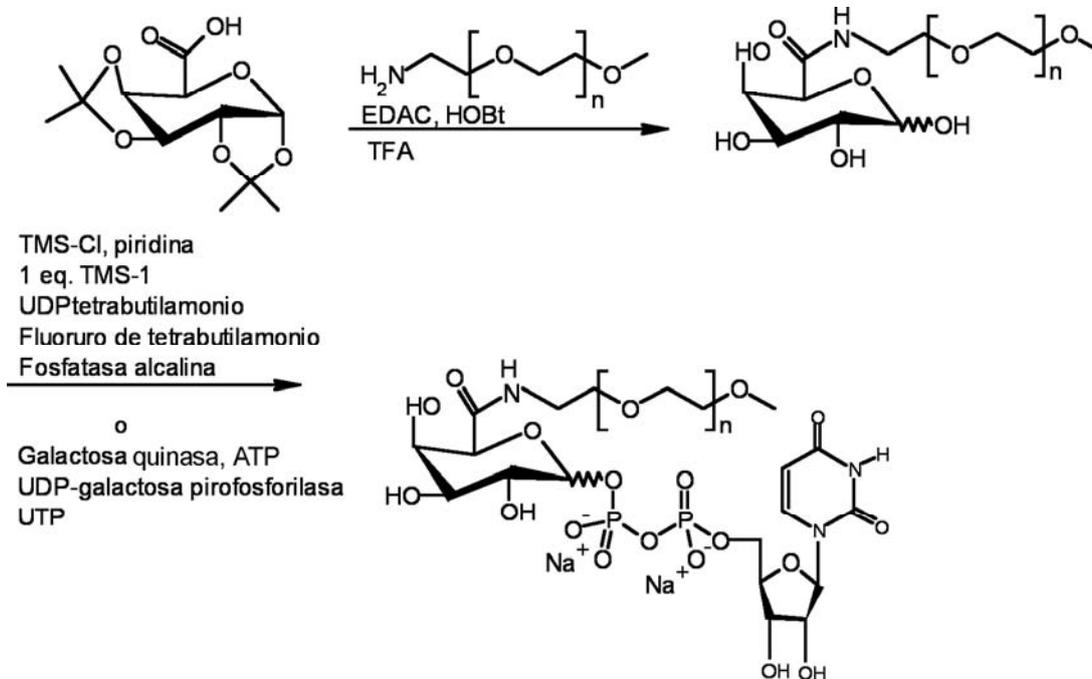
20

25

30

35

Esquema 6



5

[0111] En general, los nucleótidos de azúcar como aquellos descritos anteriormente pueden ser transferidos enzimáticamente a glicoproteínas adecuadas, como el FVII o polipéptido relacionado con FVII, usando glicosil transferasas naturales o mutantes, las cuales incluyen a manera de ilustración, pero sin limitación: α 2,3-sialil transferasas, α 2,6-sialil transferasas o β 1,4-galactosil transferasas. Dependiendo de la elección del nucleótido de azúcar derivado de PEG (CMP-SA-PEG o UDP-Gal-PEG), puede ser preferible tratar el polipéptido relacionado con el FVII con sialidasa, galactosidasa o ambas, antes de la reacción con glicosil transferasas y nucleótidos de azúcar derivados de PEG.

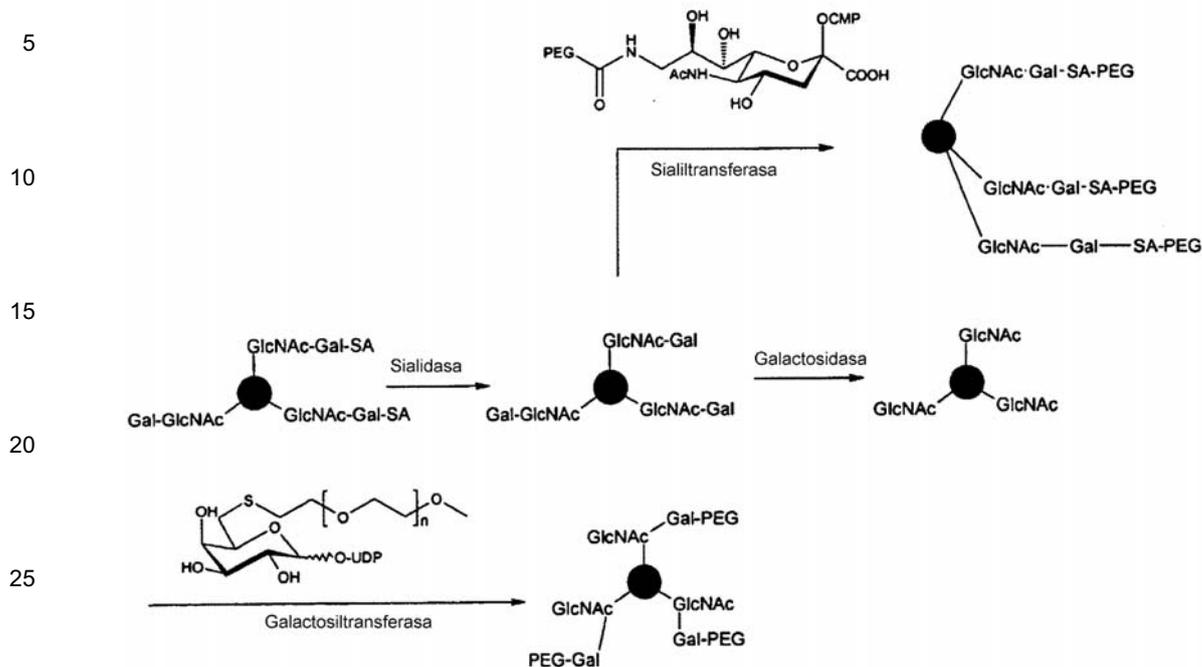
[0112] De este modo en una forma de realización preferida, un análogo del FVII es tratado con sialidasa, para producir un análogo de asialo FVII, que posteriormente es tratado con sialiltransferasa y un análogo de CMP-SA-PEG de acuerdo a la fórmula general I para dar un análogo de FVII derivado de PEG.

