

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 694**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02799394 .8**

96 Fecha de presentación: **26.09.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1432794**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.04.2003**

54 Título: **POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR VII DE COAGULACIÓN HUMANO.**

30 Prioridad:
27.09.2001 DK 200101413

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2012

73 Titular/es:
**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG
ANDREASSTRASSE 15
8050 ZÜRICH, CH**

72 Inventor/es:
**PERSSON, Egon y
OLSEN, Ole Hvilsted**

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

ES 2 376 694 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 del factor VII de coagulación humano

5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos del factor VIIa de coagulación humano que tienen actividad coagulante al igual que construcciones de polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, vectores y células huésped, comprendiendo y expresando el polinucleótido, composiciones farmacéuticas, usos y métodos de tratamiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] La coagulación de la sangre es un proceso consistente en una interacción compleja de varios componentes sanguíneos (o factores) que da lugar finalmente a un coágulo de fibrina. Generalmente, los componentes sanguíneos, que participan en lo que se ha referido como la coagulación en "cascada", son proteínas enzimáticamente inactivas (proenzimas o zimógenos) que se convierten en enzimas proteolíticas por la acción de un activador (que por sí mismo es un factor de coagulación activado). Factores de coagulación que han sufrido esta conversión son generalmente referidos como "factores activos", y se designan por la adición de la letra "a" al nombre del factor de coagulación (p. ej. factor VIIa).

20 [0003] La iniciación del proceso hemostático se media por la formación de un complejo entre factor tisular, expuesto como resultado de una lesión de la pared del vaso y factor VIIa. Este complejo luego convierte los factores IX y X en sus formas activas. El factor Xa convierte cantidades limitadas de protrombina en trombina en la célula que contiene factor tisular. La trombina activa las plaquetas y los factores V y VIII en factores Va y VIIIa, ambos cofactores en otro proceso que lleva a la explosión de trombina completa. Este proceso incluye generación de factor Xa por factor IXa (en el complejo con factor VIIIa) y ocurre en la superficie de plaquetas activadas. La trombina convierte finalmente fibrinógeno en fibrina dando como resultado la formación de un coágulo de fibrina. En los últimos años se ha encontrado que el factor VII y el factor tisular son los iniciadores principales de la coagulación sanguínea.

25 [0004] El factor VII es una glicoproteína plasmática de trazo que circula en la sangre como un zimógeno monocatenario. El zimógeno es catalíticamente inactivo. El factor VII monocatenario se puede convertir en factor VIIa bicatenario por factor Xa, factor XIIa, factor IXa, factor VIIa o trombina *in vitro*. Se cree que el factor Xa es el activador fisiológico de factor VII más importante. Como otras proteínas plasmáticas diferentes implicadas en la hemostasis, el factor VII depende de la vitamina K para su actividad, que se requiere para la gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico múltiples que son agrupados cerca del amino terminal de la proteína. Estos ácidos glutámicos gamma-carboxilados se requieren para la interacción inducida por iones de metal del factor VII con fosfolípidos. La conversión del factor VII zimógeno en la molécula bicatenaria activada ocurre por escisión de un enlace peptídico Arg152-Ile153 interno. En presencia de factor tisular, fosfolípidos e iones de calcio, el factor VIIa bicatenario rápidamente activa el factor X o factor IX por proteólisis limitada.

30 [0005] Es deseable frecuentemente estimular o mejorar la coagulación en cascada de un sujeto. El factor VIIa ha sido usado para controlar trastornos de sangrado que tienen diferentes causas, como deficiencias de factor de coagulación (p. ej. hemofilia A y B o deficiencia de factores XI o VII de coagulación) o inhibidores de factor de coagulación. El factor VIIa ha sido usado también para controlar sangrado excesivo que ocurre en sujetos con un funcionamiento normal de la coagulación en cascada de la sangre (sin deficiencias de factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación). Este sangrado puede, por ejemplo, ser provocado por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. El sangrado es también un problema importante en relación con la cirugía y otras formas de daño tisular.

35 [0006] La patente europea n°. 200,421 (ZymoGenetics) se refiere al factor VII humano de codificación de secuencia de nucleótidos y la expresión recombinante del factor VII en células de mamíferos.

40 [0007] Dickinson et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) 93, 14379-14384) se refiere a una variante del factor VII en la que Leu305 ha sido sustituido por Ala (FVII(Ala305)).

45 [0008] Iwanaga et al. (*Thromb. Haemost.* (supplement August 1999), 466, abstract 1474) se refiere a variantes del factor VIIa en las que los residuos 316-320 son eliminados o residuos 311-322 se sustituyen con los residuos correspondientes de tripsina "WO0158935 se refiere a los nuevos conjugados polipeptídicos del factor VII (FVII) o del factor VIIa (FVIIa) que comprenden al menos una molécula no peptídica, al igual que una o más sustituciones de aminoácido, y que puede demostrar una o más de las siguientes características deseables: vida media *in vivo* funcional aumentada, vida media de plasma aumentada, biodisponibilidad aumentada y/o sensibilidad a degradación proteolítica reducida. Person et al. (*Jour. Biol. Chem.* (2001) 276: 29195- 29199) se refiere a variantes polipeptídicas del factor VIIa que contienen sustituciones de aminoácido dentro y en proximidad espacial de la α -hélice (residuos

305, 307-312 y 374). Person et al. (2001) encontraron que la sustitución de valina para leucina 305 en el factor VIIa aumenta la actividad enzimática intrínseca".

[0009] Hay una necesidad de variantes del factor VIIa con actividad coagulante, variantes con actividad alta que se pueden administrar en dosis relativamente bajas y variantes que no producen los efectos secundarios indeseables, como activación sistémica del sistema de coagulación y sangrado, respectivamente, asociados a terapias convencionales.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0010] "Se ha descubierto que las variantes polipeptídicas del factor VIIa de la SEQ ID n°1, donde al menos el aminoácido Leu305 ha sido sustituido con otro aminoácido y donde el aminoácido Lys337 ha sido sustituido con otro aminoácido, han aumentado la actividad coagulante en comparación con el factor VIIa de coagulación humano de tipo salvaje".

[0011] El término "un aminoácido diferente", como se utiliza en este caso, significa un aminoácido que es diferente de aquel aminoácido naturalmente presente en esa posición. Este incluye, pero de forma no limitativa, aminoácidos que se pueden codificar por un polinucleótido. Preferiblemente, el aminoácido diferente está en forma de L natural y se puede codificar por un polinucleótido. Un ejemplo específico es L-cisteína (Cys).

[0012] El término "actividad", como se utiliza en este caso, significa la capacidad de un polipéptido del factor VII para convertir su sustrato de factor X en el factor Xa activo. La actividad de un polipéptido del factor VII se puede medir con el "Ensayo de proteólisis in vitro" (véase ejemplo 6).

[0013] El término "actividad inherente" también incluye la capacidad para generar trombina en la superficie de plaquetas activadas en ausencia de factor tisular.

[0014] El Leu305 se localiza al final de una α -hélice encontrada en la forma compleja de factor tisular del factor VIIa, que se cree que es importante para la actividad. En el Factor VIIa libre (factor VIIa no vinculado al factor tisular) la hélice se distorsiona y así posiblemente se vuelve inestable. Las variantes de polipéptido según la presente invención logran la conformación activa, que normalmente tiene que ser inducida por factor tisular. La actividad aumentada de las variantes polipeptídicas en comparación con factor VIIa de tipo salvaje se puede deber a una estabilización de la α -hélice, una reorientación de la hélice o algún otro cambio en la conformación. Sustitución de Leu305 induce una reorientación y/o estabilización de la hélice.

[0015] Los aminoácidos comprendiendo Lys157; Lys337; Asp334; Ser336; Val158; Glu296 y Met298 se localizan en un área que se cree que afecta a la inserción del amino terminal del dominio de proteasa y así la formación de la conformación catalíticamente activa de factor VIIa que depende de un puente de sal entre el grupo amino terminal de Ile153 y la cadena lateral de Asp343. Las sustituciones pueden eliminar repulsiones electroestáticas, añadir enlaces de hidrógeno o de otra manera facilitar la inserción del amino terminal.

[0016] Debido a la actividad inherente más alta de las variantes polipeptídicas del factor VIIa descritas en comparación con FVIIa nativo, una dosis inferior se puede adecuar para obtener una concentración funcionalmente adecuada en el sitio de acción y así será posible administrar una dosis inferior al sujeto con episodios de sangrado o necesidad de mejora del sistema hemostático normal.

[0017] Se ha descubierto por los presentes inventores que sustituyendo el aminoácido Leu305 en combinación con uno o más de Lys en la posición 157 y Lys en la posición 337 y Val en la posición 158 y Glu en la posición 296 y Met en la posición 298 y Asp en la posición 334 y Ser en la posición 336, el factor VIIa logra espontáneamente una conformación más activa que normalmente tiene que ser inducida por factor tisular. Estas variantes polipeptídicas del factor VIIa muestran una actividad inherente que puede ser terapéuticamente útil en situaciones donde la actividad procoagulante es independiente de factor tisular (generación de factor Xa en la superficie de las plaquetas) como cuando dosis altas de, por ejemplo, NovoSeven® son administradas.

[0018] En otra forma de realización, sustitución adicional de aminoácidos en el dominio de proteasa además facilitan formación de la conformación activa de la molécula. Se cree, no obstante, que los efectos más pronunciados se verán cuando las mutaciones mencionadas anteriormente se llevan a cabo en las proximidades (tridimensional o secuencial) de estos últimos siete aminoácidos.

[0019] La invención comprende además sustitución de unos aminoácidos en el dominio Gla N-terminal (aminoácidos en la posición correspondiente a 1-37 de la SEC ID n°1) del factor VIIa puede proporcionar la proteína con una afinidad sustancialmente más alta para fosfolípidos de membrana, como fosfolípidos de membrana de células que contienen factor tisular o plaquetario, generando así variantes polipeptídicas del factor VII que tienen un efecto procoagulante mejorado.

[0020] Así, las variantes polipeptídicas del factor VIIa mencionadas anteriormente pueden, además de la sustitución ya realizada del aminoácido en la posición 305 en combinación con sustituciones en posiciones 157, 158, 296, 298, 334, 336 o 337 y las sustituciones de aminoácido opcionales en otro lugar en el dominio de proteasa, también tienen al menos un aminoácido sustituido en el dominio Gla N-terminal, obteniendo así una proteína con una actividad aumentada al igual que una afinidad aumentada para fosfolípidos de membrana en comparación con factor VII nativo. Preferiblemente, los aminoácidos en posiciones 10 y 32 (en referencia a SEC ID n°1) del factor VII se pueden sustituir con un aminoácido diferente. Ejemplos de aminoácidos preferidos para ser incorporados en las posiciones mencionadas anteriormente son: el aminoácido Pro en la posición 10 se sustituye por Gln, Arg, His, Gln, Asn o Lys; y/o el aminoácido Lys en la posición 32 se sustituye por Glu, Gln o Asn.

