

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 110**

51 Int. Cl.:
C12N 9/64

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04762814 .4**
96 Fecha de presentación: **09.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1664291**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Polipéptidos de factor VII de coagulación**

30 Prioridad:
09.09.2003 DK 200301296
16.09.2003 US 503418 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2012

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

72 Inventor/es:
OSTERGAARD, Henrik;
BJORN, Soren E. y
PERSSON, Egon

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

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).

ES 2 381 110 T3

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de factor VII de coagulación.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a polipéptidos del factor VII de coagulación humano nuevo, al igual que constructos de polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, vectores y células huésped que comprenden y expresan el polinucleótido, composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos del factor VII, usos y métodos de tratamiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Coagulación sanguínea es un proceso que consiste en una interacción compleja de varios componentes de sangre (o factores) que finalmente da lugar a un coágulo de fibrina. Generalmente, los componentes sanguíneos, que participan en que han sido referidos como la "cascada" de coagulación, son proteínas enzimáticamente inactivas (proenzimas o zimógenos) que se convierten a enzimas proteolíticas por la acción de un activador (que por si mismo es un factor de coagulación activado). Factores de coagulación que han sido sometidos tal 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).

[0003] Iniciación del proceso hemostático se media por la formación de un complejo entre factor tisular, expuesto como resultado de herida a la pared de vaso, y factor VIIa. Este complejo luego convierte factores IX y X a sus formas activas. Factor Xa convierte cantidades limitadas de protrombina a trombina en la célula de soporte de factor de tejido. Trombina activa plaquetas y factores V y VIII en Factores Va y VIIIa, ambos cofactores en el proceso adicional conduciendo a la explosión de trombina completa. Este proceso incluye generación de Factor Xa por Factor IXa (en complejo con factor VIIIa) y ocurre en la superficie de plaquetas activadas. Trombina convierte finalmente fibrinógeno a fibrina dando como resultado formación de un coágulo de fibrina.

[0004] El factor VII es una glicoproteína de plasma de rastro que circula en la sangre como un zimógeno monocaténario. El zimógeno es catalíticamente inactivo. Factor VII monocaténario se puede convertir a Factor VIIa bicaténario por Factor Xa, Factor XIIa, Factor IXa, Factor VIIa o trombina in vitro. Factor Xa se cree que es el mayor activador fisiológico de factor VII. La conversión de factor VII de zimógeno en la molécula bicaténaria activada ocurre por escisión de un enlace peptídico interno Arg152 -Ile153.

[0005] Es frecuentemente deseable estimular la cascada de coagulación en un sujeto. Factor VIIa ha sido usado para controlar trastornos de sangrado que tienen diferentes causas tal como deficiencias factoras de coagulación (p. ej. hemofilia A y B o deficiencia de factores de coagulación XI o VII) o inhibidores de factores de coagulación. Factor VIIa también ha sido usado para controlar sangrado excesivo ocurriendo en sujetos con una cascada coagulación de sangre de funcionamiento normal (no deficiencias factoras de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación). Tal sangrado puede, por ejemplo, ser provocado por una función de plaqueta defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. Sangrado es también un problema mayor en relación con cirugía y otras formas de daño de tejido.

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

[0007] Dickinson et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 93, 14379-14384, 1996) divulga polipéptidos del factor VII donde ciertos aminoácidos han sido individualmente sustituidos por Ala. Iwanaga et al. (Tromb. Haemost. (suplemento agosto 1999), 466, abstracto 1474) se refiere a variantes de factor VIIa donde residuos 316-320 son eliminadas o residuos 311-322 se sustituyen con los residuos correspondientes de tripsina.

[0008] Hay todavía una necesidad en la técnica para polipéptidos del factor VII mejorados con actividad procoagulante. En particular, hay una necesidad de polipéptidos del factor VII con actividad TF independiente aumentada.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] La presente invención se refiere a polipéptidos del factor VII con actividad TF independiente aumentada, tal como polipéptidos del factor VII de coagulación nuevo con la misma o aumentada actividad en comparación con factor VIIa de tipo salvaje y con una afinidad de enlace de factor tisular inferior a factor VIIa humano recombinante de tipo salvaje.

[0010] En un primer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido del factor VII con una afinidad de enlace de factor tisular inferior que factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante y sustancialmente la misma actividad o actividad aumentada en comparación con factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante, donde dicho polipéptido del factor VII es

[0011] un polipéptido del factor VII que comprende un Sitio de N-glicosilación N-Xaa-S/T introducido por sustituciones de aminoácidos correspondientes a aminoácidos iniciando en la posición de SEC ID nº: 1, donde Xaa es cualquier aminoácido excepto P, en el que dicho sitio de N-glicosilación introducido reduce la afinidad de enlace de factor tisular.

5 [0012] El polipéptido FVII puede ser FVII-(I69N/F71T).