[0113] En otra forma de realización, un polipéptido relacionado con el FVII es tratado secuencialmente primero con sialidasa y en segundo lugar con galactosidasa, para producir un asialo agalacto polipéptido relacionado con el FVII. Este análogo es entonces tratado con galactosiltransferasa y un análogo de UDP-Gal-PEG de acuerdo con la fórmula general II, para dar un análogo de FVII derivado de PEG.

[0114] En una serie de formas de realización, se emplean compuestos de galactosa modificados, los cuales son unidos covalentemente a un polímero ya sea directamente o usando una fracción enlazante. Puede emplearse el Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII directamente para obtener niveles más bajos de polímero por polipéptido o tratar primero el Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII con una sialidasa, para eliminar los ácidos siálicos terminales para obtener niveles más altos de polímero por péptido. Tratando el polipéptido con una galactosidasa, se tiene acceso a los puntos de unión para los compuestos de galactosa modificados. El enlace entre los compuestos de galactosa modificados y el polipéptido tratado puede formarse empleando la forma del UDP activada de los compuestos de galactosa modificados y una galactosiltransferasa. Una forma de realización ejemplar de este tipo es ilustrada en el Esquema 7, en el cual el círculo negro representa al Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII, y se ilustra una fracción terminal de unos cuantos de los carbohidratos.

35

Esquema 7

Derivación química del FVII y análogos del FVII

[0115] La oxidación química de residuos de carbohidrato usando peryodato de sodio es un método alternativo para la preparación de conjugados de FVII-PEG. La oxidación química del carbohidrato generalmente generará múltiples grupos aldehído reactivos, cada uno capaz de reaccionar con PEG-nucleófilos, como la PEG-hidrazida, PEG-O-hidroxilamina y PEG-amina.

[0116] Con la PEG-hidrazida y la PEG-O-hidroxilamina respectivamente, pueden ser preparados conjugados estables de FVII-PEG-acilhidrazona y FVII-PEG-oxima. Con PEG-aminas, se forma un conjugado de base de Schiff menos estable. Este conjugado sin embargo puede ser estabilizado además por reducción con cianoborohidruro de sodio, por lo que se forma un enlace de amina secundaria. Los conjugados de FVII-PEG-acilhidrazona también pueden ser reducidos con cianoborohidruro de sodio por lo que se forman conjugados de hidracina ligados en N,N'.

Purificación de preparaciones de Factor VII glicoconjugado

[0117] Como se usa aquí, una "preparación de Factor VII" se refiere a una pluralidad de polipéptidos de Factor VII, polipéptidos de Factor VIIa, o polipéptidos relacionados con el Factor VII, incluyendo variantes y formas modificadas químicamente, que hayan sido separadas de la célula o medio de reacción en el que sintetizaron.

Purificación de las preparaciones y conjugados del Factor VII:

[0118] La separación de polipéptidos producidos de manera recombinante de su célula de origen puede ser lograda por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, eliminación del medio de cultivo celular que contenga el producto deseado de un cultivo de células adherentes; centrifugación o filtración para eliminar células no adherentes, y similares.

[0119] Opcionalmente, los polipéptidos del Factor VII pueden ser purificados adicionalmente. La purificación puede ser lograda usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, cromatografía de afinidad, como, por ejemplo, sobre una columna de anticuerpo anti-Factor VII (véase, por ejemplo, Wakabayashi et al., J. Biol. Chem. 261: 11097, 1986; y Thim et al., Biochem. 27: 7785, 1988); cromatografía de interacción hidrofóbica; cromatografía de intercambio iónico; cromatografía de exclusión por tamaño; procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque

isoelectrico preparativo (IEF), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), o extracción y similares. Véase, de manera general, Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, New York, 1982; y Protein Purification, J. -C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989. Después de la purificación, la preparación preferiblemente contiene menos de aproximadamente 10% en peso, de manera más preferible menos de aproximadamente 5% y de manera más preferible menos de aproximadamente 1%, de proteínas diferentes al Factor VII derivadas de la célula huésped.