[0021] Otros aminoácidos en el dominio Gla, basados en las afinidades de fosfolípido diferentes y secuencias de las proteínas plasmáticas de vitamina K-dependiente, pueden también ser considerados para sustitución.

[0022] El término "dominio GLA N-terminal" significa la secuencia de aminoácidos 1-37 del factor VII.

[0023] La indicación de tres letras "GLA" significa ácido 4-carboxiglutámico (γ -carboxiglutamato).

[0024] El término "dominio de proteasa" significa la secuencia de aminoácidos 153-406 del factor VII (la cadena pesada del factor VIIa).

[0025] El término "polipéptido del factor VII", como se utiliza en este caso, significa cualquier proteína comprendiendo la secuencia de aminoácidos 1-406 del factor VII humano nativo (SEC ID n°: 1) o variantes de este. Esto incluye, pero de forma no limitativa, factor VII humano, factor VIIa humano y variantes de estos.

[0026] El término "factor VII", como se utiliza en este caso, se entiende que comprende la molécula de factor VII zimógeno monómero inactiva al igual que la molécula del factor VII bicatenario activado (factor VIIa). Esto incluye proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos 1-406 de factor VII humano nativo o factor VIIa. También incluye proteínas con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal modificado incluyendo deleciones o adiciones de aminoácido N-terminal mientras aquellas proteínas retienen sustancialmente la actividad del factor VIIa. El término "factor VIIa" o "FVIIa", como se utiliza en este caso, significa un producto que consiste en la forma activada (factor VIIa). "Factor VIIa" o "factor VII" en la definición anterior también incluyen variantes alélicas naturales que pueden existir y ocurren de un individuo a otro. También, el grado y la ubicación de la glicosilación u otras modificaciones de postraducción pueden variar dependiendo de las células huésped elegidas y la naturaleza del entorno celular huésped.

[0027] Los términos "variantes" o "variante", como se utilizan en este caso, se entiende que designan el factor VII con la secuencia de la SEC ID n°:1, donde uno o más aminoácidos de la proteína progenitora han sido sustituidos por otro aminoácido y/o donde uno o más aminoácidos de la proteína progenitora han sido eliminados y/o donde uno o más aminoácidos han sido insertados en la proteína y/o donde uno o más aminoácidos han sido añadidos a la proteína progenitora. Esta adición puede tener lugar bien en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la proteína progenitora o en ambos. "Variantes" o "variante" dentro de esta definición todavía tienen actividad FVII en su forma activada. En una forma de realización, una variante es 70 % idéntica a la secuencia de la SEC ID n°: 1. En una forma de realización, una variante es 80 % idéntica a la secuencia de la SEC ID n°: 1. En otra forma de realización, una variante es 90 % idéntica a la secuencia de la SEC ID n°: 1. En otra forma de realización, una variante es 95 % idéntica a la secuencia de la SEC ID n°: 1.

[0028] "En otro aspecto, la invención se refiere a construcciones polinucleótidas que codifican variantes polipeptídicas del factor VIIa de la SEC ID n°:1, donde al menos el aminoácido Leu305 ha sido sustituido con otro aminoácido Lys337 que ha sido sustituido con otro aminoácido, y que tienen actividad coagulante aumentada en comparación con factor VIIa de coagulación humano de tipo salvaje".

[0029] El término "construcción" se entiende que indica un segmento polinucleótido que puede basarse en una secuencia de polinucleótidos natural completa o parcial que codifica el polipéptido de interés. La construcción puede contener opcionalmente otros segmentos polinucleótidos. De una manera similar, el término "aminoácidos que son codificados por construcciones polinucleótidas" cubre los aminoácidos que se pueden codificar por las construcciones polinucleótidas definidas anteriormente, es decir, aminoácidos como Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

[0030] En otro aspecto, la invención proporciona un vector recombinante comprendiendo la construcción polinucleótida que codifica un polipéptido del factor VII.

[0031] El término "vector", como se utiliza en este caso, significa cualquier entidad de ácido nucleico capaz de la amplificación en una célula huésped. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el cromosoma(s) en el que ha sido

integrado. La elección del vector dependerá con frecuencia de la célula huésped en la que va a ser introducido. Vectores incluyen, pero de forma no limitativa, vectores plásmidos, vectores fágicos, virus o vectores cósmidos. Los vectores contienen normalmente un origen de replicación y al menos un gen seleccionable, es decir, un gen que codifica un producto que es fácilmente detectable o la presencia del cual es esencial para crecimiento celular.

[0032] En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped recombinante comprendiendo la construcción polinucleótida o el vector. En una forma de realización, la célula huésped recombinante es una célula eucariota. En otra forma de realización, la célula huésped recombinante es de origen mamífero. En otra forma de realización, la célula huésped recombinante es seleccionada del grupo consistente en células CHO, células HEK y células BHK.

[0033] El término "una célula huésped", como se utiliza en este caso, representa cualquier célula, incluyendo células híbridas, en las que ADN heterólogo puede ser expresado. Células huésped típicas incluyen, pero de forma no limitativa, células de insecto, células de levadura, células de mamífero, incluyendo células humanas, como células BHK, CHO, HEK y COS. En la práctica de la presente invención, las células huésped que son cultivadas son preferiblemente células de mamíferos, más preferiblemente, una línea celular de mamífero establecida, incluyendo, sin limitación, líneas celulares CHO (p. ej., ATCC CCL 61), COS-1 (p. ej., ATCC CRL 1650), riñón de cría de hámster (BHK) y HEK293 (p. ej., ATCC CRL 1573 Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977). Una línea celular preferida BHK es la línea de célula BHK tk- ts13 (Waechter y Baserga, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79:1106-1110, 1982), de ahora en adelante referida como células BHK 570. La línea celular BHK 570 está disponible de la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, bajo ATCC número de acceso CRL 10314. Una línea celular BHK tk- ts13 está también disponible de la ATCC bajo número de acceso CRL 1632. Otras líneas celulares adecuadas incluyen, sin limitación, Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9,1) y células DUKX (Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 1980). También son útiles las células 3T3, células Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células.

[0034] En otro aspecto, la invención proporciona un animal transgénico conteniendo y expresando la construcción polinucleótida.

[0035] En otro aspecto, la invención proporciona una planta transgénica conteniendo y expresando la construcción polinucleótida.

[0036] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la producción del polipéptido del factor VII de la invención, el método comprendiendo cultivado de una célula comprendiendo la construcción polinucleótida en un medio de crecimiento apropiado en condiciones que permiten la expresión de la construcción polinucleótida y la recuperación del polipéptido resultante del medio de cultivo.

[0037] Como se utiliza en este caso, el término "medio de crecimiento adecuado" significa un medio con nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido del factor VII de la invención.

[0038] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la producción del polipéptido del factor VII, el método comprendiendo la recuperación del polipéptido de leche producido por el animal transgénico.

[0039] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la producción del polipéptido del factor VII, el método comprendiendo cultivo de una célula de una planta transgénica comprendiendo la construcción polinucleótida y la recuperación del polipéptido de la planta resultante.

[0040] "En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica comprendiendo una variante polipeptídica del factor VIIa de la SEC ID n°:1, donde al menos el aminoácido Leu305 ha sido sustituido por otro aminoácido y donde el aminoácido Lys337 ha sido sustituido por otro aminoácido, y que ha aumentado la actividad coagulante en comparación con el factor VIIa de coagulación humano de tipo salvaje, y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una variante polipeptídica del factor VIIa de la SEC ID n°:1, donde al menos el aminoácido Leu305 ha sido sustituido con otro aminoácido Lys337 ha sido sustituido con otro aminoácido, y que ha aumentado actividad coagulante en comparación con el factor VIIa de coagulación humano de tipo salvaje; para la preparación de un medicamento". En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de trastornos de sangrado o episodios de sangrado o para la mejora del sistema hemostático normal. En una forma de realización, el uso es para el tratamiento de hemofilia A o B.

[0041] En el presente contexto, el término "tratamiento" se entiende que incluye ambas prevención de un sangrado previsto, como en cirugía, y regulación de un sangrado que ya ha ocurrido, como en traumatismo, con el propósito de inhibir o minimizar el sangrado. Administración profiláctica del polipéptido del factor VIIa según la invención se incluye así en el término "tratamiento".

[0042] El término "episodios de sangrado" se entiende que incluye sangrado descontrolado y excesivo. Los episodios de sangrado pueden ser un problema importante ambos en relación con cirugía y otras formas de daño

5 tisular. Sangrado descontrolado y excesivo puede ocurrir en sujetos con un sistema de coagulación normal y sujetos con trastornos de coagulación o de sangrado. Como se utiliza en este caso el término "trastorno de sangrado" refleja cualquier defecto, congénito, adquirido o inducido, de origen molecular o celular que se manifiesta en sangrados. Ejemplos son deficiencias del factor de coagulación (p. ej. hemofilia A y B o deficiencia de factores XI o VII de coagulación), inhibidores de factores de coagulación, función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand.