[0013] En otro aspecto, polipéptidos del factor VII de la invención son polipéptidos del factor VII, donde el constante de disociación K_d de dicho polipéptido del factor VII de factor tisular soluble (sTF) es superior a 5 nM, tal como superior a 7 nM, tal como superior a 10 nM, tal como superior a 20 nM, tal como superior a 30 nM, tal como superior a 50 nM, tal como superior a 100 nM, tal como superior a 200 nM, tal como superior a 300 nM, tal como superior a 400 nM, tal como superior a 500 nM, tal como superior a 1 μ M.

10 [0014] En otro aspecto, polipéptidos del factor VII de la invención son polipéptidos del factor VII, donde el constante de disociación K_d de dicho polipéptido del factor VII de factor tisular (TF) es superior a 5 nM.

15 [0015] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido del factor VII con una afinidad de enlace de factor tisular inferior que factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante y sustancialmente la misma actividad o actividad aumentada en comparación con factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante, donde dicho polipéptido del factor VII es

20 [0016] un polipéptido del factor VII que comprende un Sitio de N-glicosilación N-Xaa-S/T introducido por sustituciones de aminoácidos correspondientes aminoácidos iniciando en la posición de SEC ID nº: 1, donde Xaa es cualquier aminoácido excepto P, en el que dicho sitio de N-glicosilación introducido reduce la afinidad de enlace factor tisular.

25 [0017] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido del factor VII con una afinidad de enlace de factor tisular inferior que factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante y sustancialmente la misma actividad o actividad aumentada en comparación con factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante, donde dicho polipéptido del factor VII es

30 [0018] un polipéptido del factor VII que comprende un Sitio de N-glicosilación N-Xaa-S/T introducido por sustituciones de aminoácidos correspondientes a aminoácidos iniciando en la posición

[0019] SEC ID nº: 1, donde Xaa es cualquier aminoácido excepto P, en el que dicho sitio de N-glicosilación introducido reduce la afinidad de enlace factor tisular; y opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

35 [0020] En otro aspecto, la invención se refiere a un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del factor VII que comprende un Sitio de N-glicosilación N-Xaa-S/T introducido por sustituciones de aminoácidos correspondientes a aminoácidos iniciando en la posición I69 de SEC ID nº: 1, donde Xaa es cualquier aminoácido excepto P, en el que dicho sitio de N-glicosilación introducido reduce la afinidad de enlace factor tisular.

40 El constructo polinucleótido puede ser un vector.

[0021] En otro aspecto, la invención se refiere a una célula huésped eucariota que comprende un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del factor VII que comprende un Sitio de N-glicosilación N-Xaa-S/T introducido por sustituciones de aminoácidos correspondientes a aminoácidos iniciando en la posición I69 de SEC ID nº: 1, donde Xaa es cualquier aminoácido excepto P, en el que dicho sitio de N-glicosilación introducido reduce la afinidad de enlace factor tisular. La célula huésped eucariota puede ser de origen mamífero y puede ser seleccionada del grupo que consiste en células CHO, células BHK o células HEK.

45 [0022] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la producción de un polipéptido del factor VII que comprende un sitio de N-glicosilación N-Xaa-S/T introducido por sustituciones de aminoácidos correspondientes a aminoácidos iniciando en la posición 169 de SEC ID nº: 1, donde Xaa es cualquier aminoácido excepto P, en el que dicho sitio de N-glicosilación introducido reduce la afinidad de enlace factor tisular, el método comprendiendo cultivando una célula huésped eucariota que comprende un constructo polinucleótido que codifica el polipéptido del factor VII en un medio de crecimiento apropiado bajo condiciones permitiendo síntesis de proteína de dicho constructo polinucleótido y recuperando dicho polipéptido del factor VII del medio de cultivo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0023] La presente invención se refiere a polipéptidos del factor VII de coagulación nuevo con sustancialmente la misma o aumentada actividad en comparación con factor VIIa de tipo salvaje y con una afinidad de enlace de factor tisular inferior que factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. Evidencia en aumento sugiere que tratamiento terapéutico con factor VII de coagulación humano de tipo salvaje recombinante funciona por un mecanismo TF independiente implicando unión de FVII directamente a trombocitos activados y una generación de Factor Xa activado y finalmente fibrina localmente a la posición de daño de tejido. Los polipéptidos del factor VII de la presente invención proporcionan una alternativa para tradicionales polipéptidos del factor VII de unión TF. Polipéptidos del factor VII, que no enlazan con

TF pueden ser una ventaja en el tratamiento terapéutico de sangrados, cuando la exposición de TF es alta, por ejemplo rotura de placa o sepsis.