[0120] El Factor VII y los polipéptidos relacionados con el Factor VII pueden ser activados por escisión proteolítica, usando Factor XIIa u otras proteasas que tengan especificidad similar a la de la tripsina, como por ejemplo, Factor IXa, calicreina, Factor Xa, y trombina. Véase, por ejemplo, Osterud et al., Biochem. 11: 2853 (1972); Thomas, Patente Estadounidense No. 4,456,591; y Hedner et al., J. Clin. Invest. 71: 1836 (1983). De manera alternativa, el Factor VII puede ser activado haciéndolo pasar a través de una columna de cromatografía por intercambio iónico, como la Mono Q® (Pharmacia) o similar. El Factor VII activado resultante puede entonces ser formulado y administrado como se describe más adelante.

15 **Propiedades Funcionales de Preparaciones de Factor VII**

[0121] Las preparaciones de acuerdo a la invención de polipéptidos de Factor VII y polipéptidos relacionados con el Factor VII que tienen patrones oligosacáridos predeterminados con moléculas poliméricas unidas covalentemente exhiben propiedades funcionales mejoradas con relación a las preparaciones de referencia. Las propiedades funcionales mejoradas pueden incluir, sin limitación, a) propiedades físicas como, por ejemplo, estabilidad al almacenamiento; b) propiedades farmacocinéticas como, por ejemplo, biodisponibilidad y vida media; y c) inmunogenicidad en humanos.

[0122] Una preparación de referencia se refiere a una preparación que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la contenida en la preparación de la invención con la cual está siendo comparada (como, por ejemplo, formas no conjugadas del Factor VII tipo salvaje o una variante particular o forma modificada químicamente) pero que no está conjugada a ninguna molécula polimérica encontrada en la preparación de la invención. Por ejemplo, las preparaciones de referencia típicamente comprenden Factor VII tipo salvaje no conjugado o polipéptidos relacionados con el Factor VII no conjugados.

[0123] La estabilidad al almacenamiento de una preparación del Factor VII puede ser evaluada midiendo (a) el tiempo requerido para que el 20% de la bioactividad de la preparación decaiga cuando se almacene como un polvo seco a 25°C y/o (b) el tiempo requerido para duplicar la proporción de agregados del Factor VIIa en la preparación.

[0124] En algunas formas de realización, las preparaciones de la invención exhiben un incremento de al menos aproximadamente 30%, preferiblemente de al menos aproximadamente 60% y, de manera más preferible al menos aproximadamente 100% en el tiempo requerido para que el 20% de la bioactividad decaiga en relación al tiempo requerido para el mismo fenómeno en una preparación de referencia, cuando ambas preparaciones son almacenadas como polvos secos a 25°C. Las mediciones de bioactividad pueden ser efectuadas usando cualquiera de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis, ensayo de unión de TF o ensayo de generación de trombina independiente de TF.

[0125] En algunas formas de realización, las preparaciones de la invención exhiben un incremento de al menos aproximadamente 30%, preferiblemente de al menos aproximadamente 60%, y de manera más preferible de al menos aproximadamente 100%, en el tiempo requerido para duplicar los agregados con relación a una preparación de referencia, cuando ambas preparaciones son almacenadas como polvos secos a 25°C. El contenido de agregados es determinado por HPLC por permeación en gel sobre una columna Protein Pak 300 SW (7.5 x 300 mm) (Waters, 80013) como sigue. La columna es equilibrada con Eluyente A (sulfato de amonio 0.2 M, isopropanol al 5%, pH ajustado a 2.5 con ácido fosfórico, y posteriormente el pH es ajustado a 7.0 con trietilamina), después de lo cual se aplican 25 µg de muestra a la columna. La elución es con el Eluyente A a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min durante 30 min, y la detección se efectuó midiendo la absorbancia a 215 nm. El contenido de agregados se calcula como el área pico de agregados de Factor VII/área total de picos del Factor VII (monómero y agregados).

[0126] La "biodisponibilidad" se refiere a la fracción de una dosis administrada de un Factor VII o preparación relacionada con el Factor VII que puede ser detectada en plasma a tiempos predeterminados después de la administración. Típicamente, la biodisponibilidad es medida en animales de prueba administrando una dosis de entre aproximadamente 25-250 µg/kg de la preparación; obteniendo muestras de plasma a tiempos predeterminados después de la administración; y determinando el contenido del Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII en las muestras usando uno o más de un ensayo de coagulación (o cualquier bioensayo), un inmunoensayo, o un equivalente. Los datos son presentados, de manera típica, gráficamente como [Factor VII] contra tiempo y la biodisponibilidad se expresa como el área bajo la curva (AUC). La biodisponibilidad relativa de una preparación de prueba se refiere a la relación entre la AUC de la preparación de prueba y la de la preparación de referencia.