10 [0043] Sangrados excesivos también ocurren en sujetos con una función normal de la coagulación de la sangre en cascada (sin deficiencias de factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación) y pueden ser causadas por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. En estos casos, los sangrados se pueden comparar a los sangrados provocados por hemofilia debido a que el sistema hemostático, como en la hemofilia, carece de o tiene "componentes" de coagulación esenciales (como plaquetas o proteínas de factor von Willebrand) que causa sangrados importantes. En sujetos que han experimentado daño tisular extensivo en asociación con cirugía o traumatismo extenso, el mecanismo hemostático normal puede saturarse por la demanda de hemostasis inmediata y estos pueden desarrollar sangrado a pesar de un mecanismo hemostático normal. Lograr hemostasis satisfactoria también es un problema cuando los sangrados ocurren en órganos como el cerebro, región del oído interno y ojos con posibilidad limitada de hemostasis quirúrgica. El mismo problema puede surgir en el proceso de tomar biopsias de varios órganos (hígado, pulmón, tejido tumoral, tracto gastrointestinal) al igual que en cirugía laparoscópica. Es común para todas estas situaciones la dificultad de proporcionar hemostasis por técnicas quirúrgicas, (sutura, clips, etc.) que también es el caso cuando el sangrado es difuso (gastritis hemorrágica y sangrado uterino profuso). Sangrados profusos y agudos pueden también ocurrir en sujetos en terapia anticoagulante a los que una hemostasis defectuosa ha sido inducida por la terapia dada. Estas sujetos pueden precisar intervenciones quirúrgicas en el caso en el que el efecto anticoagulante tiene que ser contrarrestado rápidamente. Prostatectomía retropúbica radical es un procedimiento comúnmente realizado en sujetos con cáncer de próstata localizado. La operación se complica frecuentemente por pérdida de sangre significativa y a veces masiva. La pérdida de sangre considerable durante prostatectomía está relacionada principalmente con la situación anatómica complicada, con varios sitios vascularizados densamente que no son accesibles fácilmente para hemostasis quirúrgica, y que pueden suponer sangrado difuso de una área grande. Otra situación que puede causar problemas en el caso de hemostasis insatisfactoria es cuando los sujetos con un mecanismo hemostático normal reciben terapia anticoagulante para prevenir enfermedad tromboembólica. Esta terapia puede incluir heparina, otras formas de proteoglicanos, warfarina u otras formas de antagonistas de vitamina K al igual que aspirina y otros inhibidores de agregación plaquetaria.

35 [0044] En una forma de realización de la invención, el sangrado se asocia con hemofilia. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con hemofilia con inhibidores adquiridos. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con trombocitopenia. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con enfermedad de von Willebrand. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con daño tisular grave. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con traumatismo grave. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con cirugía. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con cirugía laparoscópica. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con gastritis hemorrágica. En otra forma de realización, el sangrado es sangrado uterino profuso. En otra forma de realización, el sangrado se produce en órganos con una posibilidad limitada de hemostasis mecánica. En otra forma de realización, el sangrado se produce en el cerebro, región del oído interno u ojos. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con el proceso de tomar biopsias. En otra forma de realización, el sangrado se asocia con terapia anticoagulante.

45 [0045] El término "sujeto", como se utiliza en este caso, se entiende que significa cualquier animal, en particular mamíferos, como seres humanos, y puede, cuando apropiado, ser usado de forma intercambiable con el término "paciente".

50 [0046] El término "mejora del sistema hemostático normal" significa una mejora de la capacidad para generar trombina.

55 [0047] En otro aspecto, la invención se refiere al polipéptido del factor VII de la invención para uso como medicamento.

[0048] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio de proteasa ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.

60 [0049] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio de proteasa ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.

[0050] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la mayoría de los 20 aminoácidos adicionales en las posiciones restantes en el dominio de proteasa han sido sustituidos por cualquier otro aminoácido.

- [0051] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 159-170 de la SEC ID n°:1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 5 [0052] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 290-304 de la SEC ID n°:1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 10 [0053] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde R304 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Tyr, Phe, Leu y Met.
- [0054] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 306-312 de la SEC ID n°:1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 15 [0055] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde M306 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Asp y Asn.
- [0056] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde D309 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser y Thr.
- 20 [0057] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 330-339 de la SEC ID n°:1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 25 [0058] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde A274 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- [0059] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el A274 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Met, Leu, Lys y Arg.
- 30 [0060] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el K157 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp y Glu.
- [0061] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho K337 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ala, Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp y Glu.
- 35 [0062] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho D334 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gly y Glu.
- 40 [0063] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho S336 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Gly y Glu.
- [0064] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho V158 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser, Thr, Asn, Gln, Asp y Glu.
- 45 [0065] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho E296 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Arg, Lys y Val.
- 50 [0066] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho M298 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Lys, Arg, Gln y Asn.
- [0067] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho L305 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Val, Tyr y Ile.
- 55 [0068] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho L305 ha sido sustituido por Val.
- [0069] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el aminoácido ha sido sustituido por un aminoácido diferente que se puede codificar por construcciones polinucleótidas.
- 60 [0070] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho polipéptido del factor VII es factor VII humano.
- 65

[0071] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho polipéptido del factor VII es factor VIIa humano.

[0072] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 1,25. En una forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 2,0. En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 4,0.

[0073] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 1,25 cuando se evalúa en un ensayo de actividad del factor VIIa. En una forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 2,0 cuando se evalúa en un ensayo de actividad del factor VIIa. En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 4,0 cuando se evalúa en un ensayo de actividad del factor VIIa. La actividad del factor VIIa se puede medir por los ensayos descritos en los ejemplos 5 o 6.

[0074] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 1,25 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro". En una forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 2,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro". En otra forma de realización la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 4,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro".

[0075] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 1,25 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro". En una forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 2,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro". En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 4,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro". En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID n°:1 es al menos de sobre 8,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis in vitro".

[0076] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es L305V/K337A-FVII.

[0077] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es L305V/K337A/V158T-FVII.

[0078] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es L305V/K337A/M298Q-FVII.

[0079] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es L305V/K337A/E296V-FVI.

[0080] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es L305V/K337A/V158D-FVII.

[0081] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII.

[0082] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es L305V/V158T/E296V/K337A-FVII.

[0083] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es L305V/V158D/K337A/M298Q-FVI.

[0084] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es L305V/E296V/M298Q/K337A FVII.

[0085] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es L305V/V158D/E296V/K337A FVII.

[0086] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A- FVII.

[0087] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A- FVII.

[0088] En otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos del factor VIIa de coagulación humano que han aumentado la actividad independiente de factor tisular en comparación con el factor VIIa humano de coagulación nativo. En otro aspecto, la actividad aumentada no está acompañada de cambios en la especificidad del sustrato. En otro aspecto de la invención, la unión de las variantes polipeptídicas para factor tisular debería no ser afectada y las variantes polipeptídicas deberían tener al menos la actividad del factor VIIa de tipo salvaje cuando se unen al factor tisular.

[0089] La terminología para sustituciones de aminoácido usadas en esta descripción son de la siguiente manera. La primera letra representa el aminoácido presente naturalmente en una posición de la SEC ID n°:1. El siguiente número representa la posición en la SEC ID n°: 1. La segunda letra representa la sustitución de aminoácido diferente para el aminoácido natural. Un ejemplo es L305V/K337A-FVII, la leucina en la posición 305 de la SEC ID n°:1 se sustituye por una valina y la lisina en la posición 337 de la SEC ID n°:1 se sustituye por una alanina, ambas mutaciones en la misma variante polipeptídica del factor VII.

[0090] En el presente contexto las indicaciones de tres letras o de una sola letra de los aminoácidos han sido usados en sus significados convencionales como se indica en la tabla 1. A menos que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionados aquí son L-aminoácidos. Además, extremos a la izquierda y o a la derecha de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, los N- y C-terminales a menos que de otra manera se especifique.

Tabla 1: Abreviaturas para los aminoácidos

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

Preparación de variantes polipeptídicas del factor VII

[0091] La invención también se refiere a un método para la preparación de variantes polipeptídicas del factor VII humano como se ha mencionado anteriormente. Las variantes polipeptídicas del factor VII descritas aquí pueden ser producidas por medio de técnicas de ácido nucleico recombinante. En general, una secuencia de ácidos nucleicos del factor VII de tipo salvaje clonado se modifica para codificar la proteína deseada. Esta secuencia modificada se inserta luego en un vector de expresión, que es a su vez transformado o transfectado en células huésped. Células eucariotas mayores, en particular células de mamífero cultivadas, se prefieren como células huésped. El nucleótido completo y secuencias de aminoácidos para el factor VII humano se conocen (véase el documento U.S. 4,784,950, donde la clonación y expresión del factor VII humano recombinante se describen). La secuencia del factor VII bovino se describe en Takeya et al., *J. Biol. Chem.* 263:14868-14872 (1988)).

[0092] Las alteraciones en la secuencia de aminoácidos se pueden realizar por una variedad de técnicas. Modificación en la secuencia de ácidos nucleicos pueden ser por mutagénesis sitio específica. Técnicas para mutagénesis sitio específica se conocen bien en la técnica y son descritas en, por ejemplo, Zoller y Smith (*DNA* 3:479-488, 1984) o en *Splicing by extension overlap*, Horton et al., *Gene* 77, 1989, pp. 61-68. Así, el uso de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del factor VII, puede introducir la alteración(s) de elección. Asimismo, procedimientos para la preparación de una construcción de ADN usando reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos se conocen por expertos en la técnica (cf. *PCR Protocols*, 1990, *Academic Press*, San Diego, California, USA).

[0093] La construcción de ácidos nucleicos que codifican la variante polipeptídica del factor VII de la invención puede adecuadamente ser de origen genómico o de ADNc, por ejemplo, obtenido preparando una genoteca genómica o genoteca de ADNc y seleccionando las secuencias de ADN que codifican todo o parte del polipéptido mediante hibridación usando sondas oligonucleótidas de hibridación sintéticas de acuerdo con técnicas estándar (cf. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

[0094] La construcción de ácidos nucleicos que codifica la variante polipeptídica del factor VII puede también ser preparada sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes et al., *EMBO Journal* 3 (1984), 801 - 805. Según el método de fosfoamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, purificado, hibridado, ligado y clonado en vectores adecuados. Las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas del factor VII humano pueden también ser preparadas por reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en el documento US 4,683,202, Saiki et al., *Science* 239 (1988), 487 - 491, o Sambrook et al., *supra*.

[0095] Además, la construcción de ácidos nucleicos puede ser de origen mezclado genómico y sintético, mezclado sintético y de ADNc o mezclado genómico y de ADNc preparada por fragmentos de ligamento de origen sintético genómico o de ADNc (según corresponda), los fragmentos correspondientes a varias partes de la construcción de ácidos nucleicos entera, de acuerdo con técnicas estándar.

[0096] La construcción de ácidos nucleicos es preferiblemente una construcción de ADN. Secuencias de ADN para uso en la producción de las variantes polipeptídicas del factor VII según la presente invención codifican típicamente un pre-pro polipéptido en el amino-terminal del factor VII para obtener tratamiento apropiado postranslacional (p. ej. gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico) y secreción de la célula huésped. El pre-pro polipéptido puede ser aquel de factor VII u otra proteína plasmática dependiente de vitamina K, tal como Factor IX, Factor X, protrombina, proteína C o proteína S. Como se apreciará por expertos en la técnica, modificaciones adicionales pueden hacerse en la secuencia de aminoácidos de las variantes polipeptídicas del factor VII donde aquellas modificaciones significativamente no afectan a la capacidad de la proteína para hacer de coagulante. Por ejemplo, las variantes polipeptídicas del factor VII pueden también ser modificadas en el sitio de escisión de activación para inhibir la conversión del factor VII zimógeno en su forma bicatenaria activada, como se describe generalmente en el documento US 5,288,629.

