



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 307**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09156971 .5**

96 Fecha de presentación : **28.04.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **2085471**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.08.2009**

54 Título: **Polipéptidos de factor VIIA modificados.**

30 Prioridad: **29.04.1999 US 302239**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.07.2011

73 Titular/es: **Regents of the University of Minnesota
1000 Westgate Drive, Suite 160
Saint Paul, Minnesota 55114-8658, US**

72 Inventor/es: **Nelsetuen, Gary L.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 363 307 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de factor VIIA modificados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Las proteínas dependientes de vitamina K contienen de 9 a 13 restos ácido gamma-carboxiglutámico (Gla) en sus 45 restos amino terminales. Los restos Gla son producidos por enzimas en el hígado que utilizan vitamina K para carboxilar las cadenas laterales de los restos ácido glutámico en los precursores de proteínas. Las proteínas dependientes de vitamina K están implicadas en numerosos procedimientos biológicos, de los cuales el mejor descrito es la coagulación de la sangre (revisado por Furie, B. y Furie, B.C. 1988, Cell, 53:505-518). Las proteínas dependientes de vitamina K incluyen la proteína Z, la proteína S, la protrombina, el factor X, el factor IX, la proteína C, el factor VII y Gas6. La última proteína funciona en la regulación del crecimiento celular. Matsubara et al., 1996, Dev. Biol., 180:499-510. Los restos Gla son necesarios para la apropiada unión del calcio y la interacción con la membrana por medio de estas proteínas. Se piensa que el sitio de contacto con la membrana del factor X reside en los restos aminoácido 1-37. Evans y Nelsestuen, 1996, Protein Sci., 5: supl. 1, 163 Abs. Aunque las regiones que contienen Gla de las proteínas del plasma muestran un alto grado de homología de secuencia, tienen al menos un orden de afinidad por la membrana de 1.000 veces. McDonald et al., 1997, Biochemistry, 36:5120-5137.

El factor VII funciona en la fase inicial de coagulación de la sangre y puede ser un elemento clave en la formación de coágulos sanguíneos. El precursor inactivo, o zimógeno, tiene una baja actividad enzimática que aumenta enormemente por la escisión proteolítica en el enlace R152I153 para formar el factor VIIa. Esta activación puede ser catalizada por el factor Xa así como por el factor tisular VIIa, una proteína integrante de la membrana encontrada en numerosos tipos celulares. Fiore, M.M. et al., 1994, J. Biol. Chem., 269:143-149. La activación por el factor tisular VIIa es referida como autoactivación. Está implicada tanto en la activación (formación del factor VIIa a partir del factor VII) como en la subsiguiente actividad del factor VIIa. La ruta más importante para la activación in vivo no es conocida. El factor VIIa puede activar los factores de coagulación sanguínea IX y X.

El factor tisular es expresado a niveles elevados en la superficie de algunas células tumorales. Es posible un papel para el factor tisular, y para el factor VIIa, en el desarrollo de tumores y la invasión de tejidos. Vrana, J.A. et al., Cancer Res., 56:5063-5070. La expresión celular y la acción del factor tisular también es un factor principal en la respuesta tóxica al choque endotóxico. Dackiw, A.A. et al., 1996, Arch. Surg., 131:1273-1278.

La proteína C es activada por la trombina en presencia de trombomodulina, una proteína integrante de la membrana de las células endoteliales. Esmon, N.L. et al., 1982, J. Biol. Chem., 257:859-864. La proteína C activada (APC) degrada los factores Va y VIIIa en combinación con su cofactor, la proteína S. La resistencia a la APC es la forma más común de la enfermedad trombótica heredada. Dahlback, B., 1995, Blood, 85:607-614. Los inhibidores de vitamina K son administrados comúnmente como profilaxis para enfermedades trombóticas.

Las proteínas dependientes de vitamina K se utilizan para tratar ciertos tipos de hemofilia. La hemofilia A se caracteriza por la ausencia de factor VIII activo, factor VIIIa, o la presencia de inhibidores del factor VIII. La hemofilia B se caracteriza por la ausencia de factor IX activo, factor IXa. La deficiencia de factor VII, aunque rara, responde bien a la administración de factor VII. Bauer, K.A., 1996, Haemostasis, 26:155-158, supl. 1. La terapia de sustitución del factor VIII es limitada debido al desarrollo de un elevado título de anticuerpos del factor VIII inhibidores en algunos pacientes. Alternativamente, se puede utilizar el factor VIIa en el tratamiento de la hemofilia A y B. El factor IXa y el factor VIIIa activan el factor X. El factor VIIa elimina la necesidad de factores IX y VIII activando directamente el factor X, y puede superar los problemas de las deficiencias de factor IX y VIII con escasas consecuencias inmunológicas. Hedner et al., 1993, Transfus. Medi. Rev., 7:78-83; Nicolaisen, E.M., et al., 1996, Thromb. Haemost., 76:200-204. Los niveles eficaces de administración de factor VIIa son a menudo elevados (45 a 90 µg/kg de peso corporal) y puede ser necesario repetir la administración cada pocas horas. Shulmav, S. et al., 1996, Thromb. Haemost., 75:432-436.

Se ha encontrado que una forma soluble de factor tisular (factor tisular soluble o sTF) que no contiene la región de contacto con la membrana es eficaz en el tratamiento de la hemofilia cuando se administra simultáneamente con el factor VIIa. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.504.064. En perros, se demostró que el sTF reducía la cantidad de factor VIIa necesaria para tratar la hemofilia. La asociación con la membrana de sTF-VIIa es completamente dependiente del sitio de contacto con la membrana del factor VII. Esto contrasta con el complejo de tejido normal-factor VIIa, que se une a la membrana a través tanto del factor tisular como de VII (a).

Shah et al., 1998 (Proc. Natl. Acad. Sci, 95:4229-4234) describen la manipulación del sitio de unión a la membrana de las proteínas dependientes de vitamina K y concretamente la función biológica mejorada del factor Q10E32 mutante del factor VII humano (que es el mismo que el mutante VIIQ11E33 descrito en la presente solicitud).

McDonald et al., 1997 (Biochemistry, 36(17):5120-5127) comparan las proteínas dependientes de vitamina K de origen natural y las correlacionan con sus propiedades de unión a la membrana e identifican que el Factor VII, que contiene sustituciones en ambas posiciones 1 y 33, presenta la afinidad de membrana más baja.

En el documento WO 88/10295 se describe el factor VII/VIIa modificado, que está estabilizado frente a la escisión

proteolítica remplazando ciertos restos Arg y Lys. Entre otros la K33 del factor VII/VIIa es remplazada por Gln, Glu, His, Gly, Thr, Ala o Ser.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 Se ha descubierto que las modificaciones en el dominio de ácido gamma-carboxiglutámico (GLA) de los polipéptidos dependientes de vitamina K potencian sus afinidades de unión a la membrana. Los polipéptidos dependientes de vitamina K modificados de esta manera tienen un aumento de actividad y se pueden utilizar como anti-coagulantes, pro-coagulantes, o para otras funciones que utilizan proteínas dependientes de vitamina K. Por ejemplo, una molécula de factor VII mejorada puede proporcionar numerosos beneficios disminuyendo la dosificación de VIIa necesaria, reduciendo la frecuencia relativa de administración y/o proporcionando cambios cualitativos que permitan un tratamiento más eficaz de los estados de deficiencia.

10 La invención se expone en las reivindicaciones.

15 La invención ofrece polipéptidos dependientes de vitamina K que incluyen un dominio GLA modificado que intensifica la afinidad de unión a la membrana del polipéptido con respecto al correspondiente polipéptido dependiente de vitamina K nativo. La actividad del polipéptido dependiente de vitamina K también resulta intensificada. El dominio GLA modificado comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones 11, 29, 33 y 34. El dominio puede incluir otras sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos puede estar en los aminoácidos 2, 5, 9, 12, 35, o 36, y sus combinaciones. El dominio GLA modificado puede incluir una secuencia de aminoácidos, que, en el estado saturado de calcio, forma una estructura terciaria que tiene un núcleo catiónico con un halo de carga electronegativa. Los polipéptidos dependientes de vitamina K pueden ser utilizados para tratar trastornos de la coagulación y pueden incrementar la formación de coágulos.

20 El dominio GLA modificado del factor VIIa, y factor VIIa con el sitio activo modificado pueden contener una sustitución en los aminoácidos 11, 29, 33, 34, o 35, y sus combinaciones. Por ejemplo, se puede sustituir un resto glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico, o asparagina en el aminoácido 11, se puede sustituir un resto ácido glutámico o fenilalanina en el aminoácido 29, o se puede sustituir un resto ácido glutámico en el aminoácido 33, y sus combinaciones. La sustitución de un resto glutamina en el aminoácido 11 es particularmente útil. En una realización, se sustituye un resto glutamina en el aminoácido 11 y se sustituye un resto ácido glutámico en el aminoácido 33. El dominio GLA modificado puede incluir adicionalmente al menos un resto hidrófobo en los aminoácidos 34 o 35. Se puede sustituir un resto fenilalanina, leucina, o isoleucina en el aminoácido 34, y/o un resto ácido aspártico o ácido glutámico en el aminoácido 35.

25 El dominio GLA modificado de los polipéptidos dependientes de vitamina K puede incluir adicionalmente un sitio de escisión inactivado.

La invención ofrece un polipéptido dependiente de vitamina K que incluye un dominio GLA modificado que potencia la afinidad de unión a la membrana y la actividad del polipéptido. El polipéptido es el factor VIIa, y puede incluir la inserción de un resto tirosina o glicina.

35 La invención también ofrece una célula anfitriona de mamífero que incluye un polipéptido del factor VIIa dependiente de vitamina K como se ha definido antes. El polipéptido incluye un dominio GLA modificado que intensifica la afinidad de unión a la membrana del polipéptido con respecto al correspondiente polipéptido dependiente de vitamina K nativo. El dominio GLA modificado incluye al menos cuatro sustituciones de aminoácidos como se ha descrito antes.

40 La invención también hace referencia a una composición farmacéutica que incluye un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad de polipéptido del factor VIIa dependiente de vitamina K como se ha definido antes. El polipéptido dependiente de vitamina K incluye un dominio GLA modificado que intensifica la afinidad de unión a la membrana del polipéptido con respecto al correspondiente polipéptido dependiente de vitamina K nativo. También se intensifica la actividad del polipéptido. El dominio GLA modificado del polipéptido dependiente de vitamina K incluye al menos cuatro sustituciones de aminoácidos como se ha descrito antes. La composición puede incluir adicionalmente factor tisular soluble.

45 La invención también ofrece un polipéptido del factor VIIa dependiente de vitamina K como se ha definido antes para su uso como medicamento. El polipéptido dependiente de vitamina K incluye un dominio GLA modificado que intensifica la afinidad de unión a la membrana del polipéptido con respecto al correspondiente polipéptido dependiente de vitamina K nativo.

50 La invención también incluye un polipéptido de la invención para su uso en el incremento de la formación de coágulos en el mamífero. El uso puede incluir la administración de una cantidad de un polipéptido del factor VIIa dependiente de vitamina K eficaz para incrementar la formación de coágulos en el mamífero. El polipéptido del factor VIIa dependiente de vitamina K incluye un dominio GLA modificado que intensifica la afinidad de unión a la membrana del polipéptido con respecto al correspondiente polipéptido dependiente de vitamina K nativo. El dominio GLA modificado incluye al menos cuatro sustituciones de aminoácidos como se ha descrito antes.

Los polipéptidos dependientes de vitamina K de la invención se pueden utilizar en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de los trastornos de la coagulación.

5 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente comprendido por los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para poner en práctica la invención, los métodos y materiales adecuados se describen más abajo. En caso de conflicto, se impondrá la presente memoria, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, los métodos, y los ejemplos son meramente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

10 Otras características y ventajas de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa la unión, con desviaciones típicas, de VIIa de tipo salvaje (círculos vacíos), VIIQ11E33 (círculos rellenos), y factor X bovino (triángulos rellenos) a las membranas.

15 La Figura 2 representa la autoactivación de VIIQ11E33. La línea discontinua muestra la actividad en ausencia de fosfolípido.

La Figura 3 representa la activación del factor X por el factor VIIa. Los resultados para el factor VIIa de tipo salvaje (círculos vacíos) y VIIaQ11E33 (círculos rellenos) se dan para una concentración 0,06 nM.

La Figura 4 representa la coagulación de plasma humano por medio de VIIa y VIIaQ11E33 con factor tisular soluble.

20 La Figura 5 representa la coagulación de plasma por medio de zimógenos del factor VII y factor tisular normal.

La Figura 6 representa la inhibición de la formación de coágulos por medio del factor VIIaQ11E33 con el sitio activo modificado (DEGR-VIIaQ11E33).

La Figura 7 representa el tiempo en circulación del factor VIIQ11E33 en ratas.

25 La Figura 8 representa la interacción con la membrana por medio de proteínas normales y modificadas. El panel A muestra la interacción de la proteína C bovina de tipo salvaje (círculos vacíos) y la proteína C-H11 bovina (círculos rellenos) con las vesículas. El panel B muestra la interacción de la proteína C humana de tipo salvaje (círculos vacíos) y la proteína C-P11 humana (círculos rellenos) con las membranas. En ambos casos, la línea discontinua indica el resultado si toda la proteína añadida se unía a la membrana.

30 La Figura 9 representa la influencia de la proteína C activada sobre los tiempos de coagulación. En el panel A, se muestran la media y la desviación típica para tres determinaciones de tiempos de coagulación para plasma bovino para APC bovina de tipo salvaje (círculos vacíos) y para bAPC-H11 (círculos rellenos). En el panel B, se muestran la media y la desviación típica de tres réplicas de coagulación de plasma humano para humana de tipo salvaje (círculos vacíos) y APC-P11 humana (círculos rellenos).

35 La Figura 10 representa la inactivación del factor Va por medio de APC bovina y humana. El panel A representa la inactivación del factor Va por APC bovina de tipo salvaje (círculos vacíos) y APC-H11 bovina (círculos rellenos). El panel B representa la inactivación del factor Va humano en plasma deficiente en proteína S por medio de APC humana de tipo salvaje (círculos vacíos) y APC-H11 humana (círculos rellenos).

La Figura 11 representa la distribución electrostática de la proteína Z. Las líneas verticales indican regiones electropositivas y las líneas horizontales indican regiones electronegativas.

40 La Figura 12 representa la unión a la membrana y la actividad de diversas proteínas C. El panel A muestra la unión a la membrana por medio de la proteína C de tipo salvaje (círculos vacíos), el mutante P11H de la proteína C (cuadrados rellenos), Q33E, el mutante N34D (círculos rellenos) y la protrombina bovina (cuadrados vacíos). El panel B muestra la inhibición de la coagulación de la sangre por medio de estos mutantes. El panel C muestra la inactivación del factor Va.

45 La Figura 13 compara la unión a la membrana y la actividad de mutantes de la proteína C humana. El panel A compara la unión a la membrana del tipo salvaje (círculos vacíos), E33 (triángulos vacíos) y E33D34 (círculos rellenos). El panel B compara los tiempos de coagulación utilizando el tipo salvaje (triángulos vacíos), E33 (círculos vacíos) y E33D34 (círculos rellenos).

50 La Figura 14 compara la unión a la membrana (Panel A) y la inhibición de la coagulación (Panel B) con el tipo salvaje (cuadrados vacíos), H11 (círculos rellenos), E33D34 (triángulos vacíos) y el mutante triple H11E33D34 (círculos vacíos) de la proteína C bovina.

La Figura 15 representa las propiedades de interacción con la membrana de diferentes proteínas dependientes de vitamina K. El panel A compara la interacción con la membrana del factor X humano (círculos rellenos) y bovino (círculos vacíos). El panel B muestra la interacción con la membrana por medio del fragmento 1 de la protrombina bovina normal (círculos vacíos), el fragmento 1 modificado con TNBS en ausencia de calcio (círculos rellenos) y el fragmento 1 modificado con TNBS en presencia de calcio 25 mM (cuadrados rellenos). El panel C muestra la velocidad de unión de la proteína Z a las vesículas a pH 9 (círculos rellenos) y 7,5 (círculos vacíos).

Las FIGS. 16A-16C son informes del Clot Signature Analyzer de la formación de trombos inducida por colágeno (CITF) para sangre normal (A), para sangre que contiene APC de tipo salvaje 30 nM (B), y sangre que contiene APC(C) VIIQ12E33D34 6 nM.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En un aspecto, la invención ofrece un polipéptido dependiente de vitamina K que incluye un dominio GLA modificado con una afinidad de unión a la membrana intensificada con respecto al correspondiente polipéptido dependiente de vitamina K nativo como se muestra en las reivindicaciones. También se puede intensificar la actividad del polipéptido dependiente de vitamina K. Los polipéptidos dependientes de vitamina K son un grupo de proteínas que utilizan la vitamina K en su ruta biosintética para carboxilar las cadenas laterales de los restos ácido glutámico en los precursores de la proteína. El dominio GLA contiene 9-13 restos ácido γ -carboxiglutámico en la región N-terminal del polipéptido, típicamente desde el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 45. Las posiciones de los aminoácidos de los polipéptidos comentados en la presente memoria se numeran de acuerdo con el factor IX. El factor VII tiene un aminoácido menos (posición 4) y por consiguiente debe ser ajustado. Por ejemplo, la posición 10 real de la proteína C bovina es una prolina, pero en la presente memoria es numerada como aminoácido 11 para facilitar la comparación total. Según se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" es cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o de la modificación post-traducciona. Los aminoácidos han sido designados en la presente memoria por medio de las abreviaturas de tres letras y de una letra convencionales.

Las modificaciones del dominio GLA incluyen al menos sustituciones de aminoácidos en las posiciones 11, 29, 33 y 34 (p. ej., de cuatro a 10 sustituciones). Las sustituciones pueden ser conservativas o no conservativas. Las sustituciones de aminoácidos conservativas sustituyen un aminoácido por otro aminoácido de la misma clase, mientras las sustituciones de aminoácidos no conservativas sustituyen un aminoácido por otro aminoácido de una clase diferente. Las sustituciones no conservativas pueden dar como resultado un cambio sustancial en la hidrofobicidad del polipéptido o en el volumen de una cadena lateral del resto. Además, las sustituciones no conservativas pueden realizar un cambio sustancial en la carga del polipéptido, por ejemplo reduciendo las cargas electropositivas o introduciendo cargas electronegativas. Los ejemplos de las sustituciones no conservativas incluyen un aminoácido alcalino por un aminoácido no polar, o un aminoácido polar por un aminoácido ácido. La sustitución de aminoácidos puede estar en el aminoácido 2, 5, 9, 12, 35, o 36, y sus combinaciones. El dominio GLA modificado puede incluir una secuencia de aminoácidos, que, en el estado saturado con calcio, contribuye a la formación de una estructura terciaria que tiene un núcleo catiónico con un halo de carga electronegativa. Las proteínas con la afinidad más elevada muestran una carga electronegativa que se extiende a los aminoácidos 35 y 36. Sin estar ligado a una teoría concreta, el aumento de afinidad por la membrana puede resultar de un patrón electrostático concreto que consiste en un núcleo electropositivo completamente rodeado por una superficie electronegativa.

Las modificaciones del dominio GLA incluyen una inserción de un resto en la posición cuatro de un polipéptido del factor VIIa dependiente de vitamina K. El factor VII carece de un aminoácido en esta posición basándose en los alineamientos de secuencia de los polipéptidos dependientes de vitamina K.

Muchos polipéptidos dependientes de vitamina K son sustratos para enzimas unidas a la membrana. Puesto que los polipéptidos no dependientes de vitamina K presentan la máxima afinidad de unión a la membrana potencial de un dominio GLA, todos deben contener aminoácidos cuyo propósito es reducir la afinidad de unión. Por consiguiente, muchos polipéptidos dependientes de vitamina K contienen aminoácidos que no son óptimos desde el punto de vista de la máxima afinidad de unión a la membrana. Estos restos interrumpen eficazmente el sitio de unión para proporcionar un recambio más rápido para una reacción enzimática.

La disminución de afinidad por la membrana puede servir para muchos fines. La elevada afinidad está acompañada de un lento intercambio, que puede limitar las velocidades de reacción. Por ejemplo, cuando la enzima protrombinasa es ensamblada sobre las membranas con una elevada afinidad por el sustrato, el intercambio de proteínas desde la membrana, en lugar de la catálisis enzimática, es la etapa limitante. Lu, Y. y Nelsestuen, G.L. 1996, *Biochemistry*, 35:8201-8209. Alternativamente, el ajuste de la afinidad por la membrana mediante la sustitución por aminoácidos no óptimos puede equilibrar los procesos competitivos de la procoagulación (factor X, IX, VII, y protrombina) y la anticoagulación (proteína C, S). Aunque las afinidades por la membrana de las proteínas nativas pueden ser óptimas para estados normales, la intensificación de la afinidad por la membrana puede producir proteínas que son útiles para el estudio *in vitro* y también como agentes terapéuticos mejorados para regular la coagulación de la sangre en condiciones patológicas *in vivo*.

Más abajo se describen diversos ejemplos de polipéptidos dependientes de vitamina K con el dominio GLA modificado.

5 El polipéptido dependiente de vitamina K es la forma activa del factor VII, el factor VIIa. El polipéptido del factor VII nativo o de origen natural tiene una baja afinidad por las membranas. Las secuencias de aminoácidos de los dominios GLA del factor VII humano de tipo salvaje (hVII, SEQ ID NO: 3) y bovino (bVII, SEQ ID NO: 4) se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

hVII: ANA-FLXXLRP₁₁GSLXRXCKXX₂₁QCSFXXARXI₃₁FKDAXRTKLF₄₁WISY
bVII: ANG-FLXXLRP₁₁GSLXRXCRXX₂₁LCSFXXAHXI₃₁FRNXXRTRQF₄₁WVSY

10 El dominio GLA del factor VIIa contiene una inserción de aminoácido en las posiciones 11, 29, 33 y 34. El dominio GLA del factor VII o VIIa también puede contener sustituciones adicionales, por ejemplo en el aminoácido 35, o 36, y sus combinaciones. El dominio GLA modificado del factor VIIa puede incluir, por ejemplo, un resto ácido glutámico, una glutamina, una asparagina, o un ácido aspártico en el aminoácido 11, un resto fenilalanina o ácido glutámico en el aminoácido 29, o un resto ácido aspártico o ácido glutámico en los aminoácidos 33 o 35. También pueden estar sustituidos en estas posiciones otros restos neutros. El dominio GLA modificado puede incluir restos hidrófobos en una o más de las posiciones 34, 35, y 36. Por ejemplo, el dominio GLA del factor VII o VIIa puede incluir un resto glutamina en el aminoácido 11 y un resto ácido glutámico en el aminoácido 33, o un resto glutamina en el aminoácido 11 y un resto fenilalanina en el aminoácido 29. Por ejemplo, un resto fenilalanina u otro resto hidrófobo tal como leucina o isoleucina puede ser sustituido en los aminoácidos 34, 35, y/o 36. Además, el dominio GLA modificado puede incluir una inserción en la posición 4 (p. ej. un resto tirosina o glicina). El factor VII que contiene una inserción de un resto tirosina en la posición 4 combinada con una glutamina en 11, un ácido glutámico en 33, y una fenilalanina en 34 da como resultado una actividad 160 veces mayor que la del factor VIIa de tipo salvaje.