[0127] En algunas formas de realización, las preparaciones de la presente invención exhiben una biodisponibilidad relativa de al menos aproximadamente 110%, preferiblemente de al menos aproximadamente 120%, de manera más preferible de al menos aproximadamente 130% y de manera más preferible, al menos aproximadamente 140% de la biodisponibilidad de una preparación de referencia. La biodisponibilidad puede ser medida en cualquier especie de mamífero, preferiblemente perros, y los tiempos predeterminados usados para calcular la AUC pueden abarcar diferentes incrementos de 10 min-8 h.

[0128] La "vida media" se refiere al tiempo requerido para que la concentración en plasma de polipéptidos del Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII disminuya de un valor particular a la mitad de ese valor. La vida media puede ser determinada usando el mismo procedimiento que para la biodisponibilidad. En algunas formas de realización, las preparaciones de la presente invención exhiben un incremento de la vida media de al menos aproximadamente 0.25 h, de manera preferible de al menos aproximadamente 0.5 h, y de manera más preferible de al menos aproximadamente 1 h, y de manera más preferible de al menos aproximadamente 2 h, en relación a la vida media de una preparación de referencia.

[0129] La "inmunogenicidad" de una preparación se refiere a la capacidad de la preparación, cuando se administra a un humano, de producir una respuesta inmune dañina, ya sea humoral, celular o ambas. Los polipéptidos del Factor VIIa y los polipéptidos relacionados con el Factor VIIa no son conocidos por producir respuestas inmunes detectables en humanos. No obstante, en cualquier sobrepoblación humana, pueden existir individuos que exhiban sensibilidad a proteínas administradas particulares. La inmunogenicidad puede ser medida cuantificando la presencia de anticuerpos anti-Factor VII y/o células T que responden al Factor VII en un individuo sensible, usando métodos convencionales conocidos en la técnica. En algunas formas de realización, las preparaciones de la presente invención exhiben una disminución en la inmunogenicidad en un individuo sensible de al menos aproximadamente 10%, de manera preferible de al menos aproximadamente 25%, de manera más preferible de al menos aproximadamente 40%, y de manera más preferible de al menos aproximadamente 50%, en relación a la inmunogenicidad para ese individuo de una preparación de referencia.

COMPOSICIONES FARMACEUTICAS

[0130] Las preparaciones de la presente invención pueden ser usadas para tratar cualquier síndrome que responda al Factor VII, como, por ejemplo, trastornos hemorrágicos, incluyendo, sin limitación, aquellos causados por deficiencias de factores de la coagulación (por ejemplo, hemofilias A y B, y deficiencia en los Factores de coagulación XI o VII); por trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand, o por inhibidores de los factores de la coagulación, o hemorragia excesiva por cualquier causa. Las preparaciones también pueden ser administradas a pacientes en asociación con cirugía u otros traumas o a pacientes que reciben terapia anticoagulante.

[0131] Las preparaciones que comprenden polipéptidos relacionados con el Factor VII de acuerdo con la invención, que tienen bioactividad sustancialmente reducida en relación con el Factor VII tipo salvaje, pueden ser usadas como anticoagulantes, como por ejemplo, en pacientes sometidos a angioplastia u otros procedimientos quirúrgicos que puedan incrementar el riesgo de que ocurra trombosis u oclusión de los vasos sanguíneos, por ejemplo, en la restenosis. Otros indicadores médicos para los cuales son prescritos anticoagulantes incluyen, sin limitación, trombosis de las venas profundas, embolismo pulmonar, apoplejía, coagulación intravascular diseminada (DIC), deposición de fibrina en los pulmones y riñones asociada con endotoxemia gram negativa, infarto de miocardio, Síndrome de Distensión Respiratoria Aguda (ARDS), Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), Síndrome Urémico Hemolítico (HUS), MOF, y TTP.

[0132] Se pretende que las composiciones farmacéuticas que comprenden el Factor VII y las preparaciones relacionadas con el Factor VII de acuerdo con la presente invención sean principalmente pretendidas para la administración parenteral para tratamiento profilático y/o terapéutico. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas son administradas parenteralmente, es decir, intravenosa, subcutánea o intramuscularmente. Ellas pueden ser administradas por infusión continua o pulsátil.