[0097] Las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas del factor VII humano son normalmente insertadas en un vector recombinante que puede ser cualquier vector, que puede convenientemente ser sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que va a ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el cromosoma(s) en el que ha sido integrado.

[0098] El vector es preferiblemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica las variantes polipeptídicas del factor VII humano es unido operativamente a segmentos adicionales requeridos para transcripción del ADN. En general, el vector de expresión se deriva de ADN plásmido o vírico, o puede contener elementos de ambos. El término "unido operativamente" indica que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan de acuerdo con sus fines previstos, por ejemplo, la transcripción se inicia en un promotor y procede a través de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido.

[0099] Vectores de expresión para uso en las variantes polipeptídicas del factor VIIa de expresión comprenderán un promotor capaz de dirigir la transcripción de un gen clonado o ADNc. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se puede derivar de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula huésped.

[0100] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica la variante polipeptídica del VII humano en células de mamífero son el promotor SV40 (Subramani et al., *Mol. Cell Biol.* 1 (1981), 854 -864), el promotor MT-1 (gen de metalotioneína) (Palmiter et al., *Science* 222 (1983), 809 - 814), el promotor CMV (Boshart

et al., *Cell* 41:521-530, 1985) o el promotor tardío más importante de adenovirus 2 (Kaufman and Sharp, *Mol. Cell. Biol.*, 2:1304-1319, 1982).

[0101] Un ejemplo de un promotor adecuado para uso en células de insecto es el promotor de polihedrina (US 4,745,051 ; Vasuvedan et al., *FEBS Lett.* 311, (1992) 7 - 11), el promotor P10 (J.J.M. Vlak et al., *J. Gen. Virology* 69, 1988, pp. 765-776), el promotor de proteína básica de virus de poliedrosis de *Autographa californica* (EP 397 485), el promotor 1 de gen temprano inmediato de baculovirus 1 (US 5,155,037; US 5,162,222), o el promotor de gen temprano tardío de baculovirus 39K (US 5,155,037; US 5,162,222).

[0102] Ejemplos de promotores adecuados para uso en las células de huésped de levadura incluyen promotores de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 12073 - 12080 ; Alber and Kawasaki, *J. Mol. Appl. Gen.* 1 (1982), 419 - 434) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young et al., in *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals* (Hollaender et al, eds.), Plenum Press, New York, 1982), o los promotores TPI1 (US 4,599,311) o ADH2-4c (ADH2-4c (Russell et al., *Nature* 304 (1983), 652 - 654).

[0103] Ejemplos de promotores adecuados para uso en células huésped de hongo filamentoso son, por ejemplo, el promotor ADH3 (McKnight et al., *The EMBO J.* 4 (1985), 2093 - 2099) o el promotor *tpiA*. Ejemplos de otros promotores útiles son aquellos derivados del gen que codifica TAKA amilasa de *A. oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, α -amilasa neutra de *A. niger*, α -amilasa ácido estable de *A. niger*, glucoamilasa de *A. niger* o de *A. awamori* (*gluA*), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosafosfato isomerasa de *A. oryzae* o acetamidasa de *A. nidulans*. Preferidos son los promotores de la TAKA amilasa y la *gluA*. Promotores adecuados son mencionados en, por ejemplo, EP 238 023 y EP 383 779.

[0104] Las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas del factor VII humano pueden también, si es necesario, conectarse operativamente a una terminación adecuada, como la terminación de hormona de crecimiento humana (Palmiter et al., *Science* 222, 1983, pp. 809-814) o los terminadores TPI1 (Alber and Kawasaki, *J. Mol. Appl. Gen.* 1, 1982, pp. 419-434) o ADH3 (McKnight et al., *The EMBO J.* 4, 1985, pp. 2093-2099). Vectores de expresión pueden contener también un conjunto de sitios de unión de ARN localizados abajo del promotor y arriba del sitio de inserción para la secuencia del factor VII en sí misma. Sitios de unión del ARN preferidos se pueden obtener de adenovirus y/o genes de inmunoglobulina. También contenido en los vectores de expresión está una señal de poliadenilación localizada abajo del sitio de inserción. Señales de poliadenilación particularmente preferidas incluyen la señal de poliadenilación temprana o tardía de SV40 (Kaufman and Sharp, *ibid.*), la señal de poliadenilación de la región 5' del adenovirus, la terminación de gen de hormona de crecimiento humana (DeNoto et al. *Nucl. Acids Res.* 9:3719-3730, 1981) o la señal de poliadenilación del gen del factor VII humano o del gen del factor VII bovino. Los vectores de expresión pueden incluir también una secuencia líder vírica no codificante, como la líder tripartita de adenovirus 2, localizada entre el promotor y el ARN sitios de unión; y secuencias potenciadoras, como el potenciador SV40.

[0105] Para dirigir las variantes polipeptídicas del factor VII humano de la presente invención en la vía secretora de las células huésped, una secuencia de señal secretora (también conocida como una secuencia líder, prepro secuencia o pre secuencia) se puede proporcionar en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas del factor VII humano en el marco de lectura correcto. Secuencias señal secretoras se sitúan comúnmente 5' a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser que, normalmente asociada a la proteína o puede ser de un gen que codifica otra proteína segregada.

[0106] Para la secreción de células de levadura, la secuencia señal secretora puede codificar cualquier péptido señal, que asegura la dirección eficaz de las variantes polipeptídicas del factor VII humano expresado en la vía secretora de la célula. El péptido señal puede ser péptido señal producido de forma natural, o una parte funcional de este, o este puede ser un péptido sintético. Péptidos señal adecuados se ha encontrado que son el péptido de señal α -factor (cf. US 4,870,008), el péptido de señal de amilasa salival de ratón (cf. O. Hagenbuchle et al., *Nature* 289, 1981, pp. 643-646), un péptido de señal de carboxipeptidasa modificada (cf. L.A. Valls et al., *Cell* 48, 1987, pp. 887-897), el péptido de señal BAR1 de levadura (cf. WO 87/02670), o el péptido de señal de la proteasa aspártica de levadura 3 (YAP3) (cf. M. Egel-Mitani et al., *Yeast* 6, 1990, pp. 127-137).

[0107] Para una secreción eficaz en levadura, una secuencia que codifica un péptido líder puede también ser insertada abajo de la secuencia señal y arriba de la secuencia de ADN que codifica las variantes polipeptídicas del factor VII humano. La función del péptido líder es la de permitir al péptido expresado ser dirigido del retículo endoplasmático al aparato de Golgi y además a una vesícula secretora para secreción en el medio de cultivo (es decir, exportación de las variantes polipeptídicas del factor VII humano a través de la pared celular o al menos a través de la membrana celular en el espacio periplásmico de la célula de levadura). El péptido líder puede ser el alfa-factor líder de levadura (el uso del cual se describe en, por ejemplo, US 4,546,082, US 4,870,008, EP 16 201, EP 123 294, EP 123 544 y EP 163 529). Alternativamente, el péptido líder puede ser un péptido líder sintético, es decir, un péptido líder que no se encuentra en la naturaleza. Péptidos líder sintéticos pueden, por ejemplo, ser construidos como se describe en WO 89/02463 o WO 92/11378.

[0108] Para uso en hongos filamentosos, el péptido señal puede convenientemente derivar de un gen que codifica una amilasa o proteasa de *Aspergillus sp.*, un gen que codifica una lipasa o proteasa de *Rhizomucor miehei* o una lipasa *Humicola lanuginosa*. El péptido señal se deriva preferiblemente de un gen que codifica una TAKA amilasa de *A. oryzae*, α -amilasa neutra de *A. niger*, amilasa ácido estable de *A. niger*, o *A. niger*glucoamilasa. Péptidos de señal adecuados son descritos en, por ejemplo, los documentos EP 238 023 y EP 215 594.

[0109] Para uso en las células de insecto, el péptido señal puede derivarse convenientemente de un gen de insecto (cf. WO 90/05783), tal como el péptido de señal de precursor de hormona adipocinética del lepidóptero *Manduca sexta* (cf. US 5,023,328).

[0110] Los procedimientos usados para unir las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas del factor VII humano, el promotor y opcionalmente la terminación y/o secuencia secretora señal, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados con la información necesaria para replicación, se conocen por expertos en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

[0111] Métodos de transfección de células de mamífero y secuencias de ADN de expresión introducidas en las células se describen en, por ejemplo, Kaufman and Sharp, *J. Mol. Biol.* 159 (1982), 601 - 621 ; Southern and Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982), 327 - 341 ; Loyter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), 422 - 426 ; Wigler et al., *Cell* 14 (1978), 725; Corsaro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7 (1981), 603 , Graham and van der Eb, *Virology* 52 (1973), 456 ; and Neumann et al., *EMBO J.* 1 (1982), 841 - 845.

[0112] Secuencias de ADN clonadas se introducen en células de mamífero cultivadas por, por ejemplo, transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler et al., *Cell* 14:725-732, 1978 ; Corsaro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603-616, 1981 ; Graham and Van der Eb, *Virology* 52d:456-467, 1973) o electroporación (Neumann et al., *EMBO J.* 1:841-845, 1982). Para identificar y seleccionar células que expresan el ADN exógeno, un gen que confiere un fenotipo seleccionable (un marcador seleccionable) es generalmente introducido en las células junto con el gen o ADNc de interés. Marcadores seleccionables preferidos incluyen genes que confieren resistencia a fármacos como neomicina, higromicina y metotrexato. El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Un marcador seleccionable amplificable preferido es una secuencia de dihidrofolato-reductasa (DHFR). Marcadores seleccionables son evaluados por Tilli (Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA. El experto en la técnica fácilmente será capaz de elegir marcadores seleccionables adecuados.

[0113] Marcadores seleccionables se pueden introducir en la célula en un plásmido separado al mismo tiempo que el gen de interés, o se pueden introducir en el mismo plásmido. Si, en el mismo plásmido, el marcador seleccionable y el gen de interés puede estar bajo el control de diferentes promotores o el mismo promotor, esta última disposición produce un mensaje bicistrónico. Construcciones de este tipo se conocen en la técnica (por ejemplo, Levinson and Simonsen, U.S. 4,713,339). Puede también ser ventajoso añadir ADN adicional, conocido como "portador de DNA," a la mezcla que se introduce en las células.