15 El factor VII o VIIa modificado de estas maneras tiene una afinidad mucho mayor por las membranas que el polipéptido nativo o de tipo salvaje. El factor VIIa también tiene una actividad mucho mayor en la autoactivación, en la generación de factor Xa y en diversos análisis de coagulación de la sangre. La actividad resulta particularmente intensificada en condiciones de coagulación marginales, tales como bajos niveles de factor tisular y/o fosfolípidos. Por ejemplo el factor VII modificado es aproximadamente 4 veces más eficaz que el VIIa nativo a niveles de tromboplastina óptimos, pero es aproximadamente 20 veces más eficaz a un 1% de niveles de tromboplastina óptimos. Las señales de procoagulación marginales son probablemente muy predominantes *in vivo*. Los análisis de coagulación disponibles en la actualidad que utilizan niveles óptimos de tromboplastina no pueden detectar las diferencias en los tiempos de coagulación entre el plasma normal y aquellos de pacientes con hemofilia. Las diferencias en la coagulación entre semejantes muestras solamente son detectadas cuando se utilizan en los análisis de coagulación niveles no óptimos de tromboplastina o tromboplastina diluida.

20 Otro ejemplo de polipéptido dependiente de vitamina K es el Factor VIIa con el sitio activo modificado. El sitio activo del factor VIIa puede ser modificado químicamente, por ejemplo mediante DEGR, FFR, o mediante mutagénesis dirigida al sitio del sitio activo. El factor VII modificado con DEGR es un inhibidor eficaz de la coagulación mediante diversas rutas de administración. Arnljots, B. et al., 1997, *J. Vasc. Surg.*, 25:341-346. Las modificaciones del dominio GLA pueden volver más eficaz el Factor VIIa con el sitio activo modificado. Las sustituciones o inserciones adecuadas se han descrito antes.

25 Los polipéptidos dependientes de vitamina K de la invención también pueden incluir un sitio de escisión inactivado de manera que los polipéptidos no son convertidos en una forma activa. En general, se encuentra un resto arginina en el sitio de escisión de los polipéptidos dependientes de vitamina K. Cualquier resto puede ser sustituido por la arginina en esta posición para inactivar el sitio de escisión. Los polipéptidos dependientes de vitamina K de la invención que contienen adicionalmente un sitio de escisión inactivado actúan como inhibidores.

30 En otro aspecto, la invención ofrece una célula anfitriona de mamífero que incluye un polipéptido dependiente de vitamina K que tiene un dominio GLA modificado que intensifica la afinidad de unión a la membrana del polipéptido con respecto al correspondiente polipéptido dependiente de vitamina K nativo. La actividad de los polipéptidos dependientes de vitamina K es intensificada. Los polipéptidos dependientes de vitamina K adecuados y las modificaciones del dominio GLA se comentan más arriba. La célula anfitriona de mamífero incluye, por ejemplo, el factor VIIa modificado. Las células anfitrionas de mamífero adecuadas pueden modificar los restos glutamato del polipéptido dependiente de vitamina K a γ -carboxiglutamato. Las células de mamífero derivadas de riñón e hígado son especialmente útiles como células anfitrionas.

Ácidos Nucleicos que codifican polipéptidos dependientes de vitamina K modificados

35 Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos dependientes de vitamina K modificados de la invención pueden ser producidas mediante mecanismos convencionales. Según se utiliza en la presente memoria, "aislado" hace referencia a una secuencia correspondiente a parte o todas las secuencias del gen que codifican un polipéptido dependiente de vitamina K modificado, pero libre de secuencias que normalmente flanquean uno o

ambos lados del gen de tipo salvaje en un genoma de mamífero. Un polinucleótido aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN recombinante, siempre que una de las secuencias de ácido nucleico encontradas normalmente flanqueando inmediatamente esa molécula de ADN recombinante en un genoma de origen natural sea separada o esté ausente. De este modo, los polinucleótidos aislados incluyen, sin limitación, un ADN que existe como molécula separada (p. ej., un fragmento de ADNc o ADN genómico producido mediante PCR o tratamiento con endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias así como ADN recombinante que es incorporado a un vector, un plásmido autónomamente replicante, un virus (p. ej., un retrovirus, adenovirus, o herpesvirus), o en el ADN genómico de un procarionte o un eucariota. Además, un polinucleótido aislado puede incluir una molécula de ADN recombinante que es parte de un polinucleótido híbrido o de fusión.

Resultará evidente para los expertos en la técnica que un polinucleótido que existe entre cientos a millones de otros polinucleótidos, por ejemplo, de genotecas de ADNc o genómicas, o porciones de gel que contienen un producto digerido con enzimas de restricción de ADN genómico, no es considerado un polinucleótido aislado.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas tienen al menos aproximadamente 14 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede tener aproximadamente de 14 a 20, 20-50, 50-100, o más de 150 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas codifican un polipéptido dependiente de vitamina K modificado completo. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser ADN o ARN, lineal o circular, y en orientación efectora o antisentido.

Se pueden introducir cambios puntuales específicos en las secuencias del ácido nucleico que codifican los polipéptidos dependientes de vitamina K de tipo salvaje, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al oligonucleótido. En este método, el cambio deseado es incorporado en un oligonucleótido, que después es hibridado con el ácido nucleico de tipo salvaje. El oligonucleótido es prolongado con una ADN polimerasa, creando un heterodúplex que contiene un emparejamiento erróneo en el cambio puntual introducido, y una muesca monocatenaria en el extremo 5', que es sellada por una ADN ligasa. El emparejamiento erróneo es reparado tras la transformación de *E. coli* u otro organismo apropiado, y el gen que codifica el polipéptido dependiente de vitamina K modificado puede ser aislado de nuevo de *E. coli* u otro organismo apropiado. Los kits para introducir mutaciones dirigidas al sitio pueden ser adquiridos comercialmente. Por ejemplo, los kits de mutagénesis in vitro Muta-Gene7 pueden ser adquiridos de Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, Calif.).

Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también pueden ser utilizadas para introducir mutaciones. Véase, por ejemplo, Vallette et al., *Nucleic Acids Res.*, 1989, 17(2):723-733. La PCR hace referencia aun procedimiento o técnica en la que los ácidos nucleicos diana son amplificados. Típicamente se emplea la información de la secuencia de los extremos de la región de interés o más allá para diseñar cebadores oligonucleotídicos que tienen una secuencia idéntica a las hebras opuestas del molde que se va a amplificar, mientras para la introducción de mutaciones, se utilizan los oligonucleótidos que incorporan el cambio deseado para amplificar la secuencia de ácido nucleico de interés. Se puede utilizar la PCR para amplificar secuencias específicas a partir de ADN así como de ARN, incluyendo secuencias de ADN genómico total o ARN celular total. Los cebadores tienen típicamente de 14 a 40 nucleótidos de longitud, pero pueden oscilar de 10 nucleótidos a cientos de nucleótidos de longitud. Las técnicas de PCR generales se describen, por ejemplo en *PCR Primer: A Laboratory Manual*, ed. por Dieffenbach, C. y Dveksler, G., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos dependientes de vitamina K modificados también pueden ser producidos mediante síntesis química, ya sea en forma de una única molécula de ácido nucleico o en forma de una serie de oligonucleótidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar uno o más pares de oligonucleótidos largos (p. ej., >100 nucleótidos) que contengan la secuencia deseada, conteniendo cada par un segmento corto de complementariedad (p. ej., aproximadamente 15 nucleótidos) de manera que se forme un dúplex cuando el par de oligonucleótidos sea hibridado. Se utiliza ADN polimerasa para prolongar los oligonucleótidos, dando como resultado una molécula de ácido nucleico de doble hebra por par de oligonucleótidos, que después puede ser ligada en un vector.

Producción de polipéptidos dependientes de vitamina K modificados

Los polipéptidos dependientes de vitamina K modificados de la invención pueden ser producidos ligando una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido en un constructo de ácido nucleico tal como un vector de expresión, y transformando una célula bacteriana o eucariótica con el vector de expresión. En general, los constructos de ácido nucleico incluyen una secuencia reguladora conectada operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido dependiente de vitamina K. Las secuencias reguladoras no codifican típicamente un producto génico, sino que en lugar de eso afectan a la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Según se utiliza en la presente memoria, "conectado operablemente" hace referencia a la conexión de las secuencias reguladoras con la secuencia de ácido nucleico de tal manera que permita la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Los elementos reguladores pueden incluir, por ejemplo, secuencias promotoras, secuencias intensificadoras, elementos de respuesta, o elementos inducibles.

En los sistemas bacterianos, se puede utilizar una cepa de *E. coli* tal como BL-21. Los vectores de *E. coli* adecuados incluyen, sin limitación, la serie de vectores pGEX que producen proteínas de fusión con glutation S-transferasa (GST). Las *E. coli* transformadas se hacen crecer exponencialmente, después se estimulan con

isopropiltiogalactopiranosido (IPTG) antes de cosecharlas. En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden ser purificadas fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción a cuentas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de la proteasa trombina o factor Xa de manera que el producto génico diana clonado pueda ser liberado del radical GST.

5 En células anfitrionas eucarióticas, se pueden utilizar numerosos sistemas de expresión basados en virus para expresar polipéptidos dependientes de vitamina K modificados. Se puede clonar un ácido nucleico que codifica un polipéptido dependiente de vitamina K, por ejemplo, en un vector baculoviral tal como pBlueBac (Invitrogen, San Diego, Calif.) y después utilizarlo para co-transfectar células de insecto tales como células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) con ADN de tipo salvaje de virus de la polihedrosis nuclear de envoltura múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV). Los virus recombinantes que producen los polipéptidos dependientes de vitamina K modificados pueden ser identificados mediante metodología convencional. Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido dependiente de vitamina K en un vector de SV40, retroviral, o viral basado en vaccinia y utilizarlo para infectar células anfitrionas adecuadas.

15 Las líneas celulares de mamífero que expresan establemente los polipéptidos dependientes de vitamina K modificados pueden ser producidas utilizando vectores de expresión con los elementos de control apropiados y un marcador seleccionable. Por ejemplo, el vector de expresión eucariótico pcDNA.3.1+ (Invitrogen, San Diego, CA) es adecuado para la expresión de polipéptidos dependientes de vitamina K modificados, por ejemplo, en células COS, células HEK293, células de riñón de cría de hámster. Tras la introducción del vector de expresión mediante electroporación, transfección mediada por DEAE dextrano, fosfato de calcio, liposomas, u otro método adecuado, se pueden seleccionar líneas celulares estables. Alternativamente, se utilizan líneas celulares transfectadas transitoriamente para producir polipéptidos dependientes de vitamina K modificados. Los polipéptidos dependientes de vitamina K modificados también pueden ser transcritos y traducidos *in vitro* utilizando extracto de germen de trigo o producto lisado de reticulocitos de conejo.

25 Los polipéptidos dependientes de vitamina K modificados pueden ser purificados a partir de medio celular acondicionado aplicando el medio a una columna de inmunoafinidad. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo que tenga afinidad de unión específica por el Factor VII para purificar el Factor VII modificado. Alternativamente, se puede utilizar cromatografía con concanavalina A (Con A) y cromatografía de intercambio aniónico (p. ej., DEAE) junto con cromatografía de afinidad para purificar el factor VII. Los anticuerpos monoclonales dependientes o independientes de calcio que tienen afinidad de unión específica por el factor VII pueden ser utilizados en la purificación del Factor VII.

30 Los polipéptidos dependientes de vitamina K modificados tales como proteína C modificada, pueden ser purificados mediante cromatografía de intercambio aniónico, seguida de cromatografía de inmunoafinidad utilizando un anticuerpo que tenga afinidad de unión específica para la proteína C.

35 Los polipéptidos dependientes de vitamina K modificados también pueden ser sintetizados químicamente utilizando técnicas convencionales. Véase, Muir, T.W. y Kent, S.B. *Curr. Opin. Biotechnol.*, (1993) 4(4):420-427, para una revisión de las técnicas de síntesis de proteínas.

Composiciones Farmacéuticas

40 La invención también ofrece una composición farmacéutica que incluye un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad de polipéptido dependiente de vitamina K de acuerdo con la invención. El polipéptido del factor VIIa dependiente de vitamina K incluye un dominio GLA modificado con al menos cuatro inserciones de aminoácidos como se ha definido antes que intensifica la afinidad de unión a la membrana del polipéptido con respecto al correspondiente polipéptido dependiente de vitamina K nativo. También se puede intensificar la actividad del polipéptido dependiente de vitamina K. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir un factor tisular soluble.

45 La concentración de polipéptido dependiente de vitamina K eficaz para inhibir la formación de coágulos en un mamífero puede variar, dependiendo de numerosos factores, incluyendo la dosificación preferida del compuesto que se va a administrar, las características químicas de los compuestos empleados, la formulación de los excipientes del compuesto y la ruta de administración. La dosificación óptima de la composición farmacéutica que se va a administrar también puede depender de variables tales como el estado general de salud del paciente concreto y la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado. Estas composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para regular la coagulación *in vivo*. Por ejemplo, las composiciones se pueden utilizar generalmente para el tratamiento de la trombosis. La alteración de sólo unos pocos restos aminoácido del polipéptido como se ha descrito antes, generalmente no afecta significativamente a la antigenicidad de los polipéptidos mutantes.

55 Los polipéptidos dependientes de vitamina K que incluyen dominios GLA modificados pueden ser formulados en composiciones farmacéuticas mediante combinación con excipientes o portadores no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Tales compuestos y composiciones pueden ser preparados para la administración parenteral, concretamente en forma de soluciones o suspensiones líquidas en soluciones acuosas de tampones fisiológicos; para la administración oral, concretamente en forma de comprimidos o cápsulas; o para la administración intranasal,

concretamente en forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles. Las composiciones para otras rutas de administración se pueden preparar según se desee utilizando métodos convencionales.

Las formulaciones para la administración parenteral pueden contener como excipientes comunes agua o solución salina estéril, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados estériles, y similares. En particular, el polímero de lactida biocompatible, biodegradable, el copolímero de lactida/glicólido, o los copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno son ejemplos de excipientes para controlar la liberación de un compuesto de la invención *in vivo*. Otros sistemas de liberación parenteral adecuados incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Las formulaciones para la administración por inhalación pueden contener excipientes tales como lactosa, si se desea. Las formulaciones para inhalación pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauriléter, glicocolato y desoxicocolato, o pueden ser soluciones oleosas para la administración en forma de gotas nasales. Si se desea, los compuestos pueden ser formulados en forma de geles para ser aplicados intranasalmente. Las formulaciones para la administración parenteral también pueden incluir glicocolato para la administración bucal.

Estas composiciones farmacéuticas pueden ser útiles para el tratamiento de los trastornos de la coagulación tales como la hemofilia A, la hemofilia B y las enfermedades del hígado.

En una realización alternativa, la invención también ofrece un polipéptido del factor VIIa dependiente de vitamina K para su uso como medicamento. El polipéptido dependiente de vitamina K incluye un dominio GLA modificado con al menos cuatro sustituciones de aminoácidos definido antes que intensifica la afinidad de unión a la membrana del polipéptido con respecto al correspondiente polipéptido dependiente de vitamina K nativo. El Factor VII es especialmente crítico para la coagulación de la sangre debido a su localización en el inicio de la cascada de coagulación, y su capacidad para activar dos proteínas, los factores IX y X. La activación directa del factor X por el factor VIIa es importante para el posible tratamiento de las formas principales de hemofilia, tipos A y B, puesto que las etapas que implican a los factores IX y VIII son completamente evitadas. Se ha encontrado que la administración de factor VII a los pacientes es eficaz para el tratamiento de algunas formas de hemofilia. La mejora de la afinidad por la membrana del factor VIIa mediante la modificación del dominio GLA proporciona el potencial para volver el polipéptido más sensible a muchas condiciones de coagulación, para disminuir las dosis de VIIa necesarias, para ampliar los intervalos en los cuales puede ser administrado el factor VIIa, y para proporcionar cambios cualitativos adicionales que dan como resultado un tratamiento más eficaz. En conjunto, la mejora del sitio de contacto con la membrana del factor VII puede aumentar su velocidad de activación así como mejorar la actividad del factor VIIa sobre el factor X o IX. Estas etapas pueden tener un efecto multiplicativo sobre las velocidades de coagulación globales *in vivo*, dando como resultado un factor VIIa muy potente para un tratamiento superior de numerosos trastornos de la coagulación de la sangre.

En otro aspecto, la invención también incluye el polipéptido de la invención para su uso en el incremento de la formación de coágulos en un mamífero que incluye administrar una cantidad de polipéptido dependiente de vitamina K eficaz para incrementar la formación de coágulos en el mamífero. El factor VIIa dependiente de vitamina K incluye un dominio GLA modificado que intensifica la afinidad de unión a la membrana del polipéptido con respecto al correspondiente polipéptido dependiente de vitamina K nativo. El dominio GLA modificado incluye al menos una inserción de aminoácido en el aminoácido 4 y puede incluir al menos una sustitución de aminoácidos.

En otro aspecto, la invención incluye el uso de un polipéptido de la invención para la fabricación de un medicamento pre-coagulante para el tratamiento de trastornos de la coagulación.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Factor VII con Afinidad por la Membrana y Actividad Mejoradas: Se ha descubierto que la afinidad de unión a la membrana del factor VII de coagulación de la sangre humano puede ser incrementada mediante mutagénesis dirigida al sitio. Se han caracterizado las propiedades de un mutante P11Q,K33E (referido en la presente memoria como Factor VIIQ11E33 o factor VII mutante). La afinidad por la membrana aumentó sobre la de la proteína de tipo salvaje aproximadamente 20 veces. La autoactivación por el mutante aumentó al menos 100 veces por encima de la del factor VII de tipo salvaje. La forma activada de VIIQ11E33 (referida como VIIaQ11E33) presentó una actividad hacia el factor X aproximadamente 10 veces superior. La actividad de coagulación de VIIaQ11E33 con el factor tisular soluble en plasma normal fue aproximadamente 10 veces superior que la de VIIa de tipo salvaje. La actividad de coagulación del zimógeno, VIIQ11E33, con el factor tisular normal (suministrado en forma de una dilución 1:100 de tromboplastina-HS), fue 20 veces superior que la del Factor VII de tipo salvaje. El grado al cual se intensificó la actividad dependió de las condiciones, siendo especialmente activo VIIQ11E33 en las condiciones de estímulos de coagulación bajos.

En general, las concentraciones de proteína fueron determinadas mediante el análisis de Bradford utilizando albúmina de suero bovino como patrón. Bradford, M.M., 1976, *Analyt. Biochem.* 248-254. Las concentraciones molares se obtuvieron a partir de pesos moleculares de 50.000 para el factor VII y 55.000 para el factor X. A menos

que se indique, todas las medidas de actividad se realizaron en tampón convencional (Tris 0,05 M, pH 7,5, NaCl 100 mM).

Producción de Factor VII Mutante: El factor VII mutante se generó a partir de ADNc de factor VII de tipo salvaje (Número de Acceso GenBank M13232, NID gl 82799). Petersen et al., 1990, *Biochemistry* 29:3451-3457. Se introdujeron la mutación P11Q (cambio del aminoácido 11 de un resto prolina a un resto glutamina) y la mutación K33E (cambio del aminoácido 33 de un resto lisina a un resto ácido glutámico) en el ADNc del factor VII de tipo salvaje mediante una estrategia de reacción en cadena de la polimerasa esencialmente como describen Vallette et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17:723-733. Durante este procedimiento, se eliminó un sitio para la enzima de restricción *Xma*III para el diagnóstico de la mutación. Se diseñaron cuatro cebadores de PCR para cebar la síntesis de dos fragmentos mutantes de M13232, uno de *Mlu*I a *Bgl*II, posiciones 221 a 301, y el otro de *Bgl*II a *Sst*II, posiciones 302 a 787. Estos cebadores se utilizaron en condiciones de ciclos de PCR convencionales (GENEAMP, Perkin Elmer) para cebar la síntesis de fragmentos utilizando 1 ng del ADNc del factor VII de tipo salvaje como molde. Los fragmentos resultantes se purificaron en gel y se digirieron con *Mlu*I y *Bgl*II o *Bgl*II y *Sst*II. Los dos fragmentos purificados se ligaron después en el ADNc del factor VII en el vector de expresión Zem219b del cual se había separado la correspondiente secuencia de tipo salvaje en forma de un fragmento *Mlu*I-*Sst*II. Petersen et al., 1990 supra. Los fragmentos mutados se secuenciaron en su totalidad para confirmar las sustituciones P11Q y K33E, así como para eliminar la posibilidad de otros cambios de secuencia inducidos por la PCR.

Transfección, Selección y Purificación: Se hicieron crecer células de riñón de cría de hámster (BHK) en medio de Eagle modificado por Dulbecco con un suplemento de suero de ternera fetal al 10% y penicilina-estreptomina. Las células subconfluentes se transfectaron con el plásmido de expresión del factor VII utilizando lipofectAMINE (Gibco BRL) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Dos días después de la transfección, las células se tripsinizaron y se diluyeron en un medio selectivo que contenía metotrexato 1 μ M (MTX). Las células BHK transfectadas establemente se cultivaron con posterioridad en medio de Eagle modificado por Dulbecco sin suero con un suplemento de penicilina-estreptomina, 5 μ g/mL de vitamina K₁ y MTX 1 μ M, y el medio acondicionado se recogió. El medio acondicionado se aplicó dos veces a una columna de inmunoafinidad compuesta por anticuerpo monoclonal dependiente de calcio (CaFVII22) acoplado a Affi-Gel 10. Nakagaki et al., 1991, *Biochemistry*, 30:10819-10824. El Factor VIIQ11E33 purificado final corrió en forma de una única banda en la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, sin evidencia de factor VIIa en la preparación. El mutante VII(P11Q,K33E) puro mostró 1.400-2.800 unidades de factor VII/mg.

Activación del Factor VII: Se formó Factor VIIaQ11E33 Activado mediante escisión con factor Xa bovino de VIIQ11E33 (razón en peso 1:100, incubación durante 1 hora a 37°C). Alternativamente, se obtuvo Factor VIIaQ11E33 mediante autoactivación (37°C, 20 minutos) en una mezcla que contenía VIIQ11E33 7 μ M, sTF 0,7 μ M y fosfolípido (fosfatidilserina/fosfatidilcolina (PS/PC), 25/75, 0,1 g/g de proteína).