[0133] Las composiciones o formulaciones farmacéuticas contienen una preparación de acuerdo con la invención en combinación con, preferiblemente disuelta en un excipiente farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un excipiente o diluyente acuoso. Puede ser usada una variedad de excipientes, como agua, agua tamponada, solución salina al 0.4%, glicina al 0.3% y similares. Las preparaciones de la invención también pueden ser formuladas en preparaciones liposómicas para ser proporcionadas o dirigidas a los sitios del daño. Las preparaciones liposómicas son descritas, de manera general en, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 4,837,028, 4,501,728, y 4,975,282. Las composiciones pueden ser esterilizadas por las técnicas de esterilización bien conocidas, convencionales. Las soluciones acuosas resultantes pueden ser empaquetadas para usarse o filtradas bajo condiciones asépticas y liofilizadas, siendo la preparación liofilizada combinada con una solución acuosa estéril antes de la administración.

[0134] Las composiciones pueden contener sustancias o adyuvantes auxiliares farmacéuticamente aceptables, incluyendo sin limitación, agentes para ajustar el pH y tampones y/o agentes para ajustar la tonicidad, como por ejemplo, acetato de

sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc.

[0135] La concentración del Factor VII o polipéptidos relacionados con el Factor VII en esas formulaciones puede variar ampliamente, es decir de menos de aproximadamente 0.5% en peso, usualmente a o al menos aproximadamente 1% en peso hasta 15 ó 20% en peso y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de la administración seleccionada.

[0136] De este modo, podría hacerse que una composición farmacéutica típica para infusión intravenosa contenga 250 ml de solución de Ringer estéril y 10 mg de la preparación. Los métodos reales para preparar composiciones administrables parenteralmente serán conocidos o evidentes para aquellos expertos en la técnica y son descritos con mayor detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990).

[0137] Las composiciones que contienen las preparaciones de la presente invención pueden ser administradas para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones son administradas a un sujeto que ya padezca de una enfermedad, como se describió anteriormente, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o contrarrestar parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como la "cantidad terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para cada propósito dependerán de la severidad de la enfermedad o el daño así como el peso y estado general del sujeto. En general, sin embargo, la cantidad efectiva fluctuará de aproximadamente 0.05 mg hasta aproximadamente 500 mg de la preparación por día de un sujeto de 70 kg, con dosis de aproximadamente 1.0 mg hasta aproximadamente 200 mg de la preparación por día siendo más comúnmente usadas. Se comprenderá que la determinación de una dosis apropiada puede ser lograda usando la experimentación de rutina, construyendo una matriz de valores y probando diferentes puntos en la matriz.

[0138] La liberación local de la preparación de la presente invención, por ejemplo, la aplicación tópica, puede ser llevada a cabo, por ejemplo, por medio de un espray, perfusión, catéteres de doble balón, dispositivos de stent, incorporada en injertos vasculares o dispositivos de stent, hidrogeles usados para recubrir catéteres de balón, u otros métodos bien establecidos. En cualquier caso, las composiciones farmacéuticas deberán proporcionar una cantidad de la preparación suficiente para tratar efectivamente al sujeto.

[0139] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además otros agentes bioactivos, como, por ejemplo, coagulantes o anticoagulantes no relacionados con el Factor FVII.

Preparaciones de liberación sostenidas

[0140] Los ejemplos de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el polipéptido o conjugado, teniendo las matrices una forma adecuada como una película o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables como la tecnología de ProLease® o Lupron Depot® (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitúrico. Aunque los polímeros como el etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permite la liberación de moléculas durante periodos prolongados como hasta más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los polipéptidos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, ellos pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en inmunogenicidad. Pueden ser contempladas estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se describe que el mecanismo de agregación es intermolecular la formación de enlaces S-S a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede ser lograda modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

[0141] Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran ciertos aspectos de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Glicopegilación del producto con un alto contenido siálico

[0142] Se preparó polietilenglicol-CMP-ácido siálico (PEG-CMP-SA) uniendo covalentemente PEG con un pm de 10.000 Da a ácido siálico.

El Factor VIIa con un contenido del 87-99% de ácido siálico es tratado con sialidasa, por ejemplo, de acuerdo a lo descrito

en la Patente Estadounidense No. 5,272,066 y resialilado con sialiltransferasa usando PEG-CMPSA como molécula donadora (por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 6,399,336). Después de que la reacción de pegilación ha alcanzado la incorporación máxima, se agrega CMPSA a la mezcla de reacción para cubrir cualquier galactosa terminal expuesta.

5 La incorporación de ácido siálico pegilado es analizada por SDS-PAGE, CE-PAGE, geles de enfoque isoeléctrico, y CE-IEF. Se incorporan 94-100% de ácido siálico; se incorpora una media de 1-4 grupos de PEG.

Ejemplo 2

10 Glicopegilación del producto con contenido siálico medio

[0143] Se preparó polietilenglicol-CMP ácido siálico (PEG-CMPSA) uniendo covalentemente PEG con un pm de 10.000 Da a ácido siálico.