[0114] Después de que las células han absorbido el ADN, crecen en un medio de crecimiento apropiado, típicamente de 1-2 días, para iniciar la expresión el gen de interés. Como se utiliza en este caso, el término "medio de crecimiento apropiado" significa un medio con nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión de las variantes polipeptídicas del factor VII humano de interés. Medios generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, azúcares esenciales, vitaminas, sales, fosfolípidos, proteína y factores de crecimiento. Para la producción de proteínas gamma-carboxiladas, el medio contendrá vitamina K, preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a sobre 5 $\mu\text{g/ml}$. La selección de fármaco se aplica luego para seleccionar el crecimiento de células que están expresando el marcador seleccionable en una forma estable. Para células que han sido transfectadas con un marcador seleccionable amplificable, la concentración de fármaco se puede aumentar para seleccionar un número de copias aumentado de las secuencias clonadas, aumentando así los niveles de expresión. Clones de células transfectadas estables son luego seleccionados para expresión de la variante polipeptídica del factor VII humano de interés.

[0115] La célula huésped en la que las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas del factor VII humano es introducida puede ser cualquier célula, que es capaz de producir las variantes polipeptídicas del factor VII humano postranslacional modificado e incluye levadura, hongos y células eucariotas superiores.

[0116] Ejemplos de líneas celulares de mamíferos para uso en la presente invención son las líneas celulares COS-1 (ATCC CRL 1650), riñón de cría de hámster (BHK) y 293 (ATCC CRL 1573; Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977). Una línea celular preferida BHK es la línea celular BHK tk⁻ ts13 (*Waechter and Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1106-1110, 1982), de ahora en adelante referida como células BHK 570. La línea celular BHK 570 ha sido depositada con la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852, bajo ATCC número de acceso CRL 10314. Una línea celular BHK tk⁻ ts13 está también disponible de la ATCC bajo número de acceso CRL 1632. Además, varias otras líneas celulares se pueden utilizar en la presente invención, incluyendo Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139),

pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 61) y células DUKX (Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 1980).

[0117] Ejemplos de células de levaduras adecuadas incluyen células de *Saccharomyces spp.* o *Schizosaccharomyces spp.*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces kluyveri*. Métodos para la transformación de células de levadura con ADN heterólogo y polipéptidos heterólogos se describen, por ejemplo, en los documentos US 4,599,311, US 4,931,373, US 4,870,008, 5,037,743, y US 4,845,075. Células transformadas se seleccionan por un fenotipo determinado por un marcador seleccionable, comúnmente resistencia a fármaco o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente particular, por ejemplo, leucina. Un vector preferido para uso en la levadura es el vector POT1 descrito en el documento US 4,931,373. Las secuencias de ADN que codifican las variantes polipeptídicas del factor VII humano se pueden preceder por una secuencia de señal y opcionalmente una secuencia líder, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Además ejemplos de células de levadura adecuadas son cepas de *Kluyveromyces*, como *K. lactis*, *Hansenula*, por ejemplo, *H. polymorfa*, o *Pichia*, por ejemplo, *P. pastoris* (cf. Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* 132, 1986, pp. 3459-3465 ; US 4,882,279).

[0118] Ejemplos de otra células fúngicas son células de hongos filamentosos, por ejemplo, *Aspergillus spp.*, *Neurospora spp.*, *Fusarium spp.* o *Trichoderma spp.*, en particular, cepas de *A. oryzae*, *A. nidulans* o *A. niger*. El uso de *Aspergillus spp.* para la expresión de proteínas se describe en, por ejemplo, EP 272 277, EP 238 023, EP 184 438. La transformación de *F. oxysporum* puede, por ejemplo, efectuarse como se describe por Malardier et al., 1989, *Gene* 78: 147-156. La transformación de *Trichoderma spp.* se puede realizar, por ejemplo, como se describe en EP 244 234.

[0119] Cuando un hongo filamentosos se usa como la célula huésped, se puede transformar con la construcción de ADN de la invención, convenientemente integrando la construcción de ADN en el cromosoma huésped para obtener una célula huésped recombinante. Esta integración se considera generalmente que es una ventaja, ya que la secuencia de ADN es más posible que sea estable mantenida en la célula. La integración de las construcciones de ADN en el cromosoma huésped se puede realizar según métodos convencionales, por ejemplo, por recombinación homóloga o heteróloga.

[0120] La transformación de células de insecto y producción de polipéptidos heterólogos en estos se pueden realizar como se describe en los documentos US 4,745,051; US 4,879,236; US 5,155,037; 5,162,222; EP 397,485. La línea celular de insecto usado como el huésped puede adecuadamente ser una línea celular *Lepidoptera*, como células de *Spodoptera frugiperda* o células de *Trichoplusia ni* (cf. US 5,077,214). Las condiciones de cultivo pueden ser adecuadamente como se describe en, por ejemplo, WO 89/01029 o WO 89/01028, o cualquiera de las referencias mencionadas.

[0121] La célula huésped transformada o transfectada anteriormente descrita es luego cultivada en un medio nutritivo adecuado en condiciones que permiten expresión de la variante polipeptídica del factor VII humano después de la cual todo o parte del péptido resultante puede ser recuperado del cultivo. El medio usado para el cultivo de las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huésped, como medios mínimos o complejos con suplementos apropiados. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej. en catálogos de la American Type Culture Collection). La variante polipeptídica del factor VII humano producido por las células puede recuperarse luego del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo separación de las células huésped del medio por centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteico acuosos del sobrenadante o filtrado por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de gelfiltración, cromatografía de afinidad, o similares, dependiendo en el tipo de polipéptido en cuestión.

[0122] Tecnología animal transgénica se puede emplear para producir las variantes polipeptídicas del factor VII de la invención. Se prefiere producir las proteínas en las glándulas mamarias de un mamífero femenino huésped. Expresión en la glándula mamaria y secreción posterior de la proteína de interés en la leche supera muchas dificultades encontradas en proteínas aisladas de otras fuentes. La leche se recoge fácilmente, disponible en cantidades grandes, y bioquímicamente bien caracterizada. Además, las proteínas de la leche importantes están presentes en la leche en concentraciones altas (típicamente de sobre 1 a 15 g/l).

[0123] Desde un punto de vista comercial, se prefiere claramente usar como el huésped una especie que tiene una gran producción de leche. Mientras animales más pequeños como ratones y ratas pueden usarse (y se prefieren para la comprobación de fase de principio), se prefiere usar mamíferos de ganado incluyendo, pero no limitado a, cerdos, cabras, ganado vacuno. Las ovejas se prefieren particularmente debido a factores como la historia precedente de transgénesis en estas especies, producción de leche, coste y la disponibilidad de equipamiento preparado para recolectar leche de oveja (véase, por ejemplo, el documento WO 88/00239 para una comparación de factores que influyen en la elección de especie huésped). Es generalmente deseable para seleccionar una variedad de animal huésped que ha sido criado para uso lácteo, como oveja de Frisia oriental, o para introducir materia prima láctea cultivando la línea transgénica en una fecha posterior. De cualquier manera, animales de estado de salud bueno conocido deberían usarse.

[0124] Para obtener expresión en la glándula mamaria, un promotor de transcripción de un gen de proteínas de la leche se usa. Genes de proteína de la leche incluyen aquellas caseínas que codifican genes (ver U.S. 5,304,489), beta-lactoglobulina, a-lactoalbúmina y proteína ácida del lactosuero. El promotor de beta-lactoglobulina (BLG) se prefiere. En el caso del gen de la beta-lactoglobulina ovina, una región de al menos el proximal 406 pb de la secuencia flanqueante 5' del gen se usará generalmente, aunque partes más grandes de la secuencia flanqueante 5', hasta sobre 5 kbp, se prefieren, como un segmento de ADN -4,25 kbp que abarca el promotor flanqueante 5' y parte no codificante del gen de la beta-lactoglobulina (ver Whitelaw et al., *Biochem. J.* 286: 31-39 (1992)). Fragmentos similares de promotor de ADN de otras especies son también adecuados.

[0125] Otras regiones del gen de la beta-lactoglobulina pueden también ser incorporadas en construcciones, como pueden ser expresadas regiones genómicas del gen. Se acepta generalmente en la técnica que intrones carentes de construcciones, por ejemplo, que se expresan pobremente en comparación con aquellos que contienen tales secuencias de ADN (ver Brinster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 836-840 (1988) ; Palmiter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 478-482 (1991) ; Whitelaw et al., *Transgenic Res.* 1: 3-13 (1991) ; WO 89/01343 ; and WO 91/02318). A este respecto, se prefiere generalmente, cuando es posible, usar secuencias genómicas con todos o algunos de los intrones nativos de un gen que codifica la proteína o polipéptido de interés, así la inclusión adicional de al menos algunos intrones de, p. ej, el gen de la beta-lactoglobulina, se prefiere. Esta región es un segmento de ADN que proporciona para eliminación de intrones y poliadenilación del ARN desde la región no codificante 3' del gen de la beta-lactoglobulina ovina. Cuando se sustituye por secuencias 3' no codificantes naturales de un gen, este segmento de beta-lactoglobulina ovina puede mejorar y estabilizar los niveles de expresión de la proteína o polipéptido de interés. Dentro de otras formas de realización, la región circundante de la iniciación ATG de la secuencia del factor VII variante se sustituye con secuencias correspondientes de un gen de proteína de la leche específica. Esta sustitución proporciona un entorno de iniciación específica tisular putativa para mejorar expresión. Es conveniente reemplazar la variante del factor VII pre-pro entera y las secuencias no codificantes 5' con aquellas de, por ejemplo, el gen BLG, aunque regiones más pequeñas pueden ser sustituidas.

[0126] Para la expresión de variantes polipeptídicas del factor VII en animales transgénicos, un segmento de ADN que codifica la variante del factor VII se une operativamente a segmentos de ADN adicionales requeridos por su expresión para producir unidades de expresión. Estos segmentos adicionales incluyen el promotor mencionado anteriormente, al igual que secuencias que proveen a la terminación de transcripción y poliadenilación del ARNm. Las unidades de expresión además incluirán un segmento de ADN que codifica una secuencia de señal secretora operativamente unida al segmento que codifica al factor VII modificado. La secuencia de señal secretora puede ser una secuencia de señal secretora del VII nativo o puede ser de otra proteína, como una proteína de la leche (ver, por ejemplo, von Heijne, *Nucl. Acids Res.* 14: 4683-4690 (1986) ; y Meade et al., U.S. 4,873,316).