[0024] Como se utiliza en este caso, los términos "polipéptidos del factor VII" o "polipéptidos FVII" significan Factor VII VII/VIIa humano de tipo salvaje (es decir, un polipéptido con la secuencia de aminoácidos descrita en la patente EEUU n°. 4,784,950), al igual que variantes de factor VII exhibiendo sustancialmente la misma o mejorada actividad biológica en relación a factor VII de tipo salvaje, polipéptidos relacionados con el Factor VII al igual que derivados factores VII y conjugados factores VII. A menos que se indique lo contrario, el término "Factor VII" se destina para abarcar polipéptidos del factor VII en su forma (zimógeno) no dividida, al igual que aquellos que han sido proteolíticamente procesados para producir sus formas bioactivas respectivas, que puede ser designados factor VIIa. Típicamente, factor VII es dividido entre residuos 152 y 153 para producir factor VIIa. Tales variantes de factor VII pueden mostrar propiedades diferentes en relación a factor VII humano, incluyendo estabilidad, unión de fosfolípido, actividad específica alterada, y similares.

[0025] Como se utiliza en este caso "polipéptidos relacionados con el Factor VII" encierra polipéptidos, incluyendo variantes, en el que la actividad biológica factor VIIa ha sido sustancialmente modificada o reducida relativamente a la actividad de factor VIIa de tipo salvaje. Estos polipéptidos incluyen, sin limitación, factor VII o factor VIIa en que alteraciones de secuencia de aminoácidos específicas han sido introducidas que modifican o disgregan la bioactividad del polipéptido.

[0026] El término "derivado de Factor VII" como se utiliza en este caso, se destina para designar factor VII de tipo salvaje, variantes de factor VII mostrando sustancialmente la misma o mejorada actividad biológica en relación a factor VII de tipo salvaje y polipéptidos relacionados con el factor VII, en el que uno o más de los aminoácidos del péptido progenitor ha sido químicamente y/o enzimáticamente modificado, por ejemplo por alquilación, glicosilación, PEGilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similar. Este incluye pero no se limita a factor VIIa humano pegilado, factor VIIa humano pegilado de cisteína y variantes de las mismas.

[0027] La conjugación opcional de un residuo de aminoácido de cisteína con el grupo químico incluye pero de forma no limitativa a fijación covalente de polietilenglicol, (PEG) glicol de polietileno monometóxido, dextrano, poli-(N-vinilo pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenoglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polipropilenglicol, polioles polioxietilados (por ejemplo; glicerol) y alcohol polivinílico, ácidos colomónicos u otros polímeros a base de carbohidrato, polímeros de aminoácidos, y derivados de biotina. En una forma de realización de la presente invención, el grupo químico es un polímero biocompatible, no-tóxico, no-inmunogénico e hidrosoluble. Preferiblemente el grupo químico es hidrosoluble en todas proporciones.

[0028] Métodos para pegar grupos de PEG a residuos de cisteína es descrito en Roberts, M.J. et al, Advanced Drug Delivery Reviews 54 (2002) 459-476.

[0029] Un "sitio de N-glycosylation" tiene la secuencia N-Xaa-S/T, donde Xaa es cualquier residuo de aminoácido excepto prolina, N es asparagina y S/T es bien serina o treonina, tal como serina o treonina, tal como treonina.

[0030] Ejemplos específicos de polímeros de PEG activados particularmente preferidos para acoplamiento a residuos de cisteína, incluyen los siguientes PEGs lineales: vinilsulfona-PEG (VS-PEG), tal como vinilsulfona-mPEG (VS-mPEG); maleimida-PEG (MAL- PEG), tal como maleimida-mPEG (MAL-mPEG) y orthopyridyl-disulfuro-PEG (OPSS-PEG), tal como ortopiridilo disulfuro-mPEG (OPSS-MPEG). Típicamente, tal PEG o polímeros de mPEG tendrán un tamaño de aproximadamente 2 kDa, tal como aproximadamente 5 kDa, tal como aproximadamente 10 kD, tal como aproximadamente 12 kDa o tal como aproximadamente 20 kDa.

[0031] El experto en la materia será consciente que el método de activación y/o química de conjugación a ser usado depende de los grupos funcionales del polímero (p. e. siendo amina, hidróxilo, carboxilo, aldehído, sulfidril, succinimidil, maleimide, vinilsulfone o haloacetato).

[0032] Para conjugado con un grupo químico para un residuo de cisteína (p. ej. PEGilación) el polipéptido FVII es normalmente tratado con un agente reductor, tal como ditiotreitól (DDT), β -mercaptoetanol, o glutatona γ -glutamylcisteinilglicina) antes de PEGilación, tal como descrito en Higashi, S. Matsumoto, N., Iwanaga, S. (1997) J.Biol.Chem., 272(41), 25724- 25730. El agente reductor es posteriormente quitado por cualquier método convencional, tal como por desalación. Conjugación de PEG a un residuo de cisteína típicamente se desarrolla en un tampón adecuado a pH 6-9 a temperaturas que varían de 4°C a 25°C durante periodos hasta 16 horas.

[0033] En una forma de realización de la presente invención, un residuo de cisteína introducida se conjuga por formación mezclada de enlace de bisulfuro con un grupo químico seleccionado de la lista que consiste en glutatona (gamma-glutamylcisteinilglicina), gama-glutamylcisteína y cisteína presente en la célula huésped o en el medio de cultivo durante producción del polipéptido FVII.