15 El Factor VIIa con un contenido del 87-99% de ácido siálico es tratado con sialiltransferasa usando PEG-CMPSA como molécula donadora, (por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 6,399,336). Después de que la reacción de pegilación ha alcanzado su incorporación máxima, se agrega CMPSA a la mezcla de reacción para cubrir cualquier galactosa terminal expuesta.

La incorporación de ácido siálico pegilado es analizada por SDS-PAGE, CE-PAGE, geles de enfoque isoeléctrico, y CE-IEF. Se incorporan 87-100% de ácido siálico; se incorpora una media de 0.1-0.5 grupos de PEG.

20

Ejemplo 3

[0144] El derivado de ácido citidina 5'-monofosfo-siálico pegilado (CMP-SA-PEG): el metil éster de ácido N-acetil-O²-metil-9-amino-9-desoxi-neuramínico (10 mg, 0.031 mmol, preparado de acuerdo con Isecke, R.; Brossmer, R., Tetrahedron 1994, 50(25), 7445-7460) es disuelto en agua (2 ml), y se le agrega mPEG-SBA (170 mg, 0.03 mol, 5 kDa, Shearwater 2M450H01)). La mezcla es agitada a temperatura ambiente hasta concluir de acuerdo a la TLC. El solvente es eliminado por liofilización, y el residuo rediseuelto en una mezcla 1:1 de metanol y solución de NaOH 0.1 M (5 ml). La mezcla es agitada a temperatura ambiente durante 1h, entonces se hace pasar a través de una columna de resina Dowex 50W-X8 (H⁺) a 4°C y se liofiliza. El residuo es entonces rediseuelto en agua (5 ml), se agrega resina Dowex 50W-X8 (H⁺) y la mezcla se agita hasta concluir por TLC.

30

[0145] Los análogos de citidina 5'-monofosfo de los derivados del ácido siálico de fórmula I se preparan en general de acuerdo con E.S.Simon, M. D. Bednarski y G.M. Whitesides, J. Am. Chem. Soc., 1998, 110, 7159-7163 como se describe, de la siguiente manera: se disuelve ácido citidina 5'-monofosfoneuramínico sintetasa en una solución de ácido N-acetil-9-amino-9-desoxi-neuramínico pegilado en la posición 9 (preparado como se describió anteriormente) y se agrega a una solución de CTP. La mezcla es ajustada a pH 8.5 y se le agrega MgCl₂·6H₂O. La reacción es agitada a temperatura ambiente, y se le agrega NaOH 1N vía una bomba peristáltica para mantener el pH cerca de 8.5. Cuando ¹H-RMN en una alícuota muestra la conclusión, el producto es aislado por cromatografía de intercambio iónico estándar.

35

Ejemplo 4

[0146] El FVIIa (1 mg) disuelto en 1 ml de acetato de sodio 0.1 M pH 5.5 es oxidado a un nivel de sus glicanos a temperatura ambiente durante 30 min con peryodato de sodio 10 mM. La solución es entonces dializada contra acetato de sodio 100 mM, pH 5.5. Después de la diálisis, se mezcla PEG-C(O)-NHNH₂ (preparada por hidracinólisis de mPEG-SBA (2 mg, 5 kDa, Shearwater 2M450H01)) con FVIIa oxidado y se dejan reaccionar durante la noche a temperatura ambiente con agitación suave. La solución de conjugado de FVIIa-PEG así obtenida es dializada (membranas de diálisis con un corte de 10 kDa) contra tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 y almacenada a 4°C.

45

METODOS FARMACOLOGICOS

50

[0147] Los siguientes ensayos son útiles para determinar la actividad biológica, vida media y biodisponibilidad del Factor VII y polipéptidos relacionados con el Factor VII.

Ensayo (1)

55

Ensayo de Hidrólisis *In Vitro*

[0148] El siguiente método puede ser usado para ensayar la bioactividad del Factor VII. El ensayo es llevado a cabo en una placa microtituladora (Maxisorp, Nunc, Dinamarca). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida (S-2288, Chromogenix, Suecia), a una concentración final de 1 mM, es agregado al Factor VIIa (concentración final de 100 nM) en Hepes 50 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 0.1 M, CaCl₂ 5 mM y 1 mg/ml de seroalbúmina bovina. Se mide la absorbancia a

60

405 nm continuamente en un lector de placa SpectraMaxMR 340 (Molecular Devices, EUA). La absorbancia desarrollada durante una incubación de 20 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un blanco que no contiene enzima, es usada para calcular la relación entre las actividades de una prueba y un Factor VIIa de referencia.