[0127] Construcción de unidades de expresión para uso en animales transgénicos se realiza convenientemente por inserción de una secuencia de la variante del factor VII en un plásmido o fago vector conteniendo los segmentos de ADN adicionales, aunque la unidad de expresión se puede construir esencialmente por cualquier secuencia de ligaduras. Es particularmente conveniente para proporcionar un vector conteniendo un segmento de ADN que codifica una proteína de la leche y para reemplazar la secuencia codificante para la proteína de la leche con esa variante del factor VII; creando así un gen de fusión que incluye las secuencias de control de expresión del gen de proteína de la leche. De cualquier manera, la clonación de las unidades de expresión en plásmidos u otros vectores facilita la amplificación de la secuencia de la variante del factor VII. La amplificación se lleva a cabo convenientemente en células huésped bacterianas (p. ej. *E. coli*), así los vectores incluyen típicamente un origen de replicación y un marcador funcional seleccionable en células huésped bacterianas. La unidad de expresión es luego introducida en huevos fertilizados (incluyendo embriones de fase temprana) de las especies de huésped elegidas. La introducción de ADN heterólogo se puede realizar por una de diferentes vías, incluyendo microinyección (p. ej. la patente U.S. n°. 4,873,191), infección retroviral (Jaenisch, *Science* 240: 1468-1474 (1988)) o integración dirigida usando células madre embrionarias (ES) (evaluado por Bradley et al., *Bio/Technology* 10: 534-539 (1992)). Los huevos son luego implantados en los oviductos o úteros de mujeres pseudoembarazadas y se les permite desarrollar hasta término. Descendencia que lleva el ADN introducido en su línea germinal puede pasar el ADN a su progenie en el forma mendeliana normal, permitiendo el desarrollo de manadas transgénicas. Procedimientos generales para la producción de animales transgénicos se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986 ; Simons et al., *Bio/Technology* 6: 179-183 (1988) ; Wall et al., *Biol. Reprod.* 32: 645-651 (1985) ; Buhler et al., *Bio/Technology* 8: 140-143 (1990) ; Ebert et al., *Bio/Technology* 9: 835-838 (1991) ; Krimpenfort et al., *Bio/Technology* 9: 844-847 (1991); Wall et al., *J. Cell. Biochem.* 49: 113-120 (1992) ; U.S. 4,873,191 ; U.S. 4,873,316 ; WO 88/00239 , WO 90/05188 , WO 92/11757 ; y GB 87/00458). Técnicas para la introducción de secuencias de ADN externas en mamíferos y sus células germinales fueron originalmente desarrolladas en el ratón (ver, por ejemplo, Gordon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7380-7384 (1980); Gordon and Ruddle, *Science* 214: 1244- 1246 (1981) ; Palmiter and Brinster, *Cell* 41: 343-345 (1985) ; Brinster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4438-4442 (1985) ; and Hogan et al. (*ibid.*)). Estas técnicas fueron posteriormente adaptadas para uso con animales más grandes, incluyendo especies de ganado (ver, por ejemplo, WO 88/00239, WO 90/05188, y WO 92/11757; y Simons et al., *Bio/Technology* 6: 179- 183 (1988)). Para resumir, en la vía más eficaz usada hasta la fecha en la generación de ratones transgénicos o ganado, varios cientos de moléculas lineales del ADN de interés se inyectan en uno de los

pronúcleos de un huevo fertilizado según técnicas establecidas. Inyección de ADN en el citoplasma de un cigoto puede también emplearse.

5 [0128] Producción en plantas transgénicas puede también emplearse. La expresión puede generalizarse o dirigirse a un órgano particular, como un tubérculo (ver, Hiatt, *Nature* 344:469-479 (1990) ; Edelbaum et al., *J. Interferon Res.* 12:449-453 (1992) ; Sijmons et al., *Bio/Technology* 8:217-221 (1990) ; y EP 0 255 378).

10 [0129] Las variantes polipeptídicas del factor VII de la invención se recuperan del medio de cultivo celular o leche. Las variantes polipeptídicas del factor VII de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico, cromatoenfoco y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparativo (IEF), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), o extracción (ver, por ejemplo, *Protein Purification*, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989). Preferiblemente, se puede purificar por cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpos anti-Factor VII. El uso de anticuerpos calcio-dependientes monoclonales, como se describe por Wakabayashi et al., *J. Biol. Chem.* 261:11097-11108; (1986) and Thim et al., *Biochemistry* 27: 7785-7793, (1988), se prefiere particularmente. Purificación adicional se puede conseguir por medios de purificación químicos convencionales, como cromatografía líquida de alto rendimiento. Otros métodos de purificación, incluyendo precipitación de citrato de bario, se conocen en la técnica, y se pueden aplicar a la purificación de las variantes polipeptídicas del factor VII nuevas descritas aquí (ver, por ejemplo, Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982).

15
20

[0130] Para fines terapéuticos, se prefiere que las variantes polipeptídicas del factor VII de la invención sean substancialmente puras. Así, en una forma de realización preferida de la invención, las variantes polipeptídicas del factor VII de la invención se purifican por lo menos sobre de 90 a 95% de homogeneidad, preferiblemente por lo menos de sobre 98% de homogeneidad. La pureza se puede evaluar, por ejemplo, por electroforesis de gel y secuenciación de aminoácido aminoterminal.

25

[0131] La variante del factor VII se divide en su sitio de activación para convertirse a su forma bicatenaria. La activación se puede llevar a cabo según procedimientos conocidos en la técnica, como aquellos descritos por Osterud, et al., *Biochemistry* 11:2853-2857 (1972) ; Thomas, U.S. Patent No. 4,456,591 ; Hedner and Kisiel, *J. Clin. Invest.* 71:1836-1841 (1983) ; o Kisiel and Fuji-kawa, *Behring Inst. Mitt.* 73:29-42 (1983). Alternativamente, como descrito por Bjoem et al. (*Research Disclosure*, 269 September 1986, pp. 564-565), el factor VII se puede activar pasando este a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, como Mono Q® (Pharmacia fine Chemicals) o similares. La variante del actor VII activada resultante puede luego ser formulada y administrada como se describe más adelante.

30
35

ENSAYOS

[0132] La invención también proporciona ensayos adecuados para la selección de variantes del factor VIIa preferidas según la invención. Estos ensayos se pueden realizar como una simple prueba preliminar *in vitro*.

40

[0133] Así, el ejemplo 5 aquí divulga una prueba simple (titulada "Ensayo de proteólisis *in vitro*") para la actividad de variantes del factor VIIa de la invención. Basado en esto, variantes del factor VIIa que son de interés particular son aquellas variantes donde la proporción entre la actividad de la variante y la actividad del factor VII nativo mostradas en la fig. 1 es de sobre 1,0, por ejemplo, al menos de sobre 1,25, preferiblemente al menos de sobre 2,0, como al menos de sobre 3,0 o, incluso más preferido, al menos de sobre 4,0 cuando se evalúa en el "Ensayo de proteólisis *in vitro*".

45

[0134] La actividad de las variantes puede también medirse usando un sustrato fisiológico como factor X ("Ensayo de proteólisis *in vitro*") (ver ejemplo 6), adecuadamente a una concentración de 100-1000 nM, donde el factor Xa generado se mide después de la adición de un sustrato cromogénico adecuado (por ejemplo, S-2765). Además, el ensayo de actividad puede llevarse a cabo a temperatura fisiológica.

50

[0135] La capacidad de las variantes del factor VIIa para generar trombina puede también medirse en un ensayo comprendiendo todos factores de coagulación pertinentes e inhibidores a concentraciones fisiológicas (menos factor VIII cuando se imitan condiciones de hemofilia A) y plaquetas activadas (como de describe en p. 543 en Monroe et al. (1997) *Brit. J. Haematol.* 99, 542-547).

55

Administración y composiciones farmacéuticas

60

[0136] Las variantes polipeptídicas del factor VII según la presente invención se pueden utilizar para controlar trastornos de sangrado que tienen diferentes causas, tales como deficiencias del factor de coagulación (p. ej. hemofilia A y B o deficiencia de factores de coagulación XI o VII) o inhibidores de factores de coagulación, o se pueden utilizar para controlar sangrado excesivo que ocurre en sujetos con una coagulación en cascada de la sangre de funcionamiento normal (sin deficiencias de factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación). Los sangrados se pueden provocar por una función plaquetaria defectuosa,

65

trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. También se pueden ver en sujetos en los que una actividad aumentada fibrinolítica ha sido inducida por varios estímulos.

5 [0137] En sujetos que han experimentado daño tisular extenso en asociación con cirugía o traumatismo extenso, el mecanismo hemostático se puede saturar por la demanda de hemostasis inmediata y pueden desarrollar sangrados a pesar de un mecanismo hemostático normal. La realización satisfactoria de la hemostasis es también un problema cuando los sangrados ocurren en órganos, como el cerebro, región de oído interno y ojos y puede también ser un problema en casos de sangrados difusos (gastritis hemorrágica y sangrado uterino profuso) cuando es difícil de identificar la fuente. El mismo problema puede surgir en el proceso de tomar biopsias de varios órganos (hígado, pulmón, tejido tumoral, tracto gastrointestinal) al igual que en la cirugía laparoscópica. Estas situaciones comparten la dificultad de provisión de hemostasis por técnicas quirúrgicas (sutura, clips, etc.). Sangrados profusos y agudos pueden también ocurrir en sujetos en terapia anticoagulante en los que una hemostasis defectuosa ha sido inducida por la terapia dada. Estas intervenciones quirúrgicas pueden precisar sujetos en caso de que el efecto anticoagulante tenga que ser contrarrestado rápidamente. Otra situación que puede causar problemas en el caso de hemostasis insatisfactoria es cuando los sujetos con un mecanismo hemostático normal reciben terapia anticoagulante para prevenir enfermedad tromboembólica. Esta terapia puede incluir heparina, otras formas de proteoglicanos, wafarina u otras formas de antagonistas de la vitamina K, al igual que aspirina y otros inhibidores de agregación plaquetaria.

20 [0138] Una activación sistémica de la coagulación en cascada puede llevar a coagulación intravascular diseminada (DIC). No obstante, estas complicaciones no se han visto en sujetos tratados con dosis altas de factor VIIa recombinante, debido a un proceso hemostático localizado del tipo inducido por la formación del complejo entre factor VIIa y TF expuesto en el sitio de herida de la pared del vaso. Las variantes polipeptídicas del factor VII según la invención pueden también usarse así en su forma activada para controlar estos sangrados excesivos asociados a un mecanismo hemostático normal.