[0034] En una forma de realización de la invención el grupo químico es seleccionado del grupo que consiste en: dendrímero, óxido de polialquileño (PAO), glicol de polialquileño (PAG), polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG), PEGs ramificados, alcohol polivinílico (PVA), policarboxilato, poli-vinilpirrolidona, anhídrido de ácido de polietileno-co-

- maléico, anhídrido de ácido comaléico de poliestireno, dextrano, dextrano de carboximetilo; ligandos de unión de proteína sérica, tal como compuestos que enlazan a albúmina, tal como ácidos grasos, C5-C24 ácido graso, diácido alifático (p. ej. C5-C24), una estructura (p. ej. derivados de ácido siálico o miméticos) que inhibe los glicanos de unirse a receptores (p. ej. receptor de asialoglicoproteína y receptor de manosa), una pequeña molécula orgánica con fracciones
- 5 que bajo condiciones fisiológicas altera propiedades de carga, tal como ácidos carboxílicos o aminas, o sustituyentes neutros que previenen reconocimiento específico de glicano tal como sustituyentes de alquilo más pequeños (p. ej., C1-C5 alquilo), un radical con baja carga molecular orgánico (p. ej. C1-C25), que puede contener uno o más ácidos carboxílicos, sulfónicos aminas, ácidos fosfónicos, o combinación de la misma; una baja molécula molecular neutra hidrofílica (p. ej. C1-C25), tal como ciclodextrina, o una cadena de polietileno que puede opcionalmente ramificada;
- 10 polietilenoglicol con una media de peso molecular de 2-40 KDa; un polímero de precisión bien definido tal como un dendrímero con una masa molecular exacta que varía de 700 a 20.000 Da, tal como entre 700-10.000 Da; y un polipéptido sustancialmente no-inmunogénico tal como albúmina o un anticuerpo o parte de un anticuerpo opcionalmente con un dominio Fc.
- 15 [0035] El término "factor VIIa humano PEGilado" significa factor VIIa humano, con una molécula de PEG conjugado a un polipéptido factor VIIa humano. Debe entenderse, que la molécula de PEG se puede unir para cualquier parte del polipéptido factor VIIa incluyendo cualquier residuo de aminoácido o fracción de carbohidrato del polipéptido factor VIIa. El término "factor VIIa humano PEGilado de cisteína" significa Factor VIIa con una molécula de PEG conjugado a un grupo sulfhidril de una cisteína introducida en el factor VIIa humano.
- 20 [0036] La actividad biológica de factor VIIa en la coagulación de sangre deriva de su capacidad para (i) enlazar a factor tisular (TF) y (ii) catalizar la escisión proteolítica de Factor IX o Factor X para producir Factor IX o X activado (factor IXa o Xa, respectivamente). Para fines de la invención, actividad biológica factora VIIa se puede cuantificar midiendo la capacidad de una preparación para promover coagulación de sangre usando plasma deficiente de factor VII y tromboplastina, como se describe, por ejemplo, en la patente EEUU n°. 5,997,864. En este ensayo, actividad biológica
- 25 se expresa como la reducción en el tiempo de coagulación en relación a una muestra de control y se convierte a "unidades de Factor VII" por comparación con un estándar de suero humano agrupado con 1 actividad factora VII de unidad/ml. Alternativamente, actividad biológica factora VIIa se puede cuantificar (i) midiendo la capacidad de factor VIIa para producir Factor Xa en un sistema que comprende TF introducida en una membrana lipídica y Factor X. (Persson et al., J. Biol. Chem. 272:19919-19924, 1997); (ii) midiendo Factor X hidrólisis en un sistema acuoso; (iii) midiendo su unión física para TF usando un a base de instrumento basado en la resonancia de plasmón de superficie (Persson, FEBS Letts. 413:359-363, 1997) y (iv) midiendo hidrólisis de un sustrato sintético.
- 30 [0037] Variantes del factor VII con sustancialmente la misma o mejorada actividad biológica en relación a factor VIIa de tipo salvaje abarcan aquellas que exponen al menos aproximadamente 25%, preferiblemente al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente 75% y de la forma más preferible al menos aproximadamente 90% de la actividad específica de factor VIIa que ha sido producida en el mismo tipo celular, cuando evaluado en uno o más ensayos de coagulación, ensayo de proteólisis, o ensayo de enlace TF como se ha descrito anteriormente. Variantes de factor VII, si mostrando sustancialmente la misma o mejor bioactividad que factor VII de tipo salvaje, o, alternativamente, mostrando bioactividad sustancialmente modificada o reducida en relación a factor VII de tipo salvaje, incluyen, sin limitación, polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de factor VII de tipo salvaje por inserción, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos.
- 35 [0038] Los términos "variantes" o "variante", como se utilizan en este caso, se destinan para designar factor VII con la secuencia de SEC ID NO: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. Tal adición puede tener lugar bien al extremo del N-terminal o al extremo del C-terminal de la proteína progenitora o ambos. La "variante" o las "variantes" dentro de esta definición todavía tienen FVII actividad en su forma
- 40 activada. En una forma de realización una variante es 70 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO:1. En una forma de realización una variante es 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO:1. En otra forma de realización una variante es 90 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO:1. En otra forma de realización una variante es 95 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO:1.
- 45 [0039] Ejemplos no limitativos de variantes del factor VII con sustancialmente la misma actividad biológica como factor VII de tipo salvaje incluyen S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino et al., Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); variantes de FVIIa mostrando estabilidad proteolítica aumentada como descrita en la patente EEUU n°. 5,580,560; Factor VIIa que ha sido proteolíticamente dividido entre residuos 290 y 291 o entre residuos 315 y 316 (Mollerup et al., Biotechnol. Bioeng. 48:501-505, 1995); formas oxidadas de Factor VIIa (Kornfelt et al., Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999);
- 50 variantes de FVII como descritas en PCT/DK02/00189; y variantes de FVII mostrando estabilidad proteolítica aumentada como descrita en WO 02/38162 (Scripps Research Institute); variantes de FVII con un gla-dominio modificado y exhibiendo una unión de membrana mejorada como descrita en WO 99/20767 (University of Minnesota) y WO 00/66753 (University of Minnesota); y variantes de FVII como descritas en WO 01/58935 (Maxygen ApS), WO 03/93465 (Maxygen ApS) y WO 04/029091 (Maxygen ApS).
- 55 [0040] Ejemplos no limitativos de variantes de FVII con actividad biológica aumentada en comparación a FVIIa de tipo
- 60
- 65