5 **Ensayo (II)**

Ensayo de Proteólisis In Vitro

10 [0149] El siguiente método puede ser usado para ensayar la bioactividad del Factor VII. El ensayo es llevado a cabo en una placa microtituladora (Maxisorp, Nunc, Dinamarca). El Factor VIIa (10 nM) y el Factor X (0.8 microM) en 100 µl de Hepes 50 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 0.1 M, CaCl₂ 5 mM y 1 mg/ml de seroalbúmina bovina, para ser incubados durante 15 min. la escisión del Factor X es detenida entonces mediante la adición de Hepes 50 µl 50 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 0.1 M, EDTA 20 mM y 1 mg/ml de seroalbúmina bovina. La cantidad de Factor Xa generada es medida mediante la adición del sustrato cromogénico Z-D-Arg-Gly-p-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Suecia), la concentración final de 0.5 mM. La absorbancia a 405 nm es medida continuamente en un lector de placas SpectraMax[®] 340 (Molecular Devices, EUA). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo en blanco que no contiene FVIIa, es usada para calcular la relación entre las actividades proteolíticas de una prueba y un factor VIIa de referencia.

20 **Ensayo (III)**

Medición de la vida media funcional in vivo

25 [0150] La medición de la vida media biológica in vivo puede ser llevada a cabo en numerosas formas como se describe en la literatura. Un ejemplo de un ensayo para la medición de la vida media in vivo del rFVIIa y variantes del mismo se describe en el número de referencia de la FDA 96-0597. De manera breve, la actividad coagulante del FVIIa es medida en el plasma extraído antes de y durante un periodo de 24 horas después de la administración de conjugado, polipéptido o composición. Se mide el volumen de distribución aparente medio en estado estacionario y se determina la eliminación media.

30 **Ensayo (IV)**

Biodisponibilidad de polipéptidos del Factor VII

35 [0151] La biodisponibilidad puede, por ejemplo, ser medida en un modelo canino como sigue: El experimento se efectuó como un estudio cruzado de cuatro patas en 12 perros Beagle divididos en cuatro grupos. Todos los animales reciben una preparación de prueba A y una preparación de referencia B a una dosis de aproximadamente 90 µg/kg en un tampón de glicilglicina (pH 5.5) que contiene cloruro de sodio (2.92 mg/ml), dihidrato de cloruro de calcio (1.47 mg/ml), manitol (30 mg/ml) y polisorbato 80. Se obtienen muestras de sangre a los 10, 30 y 60 minutos y 2, 3, 4, 6 y 8 horas después de la administración inicial. Se obtiene el plasma de las muestras y el Factor VII es cuantificado por ELISA. La biodisponibilidad de cada muestra se expresa como el área bajo la curva de concentración de plasma ajustada por la dosis para el Factor VII (AUC/dosis). La biodisponibilidad relativa se expresa como la proporción entre la AUC/dosis media de la prueba y la preparación de referencia X 100 y se calculan límites de confianza de 90% para la biodisponibilidad relativa.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Preparación que comprende una pluralidad de polipéptidos del Factor VII, donde los polipéptidos comprenden cadenas oligosacáridas ligadas a asparagina y/o ligadas a serina, y donde al menos un grupo oligosacárido está unido covalentemente a al menos un polietilenglicol (PEG).
2. Preparación de conformidad con la reivindicación 1, donde entre aproximadamente el 94-100% de las cadenas oligosacáridas comprenden al menos una fracción de ácido siálico.
- 10 3. Preparación de conformidad con la reivindicación 2, donde entre el 94-100% de las cadenas oligosacáridas comprenden al menos una fracción de ácido siálico, y donde menos del 25% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos una antena descubierta.
- 15 4. Preparación de conformidad con la reivindicación 3, donde menos del 10% de las cadenas oligosacáridas contienen al menos una antena descubierta.
5. Preparación de conformidad con la reivindicación 4, donde menos de 5, preferiblemente el 2% de las cadenas oligosacáridas contiene al menos una antena descubierta.
- 20 6. Preparación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3-5, donde entre el 96-100% de las cadenas oligosacáridas comprenden al menos una fracción de ácido siálico.
7. Preparación de conformidad con la reivindicación 6, donde entre el 98-100% de las cadenas oligosacáridas comprenden al menos una fracción de ácido siálico.
- 25 8. Preparación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las cadenas oligosacáridas ligadas a serina se localizan en posiciones correspondientes a los aminoácidos residuales Asn-145 y Asn-322 del FVIIa humano tipo salvaje.
- 30 9. Preparación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las cadenas oligosacáridas ligadas a serina se localizan en posiciones correspondientes a los aminoácidos residuales Ser-52 y Ser-60 del FVIIa humano tipo salvaje.
- 35 10. Preparación de conformidad con la reivindicación 1, donde el polietilenglicol es PEG con un peso molecular de 300-100,000 Da, como de 500-20,000 Da., o 500-15,000 Da o 2-15 kDa o 3-15 kDa o 3-12 kDa, o 10 kDa.
11. Preparación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos del Factor VII humano tipo salvaje.
- 40 12. Preparación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde los polipéptidos son del Factor VIIa humano derivados de plasma.
- 45 13. Preparación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde los polipéptidos del Factor VII son seleccionados del grupo que consiste en: S52A-Factor VII, S60A-Factor VII, Factor VII que ha sido escindido proteolíticamente entre los residuos 290 y 291; Factor VII que ha sido escindido proteolíticamente entre los residuos 315 y 316; Factor VII que ha sido oxidado, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L3051-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296WM298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, S336G-FVII; variantes de la secuencia del Factor VII donde el aminoácido residual en las posiciones 290 y/o 291, preferiblemente 290, ha sido reemplazado; y variantes de la secuencia del Factor VII donde el aminoácido residual en las posiciones 315 y/o 316, preferiblemente 315, ha sido reemplazado.
- 50 14. Preparación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde los polipéptidos del Factor VII son seleccionados del grupo que consiste en: L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,
- 60