El factor VIIa de tipo salvaje era una proteína recombinante, homogénea (NOVO Nordisk). Las dos preparaciones consistían en un producto liofilizado y un producto no liofilizado comercial. La última proteína se purificó adicionalmente sobre FPLC mono-Q y demostró una actividad específica de 80.000 unidades/mg, calibrado con un patrón George King NPP.

Interacción intensificada con la membrana por el Factor VIIQ11E33: La preparación de fosfolípidos, el análisis, y la medida de la unión proteína-membrana se realizaron mediante los métodos descritos por Nelsestuen y Lim, 1977, *Biochemistry* 16:10819-10824. Se prepararon vesículas unilamelares grandes (LUV) y vesículas unilamelares pequeñas (SUV) mediante los métodos descritos previamente. Hope, M.J., et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, 812:55-65; y Huang, C., 1969, *Biochemistry* 8:344-352. Se mezclaron en cloroformo fosfatidilserina altamente pura (cerebro bovino) y fosfatidilcolina de huevo (Sigma Chemical Co.). El disolvente se separó mediante una corriente de gas nitrógeno. Los fosfolípidos secos se suspendieron en tampón. Las SUV se formaron mediante sonicación y filtración en gel mientras las LUV se formaron mediante congelación-descongelación y extrusión. Las concentraciones de fosfolípidos se determinaron mediante análisis de fosfato orgánico suponiendo una razón en peso fosforo:fosfolípido de 25.

Se prepararon SUV de PS/PC (25/75) o PS/PC (10/90). Se añadió la proteína al fosfolípido a las razones en peso mostradas en la Figura 1. La unión proteína-membrana se analizó mediante dispersión de luz a 90° mediante el método de Nelsestuen y Lim, 1977, supra. En resumen, se midieron la intensidad de la dispersión de luz de las vesículas de fosfolípido solas (I_1) y después de la adición de proteína (I_2) y se corrigieron para el fondo de tampón y proteína no unida. La razón de peso molecular del complejo proteína-vesícula (M_2) con respecto al de las vesículas solas (M_1), puede ser estimada a partir de la relación de la ecuación 1, donde $\delta n/\delta c$ es el índice de refracción de las respectivas especies.

$$I_2/I_1 = (M_2/M_1)^2 (\delta n/\delta c_2/\delta n/\delta c_1)^2 \quad (\text{ec. 1})$$

Si se conocen las concentraciones de fosfolípido y proteína, se puede estimar la concentración de [P*PL] unida y proteína [P] libre. Estos valores, junto con la capacidad de unión máxima a la proteína [P*PL_{max}] de las vesículas (que se supone que es de 1,0 g/g para todas las proteínas) se pueden utilizar para obtener la constante de equilibrio para la interacción proteína-membrana por medio de la relación de la ecuación 2, donde todas las concentraciones

se expresan en forma de moles de proteína o sitios de unión a la proteína.

$$K_D = [P][P^*PL_{\max} - P^*PL] / [P^*PL] \quad (\text{ec. 2})$$

La unión se evaluó en calcio 5 mM y se expresa como la razón, M2/M1.

La Figura 1 muestra la unión de VIIa de tipo salvaje (círculos vacíos) y del factor VIIQ11E33 (círculos rellenos) a las membranas de PS/PC=25/75, 25 µg/ml (Figura 1A) o PS/PC=10/90, 25 µg/ml (Figura 1B). VIIQ11E33 tenía una afinidad mucho mayor que la proteína de tipo salvaje. La unión a PS/PC (25/75) fue a nivel cuantitativo de manera que la [Proteína libre] era esencialmente cero. Por consiguiente, los valores de Kd no pudieron ser estimados a partir de estos datos. La unión a la membrana del factor X bovino (triángulos rellenos) se muestra en la Figura 1 como referencia. El factor X bovino es una de las proteínas de más alta afinidad de esta familia, dando una Kd para PS/PC (20/80) en calcio 2 mM de 40 nM. McDonald et al., 1997, *Biochemistry*. 36:5120-5127. La Kd para el factor X bovino, obtenida a partir del resultado a una razón de proteína/fosfolípido de 0,55 (Figura 1), fue de 0,025 µM.

También se determinó la unión del Factor VII de tipo salvaje y mutante a membranas de PS/PC (10/90) (Figura 1B). El VIIQ11E33 se unía a un nivel menor del cuantitativo, lo que permitió estimar una unión constante a partir de la relación de la ecuación 3.

$$K_d = [\text{Proteína}_{\text{libre}}][\text{Sitios de unión}_{\text{libres}}] / [\text{Proteína}_{\text{unida}}] \quad (\text{ec. 3})$$

Los [sitios de unión_{libres}] se estimaron a partir de la ecuación 4, suponiendo un M2/M1 máximo de 1,0 (esto es, [Sitios de unión_{totales}] = [Fosfolípido_{conc. en peso} / Proteína_{PM}]). Este es un valor común observado para diversas proteínas de esta familia. Véase McDonald et al., 1997, supra.

$$[\text{Sitios de unión}_{\text{libres}}] = [\text{Sitios de unión}_{\text{totales}}] - [\text{Proteína}_{\text{unida}}] \quad (\text{ec. 4})$$

Utilizando estas suposiciones y los datos a una razón de proteína con respecto a fosfolípido de 0,37, los valores de la Kd fueron 0,7 µM para el factor X bovino, 5,5 µM para el factor VII de tipo salvaje y 0,23 µM para VIIQ11E33. De este modo, estaba claro que el factor VIIQ11E33 tenía una afinidad de unión a la membrana enormemente mejorada sobre el factor VII de tipo salvaje y tenía una de las mayores afinidades de unión a la membrana entre las proteínas dependientes de vitamina K.

También se ha observado que la diferencia entre VIIa de tipo salvaje y VIIa-Q11E33 variaba algo con la composición de las vesículas de fosfolípido que se habían utilizado. Por ejemplo, las membranas que contenían PS/PE/PC (20/40/40) producían una actividad 33 veces mayor para VIIaQ11E33, mientras ciertas preparaciones de PS/PC (20/80 a 25/75) mostraban una actividad 10 a 19 veces mayor para VIIaQ11E33.

Activación intensificada del factor VIIQ11E33: La primera etapa de la coagulación implica la activación del factor VII. La autoactivación de VII se realizó en una solución que contenía sTF 100 nM (producto recombinante altamente purificado del Dr. Walter Kiesel, Fiore et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269:143-149), VIIQ11E33 36 nM y PS/PC (25/75, 22 µg/mL). La actividad de VIIaQ11E33 se estimó a diversos intervalos de tiempo mediante la adición de sustrato S-2288 de 0,15 mM (Kabi) y evaluación de la velocidad de liberación de fosfato de p-nitrofenilo producto mediante cambio de absorbancia a 405 nm. La actividad inicial de la preparación VIIQ11E33 fue un 4% menor que la del VIIaQ11E33 completamente activo.

Se encontró que VIIQ11E33 era un sustrato mucho mejor para la activación que el factor VII de tipo salvaje. La Figura 2 muestra la autoactivación del factor VIIQ11E33. Los datos fueron analizados mediante la relación de la ecuación 5 (ecuación 7 de Fiore et al., 1994, supra).

$$\ln[VIIa]_t = \ln [VIIa]_0 + k_{\text{cat}} \cdot y \cdot t \quad (\text{ec. 5})$$

$\ln[VIIa]_t$ es la concentración de factor VIIa a tiempo t, k_{cat} es la constante de velocidad catalítica para el factor VIIa que actúa sobre VII e y es la saturación fraccionada de los sitios de VIIa. Para el factor VIIa de tipo salvaje, esta relación y sTF 1 µM dieron una k_{cat} de 0,0045/s y una razón k_{cat}/K_m de $7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Véase, Fiore et al., 1994, supra. Para la enzima VIIQ11E33, la autoactivación fue rápida (Figura 2) y solamente fue posible estimar un límite inferior para k_{cat} . Este se obtuvo a partir de un tiempo de duplicación de VIIa de aproximadamente 25 segundos ($k_{\text{cat}} = (\ln 2) / t_{1/2}$). El valor resultante ($k_{\text{cat}, \text{min}} = 0,03/\text{s}$), junto con la concentración de sustrato de esta reacción ($3,6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) y la suposición de que $y=1,0$, dieron un valor para $k_{\text{cat}}/[S] = 8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esto debe estar bastante por debajo de la verdadera k_{cat}/K_m para VIIaQ11E33, pero era aproximadamente 100 veces mayor que el valor de k_{cat}/K_m para el factor VIIa de tipo salvaje/sTF estimado por Fiore et al, 1994, supra. De este modo, la combinación de la enzima VIIaQ11E33 y el Factor VIIQ11E33 sustrato fue superior a las proteínas de tipo salvaje en la etapa de activación de la coagulación. Esto sugirió que VIIQ11E33 era superior a la enzima de tipo salvaje cuando las condiciones de coagulación eran mínimas.

Actividad intensificada de VIIaQ11E33: Una vez generado, el factor VIIa activa el factor X o el factor IX. La activación de factor X bovino (0,1 µM) por el factor VIIa se llevó a cabo en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 que contenía NaCl 100 mM, calcio 5 mM, diversas cantidades de fosfolípido (PS/PC, 25/75) y 1 mg/mL de albúmina de

suero bovino a 22,5°C. El factor VIIa (0,06 nM de VIIaQ11E33 o 0,6 nM de VIIa de tipo salvaje) se añadió a tiempo cero y se determinó la actividad de Xa en los puntos de tiempo de 1, 3 y 5 minutos. Las alícuotas de la mezcla de reacción (0,2 mL) se mezclaron con tampón (0,2 mL) que contenía EDTA 10 mM y S-2222 (Kabi) 0,4 mM, un sustrato cromogénico para el factor Xa. El cambio de absorbancia a 405 nm se determinó en un espectrofotómetro Beckman DU8. La cantidad de factor Xa generado se calculó a partir del coeficiente de extinción ($1 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) del producto de reacción de fosfato de p-nitrofenilo y una velocidad de 33/seg para la hidrólisis del sustrato por Xa bovino purificado en las condiciones de este análisis.

La Figura 3 compara la capacidad del factor VIIa de tipo salvaje (círculos vacíos) y VIIaQ11E33 (círculos rellenos) para activar el factor X en un sistema purificado. De nuevo, VIIaQ11E33 fue bastante superior al factor VIIa de tipo salvaje en esta reacción. La diferencia fue máxima a bajas concentraciones de fosfolípidos y disminuyó al doble a 200 μg de fosfolípido por mL. Esto se esperaba a partir del hecho de que las concentraciones de membrana elevadas hacen que una porción más grande de VIIa de tipo salvaje se una a la membrana. Una vez más, el incremento de la función de VIIaQ11E33 fue máximo en condiciones de baja exposición a fosfolípidos.

Asimismo se determinó la capacidad del factor VIIa para activar el factor X sobre las superficies de plaquetas activadas. Las plaquetas se aislaron mediante técnicas convencionales que consistían en la centrifugación sobre un colchón de albúmina de suero bovino y filtración en gel para obtener plaquetas monoméricas. Las plaquetas se activaron con ionóforo de calcio (A23187) y se diluyeron a una concentración de $2 \times 10^8/\text{mL}$. El tampón fue Tris 0,05 M, pH 7,5-NaCl 0,1 M y contenía CaCl_2 5 mM. Se añadieron factor VIIa o Q11E33-VIIa (50 nM) junto con factor X 200 nM. A diversos intervalos de tiempo, se sofocó la reacción añadiendo EDTA en exceso. La cantidad de factor Xa generada fue determinada mediante su actividad hacia S-2222, un sustrato específico del factor Xa. La cantidad de factor Xa se calculó mediante comparación con concentraciones conocidas de factor Xa. A los 20 minutos la reacción que contenía VIIa de tipo salvaje había generado Xa 0,34 nM mientras la que contenía Q11E33-VIIa había generado Xa 7,7 nM. Este análisis es independiente del factor tisular y utiliza una membrana biológica.

Se realizó otro análisis con membranas biológicas con células J82. Esta línea celular expresa niveles elevados de factor tisular sobre su superficie y a menudo se utiliza para estudiar la unión del factor VII al factor tisular (p. ej., Sakai, T. et al., 1989, *J. Biol. Chem.* 264, 9980-9988). Las células se hicieron crecer en forma de monocapas mediante métodos convencionales y se liberaron de la superficie mediante tratamiento con tripsina suave. La velocidad de generación de factor Xa por las células en suspensión se determinó en presencia de factor VIIa con el sitio activo modificado 2 nM (DEGR-VIIa). El DEGR-VIIa es un inhibidor y debe ser desplazado del factor tisular por el VIIa activo añadido a la reacción. Esta es una reacción competitiva. La velocidad de generación de factor Xa se utilizó como medida del desplazamiento por VIIa de VIIa con el sitio activo modificado del factor tisular. El Q11E33-VIIa desplazó al DEGR-VIIa a una vigésimo octava parte de la concentración requerida por el VIIa de tipo salvaje. Esta superioridad fue similar a la observada en muchos otros análisis competitivos.

Coagulación superior de VIIaQ11E33: Los análisis de coagulación de sangre se realizaron a 37°C utilizando el método de inclinación manual para detectar la formación de coágulos. Se dejó que el plasma humano (0,1 mL) se equilibrara (0,1 mL) a 37°C durante 1 minuto. Se añadieron diversos reactivos en un volumen de 0,1 mL de tampón convencional. Se añadieron factor tisular soluble (50 nM) y fosfolípido (PS/PC, 10/90, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al plasma, junto con la concentración de factor VIIa mostrada en la Figura 4 (0,1-32 nM). Finalmente, se añadieron 0,1 mL de CaCl_2 25 mM para iniciar la reacción. Se midió el tiempo hasta la formación de los coágulos. En la mayoría de los casos, se informó de la media y las desviaciones típicas de muestras replicadas.

La Figura 4 muestra los tiempos de coagulación de VIIa de tipo salvaje frente a VIIaQ11E33 en plasma humano normal. La coagulación estuvo apoyada por sTF y se añadieron vesículas de fosfolípidos. El factor VII de tipo salvaje endógeno tenía una concentración aproximadamente 10 nM, y no tenía virtualmente impacto sobre los tiempos de coagulación. La coagulación de fondo fue de 120 segundos, con o sin sTF. El factor VIIaQ11E33 mostró una actividad aproximadamente 8 veces mayor que el VIIa de tipo salvaje en estas condiciones de análisis. Se obtuvieron resultados similares con plasma deficiente en factor VIII, sugiriendo que la ruta principal para la coagulación sanguínea en este sistema implicaba la activación directa del factor X por el factor VIIa. En resumen, el factor VIIaQ11E33 era superior al VIIa de tipo salvaje en cuanto a actividad procoagulante soportada por vesículas de membrana y factor tisular soluble. El zimógeno de tipo salvaje no tenía virtualmente actividad en estas condiciones, como indicaron tiempos de coagulación de fondo similares de 2 minutos, se añadiera o no sTF.

Actividad procoagulante con factor tisular normal: La coagulación apoyada por factor tisular normal fue analizada con tromboplastina de conejo convencional-HS (HS=alta sensibilidad) que contenía calcio (Sigma Chemical Co.). Esta mezcla contiene tanto fosfolípidos como factor tisular unido a membrana. Se diluyó tromboplastina de conejo de conejo-HS 1:100 en tampón y se utilizó en el análisis de VII (añadido en forma de plasma humano normal, que contiene factor VII 10 nM) y VIIQ11E33 (añadido en forma de proteína pura). La tromboplastina (0,2 mL) se añadió al plasma (0,1 mL) para iniciar la reacción y se midió el tiempo requerido para formar un coágulo de sangre. Los análisis también se realizaron con tromboplastina completa, como describe el fabricante.

A niveles óptimos de tromboplastina humana, el VII de tipo salvaje mostró un nivel normal de actividad, aproximadamente 1.500 unidades por mg. Esta es aproximadamente 25 veces menor que la actividad del factor VIIa de tipo salvaje (80.000 unidades por mg). El VIIQ11E33 dio aproximadamente 1.500-3.000 unidades por mg en las

mismas condiciones de análisis convencionales, solamente 2 veces mayor que el VII de tipo salvaje.

La diferencia entre VII de tipo salvaje y VIIQ11E33 fue mucho mayor cuando las condiciones de coagulación fueron sub-óptimas. La Figura 5 muestra los tiempos de coagulación y las concentraciones de zimógeno en los análisis que contenían 0,01 veces el nivel de tromboplastina normal. En estas condiciones, VIIQ11E33 fue aproximadamente 20 veces más activo que el factor VII de tipo salvaje. De este modo, la mayor eficacia del mutante VIIQ11E33 fue especialmente evidente cuando las condiciones de coagulación fueron limitadas, lo que resulta relevante para muchas situaciones *in vivo*.

Actividades Anticoagulantes de DEGR-VIIaQ11E33: Se realizaron análisis de coagulación convencionales con suero humano normal y tromboplastina humana que se había diluido 1:10 con tampón. El sitio activo del factor VIIaQ11E33 fue modificado mediante DEGR como describen Sorenson, B. B. et al., 1997, supra. La Figura 6 muestra el tiempo de coagulación de DEGR-VIIaQ11E33 (0-4 nM) incubado con tromboplastina, en tampón calcio, durante 15 segundos antes de la adición del plasma. Se determinó el tiempo para formar un coágulo con el método de inclinación manual. El tiempo de coagulación fue de aproximadamente 45 segundos con aproximadamente 1 nM de DEGR-VIIaQ11E33. El Factor VIIaQ11E33 con el sitio activo modificado tenía una actividad de anticoagulación incrementada.

Ejemplo 2: Purificación de Factor VII: Se purificó el Factor VII (de tipo salvaje o mutante) por medio de Concanavalina A (Con A), DEAE, y cromatografía de afinidad. Los medios brutos de células 293 transfectadas se incubaron con resina con Con A (Pharmacia) durante 4 horas a 4°C. Después la resina se lavó con una solución que contenía Tris 50 mM, pH 7,5, benzamidina 10 mM, CaCl₂ 1 mM, y MgCl₂ 1 mM, y se hizo eluir el factor VII con D-metilmanósido 0,2 M, NaCl 0,5 M en tampón Tris 50 mM, pH 7,5. El factor VII se sometió a diálisis frente a Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, benzamidina 10 mM, y D-metilmanósido 25 mM durante la noche.

Después se incubó el factor VII sometido a diálisis con resina de DEAE (Pharmacia) durante una hora y la mezcla se cargó en una columna. La columna de DEAE se lavó con Tris 50 mM, pH 8,0, Benzamidina 10 mM, y NaCl 50 mM, y el factor VII se hizo eluir con un gradiente de NaCl de 50 mM a 500 mM en tampón Tris 50 mM, pH 8,0 a una velocidad de flujo de 2 mL/min. Las fracciones que contenían actividad de factor VII se reunieron y se sometieron a diálisis frente a Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, y CaCl₂ 5 mM durante la noche. El factor VII parcialmente purificado con Con A y DEAE fue activado por medio de factor Xa bovino (razón en peso 1:10, Enzyme Research Laboratory) a 37°C durante una hora.

El factor VII activado fue purificado mediante cromatografía de afinidad. Se acopló un anticuerpo monoclonal independiente de calcio para el factor VII (Sigma) a affigel-10 (Bio-Rad Laboratory) como describen Broze et al., *J. Clin. Invest.*, 1985, 76:937-946, y se incubó con la columna de afinidad durante la noche a 4°C. La columna se lavó con Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,1 M, y el factor VIIa se hizo eluir con Tris 50 mM, pH 7,5, NaSCN 3 M a una velocidad de flujo de 0,2 mL/min. Las fracciones eluidas se diluyeron inmediatamente cinco veces en Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,1 M. Las fracciones que contenían actividad del factor VIIa se reunieron, se concentraron, y se sometieron a diálisis frente a Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,1 M durante la noche.

La concentración de proteína del factor VIIa se determinó con un kit de análisis de proteínas Bio-Rad, utilizando BSA como patrón. La pureza del factor VIIa se analizó por medio de gel de Coomassie y Transferencia Western en condiciones reductoras y desnaturalizantes. La actividad proteolítica del factor VIIa se midió utilizando un sustrato peptídico sintético Spectrozyme-FVIIa (American Diagnostica) en presencia de tromboplastina (Sigma). El factor VIIa purificado se almacenó en 0,1 mg/ml de BSA, NaCl 0,1 M, Tris 50 mM, pH 7,5 a -80°C.

La eficacia procoagulante de los mutantes del factor VIIa se evaluó utilizando análisis de coagulación *in vitro* convencionales (y sus modificaciones); específicamente, el análisis de tiempo de protrombina (PT) y el análisis de tromboplastina parcialmente activada (aPTT). Las diversas concentraciones de los mutantes del Factor VIIa se evaluaron en plasma de donantes humanos normales reunidos y en plasmas humanos deficientes en factor de coagulación (Factor VIII, Factor IX, Factor VII) (Sigma). Se determinaron los tiempos de coagulación a 37°C utilizando un fibrómetro FibroSystem (BBL) con una sonda de 0,3 mL y un Analizador de la Coagulación Automatizado Sysmex CA-6000 (Dade Behring).

Se preparó plasma pobre en plaquetas (PPP) a partir de sangre de donantes humanos normales reunida. La sangre (4,5 mL) se recogió de cada donante sano en tubos Vacutainer tratados con citrato (0,5 mL de citrato de sodio tamponado al 3,2%). Se obtuvo el plasma tras una centrifugación a 2.000 g durante diez minutos y se mantuvo sobre hielo antes de su uso. Los plasmas deficientes en factor adquiridos se reconstituyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las diluciones seriadas de cada solución de partida de mutante de Factor VIIa se prepararon en plasma. Todos los plasmas (con o sin mutantes del Factor VIIa) se mantuvieron en hielo antes de su uso. En todos los casos, se midió el tiempo para formar un coágulo. Se informó de la media y la desviación típica de las muestras replicadas.

El análisis de tiempo de protrombina (PT) se realizó en plasmas (con o sin diluciones seriadas de mutantes de FVIIa añadidos) utilizando cualquiera de los siguientes reactivos de PT: Tromboplastina C-Plus (Dade), Innovin (Dade), Tromboplastina Con Calcio (Sigma), o Tromboplastina HS Con Calcio (Sigma). Los análisis se realizaron de acuerdo

con las instrucciones del fabricante. Además de utilizar reactivos de PT a la concentración de total intensidad fabricada, el análisis de PT también se realizó utilizando diversas diluciones de reactivos de PT. En todos los casos, se midió el tiempo para formar un coágulo. Se informó de la media y la desviación típica de muestras replicadas.