salvaje incluyen variantes de FVII como descritas en WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, PCT/DK02/00635, Danish patent application PA 2002 01423, Danish patent application PA 2001 01627; WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes de FVIIa con actividad mejorada como descrita en JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.). Ejemplos no limitativos de variantes del factor VII con actividad biológica reducida o sustancialmente modificada en relación a Factor VII de tipo salvaje incluyen R152E-FVIIa (Wildgoose et al., Biochem 29:3413-3420,1990), S344A-FVIIa (Kazama et al., J. Biol. Chem. 270:66- 72, 1995), FFR-FVIIa (Holst et al., Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 15:515-520, 1998), y factor VIIa que carece del dominio Gla, (Nicolaisen et al., FEBS Letts. 317:245-249, 1993). Ejemplos de variantes de factor VII, factor VII o polipéptidos relacionados de factor VII incluyen, sin limitación, factor VII de tipo salvaje, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, y S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305VN158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305VN158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305VN158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305VN158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,

F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305VN158T/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVI, F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T-S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVI, F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T-S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A-factor VII, factor de S60A VII; factor de R152E VII, factor de S344A VII, factor VIIa que carece del dominio Gla; y P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; y FVII teniendo sustituciones, adiciones o eliminaciones en la secuencia de aminoácidos de 233Tr a 240Asn, FVII teniendo sustituciones, adiciones o eliminaciones en la secuencia de aminoácidos de 304Arg a 329Cys.

[0041] La terminología para sustituciones de aminoácido usada es como sigue. La primera letra representa el aminoácido naturalmente presente a una posición de FVII humano de tipo salvaje. El siguiente número representa la posición en el FVII humano de salvaje. La segunda letra representa el aminoácido diferentes sustituyendo para (reemplazar) el aminoácido natural. Un ejemplo es M298Q, dónde una metionina en la posición 298 de FVII humano de tipo salvaje se sustituye por una glutamina. En otro ejemplo, V158T/M298Q, la valina en la posición 158 de FVII humano tipo salvaje se sustituye por una treonina y la metionina en la posición 298 de FVII humano de tipo salvaje se sustituye por una glutamina en el mismo polipéptido del factor VII.

[0042] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 1,25. En una forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 2,0. En otra forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 4,0.

[0043] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 1,25 cuando se evaluó en un ensayo de actividad de factor VIIa. En una forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 2,0 cuando se evaluó en un ensayo de actividad de factor VIIa. En otra forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 4,0 cuando se evaluó en un ensayo de actividad de factor VIIa. La actividad de factor VIIa se puede medir por los ensayos descrito bajo "ensayos".

[0044] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 1,25 cuando se evaluó en el "Ensayo de hidrólisis In Vitro". En una forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 2,0 cuando se evaluó en el "Ensayo de hidrólisis In Vitro". En otra forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 4,0 cuando se evaluó en el "Ensayo de hidrólisis In Vitro".

[0045] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 1,25 cuando se evaluó en el "Ensayo de proteólisis In Vitro". En una forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 2,0 cuando se evaluó en el "Ensayo de proteólisis In Vitro". En otra forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 4,0 cuando se evaluó en el "Ensayo de proteólisis In Vitro". En otra forma de realización la proporción entre la actividad del polipéptido del factor VII y la actividad del factor VIIa humano de tipo salvaje es al menos aproximadamente 8,0 cuando se evaluó en el "Ensayo de proteólisis In Vitro".