S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,

- 5 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A-Factor VII, S60A-Factor VII; y P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; teniendo el FVII sustituciones, adiciones o supresiones en la secuencia de aminoácidos de 233Thr a 240Asn, teniendo el FVII sustituciones, adiciones o supresiones en la secuencia de aminoácidos de 304Arg a 329Cys, y teniendo el FVII sustituciones, supresiones, adiciones en la secuencia de aminoácidos de Ile153-Arg223.
- 10 15. Preparación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde los polipéptidos del Factor VII son seleccionados del grupo que consiste en: R152E-Factor VII, S344A-Factor VII, FFR-Factor VII, y el Factor VIIa careciendo del dominio Gla.
- 15 16. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde dicho método comprende poner en contacto el polipéptido conjugado con una molécula de polímero bajo condiciones en las cuales al menos una molécula de polímero se une covalentemente a al menos una de las cadenas oligosacáridas de los polipéptidos.
- 20 17. Formulación farmacéutica comprendiendo una preparación como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y un portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 25 18. Uso de una preparación que comprende polipéptidos del Factor VII o polipéptidos como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, trombocitopenia, y enfermedad de von Willebrand, incluyendo coagulopatía dilucional, hemorragia intracraneal, hemorragias gastrointestinales superiores, y enfermedad hepática.
- 30 19. Uso de una preparación que comprende polipéptidos del Factor VII como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para la preparación de un medicamento para la prevención de una coagulación sanguínea indeseable, donde la coagulación sanguínea indeseable está asociada con una condición seleccionada del grupo que consiste en: angioplastia, trombosis de las venas profundas, embolismo pulmonar, apoplejía, coagulación intravascular diseminada (DIC), deposición de fibrina en los pulmones y riñones asociada con endotoxemia gram negativa, e infarto al miocardio.
- 35 20. Uso de una preparación que comprende polipéptidos del Factor VII como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para la preparación de un medicamento para prevenir reacciones mediadas por el factor tisular, donde las reacciones mediadas por el factor tisular están asociadas con una condición seleccionada del grupo que consiste en Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), Lesión Pulmonar Aguda (ALI), Síndrome de Distensión Respiratoria Aguda (ARDS), Insuficiencia de Órganos Múltiples (MOF), Síndrome Urémico Hemolítico (HUS), y púrpura trombocitopénica trombótica (TTP).

FIG: 1

Secuencia de aminoácidos de Factor VII humano tipo salvaje:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys-Asn-Trp-Arg-Asn-Leu-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-His-Asp-Leu-Ser-Glu-His-
 200 205 210 215

Asp-Gly-Asp-Glu-Gln-Ser-Arg-Arg-Val-Ala-Gln-Val-Ile-Ile-Pro-Ser-Thr-Tyr-
 220 225 230

Val-Pro-Gly-Thr-Thr-Asn-His-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Arg-Leu-His-Gln-Pro-Val-
 235 240 245 250

Val-Leu-Thr-Asp-His-Val-Val-Pro-Leu-Cys-Leu-Pro-Glu-Arg-Thr-Phe-Ser-Glu-
 255 260 265 270

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

Asp-Arg-Gly-Ala-Thr-Ala-Leu-Glu-Leu-Met-Val-Leu-Asn-Val-Pro-Arg-Leu-Met-
 290 295 300 305 306

Thr-Gln-Asp-Cys-Leu-Gln-Gln-Ser-Arg-Lys-Val-Gly-Asp-Ser-Pro-Asn-Ile-Thr-
 310 315 320

Glu-Tyr-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Ser-Asp-Gly-Ser-Lys-Asp-Ser-Cys-Lys-Gly-
 325 330 335 340

Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-His-Ala-Thr-His-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Tyr-Leu-Thr-Gly-
 345 350 355 360

Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Gln-Gly-Cys-Ala-Thr-Val-Gly-His-Phe-Gly-Val-Tyr-Thr-
 365 370 375

Arg-Val-Ser-Gln-Tyr-Ile-Glu-Trp-Leu-Gln-Lys-Leu-Met-Arg-Ser-Glu-Pro-Arg-
 380 385 390 395

Pro-Gly-Val-Leu-Leu-Arg-Ala-Pro-Phe-Pro
 400 405 406