5 El análisis de tromboplastina parcial activada (aPTT) se realizó en plasmas (con o sin diluciones seriadas de mutantes de Factor VIIa añadidas) utilizando Actin FS (Dade) o reactivo APTT (Sigma). La coagulación se inició utilizando CaCl_2 0,025 M (Dade) para Actin FS (Dade) o CaCl_2 0,02M (Sigma) para el reactivo APTT (Sigma). Los análisis se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Además de utilizar reactivos aPTT a la concentración de total intensidad fabricada, el análisis de aPTT también se realizó utilizando diversas diluciones de reactivo aPTT. En todos los casos, se midió el tiempo para formar un coágulo. Se informó de la media y la desviación típica de muestras replicadas.

10 También se realizaron análisis de coagulación a 37°C en los que se añadieron diferentes concentraciones de vesículas de fosfolípidos [a concentraciones variables de PS/PC o PS/PC/PE (PE=fosfatidiletanolamina)] a plasmas (con o sin diluciones seriadas de mutantes de FVIIa añadidos). La coagulación se inició mediante la adición de CaCl_2 20 mM. Se añadieron diversos reactivos en tampón convencional. En todos los casos, se midió el tiempo para formar un coágulo. Se informó sobre la media y la desviación típica de muestras replicadas.

15 Se evaluó la actividad de coagulación del Factor VIIa específico en los plasmas (con o sin mutantes del Factor VIIa añadidos) utilizando el kit STACLOT VIIa-rTF (Diagnostica Stago), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en el análisis de coagulación cuantitativa para FVII activado (Morrissey et al., 1993, *Blood*, 81(3):734-744). Se determinaron los tiempos de coagulación utilizando un fibrómetro FibroSystem (BBL) con una sonda de 0,3 mL y un Analizador de la Coagulación Automatizado Sysmex CA-6000 (Dade Behring).

20 **Ejemplo 3 - Tiempo Circulatorio del Factor VIIQ11E33 en Rata:** Se inyectaron 36 μg de Factor VIIQ11E33 en dos ratas Sprage Dawley (325-350 g) anestesiadas (nembutil sódico) a tiempo cero. La inyección fue a través de la vena yugular, en la cual se había colocado una cánula. En los tiempos mostrados en la Figura 7, se recogió sangre de la arteria carótida, en la cual se había insertado una cánula mediante cirugía. La cantidad de factor VIIQ11E33 en la circulación se estimó a partir del tiempo de coagulación de plasma deficiente en factor VII humano, al que se había añadido 1 μL de una dilución 1:10 de plasma de rata. Se utilizó una dilución 1:100 de tromboplastina de cerebro de conejo-HS (Sigma Chemical Co.). Se evaluó la coagulación mediante el método de inclinación manual del tubo como se describe en el Ejemplo 1. Se determinó la cantidad de actividad del factor VII en plasma antes de la inyección de VIIQ11E33 y se sustrajo como blanco. La concentración de factor VIIQ11E33 en la circulación se da como el log nM. Se realizó un experimento simulado en el que un tercer animal experimentó la operación y la canulación pero no el factor VIIQ11E33. La cantidad de actividad del factor VII en ese animal no cambió durante el tiempo del experimento (100 minutos). Al final del experimento, los animales fueron sometidos a eutanasia mediante un exceso de nembutil sódico.

25 Las ratas parecían normales a lo largo de todo el experimento sin evidencia de coagulación. Por lo tanto, el factor VIIQ11E33 no causaba una coagulación indiscriminada, ni siquiera en la rata después de la cirugía. El tiempo de vida en la circulación del VIIQ11E33 fue normal (Figura 7), aclarándose aproximadamente el 40% de la proteína en aproximadamente 60 minutos y con una desaparición incluso más lenta de la proteína restante. Esta fue similar a la velocidad de aclaramiento de la protrombina bovina de la rata. Nelsestuen y Suttie, 1971, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45:198-203. Esta es superior a la del factor VIIa recombinante de tipo salvaje que dio un tiempo medio en la circulación para los análisis funcionales de 20-45 minutos. Thomsen, M.K., et al., 1993, *Thromb. Haemost.*, 70:458-464. Esto indicó que el factor VIIQ11E33 no era reconocido como una proteína anormal y que no era rápidamente destruida por la actividad de coagulación. Parecía una proteína normal y debía tener una vida en la circulación normalizada en el animal.

35 **Ejemplo 4: Potenciación del sitio de membrana y actividad de la proteína C:** La proteína C bovina y humana muestran un alto grado de homología en los aminoácidos de sus dominios GLA (44 restos amino terminales), a pesar de una afinidad de membrana aproximadamente 10 veces superior de la proteína humana. La proteína C bovina contiene una prolina en la posición 11 versus una histidina en la posición 11 de la proteína C humana. Se examinó el impacto de remplazar la prolina 11 de la proteína C humana por histidina, y el cambio inverso en la proteína C humana. En ambos casos, la proteína que contenía la prolina 11 mostró una afinidad de membrana inferior, aproximadamente 10 veces para la proteína C bovina y 5 veces para la proteína C humana. La proteína C humana activada (hAPC) que contenía prolina en la posición 11 mostró una actividad 2,4 a 3,5 veces inferior que la hAPC de tipo salvaje, dependiendo del análisis utilizado. La APC bovina que contenía histidina 11 presentó una actividad hasta 15 veces superior que la de hAPC de tipo salvaje. Esto demostró la capacidad para mejorar tanto el contacto con la membrana como la actividad por medio de la mutación.

40 **Mutagénesis de la Proteína C:** El clon de ADNc de la proteína C humana completa fue proporcionado por el Dr. Johan Stenflo (Dept. of Clinical Chemistry, University Hospital, Malmo, Suecia). El clon de ADNc de la proteína C bovina fue proporcionado por el Dr. Donald Foster (ZymoGenetics, Inc., EEUU). El número de acceso GenBank para la secuencia de nucleótidos de la proteína C bovina es KO2435, NID g163486 y es K02059, NID g190322 para la secuencia de nucleótidos de la proteína C humana.

La mutagénesis dirigida al sitio fue realizada mediante el método de PCR. Para la mutagénesis de la proteína C humana de histidina 11 a prolina, se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos: A, 5'-AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCC AAG CTT-3' (correspondiente a los nucleótidos 860-895 del vector pRc/CMV, SEQ ID NO: 7) para crear un sitio *Hind* III entre pRc/CMV y la proteína C. B, 5'-GCA CTC CCG CTC CAG GCT GCT GGG ACG GAG CTC CTC CAG GAA-3' (correspondiente a los restos aminoácido 4-17 de la proteína C humana, el 8^o resto de esta secuencia se mutó a partir del de la proteína C humana al de la proteína C bovina, como se indica por medio del subrayado, SEQ ID NO: 8).

Para la mutagénesis de la proteína C bovina de prolina 11 a histidina, se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos: A, (como se ha descrito antes); C, 5'-ACG CTC CAC GTT GCC GTG CCG CAG CTC CTC TAG GAA-3' (correspondiente a los restos aminoácido 4-15 de la proteína C bovina, el 6^o aminoácido se mutó del de la proteína C bovina al de la proteína C humana como se marca con el subrayado SEQ ID NO: 9); D, 5'-TTC CTA GAG GAG CTG CGG CAC GGC AAC GTG GAG CGT-3' (correspondiente a los restos aminoácido 4-15 en la proteína C bovina, el 7^o aminoácido se mutó del de la proteína C bovina al de la proteína C humana; los nucleótidos mutados están subrayados, SEQ ID NO: 10); E, 5'-GCA TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA GGG CCC TCT AGA-3' (correspondiente a los nucleótidos 984-1019 en el vector pRc/CMV), creando un sitio *Xba* I entre pRc/CMV y la proteína C, SEQ ID NO: 11).

Se clonaron los ADNc de la proteína C tanto humana como bovina en los sitios *Hind* III y *Xba* I del vector de expresión pRc/CMV. El ADNc de la proteína C humana que contenía del extremo 5' al aminoácido 17 fue amplificado mediante PCR con ADNc de proteína C humana intacta y los cebadores A y B. El volumen para la reacción de PCR fue de 100 µl y contenía 0,25 µg de ADN molde, 200 µM de cada uno de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato, 0,5 mM de cada cebador y 2,5 U de ADN polimerasa Pwo (Boehringer Mannheim) en tampón Tris-HCl (Tris 10 mM, KCl 25 mM, (NH₄)₂SO₄ 5 mM, y MgSO₄ 2 mM, pH 8,85). Las muestras se sometieron a 30 ciclos de PCR que consistieron en un período de desnaturalización de 2 minutos, 94°C, un período de hibridación de 2 minutos a 55°C, y un período de elongación de 2 minutos a 72°C. Después de la amplificación, el ADN se sometió a electroforesis a través de un gel de agarosa al 0,8% en tampón Tris-acetato 40 mM que contenía EDTA 1 mM. Los productos de la PCR se purificaron con el JET Plasmid Miniprep-Kit (Saveen Biotech AB, Suecia). El ADNc de la proteína C humana que contenía las respectivas mutaciones se escindió por medio de *Hind* III y *Bsr* BI, y después se clonó en el vector pRc/CMV que fue escindido con *Hind* III/*Xba* I y que contenía un fragmento de la proteína C humana desde *Bsr* BI al extremo 3' para producir un ADNc completo de la proteína C humana con la mutación.

El ADNc de la proteína C bovina, que contenía del extremo 5' al aminoácido 11, se amplificó mediante PCR con ADNc de proteína C humana intacta y los cebadores A y C. El ADNc de la proteína C bovina desde el aminoácido 11 al extremo 3' se amplificó con ADNc de proteína C humana intacta y los cebadores D y E. Se utilizaron estos dos fragmentos de ADNc como moldes para amplificar el ADNc de la proteína C bovina completa que contenía los aminoácidos mutados con los cebadores A y E. Las condiciones de la reacción de PCR fueron idénticas a las utilizadas para la hAPC. El ADNc de la proteína C bovina que contenía las respectivas mutaciones se escindió mediante *Hind* III y *Bsu* 36I, y el fragmento *Hind* III/*Bsu*36I se clonó en el vector pRc/CMV que contenía fragmentos de la proteína C bovina intacta desde *Bsu* 36I al extremo 3' para producir ADNc de la proteína C bovina completa que contenía la mutación. Todas las mutaciones fueron confirmadas mediante secuenciación del ADN antes de la transfección.

Cultivo Celular y Expresión: Se hizo crecer la línea de células de riñón humanas transfectadas con adenovirus 293 en medio DMEM con un suplemento de suero de ternera fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomycinina y 10 µg/ml de vitamina K₁. La transfección se realizó utilizando el método de la Lipofectina. Felgner, P.L., et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 84:7413-7417. Se diluyeron 2 µg de ADN hasta 0,1 mL con DMEM que contenía medio de 2 mM de L-glutamina. Se añadieron 10 µL de Lipofectina (1 mg/ml) a 100 µL de DMEM que contenía medio de L-glutamina 2 mM. Se mezclaron el ADN y la Lipofectina y se dejaron a la temperatura ambiente durante 10-15 min. Las monocapas de células (confluencia del 25-50% en placas petri de 5 cm) se lavaron dos veces en DMEM con medio de L-glutamina 2 mM. La mezcla de ADN/lípido se diluyó hasta 1,8 mL en DMEM que contenía medio de L-glutamina 2 mM, se añadió a las células y se incubó durante 16 horas. Las células se alimentaron con 2 mL de medio completo que contenía suero de ternera al 10%, se dejó que se recuperara durante otras 48-72 horas y después se trató con tripsina y se sembró en placas de 10 cm con medio de selección (DMEM que contenía suero al 10% y 400 µg/mL de Geneticina) a 1:5. Yan, S.C.B. et al., 1990, Bio/Technology 655-661. Se obtuvieron colonias resistentes a Geneticina después de 3-5 semanas de selección. Se escogieron veinticuatro colonias de cada transfección con ADN, se hicieron crecer hasta la confluencia y se escrutó el medio en busca de expresión de proteína C con un análisis de transferencia puntual utilizando un anticuerpo monoclonal HPC4 (para proteína C humana) y anticuerpo monoclonal BPC5 (para proteína C bovina). Los clones que produjeron elevadas cantidades de proteína se aislaron y se hicieron crecer hasta la confluencia en presencia de 10 µg/mL de vitamina K₁.

La purificación de la proteína C recombinante bovina y su mutante se basó en el método descrito previamente con algunas modificaciones. Rezair, A.R., y Esmon, C.T., 1992, J. Biol. Chem., 267:26104-26109. El medio sin células acondicionado de las células transfectadas establemente se centrifugó a 5.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró a través de membranas de nitrato de celulosa 0,45 µm (Micro Filtration Systems, Japón). Se

añadieron EDTA (5 mM, concentración final) y PPACK (0,2 μ M, concentración final) al medio acondicionado de células 293, después se hicieron pasar a través una columna de intercambio aniónico Pharmacia FFQ a la temperatura ambiente utilizando Millipore Con Sep LC100 (Millipore, EEUU). La proteína se hizo eluir con un gradiente de CaCl_2 (solución de partida, Tris-HCl 20 mM/NaCl 150 mM, pH 7,4; solución limitante, Tris-HCl 20 mM/NaCl 150 mM/ CaCl_2 30 mM, pH 7,4). Tras la separación del CaCl_2 mediante diálisis y tratamiento con Chelex 100, la proteína se reabsorbió en una segunda columna FFQ, después se hizo eluir con un gradiente de NaCl (solución de partida Tris-HCl 20 mM/NaCl 150 mM, pH 7,4; solución limitante, Tris-HCl 20 mM/ NaCl 500 mM, pH 7,4). En este punto de la purificación, la proteína C bovina recombinante mutante y de tipo salvaje eran homogéneas como se determinó mediante SDS-PAGE.

La primera columna utilizada para la purificación de la proteína C humana recombinante mutante y de tipo salvaje fue la misma descrita para la proteína C bovina. Se empleó el método cromatográfico descrito por Rezair y Esmon con algunas modificaciones descritas para el método de purificación de la proteína S. Rezair, A.R., y Esmon, C.T., 1992, supra; He, Z., et al., 1995, *Eur. J. Biochem.*, 227:433-440. Las fracciones que contenían proteína C de la cromatografía de intercambio aniónico fueron identificadas mediante transferencia puntual. Las fracciones positivas se reunieron y se aplicaron a una columna de afinidad que contenía el anticuerpo dependiente de Ca^{2+} HPC-4. La columna se equilibró con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, que contenía Benzamidina-HCl 5 mM y CaCl_2 2 mM. Tras la aplicación, la columna se lavó con el mismo tampón que contenía NaCl 1 M. La proteína C se hizo eluir después con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM, pH 7,4, que contenía Benzamidina-HCl 5 mM. Después de la purificación, se estimó la pureza de todas las preparaciones de proteína C recombinante bovina y humana mediante SDS-PAGE seguido de tinción con plata. Las proteínas se concentraron utilizando filtros YM 10 (Amicon), después se sometieron a diálisis frente a tampón (Tris-HCl 50 mM y NaCl 150 mM, pH 7,4) durante 12 horas y se almacenaron a -70°C . Las concentraciones de las proteínas se midieron mediante absorbancia a 280 nm.

Asociación de moléculas de proteína C mutantes y normales con membranas: Se prepararon LUV y SUV mediante los métodos descritos en el Ejemplo 1. Se utilizó la dispersión de luz a 90° para la luz incidente para cuantificar la unión proteína-membrana como se ha descrito antes para el Factor VII (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PS/PC, (25/75) en calcio 5 mM (tampón Tris 0,05 M-NaCl 0,1 M, pH 7,5).

La proteína C bovina que contenía histidina en la posición 11 interactuaba con las membranas con una afinidad aproximadamente 10 veces superior que la proteína de tipo salvaje. Cuando se ajustaron a la ecuación 2, los datos dieron valores de K_D de 93,080 nM para la proteína C-H11 y 920,0950 nM para la proteína C de tipo salvaje (Figura 8A). La diferencia en la afinidad correspondía a aproximadamente 1,4 kcal/mol a 25°C . De hecho, la afinidad por la membrana de la proteína C-H11 bovina fue casi idéntica a la de la proteína C humana nativa (660 nM, Figura 8B). Esto sugirió que la prolina 11 formaba una base principal para las diferencias entre el sitio de unión a la membrana de las proteínas humanas y bovinas.

La sustitución inversa, el remplazo de His-11 de la proteína C humana por prolina, disminuyó la afinidad por la membrana (Figura 8B). Cuando se ajustaron a la ecuación 2, estos datos dieron valores de K_D de 660,090 nM para la proteína C humana de tipo salvaje y 3350,110 nM para la proteína C-P11 humana. El impacto de la introducción de prolina solamente fue ligeramente menor que el de la prolina en las proteínas bovinas.

Impacto de la prolina-11 sobre la actividad de la proteína C activada: Se generó proteína C activada mediante escisión con trombina, utilizando condiciones idénticas para las proteínas de tipo salvaje y mutante. Se mezclaron aproximadamente 150 μg de las diversas preparaciones de proteína C (1 mg/mL) con trombina bovina (3 μg) y se incubaron a 37°C durante 5 horas. El producto de reacción se diluyó a tampón Tris 0,025 M-NaCl 0,05 M y se aplicó a una columna de 1 mL de SP-Sephadex C-50. La columna se lavó con 1 mL del mismo tampón y se reunió el flujo continuo en forma de proteína C activada. Se recuperó aproximadamente un 65-80% de la proteína aplicada a la columna. Se determinó la actividad de APC mediante proteólisis de S2366 (0,1 mM) a 25°C . Las preparaciones se compararon con preparaciones normalizadas obtenidas a mayor escala. La APC humana patrón fue proporcionada por el Dr. Walter Kisiel. Para las proteínas bovinas, el patrón fue una preparación a gran escala de APC activada con trombina. La actividad de la APC bovina fue constante para todas las preparaciones de proteínas mutantes y normales (5%). Se utilizaron dos preparaciones de APC bovina para las comparaciones. La APC humana generada a partir de trombina fue de 55 a 60% más activa que el patrón. Las concentraciones referidas en este estudio se basaron en la actividad hacia S2366, con respecto a la del patrón.

El ensayo APTT patrón utilizó plasma humano o bovino y reactivo APTT patrón (Sigma Chemical Co.) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Alternativamente, se proporcionó fosfolípido en forma de vesículas formadas a partir de fosfolípidos altamente purificados. En este análisis, se incubó plasma bovino (0,1 mL) con caolín (0,1 mL de 5 mg/mL en tampón Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5) o ácido elálgico (0,1 mM en tampón) durante 5 minutos a 35°C . La coagulación se inició añadiendo 0,1 mL de tampón que contenía fosfolípido y las cantidades de APC mostradas, seguido de 0,1 mL de cloruro de calcio 25 mM. Todos los reactivos estaban en tampón convencional que contenía tampón Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5. Se necesitó una media de concentración 14 veces superior de bAPC de tipo salvaje para duplicar el impacto del mutante de H11. El tiempo de coagulación a bAPC-H11 10 nM fue mayor de 120 minutos. El reactivo APTT patrón (Sigma Chemical Co.) dio un tiempo de coagulación de aproximadamente 61 segundos a 35°C con este plasma. El tiempo requerido para formar un coágulo

se registró por medio de una técnica manual. La cantidad de fosfolípido se diseñó para que fuera el componente limitante en el análisis y para dar los tiempos de coagulación mostrados. Los fosfolípidos utilizados fueron SUV (45 µg/0,4 mL en el análisis final, PS/PC, 10/90) o LUV (120 µg/0,4 mL en el análisis final, PS/PC, 25/75).

5 La actividad anticoagulante de la proteína C activada se sometió a ensayo en diversos análisis. La Figura 9 muestra el impacto sobre el análisis de APTT, realizado con fosfolípido limitante. En las condiciones de este análisis, los tiempos de coagulación disminuyeron en una relación inversa, casi lineal con la concentración de fosfolípido. Se necesitaron aproximadamente 14 veces más de APC bovina de tipo salvaje para igualar el efecto de la APC-H11 bovina.

10 Se repitieron partes del estudio de la Figura 9 para membranas de PS/PC (25/75, LUV). De nuevo, la actividad estuvo limitada por el fosfolípido, y su concentración se ajustó para dar un tiempo de coagulación de control de 360 segundos (120 µg de PS al 25% en el análisis de 0,4 mL). Se necesitaron aproximadamente 15 veces más de enzima de tipo salvaje para igualar el impacto del mutante de H11. Finalmente, se utilizó reactivo APTT patrón (Sigma Chemical Co., tiempo de coagulación del patrón 502 segundos). Se necesitaron aproximadamente 10,007 nM; de enzima de tipo salvaje para duplicar el tiempo de coagulación hasta 102,5 segundos. Se produjo el mismo impacto por medio de APC-H11 bovina 2,20,1 nM. El fosfolípido no era limitante de la velocidad en el análisis convencional de manera que se puede esperar un impacto más pequeño sobre la afinidad por la membrana.

15 Los resultados para las proteínas humanas se muestran en la Figura 8B. Se requirieron aproximadamente 2,5 veces más de APC humana que contenía prolina 11 para prolongar la coagulación hasta el punto de la APC de tipo salvaje. Un impacto inferior de la introducción de prolina 11 puede reflejar diferencias más pequeñas en la afinidad por la membrana de las proteínas humanas (Figura 9B).

20 Inactivación del factor Va: Se analizó la inactivación del factor Va mediante el método de Nicolaes et al., 1996, *Thrombosis and Haemostasis* 76:404-410. En resumen, para las proteínas bovinas, se diluyó plasma bovino 1000 veces en Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M, 1 mg/mL de albúmina de suero bovino y calcio 5 mM a pH 7,5. Se añadieron vesículas de fosfolípidos (5 µg/0,24 mL de análisis) y 5 µL de trombina 190 nM para activar el factor V. Tras una incubación de 10 minutos a 37°C, se añadió APC y la incubación continuó durante 6 minutos. Se añadieron protrombina bovina (a una concentración final 10 µM) y factor Xa (concentración final 0,3 nM) y la reacción se incubó durante un minuto a 37°C. Se añadió una muestra de 20 µL de esta reacción de activación a 0,38 mL de tampón (Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 7,5) que contenía sustrato S2288 (60 µM). La cantidad de trombina se determinó mediante el cambio de absorbancia a 405 nM ($\epsilon = 1,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, k_{cat} para la trombina = 100/s). Para las proteínas humanas, se diluyó plasma deficiente en proteína S humana (Biopool Canadá, Inc.) 100 veces, se activó el factor Va por medio de trombina humana y se analizó el factor Va producido con los reactivos utilizados para las proteínas bovinas.

25 La APC-H11 bovina fue 9,2 veces más activa que el tipo salvaje (Figura 10A) en la inactivación del factor Va. En cuanto a la unión a la membrana (anterior), el impacto de la prolina 11 fue menor con las proteínas humanas, con una media de diferencia de 2,4 veces entre las curvas trazadas para el tipo salvaje y el mutante P-11 (Figura 10B). Se obtuvieron resultados similares con el plasma humano normal.