[0046] La presente invención es también adecuada para variantes de Factor VII/VIIa con actividad aumentada en comparación con tipo salvaje. Variantes de Factor VII/VIIa con actividad aumentada se pueden encontrar probando en ensayos adecuados descritos en lo siguiente. Estos ensayos se pueden realizar como una simple prueba in vitro preliminar. Así, la sección "ensayos" divulga una simple prueba (titulada "Ensayo de hidrólisis In Vitro") para la actividad de variantes de factor VIIa de la invención. Basado sobre lo mismo, variantes de factor VIIa que son de interés

particular son tales variantes dónde la proporción entre la actividad de la variante y la actividad de factor VII de tipo salvaje está sobre 1,0, por ejemplo al menos aproximadamente 1,25, preferiblemente al menos aproximadamente 2,0, tal como al menos aproximadamente 3,0 o, incluso más preferido, al menos aproximadamente 4,0 cuando se evaluó en el "Ensayo de hidrólisis In Vitro".

[0047] La actividad de las variantes puede también ser medida usando un sustrato fisiológico tal como factor X ("Ensayo de proteólisis In Vitro") (ver bajo "ensayos"), adecuadamente a una concentración de 100-1000 nM, dónde el Factor Xa generado es medido después de la adición de un sustrato cromogénico adecuado (p. ej. S-2765). Además, el ensayo de actividad se puede hacer funcionar a temperatura fisiológica.

[0048] La capacidad de las variantes de factor VIIa para generar trombina puede también ser medida en un ensayo que comprende todos factores de coagulación pertinentes e inhibidores a concentraciones fisiológicas (menos factor VIII cuando se imita condiciones de hemofilia A) y plaquetas activadas (como descritas en p. 543 en Monroe et al. (1997) Brit. J. Haematol. 99, 542-547 que por la presente es incorporada como referencia).

[0049] El término "identidad" como conocido en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptido o dos o más moléculas de ácido nucleico, como determinado por comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre moléculas de ácido nucleico o entre polipéptidos, según sea el caso, como determinado por el número de coincidencias entre cuerdas de dos o más residuos de nucleótido o dos o más residuos de aminoácidos. "Identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineamientos de espacio (si fuera el caso) dirigida por un modelo matemático particular o programa informático (es decir, "algoritmos").

[0050] El término "similitud" es un concepto relacionado, pero a diferencia de "identidad", se refiere a una relación secuencial que incluye ambas coincidencias idénticas y coincidencias de sustitución conservadoras. Si dos secuencias polipéptidas tienen, por ejemplo, { fracción (10/20)} aminoácidos idénticos, y el resto son todas sustituciones no conservadoras, entonces la identidad y similitud en porcentaje serían ambas 50%. Si, en el mismo ejemplo, hay 5 más posiciones dónde hay sustituciones conservadoras, entonces la identidad en porcentaje permanece 50%, pero la similitud en porcentaje sería 75% ({ fracción (15/20)}). Por lo tanto, en casos dónde hay sustituciones conservadoras, el grado de similitud entre dos polipéptidos será superior la identidad en porcentaje entre aquellos dos polipéptidos.

[0051] El término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido de la presente invención que (1) ha sido separado de al menos aproximadamente 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, carbohidratos o otros materiales (es decir; contaminantes) con los cuales es naturalmente asociado, (2) no es enlazado de manera covalente a todos o una parte de un polipéptido al que el "polipéptido aislado" se enlaza en naturaleza, (3) es operativamente enlazado de manera covalente a un polipéptido al cual no está enlazado de manera covalente en la naturaleza, o (4) no ocurre en la naturaleza. Preferiblemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de cualquier otros polipéptidos contaminantes u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o de investigación.

[0052] Modificaciones conservadoras a la secuencia de aminoácido SEC ID NO:1 (y las modificaciones correspondientes a los nucleótidos de codificación) al exterior de las posiciones para sustituciones reivindicadas producirán polipéptidos de FVII con características funcionales y químicas similares de aquellas de polipéptido de FVII de origen natural. En cambio, modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de polipéptidos de FVII se pueden realizar seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:1 que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto molecular en la región de la sustitución, por ejemplo, como una chapa o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula al sitio de objetivo, o (c) el bulto de la cadena lateral.

[0053] Por ejemplo, una "sustitución de aminoácido conservativa" puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo con un residuo no nativo de manera que hay poco o ningún efecto en la polaridad o carga del residuo de aminoácido en esa posición. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido puede también ser sustituido con almandino, como ha sido previamente descrito para "mutagénesis de escaneado de alanina" (ver, por ejemplo, MacLennan et al., 1998, Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67; Sasaki et al., 1998, Adv. Biophys. 35:1-24, que discuten mutagénesis de escaneado de alanina).

[0054] Identidad y similitud de polipéptidos relacionados pueden ser fácilmente calculadas por métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero de forma no limitativa, aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988 ; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993 ; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994 ; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987 ; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991 ; and Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988).