30 [0139] Para tratamiento en relación con intervenciones deliberadas, las variantes polipeptídicas del factor VII de la invención se administran típicamente en de sobre 24 horas antes de que se realice la intervención, y de hasta 7 días o más después. Administración como un coagulante puede ser por una variedad de vías como se describe en este caso.

35 [0140] La dosis de las variantes polipeptídicas del factor VII varía de sobre 0,05 mg a 500 mg/día, preferiblemente de sobre 1 mg a 200 mg/día, y más preferiblemente de sobre 10 mg a sobre 175 mg/día para un sujeto de 70 kg como dosis de carga y de mantenimiento, dependiendo del peso del sujeto y de la gravedad de la enfermedad.

40 [0141] Las composiciones farmacéuticas están principalmente destinadas a administración parenteral para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran parenteralmente, es decir, por vía intravenosa, subcutánea, o intramuscular, o se pueden administrar por infusión pulsátil o continua. Las composiciones para administración parenteral comprenden la variante del factor VII de la invención en combinación con, preferiblemente disuelto en, un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Una variedad de soportes acuosos pueden utilizarse, como agua, agua tamponada, solución salina 0,4%, glicina 0,3% y similares. Las variantes polipeptídicas del factor VII de la invención pueden también ser formuladas en las preparaciones de liposoma para entrega u objetivo a los sitios de herida. Preparaciones de liposoma son generalmente descritas en, por ejemplo, los documentos U.S. 4,837,028 , U.S. 4,501,728 y U.S. 4,975,282. Las composiciones se pueden esterilizar por técnicas de esterilización convencionales conocidas. Las soluciones acuosas resultantes se pueden empaquetar para uso o filtrado bajo condiciones asépticas y liofilizadas, la preparación liofilizada es combinada con una solución estéril acuosa antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a condiciones fisiológicas, como pH ajustado y agentes amortiguadores, agentes ajustadores de tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc.

50 [0142] La concentración de la variante del factor VII en estas formulaciones puede variar mucho, es decir, de menos de sobre 0,5% en peso, normalmente a o al menos a sobre 1% en peso a un máximo de 15 o 20% en peso y será seleccionado principalmente por volúmenes fluidos, viscosidades, etc., conforme al modo particular de administración seleccionado.

60 [0143] Así, una composición típica farmacéutica para infusión intravenosa se puede hacer para contener 250 ml de solución de Ringer estéril y 10 mg de la variante del factor VII. Métodos actuales para la preparación de composiciones administrables parenteralmente serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle en, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990).

65 [0144] Las composiciones con las variantes polipeptídicas del factor VII de la presente invención se pueden administrar para tratamientos terapéuticos y/o profilácticos. En aplicaciones terapéuticas, composiciones se administran a un sujeto que ya sufre una enfermedad, como se ha descrito anteriormente, en una cantidad suficiente

para curar, aliviar o parcialmente detener la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como "cantidad terapéuticamente eficaz". Como se entenderá por el experto en la técnica, cantidades eficaces para este propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o herida al igual que el peso y el estado general del sujeto. En general, no obstante, la cantidad eficaz variará de sobre 0,05 mg hasta sobre 500 mg de la variante del factor VII al día para un sujeto de 70 kg, con dosificaciones de sobre 1,0 mg a sobre 200 mg de la variante del factor VII al día siendo más comúnmente usado.

[0145] Los polipéptidos FVIIa de la presente invención pueden generalmente ser empleados en enfermedad grave o estados de herida, es decir, situaciones que ponen en riesgo la vida o que la ponen en riesgo potencialmente. En estos casos, vista la minimización de sustancias extrañas y la carencia general de inmunogenicidad de variantes polipeptídicas del factor VII humano en seres humanos, puede ser deseable por el médico tratante administrar un exceso sustancial de estas composiciones de la variante del factor VII.

[0146] En aplicaciones profilácticas, composiciones con la variante del factor VII de la invención se administran a un sujeto susceptible a o de otra manera en riesgo de un estado de enfermedad o herida para mejorar la propia capacidad coagulante del sujeto. Esta cantidad se define como una "dosis profilácticamente efectiva". En aplicaciones profilácticas, las cantidades precisas otra vez dependen del estado de salud y peso del sujeto, pero la dosis generalmente varía de sobre 0,05 mg a sobre 500 mg al día para un sujeto de 70 kilogramos, más comúnmente de sobre 1,0 mg a sobre 200 mg al día para un sujeto de 70 kilogramos.

[0147] Administraciones múltiples o únicas de las composiciones pueden llevarse a cabo con niveles de dosis y modelos que se seleccionan por el médico tratante. Para sujetos ambulatorios que requieren niveles de mantenimiento diarios, las variantes polipeptídicas del factor VII se pueden administrar por uso de infusión continua, por ejemplo, un sistema de bomba portátil.

[0148] Entrega local de la variante del factor VII de la presente invención, como, por ejemplo, aplicación tópica, puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante un *spray*, perfusión, catéteres de doble balón, *stent*, incorporado en injertos vasculares o *stents*, hidrogeles usados para revestir catéteres de balón, u otros métodos bien establecidos. De cualquier manera, las composiciones farmacéuticas deberían proporcionar una cantidad de variante del factor VII suficiente para tratar eficazmente al sujeto.

[0149] La presente invención se ilustra posteriormente por los siguientes ejemplos que, no obstante, no deben ser interpretados como limitación del alcance de protección. Las características descritas en la descripción precedente y en los siguientes ejemplos pueden, tanto por separado como en cualquier combinación de estos, ser material para la realización de la invención en formas diversas de esta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0150] La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos completa del factor VII humano de coagulación nativo (tipo salvaje) (SEC ID n°: 1).

Ejemplos

[0151] La terminología para sustituciones de aminoácido usada en los siguientes ejemplos son de la siguiente manera. La primera letra representa el aminoácido naturalmente presente en una posición de la SEC ID n°:1. El siguiente número representa la posición en la SEC ID n°:1. La segunda letra representa la sustitución de aminoácido diferente por el aminoácido natural. Un ejemplo es L305V/K337A-FVII, la leucina en la posición 305 de la SEC ID n°:1 se sustituye por una valina y la lisina en la posición 337 de la SEC ID n°:1 se sustituye por una alanina, ambas mutaciones en la misma variante del factor VII.

Ejemplo 1

[0152] ADN que codifica L305V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII.

[0153] Construcciones de ADN que codifican L305V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, y L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII fueron preparados por mutagénesis dirigida usando un vector de ADN bicatenario superenrollado con una inserción de interés y dos cebadores sintéticos con la mutación deseada. Los siguientes cebadores fueron usados:

Para L305V-FVII:

5'-CGT GCC CCG GGT GAT GAC CCA GGA C-3' (SEQ ID n°:2)

5 5'-GTC CTG GGT CAT CAC CCG GGG CAC G-3' (SEQ ID n°:3)

Para K337A-FVII:

10 5'-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3' (SEQ ID n°:4)

5'-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3' (SEQ ID n°:5)

15 Para V158D-FVII:

5'-GTG GGG GGC AAG GAC TGC CCC AAA GGG G-3' (SEQ ID n°:6)

20 5'-CCC CTT TGG GGC AGT CCT TGC CCC CCA C-3' (SEQ ID n°:7)

Para E296V/M298Q-FVII:

25 5'-GCC ACG GCC CTG GTG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3' (SEQ ID n°:8)

5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CAC CAG GGC CGT GGC-3' (SEQ ID n°:9)

30 [0154] Los cebadores oligonucleótidos, cada complementario a cadenas opuestas del vector, fueron extendidos durante variación cíclica de la temperatura mediante Pfu ADN polimerasa. En la incorporación de los cebadores, un plásmido mutado con cortes en bisel fue generado. Después del ciclo de temperatura, el producto fue tratado con DpnI que es específico para ADN metilado y hemimetilado para digerir el molde de ADN parental y para seleccionar el ADN sintetizado que contiene la mutación.

35 [0155] Procedimientos para la preparación de una construcción de ADN usando reacción en cadena de polimerasa usando unos cebadores específicos se conocen por expertos en la técnica (cf. *PCR Protocols*, 1990, Academic Press, San Diego, California, USA).

Ejemplo 2

40 Preparación de L305V/K337A-FVII.

45 [0156] Células BHK fueron transfectadas esencialmente como se describió previamente (Yhim et al. (1988) *Biochemistry* 27, 7785- 7793 ; Persson and Nielsen (1996) *FEBS Lett.* 385, 241-243) para obtener expresión de la variante L305V/K337A-FVII. La variante del factor VII fue purificada de la siguiente manera:

[0157] Medio acondicionado fue cargado sobre una columna 25-ml de Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) después de adición de 5 mM de EDTA, 0,1% de Tritón X-100 y 10 mM de Tris, ajuste del pH a 8,0 y ajuste de la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua.

50 [0158] Elución de la proteína fue realizada paso por paso de 10 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 0,1% de Tritón X-100, pH 8,0 a 10 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 25 mM de CaCl₂, 0,1% de Tritón X-100, pH 8,0. Las fracciones con L305V/K337A-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna 25-ml con anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) acoplado a sefrosa 4b CNBr-activada (Pharmacia Biotech).

55 [0159] La columna fue equilibrada con 50 mM de HEPES, pH 7,5, con 10 mM de CaCl₂, 100 mM de NaCl y Tritón X-100 0,02%. Después de lavado con tampón de equilibrio y tampón de equilibrio conteniendo 2 M de NaCl, el material unido fue eluido con tampón de equilibrio conteniendo 10 mM de EDTA en vez de CaCl₂. Antes de uso o almacenamiento, exceso CaCl₂ sobre EDTA fue añadido o L305V/K337A-FVII fue transferido a un tampón con Ca²⁺. El rendimiento de cada paso se siguió por mediciones ELISA del factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

60

Ejemplo 3

Preparación de L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII.

5 [0160] Células BHK fueron transfectadas esencialmente como previamente se describe (Thim et al. (1988) *Biochemistry* 27, 7785- 7793 ; Persson and Nielsen (1996) *FEBS Lett.* 385, 241-243) para obtener expresión de la variante L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII. La variante del factor VII fue purificada de la siguiente manera:

10 [0161] Medio acondicionado fue cargado sobre una columna 25-ml de Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) después adición de 5 mM de EDTA, Tritón X-100 0,1% y 10 mM de Tris, ajuste de pH a 8,0 y ajuste de la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada paso por paso de 10 mM de Tris, 50 mM de NaCl, Tritón X-100 0,1%, pH 8,0 a 10 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 25 mM de CaCl₂, Tritón X-100 0,1%, pH 8,0. las fracciones con L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna 25-ml con anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) acoplado a sefarosa 4b CNBr-activada (Pharmacia Biotech).