30 **Ejemplo 5 - Identificación de una afinidad de membrana arquetipo para el sitio de contacto con la membrana de las proteínas dependientes de vitamina K:** La comparación de diversos mutantes de proteína C humana y bovina y otros polipéptidos dependientes de vitamina K condujo a un arquetipo del sitio de contacto con la membrana propuesto. El arquetipo electrostático consiste en un núcleo electropositivo sobre una superficie de la proteína, creado por iones calcio unidos, rodeado por un halo de carga electronegativa de aminoácidos de la proteína. Cuanto más se acerca un miembro de esta familia de proteínas a este patrón electrostático, mayor es su afinidad por las membranas.

35 Las vesículas de fosfolípido, la proteína C bovina de tipo salvaje, los estudios de interacción proteína-membrana, la activación y la cuantificación de proteína C, y el análisis de la actividad fueron los descritos en el Ejemplo 4.

40 Se generó proteína C mutante, recombinante mediante los siguientes procedimientos. La mutagénesis dirigida al sitio se realizó mediante un método de PCR. Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos: A, como se describe en el Ejemplo 4; F, 5'-GCA TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA GGG CCC TCT AGA-3' (correspondiente a los nucleótidos 984-1019 del vector pRc/CMV, SEQ ID NO:11), creando un sitio Xba I entre pRc/CMV y la proteína C; G, 5'-GAA GGC CAT TGT GTC TTC CGT GTC TTC GAA AAT CTC CCG AGC-3' (correspondiente a los restos aminoácido 40-27 de la proteína C bovina, los aminoácidos 8^o y 9^o se mutaron de QN a ED como se indica con el subrayado, SEQ ID NO: 12); H, 5'-CAG TGT GTC ATC CAC ATC TTC GAA AAT TTC CTT GGC-3' (correspondiente a los restos aminoácido 38-27 de la proteína C humana, los aminoácidos 6^o y 7^o de esta secuencia se mutaron de QN a ED como se indica con el subrayado, SEQ ID NO: 13); I, 5'-GCC AAG GAA ATT TTC GAA GAT GTG GAT GAC ACA CTG-3' (correspondiente a los restos aminoácido 27-38 de la proteína C humana, los aminoácidos 6^o y 7^o de esta secuencia se mutaron de QN a ED como se indica en el subrayado, SEQ ID NO: 14); J, 5'-CAG TGT GTC ATC CAC ATT TTC GAA AAT TTC CTT GGC-3 (correspondiente a los restos aminoácido 38-27 de la proteína C humana, el 7^o aminoácido de esta secuencia se mutó de Q a E como se indica con el subrayado, SEQ ID NO: 15); K, 5'-GCC AAG GAA ATT TTC GAA AAT GTG GAT GAC ACA CTG-3' (correspondiente a los restos aminoácido 27-

38 de la proteína C humana, el 6º aminoácido de esta secuencia se mutó de Q a E como se indica con el subrayado, SEQ ID NO: 16);

Se clonaron los ADNc completos de la proteína C humana y bovina en el sitio Hind III y Xba I del vector pRc/CMV. Para obtener el mutante de la proteína C bovina E33D34, se realizó la amplificación por PCR del ADN diana como sigue. El ADNc de la proteína C bovina que contenía del extremo 5' al aminoácido de la posición 40, se amplificó con ADNc de proteína C bovina intacta y los cebadores A y C. Las condiciones de reacción de la PCR fueron las descritas en el Ejemplo 3. La muestra se sometió a 30 ciclos de PCR que consistieron en un período de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, un período de hibridación de 2 min a 55°C y un período de elongación de 2 min a 72°C. Tras la amplificación, el ADN se sometió a electroforesis a través de un gel de agarosa al 0,8% en tampón Tris-acetato 40 mM que contenía EDTA 1 mM. Los productos de la PCR se purificaron con el kit GeneClean III (BIO 101, Inc. EEUU), y el fragmento de la PCR del ADNc de la proteína C bovina que contenía las respectivas mutaciones se escindió por medio de Hind III y Bbs I. El fragmento Hind III/Bbs I y el fragmento de la proteína C humana (Bbs I-extremo 3') se clonaron en los sitios Hind III y Xba I del vector pRc/CMV para producir un ADNc de la proteína C bovina completa con las mutaciones. El mutante de la proteína C bovina H11 E33 D34 se creó del mismo modo, pero utilizando el mutante de la proteína C bovina H11 como molde en la reacción de PCR.

El ADNc de la proteína C humana que contenía del extremo 5' al aminoácido 38 fue amplificado mediante PCR con el ADNc de la proteína C humana intacto y los cebadores A y D. El ADNc de la proteína C humana desde el aminoácido 27 al extremo 3' se amplificó con ADNc de la proteína C humana intacto y los cebadores B y E. Estos dos fragmentos de ADNc se utilizaron como moldes para amplificar el ADNc de la proteína C bovina completo que contenía los aminoácidos mutados (E33 D34) con los cebadores A y B. Se obtuvo el mutante de la proteína C humana E33 mediante las siguientes etapas: se amplificó el ADNc de la proteína C humana que contenía del el extremo 5' al aminoácido 38 con el ADNc de la proteína C humana intacto y los cebadores A y F. El ADNc de la proteína C humana desde el aminoácido 27 al extremo 3' se amplificó con el ADNc de la proteína C humana intacto y los cebadores B y G. Se utilizaron estos dos fragmentos de ADNc como moldes para amplificar el ADNc de la proteína C bovina completo que contenía los aminoácidos mutados (E33) con los cebadores A y B. La mezcla y el programa de la PCR se han descrito antes. Los productos de la PCR de la proteína C humana que contenían las respectivas mutaciones se escindieron por medio de Hind III y Sal I, y después se clonaron el fragmento (Hind III-Sal I) con el fragmento de la proteína C humana intacto (Sal I-extremo 3') en los sitios Hind III y Xba I del vector pRc/CMV para producir el ADNc de la proteína C humana completo con las respectivas mutaciones. También se elaboró la proteína C humana que contenía un resto glicina en la posición 12, junto con las mutaciones E33D34. Todas las mutaciones fueron confirmadas mediante secuenciación del ADN antes de la transfección.

La línea de células de riñón humano 293 transfectadas con adenovirus se cultivó y se transfectó como se ha descrito en el Ejemplo 4. Se purificaron la proteína C humana y bovina recombinante y los mutantes como se ha descrito en el Ejemplo 4.

Las proteínas dependientes de vitamina K se clasificaron en cuatro grupos basándose en sus afinidades por una membrana patrón (Tabla 5). Se dan las secuencias de los restos amino terminales de algunas proteínas relevantes incluyendo la proteína C humana (hC, SEQ ID NO: 1), proteína C bovina (bC, SEQ ID NO: 2), protrombina bovina (bPT, SEQ ID NO:17), factor X bovino (bX, SEQ ID NO: 18), factor VII humano (hVII, SEQ ID NO: 3), proteína Z humana (hZ, SEQ ID NO: 20), y proteína Z bovina (bZ, SEQ ID NO: 21) como referencia, donde X es Gla (ácido γ -carboxiglutámico) o Glu.

bPT: ANKGFLXXVRK₁GNLXRXCLXX₂PCSRXXAFXA₃LXSLSATDAF₄WAKY

bX: ANS- FLXXVKQ₁GNLXRXCLXX₂ACSLXXARXV₃FXDAXQTDXF₄WSKY

hC: ANS- FLXXLRH₁SSLXRXCIXX₂ICDFXXAKXI₃FQNVDDTLAF₄WSKH

bC: ANS- FLXXLRP₁GNVXRXCXXX₂VCXFXXARXI₃FQNTXDTMAF₄WSFY

hVII: ANA- FLXXLRP₁GSLXRXCKXX₂QCSFXXARXI₃FKDAXRTKLF₄WISY

hZ: AGSYLLXXLFX₁GNLXKXCXYX₂ICVYXXARXV₃FXNXVVTDXF₄WRRY

bZ: AGSYLLXXLFX₁GHLXKKCWXX₂ICVYXXARXV₃FXDDXTTDXF₄WRTY

TABLA 5

Cargas y Afinidad							
	Residuo						
	11 + 29 + 33 + 34 = Suma					Total	K _D (nM)
Clase I							
bZ	-2	+	-2	-1	-4	-6	0,2 ^a -32
hZ	-2	+	-2		-3	-5	2,0 ^a -170
Clase II							
bPT-TNBS			-2		-2	-1	<10
hVII-Q11E33		+	-2	-1	-2	-2	10
hS		+	-2	-1	-2	-2	40
bX		+	-2	-1	-2	-3	40
bC-E33D34	P	+	-2	-1	-2	-4	125
hX	+	+	-2	-1	-1	-2	160
bPT	+		-2		-1	0	100
hPT	+		-2		-1	-1	
bS	+	+	-2		0	0	120
Clase III							
bIX		+	-2		-1	-1	1000
hIX		+	-2		-1	-1	1000
hC		+			+1	-2	660
bC-H11		+			+1	-1	930
Clase IV							
hC	P	+			+1	-2	3300
hVII	P	+	+	-1	+1	+1	4000
bC	P	+			+1	-1	9200
bVII	P	+	+		+1	0	15000

^aUn Valor de afinidad superior iguala la K_{disociación}/1*10⁷/M⁻¹S⁻¹; el denominador es una K_{asociación} típica para otras proteínas.

En la Tabla 5, los mutantes de polipéptidos dependientes de vitamina K están en negrita. La carga total (restos 1-34) incluye 7 iones calcio (+14) y el extremo amino (+1).

5 La proteína Z fue asignada a la clase I basándose en su constante de la velocidad de disociación, que era de 100 a 1.000 veces más lenta que la de otras proteínas. Si la proteína Z presentaba una constante de la velocidad de asociación normal (aproximadamente 10⁷ M⁻¹s⁻¹) la K_D sería aproximadamente 10⁻¹⁰ M. Wei, G.J., et al., 1982,

Biochemistry, 21:1949-1959. La última afinidad puede ser la máxima posible para las proteínas dependientes de vitamina K. La proteína Z es un candidato para la terapia de anticoagulación como cofactor para la inhibición del factor Xa por medio del inhibidor de la proteasa dependiente de proteína Z (ZPI). La incubación de la proteína Z y ZPI con el factor Xa reduce la actividad procoagulante del factor Xa. Véase, por ejemplo, Han et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU*, 1998, 95:9250-9255. La potenciación de la cinética de asociación aceleraría las velocidades de inhibición e incrementaría la afinidad de unión en equilibrio. La proteína Z contiene gly-2, que se piensa que anula la interacción de la asn-2 con el calcio unido en otras proteínas. La presencia de un resto glicina en la posición 2 puede desestabilizar el plegamiento de la proteína y disminuir la cinética de asociación. Además, la menor afinidad de la proteína Z con respecto a la de la proteína Z bovina puede provenir de cargas aniónicas inferiores en las posiciones 34-36 (Tabla 5).

Las proteínas de la Clase IV diferían de las de clase III en la presencia de prolina-11, que puede alterar la afinidad mediante métodos no electrostáticos.

Si bien existía una correlación relativamente débil entre la afinidad por la membrana y la carga negativa neta de los restos 1-34, se encontró una excelente correlación solamente cuando se tenían en cuenta los restos 5, 11, 29, 33 y 34 (Tabla 5). Los últimos aminoácidos están localizados sobre la superficie de la proteína. Se modelaron numerosas proteínas mediante sustitución de aminoácidos en la estructura de la protrombina y se estimaron sus potenciales electrostáticos por medio del programa DelPhi. En la Figura 11 se muestra un boceto diseñado según el potencial electrostático de la proteína Z bovina. Los sitios electronegativos en 7, 8, 26, 30, 33, 34 y 11 producen un halo de carga electronegativa que rodea un núcleo catiónico producido por el poro recubierto de calcio (Figura 11). Cuanto más se aproxima una estructura de proteína a esta estructura, mayor es su afinidad por la membrana. Las proteínas de mayor afinidad muestran una carga electronegativa que se extiende a los aminoácidos 35 y 36. Esta correlación es evidente a partir de las proteínas de tipo salvaje, los mutantes y las proteínas modificadas químicamente.

El patrón para otras estructuras puede ser extrapolado a partir del examen de los grupos con carga que están ausentes en otras proteínas. Por ejemplo, Lys-11 y Arg-10 de la protrombina bovina generan regiones altamente electropositivas en sus proximidades; la carencia de Gla-33 en la proteína C y el Factor VII crea menos electronegatividad en esas regiones de la proteína. En todos los casos, la mayor afinidad correspondía a una estructura con un núcleo electropositivo que estaba completamente rodeado por una superficie electronegativa de la proteína, como se muestra para la proteína Z. Las excepciones a este patrón son las proteínas con Pro-11, que pueden disminuir la afinidad mediante un impacto estructural y ser-12 (proteína C humana), que es un resto no cargado único.

Para someter a ensayo adicionalmente la hipótesis de un arquetipo para la distribución electrostática, se utilizó la mutagénesis dirigida al sitio para reemplazar Gln33Asn34 de la proteína C bovina y humana por Glu33Asp34. Glu33 debe ser modificada adicionalmente a Gla durante el procesamiento de la proteína. Estos cambios alteraban el potencial electrostático de la proteína C bovina al del factor X bovino. Se esperaba que la afinidad por la membrana de la proteína mutante fuera inferior a la del factor X debido a la presencia de prolina-11. En efecto, el mutante de la proteína C bovina dio una afinidad por la membrana similar a la de la protrombina bovina (Figura 12A), y ligeramente menor que la del factor X bovino (Tabla 5).

Fue más interesante que la inhibición de la coagulación por APC fuera mayor para el mutante que para la enzima de tipo salvaje (Figura 12B, C). La inclusión de los resultados para el mutante P11H de la proteína C bovina del Ejemplo 3 demostró que se podía producir una familia de proteínas, cada una con una afinidad por la membrana y una actividad diferentes, variando las sustituciones de los aminoácidos de las posiciones 11, 33 y 34.

Los mutantes de la proteína C humana que contenían E33 y E33D34 dieron como resultado un pequeño incremento en la afinidad de unión a la membrana (Figura 13a). La actividad de estos mutantes fue ligeramente menor que la de la enzima de tipo salvaje (Figura 13b). Los resultados con los mutantes de la proteína C bovina sugieren que el fracaso de la mutación E33D34 en la proteína humana puede proceder de H11 y/u otros aminoácidos únicos en la proteína. La Figura 14A muestra que el mutante H11 de la proteína C bovina se unía a la membrana con una afinidad aproximadamente 10 veces mayor que la de la proteína de tipo salvaje, el mutante E33D34 se unía con aproximadamente 70 veces la afinidad, pero que el triple mutante, H11E33D34, sólo era ligeramente mejor que el mutante H11. Esta relación se reflejó en la actividad de APC formada a partir de estos mutantes (Figura 14B). Este resultado sugirió que la presencia de H11 reducía el impacto de E33D34 sobre la afinidad de unión a la membrana.

Estos resultados indicaban que la introducción de E33D34 sólo puede no ser óptima para todas las proteínas. Por consiguiente, pueden ser deseables otras mutaciones para crear la proteína C humana que utilicen E33D34 y tengan una afinidad de membrana incrementada máxima. El resultado con la proteína bovina sugirió que la histidina 11 podía ser la causa principal de este fenómeno. Por consiguiente, H11 podía ser alterada a glutamina u otro aminoácido en la proteína C humana, junto con la mutación E33D34. Otro aminoácido que puede tener impacto en la afinidad es la serina de la posición 12, un aminoácido que es absolutamente único en la proteína C humana. Estos cambios adicionales deben producir proteínas con una afinidad de membrana intensificada. La sustitución de un resto glicina por una serina en la posición 12 de la proteína C humana activada, junto con E33D34 dio como resultado una actividad 9 veces superior que la de la proteína C humana activada de tipo salvaje. La actividad del mutante G12E33D34 fue evaluada con un análisis de tromboplastina diluida utilizando un tiempo de coagulación de

control de 30 segundos y plasma humano normal. El arquetipo electrostático también fue sometido a ensayo mediante la comparación del factor X bovino y humano. La presencia de lisina-11 en el factor X humano sugiere que debe tener una afinidad menor que la del factor X bovino. Esta predicción fue confirmada, por el resultado mostrado en la Figura 15.

- 5 Estudios anteriores han demostrado que la modificación con ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) del fragmento 1 de la protrombina humana y bovina tenía un impacto relativamente pequeño (0 a 5-veces) sobre la afinidad por la membrana. Weber, D.J., et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267:4564-4569; Welsch, D.J., et al., 1988, *Biochemistry* 27:4933-4938. Las condiciones utilizadas para la reacción dieron como resultado la derivatización del extremo amino, un cambio que está ligado a la disminución de la afinidad por la membrana. Welsch, D.J., y Nelsestuen, G.L., 10 1988, *Biochemistry*, 27:4939-4945. La modificación de la proteína en presencia de calcio, que protege el extremo amino, dio como resultado una proteína modificada con TNBS con una afinidad por la membrana muy superior a la del fragmento 1 nativo.

15 La sugerencia de que la proteína Z constituye el arquetipo se basó en su constante de la velocidad de disociación y en que una velocidad de asociación normal generaría una $K_D = 10^{-10}$ M. Es dudoso que este valor pueda ser alcanzado. Es posible que la velocidad de asociación lenta de la proteína Z esté causada por un plegamiento no apropiado de la proteína, dando como resultado una baja concentración de la conformación de unión a la membrana. Si se pueden alterar las condiciones para mejorar el plegamiento de la proteína, deben mejorar las velocidades de asociación de la proteína Z. En efecto, la constante de la velocidad de asociación para la proteína Z fue mejorada mediante la alteración del pH. La base para esta observación puede estar relacionada con un rasgo 20 inusual de la estructura de la protrombina, que es la próxima situación del extremo amino (+1 a pH 7,5) a los iones calcio 2 y 3. La carga +1 sobre el extremo amino es responsable de la región ligeramente electropositiva inmediatamente por encima de Ca-1 en la Figura 11. La repulsión de la carga entre Ca y el extremo amino puede desestabilizar el plegamiento de la proteína y podría ser un serio problema para una proteína que tuviera una baja estabilidad de plegamiento.

25 La Tabla 6 proporciona un apoyo adicional para el modelo del arquetipo. Muestra la relación entre la distancia de los grupos iónicos de los iones estroncio 1 y 8 (correspondientes al calcio 1 y un ión metálico divalente extra encontrado en la estructura cristalina por rayos x del Sr de la protrombina). El patrón sugiere que cuanto más próximo está un grupo iónico a estos iones metálicos, mayor es su impacto sobre la afinidad por la membrana. La excepción es la Arg-16, que contribuye a la carga del núcleo electropositivo. La mayor afinidad se corresponde con la carga 30 electronegativa en todos los demás sitios. Esta correlación también se aplica a los restos GLA.

TABLA 6

Distancia a Sr-1, 8 e Importancia de los Iones				
Posición	Átomo ^a	Distancia (Å) a:		Impacto/ión sobre $K_p(K_M)$
		Sr-1	Sr-8	
(Proteína A-A)				
3(K-PT)	ϵ -N	22,1	21,7	Bajo o Desconocido
5(K-IX)	para-C(F)	20,1	20,8	"
19(K/R-VII)	C5(L)	20,2	17,8	"
22(K-IX)	C4(P)	17,0	18,5	"
10(R)	C6(R)	16,8	12,9	"
25(R-PT)	C6(R)	11,2	13,8	"
24(X/D-PC)	O(S)	8,1	12,0	"
11(K-PT, hX, bS; Gla-PZ)				
	ϵ -C(K)	14,7	7,4	3-10 veces ^b
33(Gla)	γ -C(E)	11,6	7,5	"
34(D)	O(S)	15,3	12,1	"
29(R)	para-C(F)	7,5	8,4	"

Distancia a Sr-1, 8 e Importancia de los Iones				
		Distancia (Å) a:		Impacto/ión sobre $K_p(K_M)$
Posición	Átomo ^a	Sr-1	Sr-8	
16(R)	C6(R)	14,2	10,6	"
Resto Gla ^a				
Poca importancia:				
7		12,8	13,3	+2(<2)
15		20	16	<2(<2)
20		19,4	17,8	<2(<2)
21		17,2	15	4(3)
33		11,6	7,5	? ^e (<2)
Mucha importancia:				
8		8,7	10,9	? ^e (20)
26		3,6	9,5	? ^e (50)
17		11,1	9,1	>200(100)
27		8,4	10,6	>200(85)
30		3,4	4,2	>200(25)
^a Las distancias son desde este átomo de la protrombina bovina (el resto de la protrombina utilizado en la medida se da entre paréntesis) al estroncio 1 y 8 de la estructura del fragmento 1 de Sr-Protrombina. Seshadri et al. 1994, <u>Biochemistry</u> 33: 1087-1092. ^b Para todos menos para 16-R, los cationes disminuyen la afinidad y los aniones incrementan la afinidad. ^c Thariath et al. 1997 <u>Biochem. J.</u> 322: 309-315. ^d Impacto de las mutaciones Glu a Asp, las distancias son las medias para los carbonos gamma carboxílicos. Los datos de $K_D(K_M)$ son de Ratcliffe et al. 1993 <u>J. Biol. Chem.</u> 268: 24339-45. ^e La unión fue de baja capacidad o causó agregación, haciendo las comparaciones menos seguras.				

Los resultados de la Figura 15C muestran que la velocidad de asociación para la proteína Z era sustancialmente mejorada a pH 9, donde un amino terminal debe estar no cargado. La constante de velocidad obtenida a partir de estos datos fue aproximadamente 12 veces superior a pH 9 que a pH 7,5 (Figura 15C).

- 5 **Ejemplo 6: Análisis de Competición para Evaluar la Afinidad del Factor VII Modificado:** Se evaluó la actividad de coagulación de VIIaQ11E33 y de tipo salvaje utilizando factor tisular reconstituido (Innovin, Dade) y membrana. Se utilizaron cantidades saturantes de factor VIIa (aproximadamente 0,7 μ l de Innovin/0,15 ml de análisis). Se añadieron el factor VIIa y el Innovin a tampón sin plasma (CaCl₂ 6,7 mM, Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM) en 112,5 μ l. Después de 15 minutos, se añadieron 37,5 μ l de plasma deficiente en factor VII y se registró el tiempo de coagulación. La actividad de VIIaQ11E33 dependiente del factor tisular fue similar a la de la proteína de tipo salvaje cuando se analizó de esta manera. Como el uso de plasma carente de Factor VII no es representativo de las condiciones *in vivo*, la afinidad relativa del factor VII modificado para el tejido unido a la membrana fue evaluada en presencia de una proteína competidora. En particular, se utilizó el factor VIIa con el sitio activo modificado como proteína competidora y estuvo presente en abundancia (2 nM). El factor VII modificado que se iba a evaluar se utilizó por encima de la concentración del factor tisular. En estas condiciones, las concentraciones de proteína libre de todas las proteínas fueron aproximadamente iguales a las proteínas totales añadidas. La sustracción de la proteína unida de la total para obtener las concentraciones de proteína libre representa una pequeña corrección. Basándose en el análisis competitivo, el factor VIIaQ11E33 fue 41 veces más eficaz que el VIIa de tipo salvaje.
- 10
- 15

Ejemplo 7: Afinidad de unión a la membrana y actividad intensificadas del Factor VII, la Proteína S, y otros polipéptidos dependientes de vitamina K:

La proteína S (número de Acceso GenBank M57853 J02917) es una proteína de unión a la membrana de alta afinidad y un cofactor para la acción de la APC. La deficiencia en proteína S es un potente indicador de enfermedad trombótica y puede ser utilizada en pacientes que tienen bajos niveles de esta proteína o que presentan un incremento de riesgo de trombosis. Véase, por ejemplo, Dahlback, Blood, 1995, 85:607-614 y Patente de los Estados Unidos Núm. 5.258.288.