[0055] Métodos preferidos para determinar identidad y/o similitud se diseñan por dar la correspondencia más grande entre las secuencias evaluadas. Métodos para determinar identidad y similitud son descritas en programas informáticos públicamente disponibles. Métodos de programa informáticos preferidos para determinar identidad y similitud entre dos

secuencias incluyen, pero de forma no limitativa, el paquete de programa GCG, incluyendo GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984)); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible del centro nacional para la información biotecnológica (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894 ; Altschul et al., supra). El bien conocido algoritmo de Smith Waterman puede también ser usado para determinar identidad.

[0056] Determinados esquemas de alineamiento para alinear dos secuencias de aminoácidos puede suponer la correspondencia de sólo una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener identidad de secuencia muy alta aunque no hay relación significativa entre las dos secuencias de longitud total. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, el método de alineamiento seleccionado (programa GAP) resultará en un alineamiento que extiende al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido de objetivo.

[0057] Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), dos polipéptidos para los cuales debe ser determinada la identidad de secuencia en porcentaje se alinean para correspondencia óptima de sus aminoácidos respectivos (la "extensión correspondida", como determinado por el algoritmo). Una penalización de abertura de espacio (que se calcula como 3 veces la diagonal media; la "diagonal media" es la media de la diagonal de la matriz de comparación siendo usada; el "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada correspondencia de ácido de amina perfecta por la matriz de comparación particular) y una penalización de extensión de espacio (que es normalmente {la fracción (1/10)} veces la penalización de abertura del espacio), al igual que una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 se usan conjuntamente con el algoritmo. Una matriz de comparación estándar (ver Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp.3 (1978)) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU, 89:10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62) es también usada por el algoritmo.

[0058] Parámetros preferidos para una comparación de secuencia polipeptídica incluyen lo siguiente:

[0059] Algoritmo: Needleman et al., J. Mol. Biol., 48:443-453 (1970); matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919 (1992) ; penalización del espacio: 12, penalización de longitud del espacio: 4, umbral de similitud: 0.

[0060] El programa GAP es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados son los parámetros por defecto para comparaciones de polipéptido (con ninguna penalización para espacios finales) usando el algoritmo GAP.

[0061] Parámetros preferidos para comparaciones de secuencia de molécula de ácido nucleico incluyen lo siguiente: algoritmo: Needleman et al., J. Mol. Biol., 48:443-453 (1970); matriz de comparación: correspondencias=+10, falta de correspondencia=0, penalización del espacio: 50, penalización de longitud del espacio: 3.

[0062] El programa GAP es también útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados son los parámetros por defecto para comparaciones de molécula de ácido nucleico.

[0063] Otros algoritmos ejemplares, penalizaciones de abertura de espacio, penalizaciones de extensión de espacio, matrices de comparación, umbrales de similitud, etc., pueden ser utilizados incluyendo aquellos expuestos en el Program Manual, paquete Wisconsin, versión 9, septiembre, 1997. Las opciones particulares a ser hechas serán evidentes para los expertos en la técnica y dependerá de la comparación específica a ser hecha, tal como ADN para ADN, proteína para proteína, proteína para ADN; y adicionalmente, si la comparación es entre dados pares de secuencias (en cuyo caso son generalmente preferidos GAP o BestFit) o entre una secuencia y una base de datos grande de secuencias (en cuyo caso son preferidos FASTA o BLASTA).

[0064] El término "afinidad de unión de factor tisular", como se utiliza en este caso, significa la resistencia de la unión de un polipéptido de FVII para factor tisular humano. La afinidad de un polipéptido de FVII se mide por el constante de disociación K_d , definido como $[FVII] \times [TF] / [FVII-TF]$ donde $[FVII-TF]$ es la concentración molar del complejo FVII/TF, $[FVII]$ es la concentración molar del polipéptido FVII no unido y $[TF]$ es la concentración molar del factor tisular humano no unido. La constante de afinidad K_a se define por $1/K_d$.

[0065] La frase "sustancialmente la misma o aumentada actividad en comparación a Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante", como se utiliza en este caso, significa una actividad más del 50 % de la actividad de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la actividad es más del 60 % de la actividad de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la actividad es más del 70 % de la actividad de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la actividad es más del 80 % de la actividad de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En otra forma de realización la actividad es más del 90 % de la actividad de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En otra forma de realización la actividad es más del 100 % de la actividad de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En otra forma de realización la actividad es más del 120 % de la actividad de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En otra forma de realización la actividad es más del 200 % de la actividad de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En otra forma de realización la

actividad es más del 400 % de la actividad de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante.

[0066] El término "actividad" como se utiliza en este caso significa la capacidad de un polipéptido del factor VII para convertir su Factor X de sustrato al Factor Xa activo. La actividad de un polipéptido del factor VII se puede medir con el "Ensayo de proteólisis In Vitro".