15 [0162] La columna fue equilibrada con 50 mM de Hepes, pH 7,5, con 10 mM de CaCl₂, 100 mM de NaCl y Tritón X-100 0,02%. Después lavado con tampón de equilibrio y tampón de equilibrio con 2 M de NaCl, material unido fue eluido con tampón de equilibrio con 10 mM de EDTA en vez de CaCl₂. Antes de uso o almacenamiento, exceso de CaCl₂ sobre EDTA fue añadido o L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII fue transferido a un tampón con Ca²⁺. El rendimiento de cada paso se siguió por mediciones ELIZA del factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 4

25 Preparación de L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII.

30 [0163] Células BHK fueron transfectadas esencialmente como previamente se describe (Thim et al. (1988) *Biochemistry* 27, 7785- 7793 ; Persson and Nielsen (1996) *FEBS Lett.* 385, 241-243) para obtener expresión de la variante L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII. La variante del factor VII fue purificada de la siguiente manera:

35 [0164] Medio acondicionado fue cargado sobre una columna 25-ml de Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) después adición de 5 mM de EDTA, Tritón X-100 0,1% y 10 mM de Tris, ajuste del pH a 8,0 y ajuste de la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada paso por paso de 10 mM de Tris, 50 mM de NaCl, Tritón X-100 0,1%, pH 8,0 a 10 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 25 mM de CaCl₂, Tritón X-100 0,1%, pH 8,0. Las fracciones con L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna 25-ml con anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) acoplado a sefarosa 4b CNBr-activada (Pharmacia Biotech).

40 [0165] La columna fue equilibrada con 50 mM de Hepes, pH 7,5, con 10 mM de CaCl₂, 100 mM de NaCl y Tritón X-100 0,02%. Después lavado con tampón de equilibrio y tampón de equilibrio con 2 M de NaCl, material unido fue eluido con tampón de equilibrio con 10 mM de EDTA en vez de CaCl₂. Antes de uso o almacenamiento, exceso de CaCl₂ sobre EDTA fue añadido o L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII fue transferido a un tampón con Ca²⁺. El rendimiento de cada paso se siguió por mediciones ELISA del factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 5

50 Ensayo de hidrólisis *in vitro*

[0166] Factor VIIa nativo (tipo salvaje) y variante del factor VIIa (ambos de aquí en adelante referidos como "factor VIIa") se evalúan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida (S-2288, Chromogenix, Suecia), concentración final 1 mM, se adiciona para factor VIIa (concentración final 100 nM) en 50 mM de Hepes, pH 7,4, con 0,1 M de NaCl, 5 mM de CaCl₂ y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La absorbencia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placa SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EEUU). La absorbencia desarrollada durante una incubación de 20 minutos, después sustracción de la absorbencia en un pocillo vacío no conteniendo enzima, se utiliza para calcular la proporción entre las actividades de variante y factor VIIa de tipo salvaje:

60

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

Ejemplo 6Ensayo de proteólisis *in vitro*

[0167] Factor VIIa nativo (tipo salvaje) y variante del factor VIIa (ambos de aquí en adelante referidos como "factor VIIa") se evalúan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). Factor VIIa (10 nM) y factor X (0,8 microM) en 100 microL 50 mM de Hepes, pH 7,4, con 0,1 M de NaCl, 5 mM de CaCl₂ y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, se incuban durante 15 min. Escisión del factor X se detiene luego por la adición de 50 microL 50 mM de Hepes, pH 7,4, con 0,1 M NaCl, 20 mM de EDTA y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La cantidad de factor Xa generado se mide por adición del sustrato cromogénico z-D-Arg-Gly-Arg-P-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Suecia), concentración final 0,5 mM. La absorbencia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placa SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EEUU). La absorbencia desarrollada durante 10 minutos, después sustracción de la absorbencia en un pocillo vacío no conteniendo FVIIa, se utiliza para calcular la proporción entre las actividades proteolíticas de variante y factor VIIa de tipo salvaje:

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

Ejemplo 7

20 Actividades relativas de variantes de FVIIA medidas en los ensayos descritos en los ejemplos 5 y 6.

[0168]

Variante	Proporción en el ejemplo 5	Proporción en el ejemplo 6
L305V/K337A-FVII	7,2	6,2
L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII	6,7	45
L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII	11,5	72
peso-FVIIa	1,0	1,0

25

ES 2 376 694 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SEC ID nº:2 (Cebador de ADN para preparación de L305V-FVII):

5 5'-CGT GCC CCG GGT GAT GAC CCA GGA C-3'

SEC ID nº:3 (Cebador de ADN para preparación de L305V-FVII):

10 5'-GTC CTG GGT CAT CAC CCG GGG CAC G-3'

SEC ID nº:4 (Cebador de ADN para preparación de K337A-FVII):

5'-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3'

5

SEC ID nº:5 (Cebador de ADN para preparación de K337A-FVII):

5'-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3'

10

SEC ID nº:6 (Cebador de ADN para preparación de V158D-FVII):

5'-GTG GGG GGC AAG GAC TGC CCC AAA GGG G-3'

15

SEC ID nº:7 (Cebador de ADN para preparación de V158D-FVII):

5'-CCC CTT TGG GGC AGT CCT TGC CCC CCA C-3'

20

SEC ID nº:8 (Cebador de ADN para preparación de E296V/M298Q-FVII):

5'-GCC ACG GCC CTG GTG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3'

25

SEC ID nº:9 (Cebador de ADN para preparación de E296V/M298Q-FVII):

5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CAC CAG GGC CGT GGC-3'

30

LISTADO DE SECUENCIAS

[0170]

35

<110> Novo Nordisk A/S

<120> POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR VII DE COAGULACIÓN HUMANO

<130> 6357-WO

40

<150> DK PA 2001 01413

<151> 2001-09-27

<160> 9

45

<170> Versión de patentIn 3.1

<210> 1

<211> 406

50

<212> PRT

<213> Factor VII de coagulación humano

<220>

<221> MISC_FEATURE

55

<222> (1)..(406)

<223> Xaa significa ácido 4-carboxiglutámico (gamma-carboxiglutamato)

<400> 1

Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Pro Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15

60

Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Lys
20 25 30

ES 2 376 694 T3

Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35 40 45
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50 55 60
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65 70 75 80
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85 90 95
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100 105 110
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115 120 125
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130 135 140
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145 150 155 160
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165 170 175
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180 185 190
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195 200 205
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210 215 220
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225 230 235 240
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245 250 255
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260 265 270

ES 2 376 694 T3

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

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

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305 310 315 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325 330 335

Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340 345 350

Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355 360 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370 375 380

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

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

- <210> 2
- <211> 25
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Cebador de ADN para preparación de L305V-FVII

- <400> 2
- cgtgccccgg gtgatgacc aggac 25

- <210> 3
- 15 <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 20 <223> Cebador de ADN para preparación de L305V-FVII

- <400> 3
- gtcctgggtc atcaccggg gcacg 25

- <210> 4
- 25 <211> 28
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de ADN para preparación de K337A-FVII

5 <400> 4
 cggatggcag cgcggactcc tgcaaggg 28

<210> 5
 <211> 28
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de ADN para preparación de K337A-FVII

15 <400> 5
 cccttgagg agtccgcgct gccatccg 28

<210> 6
 <211> 28
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de ADN para preparación de V158D-FVII

25 <400> 6
 gtggggggca aggactgccc caaagggg 28

<210> 7
 <211> 28
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de ADN para preparación de V158D-FVII

<400> 7
 40 ccccttggg gcagtcctg cccccac 28

<210> 8
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador de ADN para preparación de E296V/M298Q-FVII

<400> 8
 50 gccacggccc tggctctca ggtctcaac gtgccc 36

<210> 9
 <211> 36
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador de ADN para preparación de E296V/M298Q-FVII

<400> 9
 60 gggcacgtg aggacctga gcaccagggc cgtggc 36

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido del factor VII que comprende al menos dos sustituciones en relación a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 1, donde L305 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido y K337 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido, y donde dicho polipéptido del factor VII tiene una actividad coagulante aumentada en comparación con el factor VIIa de coagulación humano de tipo salvaje.
- 10 2. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 1, donde al menos un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio de proteasa ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 15 3. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 2, donde como máximo 20 aminoácidos adicionales en las posiciones restantes en el dominio de proteasa han sido sustituidos por otros aminoácidos.
- 20 4. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 3, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 159-170 de la SEC ID nº: 1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 25 5. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 2, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 290-304 de la SEC ID nº: 1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 30 6. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 5, donde R304 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Tyr, Phe, Leu y Met.
- 35 7. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 2, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 306-312 de la SEC ID nº: 1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 40 8. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 7, donde M306 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Asp y Asn.
- 45 9. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 7, donde D309 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ser y Thr.
- 50 10. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 2, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 330-339 de la SEC ID nº: 1 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 55 11. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 2, donde A274 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido.
- 60 12. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 11, donde dicho A274 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Met, Leu, Lys y Arg.
- 65 13. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 1, donde dicho K337 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Ala, Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp y Glu.
14. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 1, donde dicho L305 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo consistente en Val, Tyr y Ile.
15. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 14, donde dicho L305 ha sido sustituido por Val.
16. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que puede ser codificado por construcciones polinucleótidas.
17. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones de 1-15, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del factor VII y la actividad del polipéptido del factor VIIa nativo mostrados en la SEC ID nº: 1 es al menos aproximadamente 1,25.
18. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 17, donde dicha proporción es al menos aproximadamente 2,0, preferiblemente al menos aproximadamente 4,0.
19. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 1, que es L305V/K337A-FVII.
20. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 1, que es L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII.

21. Construcción polinucleótida que codifica un polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
- 5 22. Célula huésped que comprende la construcción polinucleótida según la reivindicación 21.
23. Animal no humano transgénico que contiene y expresa la construcción polinucleótida según la reivindicación 21.
- 10 24. Composición farmacéutica de un polipéptido del factor VII que comprende al menos dos sustituciones en relación a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 1, donde L305 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido y K337 ha sido sustituido por cualquier otro aminoácido y donde dicho polipéptido del factor VII tiene una actividad coagulante aumentada en comparación con el factor VIIa de coagulación humano de tipo salvaje; y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

Figura 1: La secuencia de aminoácidos del factor VII de coagulación humano nativo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fig. 1