Las sustituciones de los aminoácidos 5 o 9 pueden intensificar la afinidad de unión a la membrana y la actividad de la Proteína S. El resto 9 de la Proteína S es un resto treonina, mientras la mayoría de las proteínas dependientes de vitamina K contienen un resto hidrófobo en esta posición. Véase, por ejemplo, McDonald et al., Biochemistry, 1997, 36:5120-5127. El remplazo del resto análogo en la Proteína C humana (un resto leucina) por glutamina, un remplazo de hidrófobo por hidrófilo, dio como resultado una grave pérdida de actividad. Véase, Christiansen et al., 1995, Biochemistry, 34:10376-10382. De este modo, existe confusión sobre la importancia de la posición 8 en la asociación con la membrana de las proteínas dependientes de vitamina K.

El factor VII humano que contiene una sustitución de treonina en el aminoácido 9 junto con las mutaciones de Q11E33 descritas antes, fueron preparados por los ATG Laboratories, Inc. y proporcionados en un vector apropiado para la transfección en la línea celular de riñón humano 293, como se ha descrito antes en el Ejemplo 4.

El vector que contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor VII mutante fue transfectado en una línea celular de riñón humano 293, utilizando kits disponibles en el mercado. Las células se hicieron crecer y se seleccionaron las colonias que proporcionaban niveles elevados de antígeno del factor VII mediante análisis de transferencia puntual, como se ha descrito para la proteína C, utilizando anticuerpos policlonales disponibles en el mercado. La cantidad de factor VII del medio acondicionado también se determinó mediante un análisis de coagulación, utilizando el análisis de competición descrito en el Ejemplo 6. En general, el Factor VII se convirtió en el VIIa mediante incubación con factor tisular antes del inicio de la coagulación. Se utilizaron cantidades idénticas de VIIa-Q11E33 y VIIa-T9Q11E33 en los análisis. Los polipéptidos de factor VII se mezclaron con una cantidad apropiada de factor tisular asociado a la membrana (Innovin, Dade). Se añadió VIIa con el sitio activo modificado (FFR-VIIa) (0 a 3,5 nM) y se permitió que las reacciones se equilibraran durante 60 minutos en 112,5 µL de tampón que contenía CaCl₂ 6,7 mM, Tris 50 mM, pH 7,5, y NaCl 100 mM. Finalmente, se añadió plasma deficiente en factor VII y se midió el tiempo requerido para formar un coágulo. Se determinó la eficacia por medio del tiempo de coagulación como una función del inhibidor añadido. El factor VIIa T9Q11E33 humano mostró una grave pérdida de afinidad de unión competitiva. De este modo, un resto treonina no fue óptimo en esta posición. La introducción de un resto leucina en la proteína 9 de la proteína S debe aumentar la afinidad por la membrana y la actividad de la proteína S en muchas condiciones.

La base para una elevada afinidad por la membrana de la proteína S, a pesar de la presencia de restos sub-óptimos sustanciales, puede proceder de otras partes de su estructura. Esto es, la proteína S contiene una región de la secuencia conocida como "segundo bucle disulfuro" o región sensible a la trombina (restos 46 a 75 del polipéptido maduro). La protrombina también contiene un segundo bucle disulfuro en una versión más corta. La escisión proteolítica del bucle de la protrombina produce la pérdida de afinidad por la membrana. Véase, Schwalbe et al., J. Biol. Chem., 1989, 264:20288-20296. La escisión puede estar implicada en la regulación de la actividad de la proteína S proporcionando un control negativo de la acción de la proteína S. El segundo bucle disulfuro puede servir para producir un sitio de unión a la membrana óptimo de manera que los restos 46-75 se plieguen hacia atrás sobre los restos 1-45 para crear un sitio de unión óptimo. Los restos 1-45 aislados de la proteína S no se asocian con membranas de una manera dependiente de calcio, lo que difiere de los restos 1-41 o 1-38 de la protrombina, los restos 1-44 del factor X, los restos 1-41 de la proteína C, o los restos 1-45 de la proteína Z que se unen a las membranas de una manera dependiente de calcio. De este modo, a pesar de que la proteína S intacta tiene una elevada afinidad, los resultados con el dominio 1-45 GLA aislado de la proteína S sugieren que la proteína intacta experimenta una pérdida sustancial de afinidad en el dominio GLA.

La proteólisis evita la función apropiada del segundo bucle disulfuro en este papel, y la proteína S resultante muestra pérdida de actividad a medida que la afinidad por la membrana disminuye hasta la esperada por los aminoácidos de los restos 1-45. De este modo, el aumento de la afinidad por la membrana mediante la introducción de Leu9 y otros cambios (véase más abajo), crearía una proteína S que ya no es regulada a la baja por la proteólisis y que sería un anticoagulante más eficaz.

Un resto conservado en la mayoría de las proteínas dependientes de vitamina K es el de la posición 5. En esta posición se encuentra leucina tanto en la proteína S como en la proteína Z. La proteína C, los factores X y VII, y la protrombina contienen fenilalanina, otro resto hidrófobo, en la posición correspondiente. El factor IX contiene una lisina en el resto 5, una desviación importante de otras proteínas. Parece no haber conexión aparente para este resto no conservado y la afinidad por la membrana del factor IX, haciendo ambiguo el papel de la posición 5.

La sustitución de un resto glutamina en la posición 5 de la proteína C humana dio como resultado una proteína que presentaba una afinidad similar por las membranas y titulaciones de calcio similares, con una reducción de la actividad de coagulación. La sustitución de una leucina por un resto fenilalanina en la posición 5 del factor VII (que contenía las mutaciones Q11E33) se llevó a cabo mediante los métodos descritos antes. El producto, L5Q11E33,

tuvo solamente 33% de la actividad del mutante Q11E33 cuando se analizó mediante el método de competición con VIIa con el sitio activo modificado (0-3,2 nM) descrito antes. De este modo, se puede mejorar la actividad de la proteína S mediante sustitución, por ejemplo, de un resto fenilalanina en la posición 5. La sustitución de F5K en el factor VII también dio como resultado una proteína con 33% de la actividad del Factor VII de tipo salvaje cuando se analizó mediante el análisis competitivo descrito en el Ejemplo 6. La afinidad de unión a la membrana del Factor IX puede ser intensificada por una mutación K5E. La sustitución de P11Q en el Factor VII tuvo un impacto positivo, mientras un cambio adicional de Q11E (para hacer esta posición como la de la proteína Z), no tuvo un impacto adicional, esto es P11Q y P11E fueron ambos mejores que el tipo salvaje, pero no fueron mejores uno que otro. Por consiguiente, el impacto de las sustituciones de los restos individuales varía con la proteína. Sin embargo, las sustituciones combinadas apropiadas elucidan la importancia universal de estos restos.

Se produjo una molécula de factor VIIa mediante los procedimientos esbozados antes. Este mutante contenía las mutaciones Q11E33 y también contenía las mutaciones R29F y D34F (Q11F29E33F34). Este mutante tenía una actividad 2,5 veces superior a la del mutante Q11E33 solo cuando se analizó en el análisis de competición descrito en el Ejemplo 6. De este modo, la combinación correcta de restos aminoácido en los sitios importantes descritos, es necesaria para maximizar la función de los grupos carboxilo importantes en la proteína. La combinación óptima de estos sitios puede incluir restos aniónicos así como neutros e hidrófobos.

La importancia de la posición 35 está indicada por la modificación del mutante del Factor VII Q11E33F34 para incluir adicionalmente A351. La actividad del mutante Q11E33F34I35 fue 60% la del mutante Q11E33F34 cuando se evaluó en el análisis competitivo descrito en el Ejemplo 6. Se produjo otro mutante, Q11E33I34F35 y desplegó una actividad similar a la del mutante Q11E33F34I35. Estos resultados indican que no es deseable la presencia de un grupo hidrófobo grande en la posición 35.

La estabilidad del mutante Q11E33F34 en el medio de cultivo celular se redujo un 75% con respecto a la del mutante Q11E33. La reducción de la estabilidad dio como resultado una disminución del rendimiento del medio de cultivo. La pérdida de estabilidad parecía proceder de la proteólisis. Se puede requerir la modificación de la posición 35 a Glu para incrementar la estabilidad de la proteína con la actividad más alta, ya que los restos Glu evitan la proteólisis. La introducción de la mutación A35E puede incrementar la estabilidad del mutante Q11E33F34.

La importancia de la posición 36 estaba indicada por la adición de una mutación E36D al mutante del factor VII Q11E33. El mutante resultante, Q11E33D36, tenía un 70% de la actividad del mutante Q11E33 en el análisis competitivo descrito en el Ejemplo 6.

Las modificaciones de las posiciones 34-36 parecían tener el mayor impacto sobre la proteína C humana, donde la proteína de tipo salvaje contiene N34V35D36. La introducción de F34X35E36, donde X es un aminoácido resistente a la digestión proteolítica puede intensificar la afinidad de unión a la membrana de la proteína C humana.

Ejemplo 8: Inserción de Restos en el Aminoácido 4: El factor VII que contenía un resto tirosina fue preparado por ATG Laboratories, Inc. y analizado mediante el análisis de competición descrito en el Ejemplo 6. El factor VII fue activado mediante incubación con Innovin (20 ml) en calcio 5 mM. Las muestras que contenían cantidades suficientes de Innovin para dar un tiempo de coagulación mínimo de 28 segundos (aproximadamente 0,7 μ l) fueron transferidas a tampón. Se añadió el plasma deficiente en factor VII y se registraron los tiempos de coagulación. Se analizaron las muestras en diversos momentos hasta que se alcanzó la actividad máxima (normalmente \leq 30 min.). Se determinó la cantidad de Factor VII en el medio acondicionado necesaria para generar un tiempo de coagulación de 30 segundos. Esta razón de medio/Innovin representa una razón de casi 1:1 de factor VIIa/Factor Tisular. Tras la activación, se diluyeron las muestras de medio/Innovin suficientes para dar un tiempo de coagulación de 19 segundos (aproximadamente 4 μ l de Innovin) a 112,5 μ l con tampón que contenía calcio y BSA (1 g/L). Se añadieron diversas cantidades de factor VIIa con el sitio activo modificado (DEGR-VIIa) y se dejaron incubando hasta que se alcanzó el equilibrio; típicamente 60 minutos a 37°C. Se añadió plasma deficiente en factor VII humano (37,5 μ l) y se midieron los tiempos de coagulación. Se compararon los resultados con experimentos similares realizados con medio que contenía VIIa de tipo salvaje. Basándose en los resultados del análisis de desplazamiento competitivo, el factor VII humano que contenía un resto tirosina en la posición 4 tenía una actividad dos veces superior que una molécula de factor VIIa similar que carecía de este resto.

La combinación de las mutaciones beneficiosas se llevó a cabo para generar un mutante del factor VII, Q11E33F34 con una Tirosina insertada en la posición 4. Este mutante mostró una actividad 5 veces mayor que la del mutante Q11E33 del factor VII en el análisis competitivo descrito antes. En resumen, este mutante tiene una actividad 160 veces mayor que la del factor VIIa de tipo salvaje en el análisis de competición descrito en el Ejemplo 6. Este resultado demostró que los beneficios de los restos individuales son aditivos cuando se presentan combinados.

Ejemplo 9: Anticoagulación de sangre humana por proteína C activada (APC). Se utilizó el aparato Clot Signature Analyzer (CSA) (Xylum Company, Scarsdale, N.Y.) para someter a ensayo la eficacia relativa de APC de tipo salvaje frente al mutante Q11G12E33D34. En un análisis, este aparato bombea sangre recién recogida (<2 min), no tratada con anticoagulante a través de un tubo que contiene una fibra que tiene una superficie de colágeno. La presión del flujo de sangre (mm Hg) es similar a la del sistema circulatorio. Las plaquetas de la sangre se unen al colágeno, se activan y ayudan a la coagulación. El aparato detecta la presión en la salida del tubo, como se muestra

en la Figura 16. Tras la formación del coágulo, la presión a la salida del tubo disminuye y el punto medio de la reacción se describe como el tiempo de "Formación del Trombo Inducido por Colágeno" (CITF). Sin aditivos, el tiempo CITF para el sujeto humano fue de 5,0 minutos (Figura 16A). El tiempo de fondo se resta del valor de la Figura 16 para obtener el CITF. Con APC de tipo salvaje 30 nM añadida a la sangre, el tiempo CITF medio fue de 6,5 min (5 determinaciones) para el mismo sujeto (Figura 16B). El tiempo CITF medio fue de 15,5 min con la APC mutante (Q11G12E33D34) 6 nM, basándose en 5 determinaciones (Figura 16C), y fue de 9,5 min con 3 nM de la misma APC mutante, basándose en 5 determinaciones. De este modo, la APC mutante fue al menos 10 veces más eficaz que la APC de tipo salvaje para la inhibición de la formación de coágulos en sangre humana completa a una presión de flujo, utilizando membranas de plaquetas humanas activadas como fuente de fosfolípidos. En un experimento adicional, en el que se evaluó el CITF en un sujeto que había ingerido dos aspirinas, se observó una diferencia incluso mayor entre la APC mutante y la de tipo salvaje. La actividad de membrana más baja se puede corresponder con un mayor impacto del mutante.

Este resultado difirió de la consecuencia de un ensayo de coagulación *in vitro* utilizando el procedimiento de análisis de inclinación manual, descrito antes en este documento. Utilizando las condiciones normalizadas y los reactivos de total intensidad para el ensayo APTT (materiales obtenidos de, y procedimientos descritos por el fabricante Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., 1998), la proteína mutante mostró una actividad solamente 1,5 veces superior a la de la proteína de tipo salvaje. El análisis APTT, sin embargo, contiene elevados niveles de fosfolípido, una condición que minimiza la diferencia entre las proteínas mutante y de tipo salvaje. Una vez más, estos resultados indican que las condiciones del análisis son importantes en la caracterización de las ventajas de las proteínas mutantes producidas por esta invención y que la baja concentración de fosfolípido es característica de la membrana biológica proporcionada por las plaquetas.

Se sometió a ensayo el impacto de una proteína procoagulante sobre la sangre de dos pacientes con hemofilia en el CSA. El CITF para el primer paciente con hemofilia fue de 13,2 minutos y el coágulo fue inestable con continuas roturas (con incrementos de la presión) similares a las mostradas para sangre anticoagulada de la figura 6. En una segunda muestra, se añadió factor VIIa de tipo salvaje 60 nM a la sangre antes del análisis. Esta dosis se corresponde con los niveles terapéuticos. El tiempo CITF (9,7 min) se acortó y el coágulo fue más estable. Una tercera muestra utilizó factor VIIa Q11E33 60 nM. El tiempo CITF (3,7 min) estuvo por debajo del intervalo para los individuos normales y el coágulo fue estable. El segundo paciente con hemofilia produjo respuestas similares.

El CSA representa un importante análisis puesto que utiliza membranas biológicas para ayudar a la coagulación de la sangre. También se sometió a ensayo otro análisis que utiliza membranas biológicas. El análisis proporcionado por Hemochron Jr. Signature Whole Blood Microcoagulation System es una herramienta común para someter a ensayo la coagulación en situaciones clínicas. Se recoge sangre completa en un casete y se determina el tiempo para alcanzar la coagulación. Utilizando este sistema, el mutante Q11G12E33D34 de la proteína C activada fue de 5 a 10 veces más activo que la proteína C activada humana de tipo salvaje. Esta actividad refleja la ventaja del mutante en muchos otros análisis.

Ejemplo 10: Estado de Carboxilación de Polipéptidos Modificados: Se evaluó la carboxilación del dominio GLA de los polipéptidos dependientes de vitamina K mediante espectrometría de Masas MALDI-TOF después de la liberación del dominio GLA de la proteína intacta mediante digestión suave con quimotripsina (1:500, proteasa:proteína sustrato, pH 7,5 a 37°C durante 3 horas). La quimotripsina escinde preferentemente en torno a los restos 40-45 de las proteínas dependientes de vitamina K, liberando los dominios GLA que pueden ser aislados para su estudio. Se eliminaron las sales de los péptidos mediante adsorción sobre un gel de fase inversa C18 y elución con acetonitrilo al 75% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Se utilizó ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico como matriz. Este análisis demostró que el factor VIIa recombinante de tipo salvaje (NOVO Nordisk) tenía un resto Gla menos de lo esperado. El producto principal formado a partir de la digestión con quimotripsina fue el péptido 1-40, que proporcionó un ión M+1 de 5145,6 unidades de masa, aproximadamente un grupo carboxilo (44 unidades de masa) menos que el valor teórico para el péptido 1-40 completamente carboxilado (teórico = 5190,4 unidades de masa). El factor VIIa derivado de plasma fue adquirido de Enzyme Research Laboratories. El ión M+1 para el péptido 1-40 tenía 5189,8 unidades de masa, igual al dominio Gla completamente carboxilado. Se observó un segundo ión para el producto VIIa recombinante de NOVO correspondiente a los restos 1-32. El ión M+1 para este péptido tenía 4184,6 unidades de masa, igual al valor teórico para el péptido 1-32 completamente carboxilado (teórico = 4185,3 unidades de masa). De este modo, el factor VIIa de tipo salvaje recombinante está seriamente infracarboxilado, con casi toda de ésta expresada en la posición 36. En contraste con este resultado, el mutante Q11E33 del factor VII dio iones M+1 de 5312,8 y 5269,0 en una abundancia aproximadamente igual. El M+1 para este péptido completamente carboxilado es de 5311,4. El segundo pico corresponde a un péptido con un grupo carboxilo menos (~44 unidades de masa). Este resultado demuestra que la incorporación de las mutaciones Q11E33 producía un dominio Gla completamente carboxilado tras la producción en el cultivo de tejidos. Una ventaja del mutante Q11E33 puede surgir de la carboxilación más completa de la posición 36. En resumen, la producción de proteína con un dominio Gla óptimo supone la selección de restos que facilitan la completa carboxilación en el cultivo de tejidos. La selección apropiada de los restos en las posiciones 33-36 parece importante en este aspecto.

OTRAS REALIZACIONES

Se debe entender que si bien la invención ha sido descrita junto con la descripción detallada de la misma, la

descripción precedente está destinada a ilustrar y no a limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> University of Minnesota
- <120> POLIPÉPTIDOS DEPENDIENTES DE VITAMINA K MODIFICADOS
- <130> 09531-016w01
- 5 <140> PCT/US00/11416
<141> 28-04-2000

<150> 09/302,239
<151> 29-04-1999
- 10 <150> 08/955,636
<151> 23-10-1997

<160> 21

<170> FastSEQ para windows versión 4.0
- <210> 1
<211> 44
- 15 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANTE
<222> 6,7,14,16,19,20,25,26,29
- 20 <223> /sustituir="ácido gamma carboxiglutámico"

<400> 1
- ```

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg His Ser Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
Cys Ile Glu Glu Ile Cys Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Gln
 20 25 30
Asn Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His
 35 40

```
- <210> 2  
<211> 44
- 25 <212> PRT  
<213> Bos taurus  
  
<220>  
<221> VARIANTE  
<222> 6,7,14,16,19,20,23,25,26,29,35
- 30 <223> /sustituir="ácido gamma carboxiglutámico"  
  
<400> 2
- ```

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Asn Val Glu Arg Glu
 1          5          10          15
Cys Ser Glu Glu Val Cys Glu Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Gln
          20          25          30
Asn Thr Glu Asp Thr Met Ala Phe Trp Ser Phe Tyr
          35          40
    
```
- <210> 3
<211> 44
- 35 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANTE
<222> 6,7,14,16,19,20,25,26,29,35
- 40 <223> /sustituir="ácido gamma carboxiglutámico"

<400> 3

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20 25 30
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr
 35 40

<210> 4
 <211> 44
 <212> PRT

5 <213> Bos taurus

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6,7,14,16,19,20,25,26,29,34,35
 <223> /sustituir="ácido gamma carboxiglutámico"

10 <400> 4

Ala Asn Gly Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 Cys Arg Glu Glu Leu Cys Ser Phe Glu Glu Ala His Glu Ile Phe Arg
 20 25 30
 Asn Glu Glu Arg Thr Arg Gln Phe Trp Val Ser Tyr
 35 40

<210> 5
 <211> 45
 <212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7,8,15,17,20,21,26,27,30,33,36,40
 <223> /sustituir="ácido gamma carboxiglutámico "

20 <400> 5

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
 20 25 30
 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr
 35 40 45

<210> 6
 <211> 46
 <212> PRT

25 <213> Bos taurus

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7,8,15,17,20,21,26,27,30,33,36,41
 <223> /sustituir="ácido gamma carboxiglutámico"

30 <400> 6

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
 20 25 30
 Glu Asn Thr Glu Lys Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr
 35 40 45

<210> 7
 <211> 36
 <212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

	<220> <223> Oligonucleótido mutagénico de proteína C <400> 7 aaattaatac gactcactat agggagaccc aagctt	36
5	<210> 8 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido mutagénico de proteína C <400> 8 gcactccgc tccaggctgc tgggacggag ctctccagg aa	42
15	<210> 9 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido mutagénico de proteína C <400> 9 acgctccacg ttgccgtgcc gcagctctc taggaa	36
25	<210> 10 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido mutagénico de proteína C <400> 10 ttcctagagg agctgcgga cggcaacgtg gagcgt	36
35	<210> 11 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido mutagénico de proteína C <400> 11 gcatttaggt gacactatag aatagggccc tctaga	36
45	<210> 12 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido mutagénico de proteína C <400> 12 gaaggccatt gtgtcttccg tgtctcgaa aatctcccga gc	42
55	<210> 13 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido mutagénico de proteína C <400> 13 cagtgtgtca tccacatctt cgaaaatttc cttggc	36
55	<210> 14 <211> 36 <212> ADN	

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido mutagénico de proteína C
 <400> 14

5 gccaaggaaa tttcgaaga tgtggtgac aactg 36

<210> 15
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido mutagénico de proteína C
 <400> 15

cagtgtgca tccacat ttt cgaaaatttc ctggc 36

<210> 16
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido mutagénico de proteína C
 <400> 16

20 gccaaggaaa tttcgaaaa tgtggtgac aactg 36

<210> 17
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7,8,15,17,20,21,26,27,30,33
 <223> /sustituir="ácido gamma carboxiglutámico"

30 <400> 17

Ala Asn Lys Gly Phe Leu Glu Glu Val Arg Lys Gly Asn Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Glu Cys Leu Glu Glu Pro Cys Ser Arg Glu Glu Ala Phe Glu Ala Leu
 20 25 30
 Glu Ser Leu Ser Ala Thr Asp Ala Phe Trp Ala Lys Tyr
 35 40 45

<210> 18
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6,7,14,16,19,20,25,26,29,32,35,39
 <223> /sustituir="ácido gamma carboxiglutámico"

40 <400> 18

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Val Lys Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 Cys Leu Glu Glu Ala Cys Ser Leu Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
 20 25 30
 Asp Ala Glu Gln Thr Asp Glu Phe Trp Ser Lys Tyr
 35 40

<210> 19
 <211> 44
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> 6,7,14,16,19,20,25,26,29,32,36

5 <223> /sustituir="ácido gamma carboxiglutámico"

<400> 19

```

Ala Asn Ser Leu Leu Glu Glu Thr Lys Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu
 1      5      10
Cys Ile Glu Glu Leu Cys Asn Lys Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
      20      25      30
Asn Asp Pro Glu Thr Asp Tyr Phe Tyr Pro Lys Tyr
      35      40
    
```

<210> 20

<211> 45

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

<222> 7,8,11,15,17,20,21,26,27,30,33,35,40

15 <223> /sustituir="ácido gamma carboxiglutámico"

<400> 20

```

Ala Gly Ser Tyr Leu Leu Glu Glu Leu Phe Glu Gly Asn Leu Glu Lys
 1      5      10
Glu Cys Tyr Glu Glu Ile Cys Val Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
      20      25      30
Glu Asn Glu Val Val Thr Asp Glu Phe Trp Arg Arg Tyr
      35      40      45
    
```

<210> 21

<211> 45

20 <212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANTE

<222> 7,8,11,15,20,21,26,27,30,33,36,40

25 <223> /sustituir="ácido gamma carboxiglutámico"

<400> 21

```

Ala Gly Ser Tyr Leu Leu Glu Glu Leu Phe Glu Gly His Leu Glu Lys
 1      5      10
Lys Cys Trp Glu Glu Ile Cys Val Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
      20      25      30
Glu Asp Asp Glu Thr Thr Asp Glu Phe Trp Arg Thr Tyr
      35      40      45
    
```

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido del Factor VIIa que comprende un dominio GLA modificado que aumenta la afinidad de unión a la membrana de dicho polipéptido con respecto al correspondiente polipéptido del Factor VIIa nativo, comprendiendo dicho dominio GLA modificado:
- 5 a) una sustitución de aminoácido en la posición 11,
 b) una sustitución de aminoácido en la posición 29,
 c) una sustitución de aminoácido en la posición 33, y
 d) una sustitución de aminoácido en la posición 34;
- donde las posiciones de los aminoácidos del polipéptido del Factor VIIa se numeran de acuerdo con el Factor IX.
- 10 2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho dominio GLA modificado comprende adicionalmente un resto tirosina es insertado en el aminoácido 4.
3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho dominio GLA modificado comprende adicionalmente la sustitución de un resto aminoácido hidrófobo o un resto ácido glutámico en el aminoácido 35.
- 15 4. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, donde el resto aminoácido hidrófobo es un resto fenilalanina, leucina o isoleucina.
5. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, donde un resto glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico, o asparagina es sustituido en el aminoácido 11.
- 20 6. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, donde un resto ácido glutámico es sustituido en el aminoácido 33.
7. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, donde el resto aminoácido hidrófobo es sustituido en el aminoácido 34.
8. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7, donde un resto fenilalanina, leucina o isoleucina es sustituido en el aminoácido 34.
- 25 9. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, donde un resto fenilalanina o ácido glutámico es sustituido en el aminoácido 29.
10. Una molécula de ácido nucleico aislada, comprendiendo dicha molécula una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. Un vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10.
- 30 12. Una célula anfitriona de mamífero que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un portador farmacéuticamente aceptable.
14. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso como medicamento.
- 35 15. El uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para la fabricación de un medicamento pro-coagulante para el tratamiento de los trastornos de la coagulación.
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicho trastorno de la coagulación es la hemofilia A, la hemofilia B o una enfermedad del hígado.

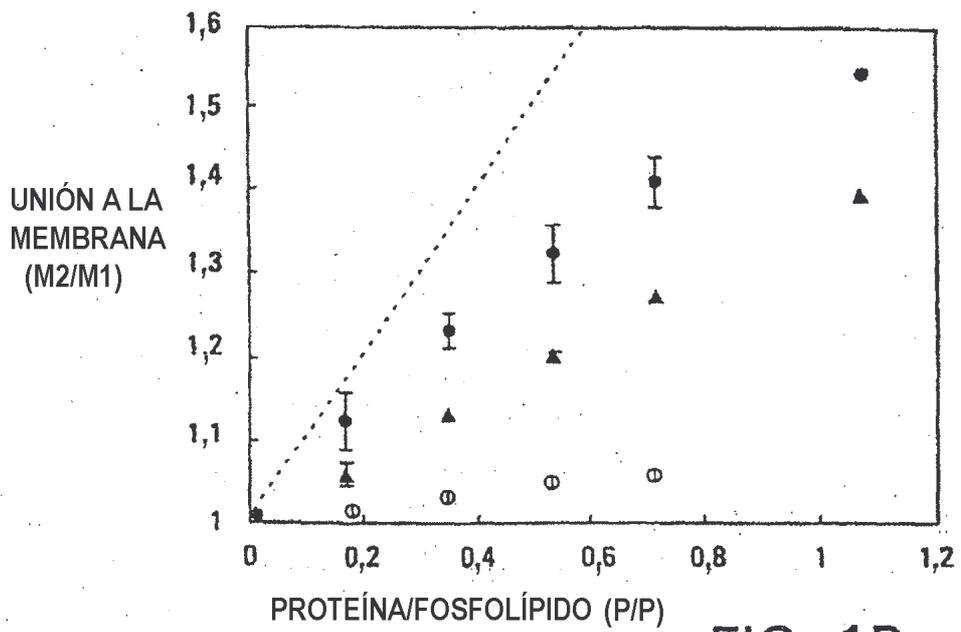
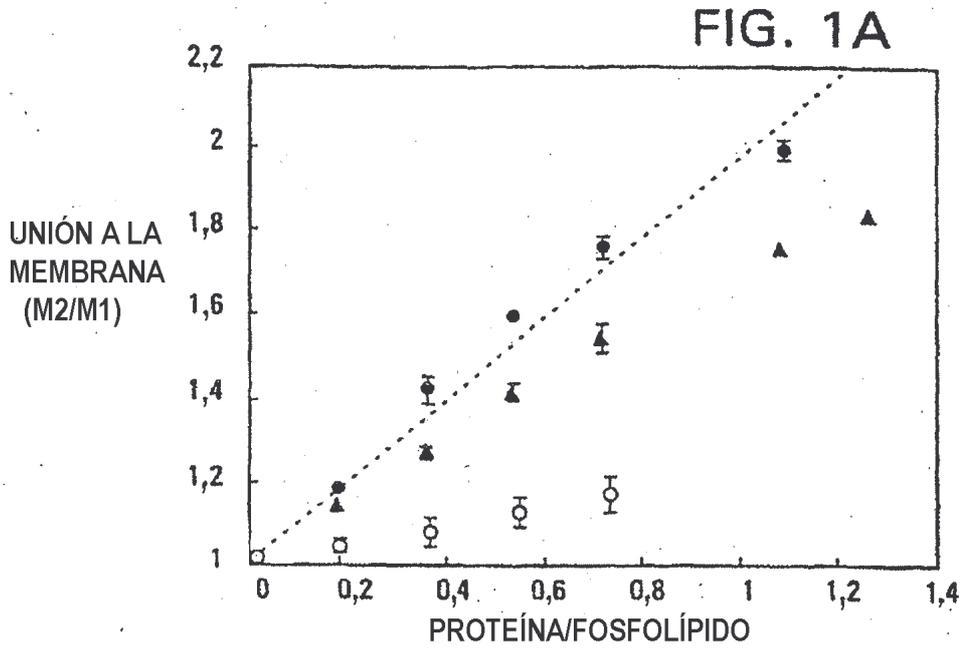


FIG. 1B

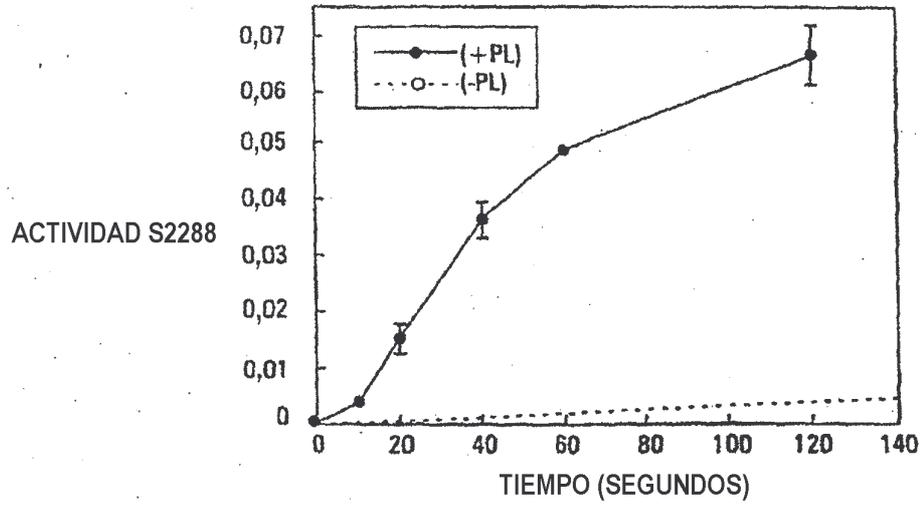


FIG. 2

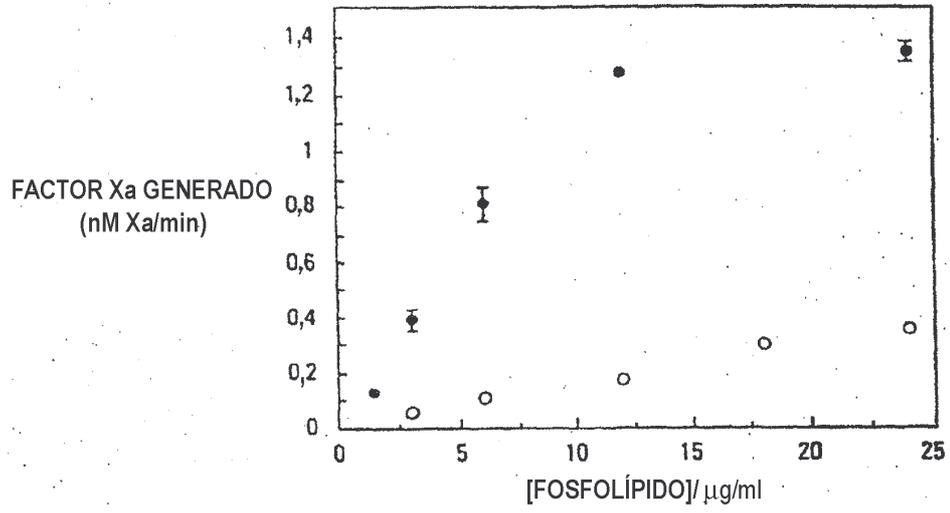
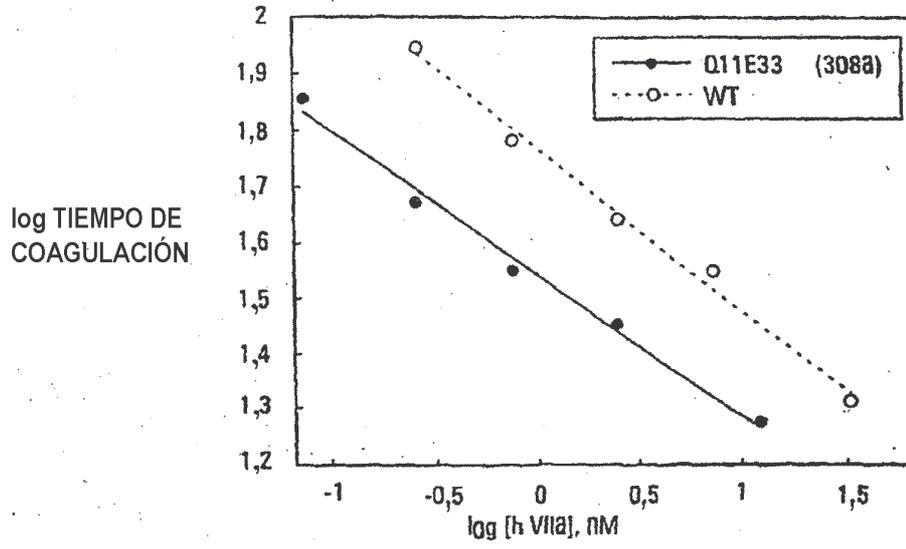


FIG. 3

FIG. 4



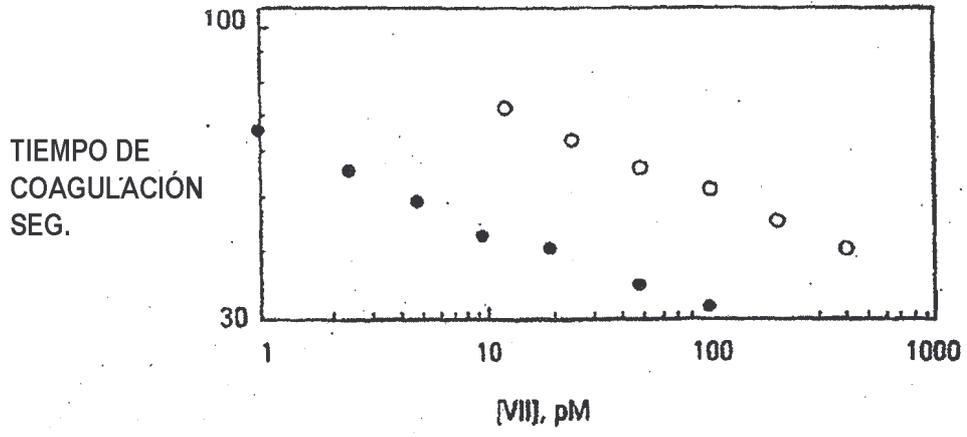


FIG. 5

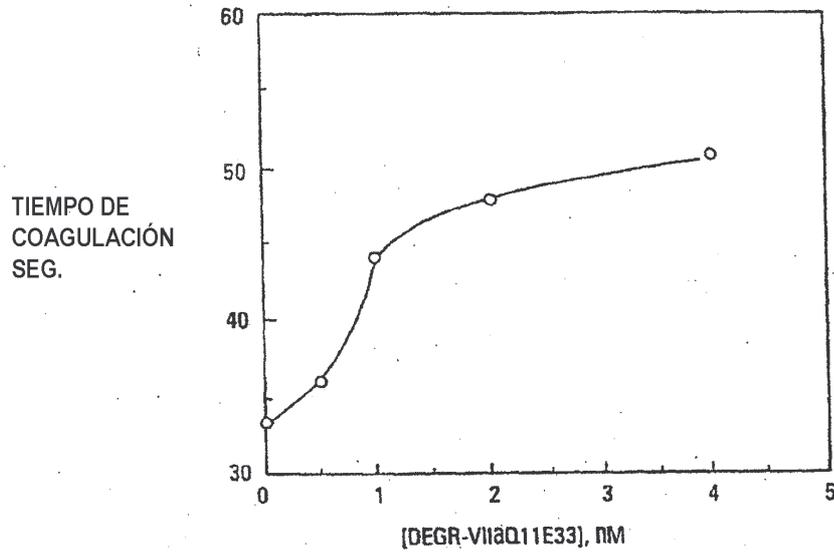


FIG. 6

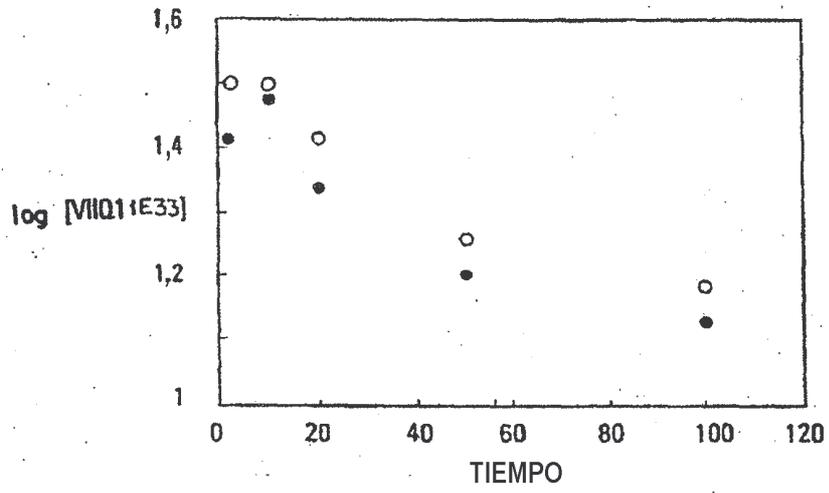


FIG. 7

FIG. 8A

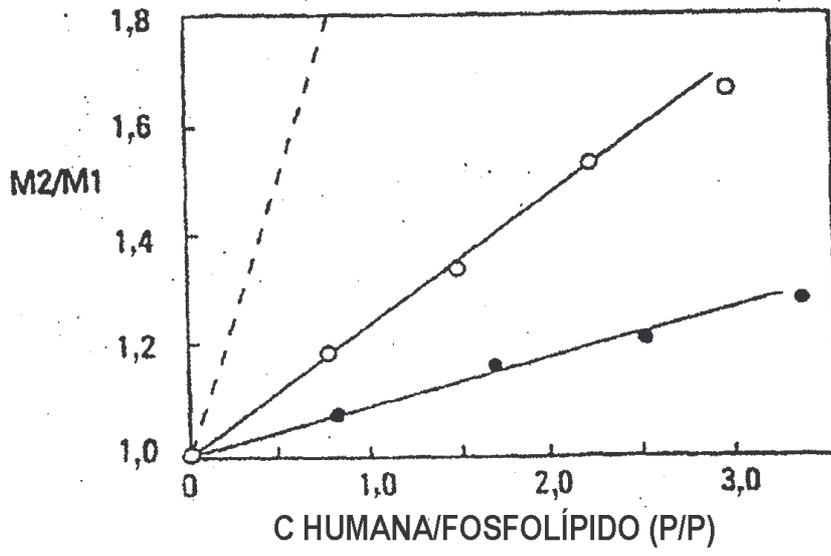
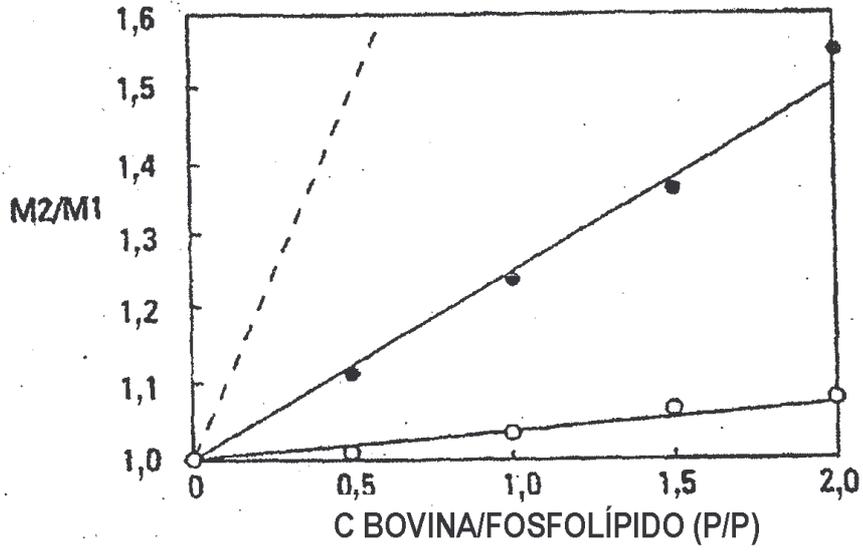


FIG. 8B

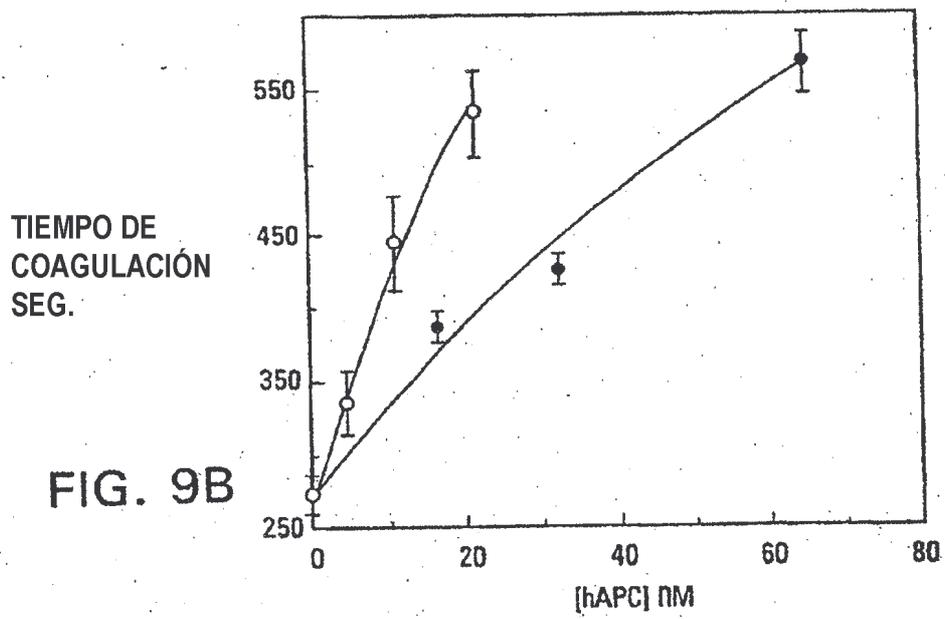
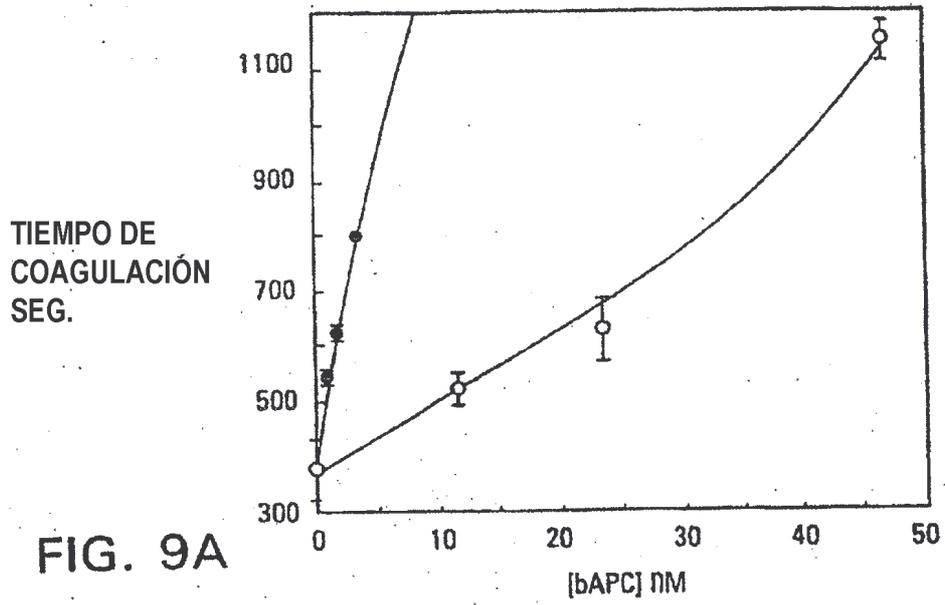


FIG. 10A

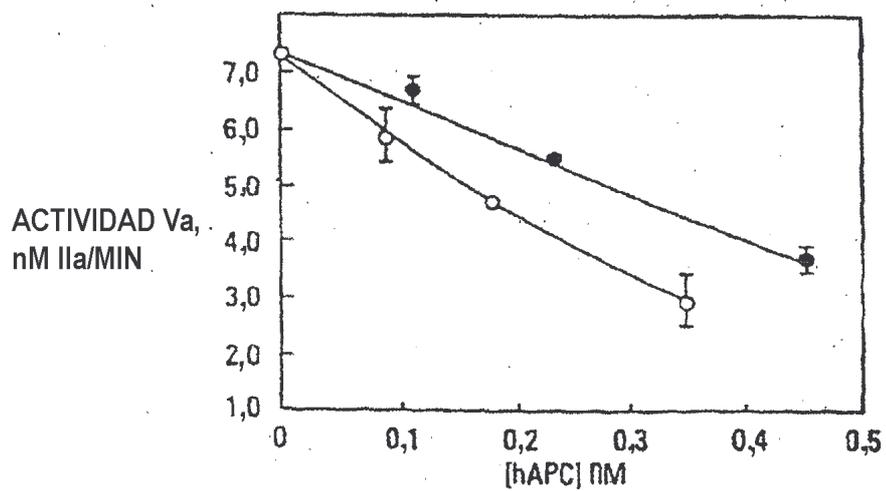
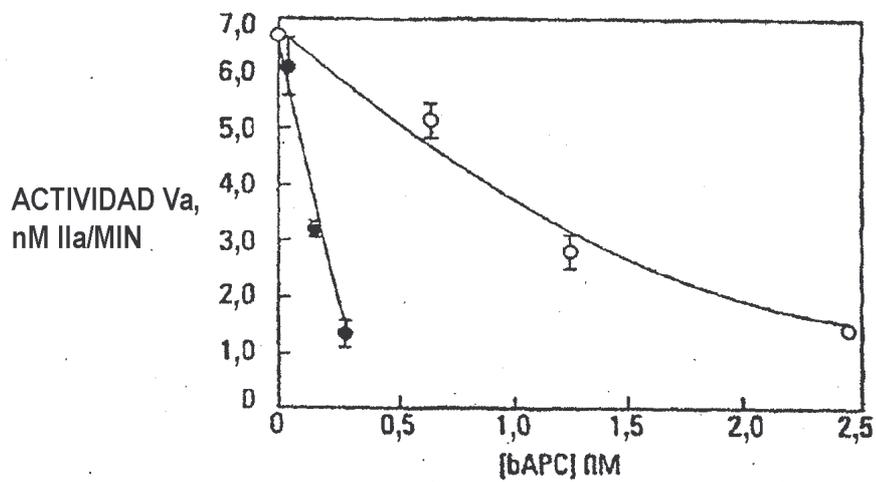
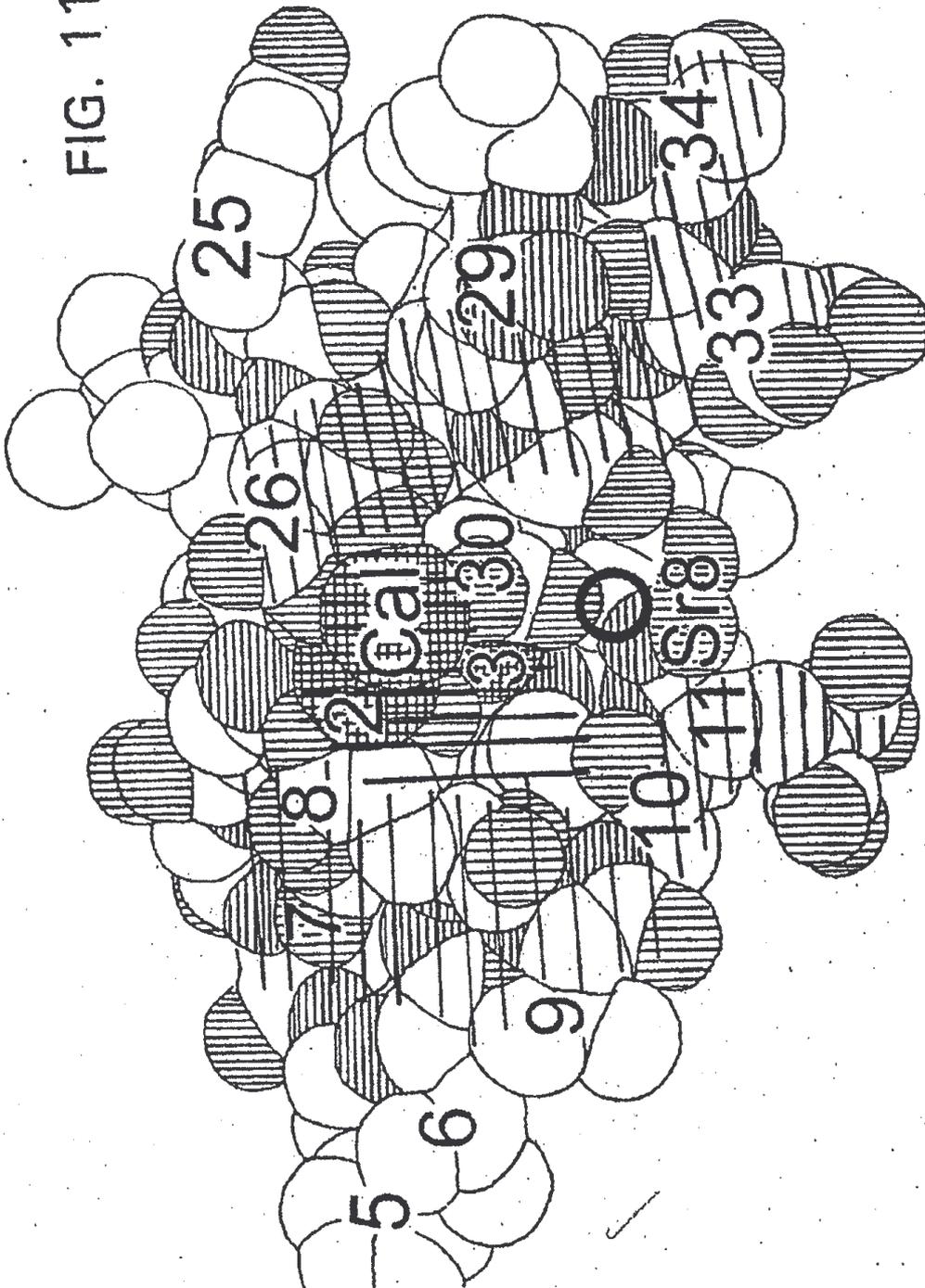


FIG. 10B

FIG. 11



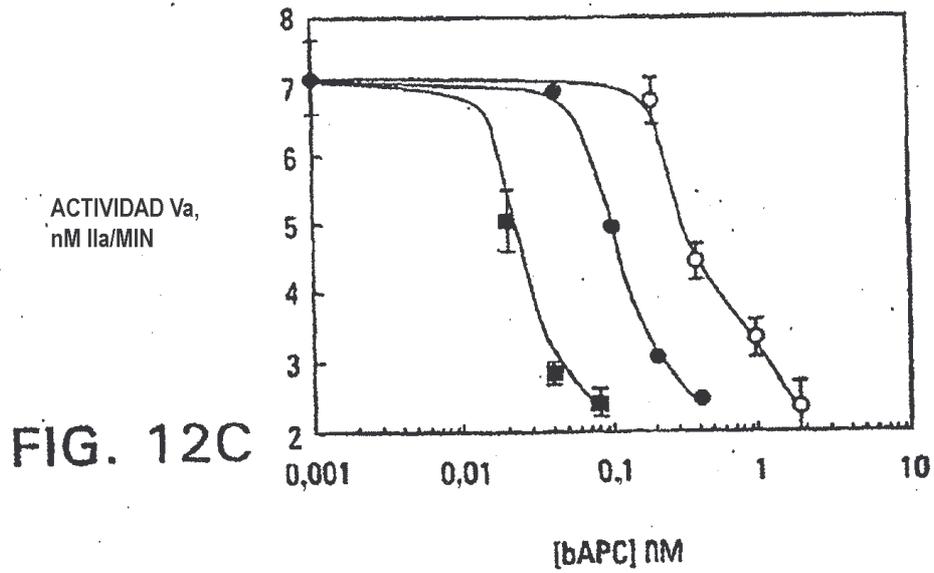
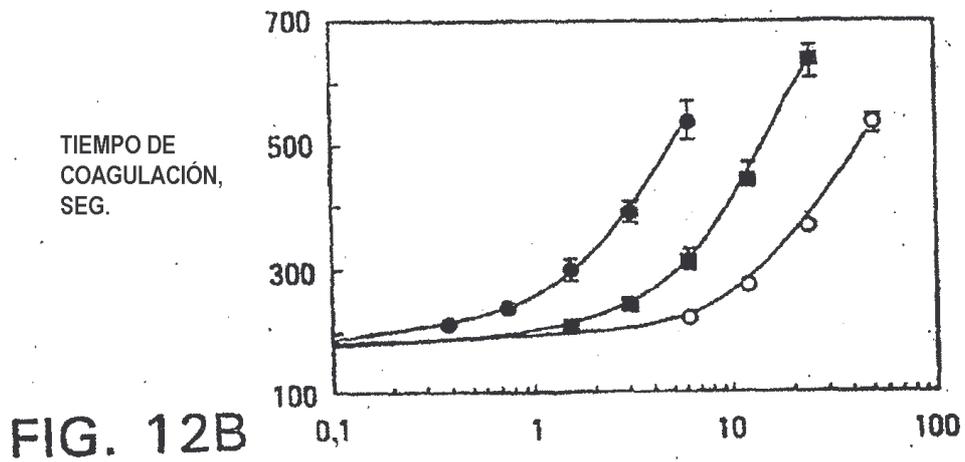
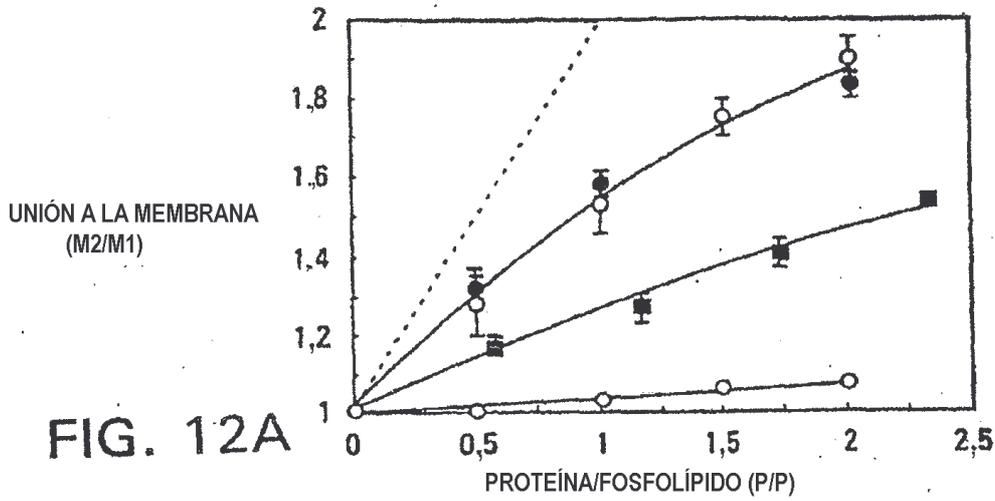
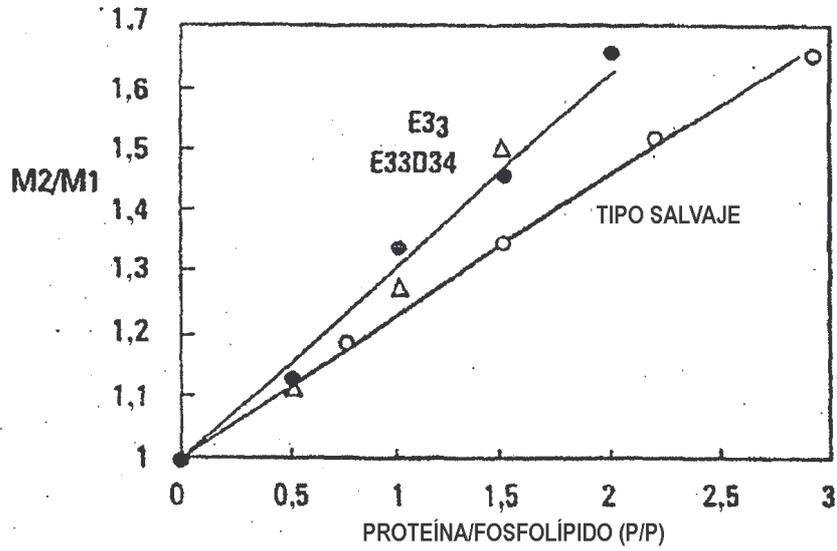


FIG. 13A

FIGURA 1-COMPARACIÓN DE MUTANTES DE PROTEÍNA C HUMANA
UNIÓN A LA MEMBRANA - PROTEÍNA C HUMANA



TIEMPOS DE COAGULACIÓN - APC HUMANA

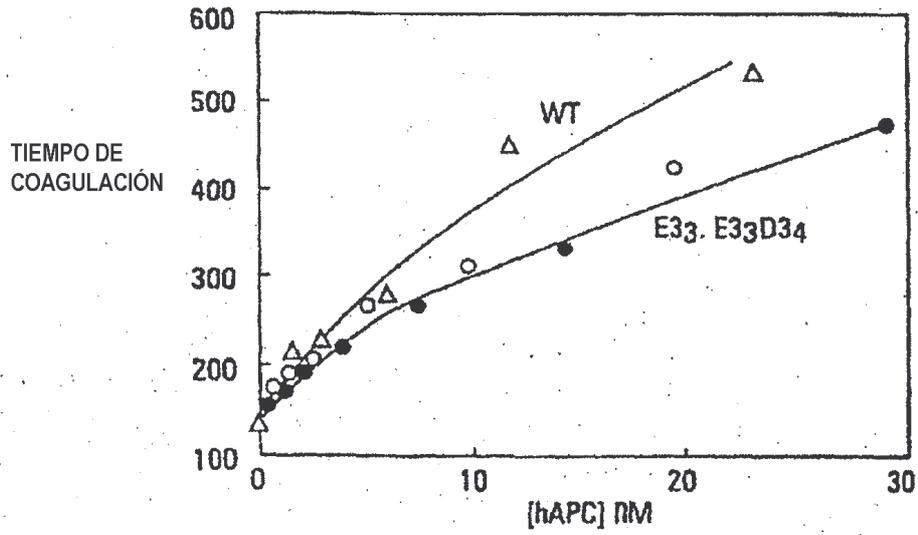
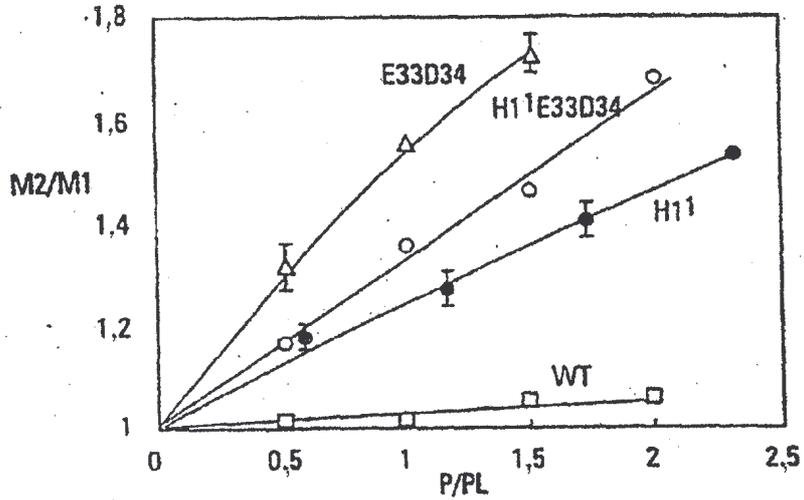


FIG. 13B

FIG. 14A

COMPARACIÓN DE MUTANTE TRIPLE DE PROTEÍNA C BOVINA
UNIÓN A LA MEMBRANA



INHIBICIÓN DE LA COAGULACIÓN

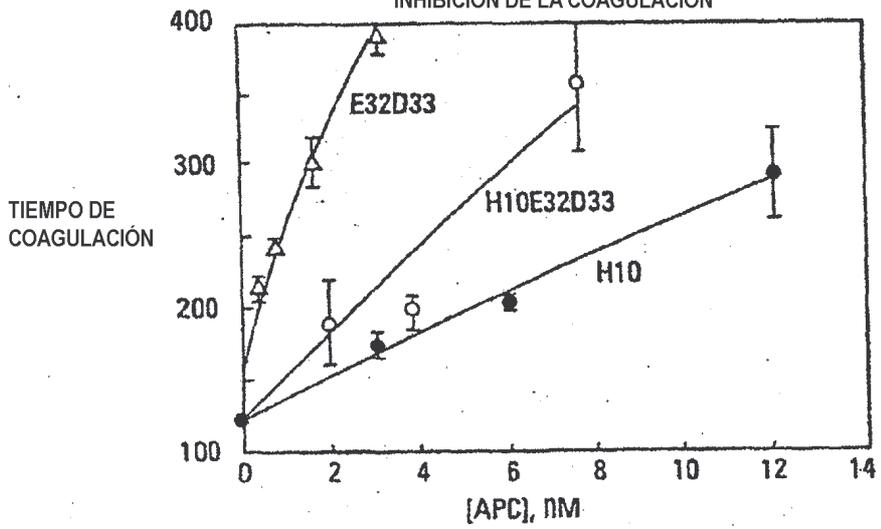


FIG. 14B

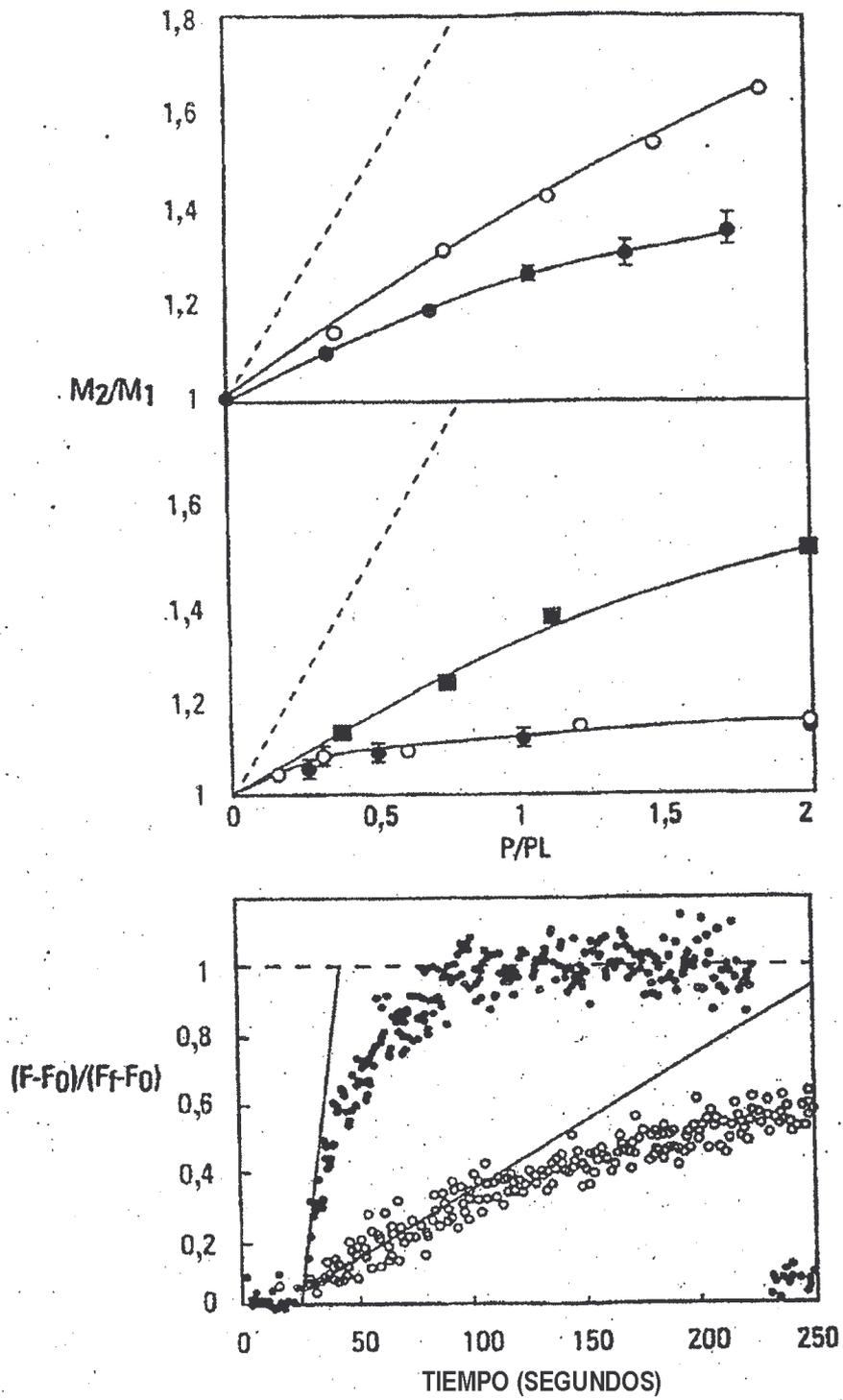


FIG. 15