[0067] La frase "una afinidad de enlace de factor tisular inferior a factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante", como se utiliza en este caso, significa una afinidad de enlace inferior a la del factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante como medido en un ensayo de afinidad de enlace TF, tal como el ensayo biosensor como se describe en el ejemplo 5. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 90 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 80 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 70 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 60 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 50 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 40 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 30 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 20% de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 10 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 5 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 1 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 0,1 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 0,01 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante. En una forma de realización la afinidad de enlace de factor tisular es inferior a 0,001 % de la afinidad de enlace de factor tisular de factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante.

[0068] El término "polietilenglicol" o "PEG" significa un compuesto de polietilenglicol o un derivado, con o sin agentes de acoplamiento, activantes de acoplamiento o fracciones (p. ej., con tiol, triflato, tresilato, azirdine, oxirano, o preferiblemente con una fracción de maleimide). Compuestos tal como PEG monometóxido maleimido son ejemplares de compuestos de PEG activados de la invención.

[0069] El término "un aminoácido diferente" como se utiliza en este caso significa uno o más aminoácidos que son diferentes que aquellos aminoácidos naturalmente presente en esa posición. Esto incluye pero no se limita a aminoácidos que se pueden codificar por un polinucleótido. Preferiblemente el aminoácido diferente está en la forma L natural y se puede codificar por un polinucleótido. Un ejemplo específico siendo ácido glutámico a L (L-Glu).

[0070] En otra forma de realización, los polipéptidos del factor VII de la invención son polipéptidos del factor VII que comprenden además sustituciones de aminoácido seleccionadas de la lista que consiste en L305V, L305V/M306D/D309S, L305I, L305T, F374P, V158T/M298Q, V158D/E296V/M298Q, K337A, M298Q, V158D/M298Q, L305V/K337A, V158D/E296V/M298Q/L305V, V158D/E296V/M298Q/K337A, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A, K157A, E296V, E296V/M298Q, V158D/E296V, V158D/M298K, y S336G, L305V/K337A, L305VN158D, L305V/E296V, L305V/M298Q, L305V/V158T, L305V/K337A/V158T, L305V/K337A/M298Q, L305V/K337A/E296V, L305V/K337A/V158D, L305V/V158D/M298Q, L305VN158D/E296V, L305V/V158T/M298Q, L305V/V158T/E296V, L305V/E296V/M298Q, L305V/V158D/E296V/M298Q, L305V/V158T/E296V/M298Q, L305V/V158T/K337A/M298Q, L305V/V158T/E296V/K337A, L305V/V158D/K337A/M298Q, L305V/V158D/E296V/K337A, L305V/V158T/E296V/K337A, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A, S314E/K316H, S314E/K316Q, S314E/L305V, S314E/K337A, S314EN158D, S314E/E296V, S314E/M298Q, S314EN158T, K316H/L305V, K316H/K337A, K316HN158D, K316H/E296V, K316H/M298Q, K316HN158T, K316Q/L305V, K316Q/K337A, K316Q/V158D, K316Q/E296V, K316Q/M298Q, K316Q/V158T, S314E/L305V/K337A, S314E/L305VN158D, S314E/L305V/E296V, S314E/L305V/M298Q, S314E/L305V/V158T, S314E/L305V/K337AN158T, S314E/L305V/K337A/M298Q, S314E/L305V/K337A/E296V, S314E/L305V/K337A/V158D, S314E/L305V/V158D/M298Q, S314E/L305V/V158D/E296V, S314E/L305V/V158T/M298Q, S314E/L305VN158T/E296V, S314E/L305V/E296V/M298Q, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q, S314E/L305VN158T/K337A/M298Q, S314E/L305VN158T/E296V/K337A, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A, K316H/L305V/K337A, K316H/L305V/V158D, K316H/L305V/E296V, K316H/L305V/M298Q, K316H/L305VN158T, K316H/L305V/K337AN158T, K316H/L305V/K337A/M298Q, K316H/L305V/K337A/E296V, K316H/L305V/K337A/V158D, K316H/L305V/V158D/M298Q, K316H/L305V/V158D/E296V, K316H/L305V/V158T/M298Q, K316H/L305V/V158T/E296V, K316H/L305V/E296V/M298Q, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A, K316Q/L305V/K337A,

K316Q/L305V/V158D, K316Q/L305V/E296V, K316Q/L305V/M298Q, K316Q/L305V/V158T, K316Q/L305V/K337A/V158T, K316Q/L305V/K337A/M298Q, K316Q/L305V/K337A/E296V, K316Q/L305V/K337A/V158D, K316Q/L305V/V158D/M298Q, K316Q/L305V/V158D/E296V, K316Q/L305V/V158T/M298Q, K316Q/L305V/V158T/E296V, K316Q/L305V/E296V/M298Q, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A, F374Y/K337A, F374Y/V158D, F374Y/E296V, F374Y/M298Q, F374Y/V158T, F374Y/S314E, F374Y/L305V, F374Y/L305V/K337A, F374Y/L305V/V158D, F374Y/L305V/E296V, F374Y/L305V/M298Q, F374Y/L305V/V158T, F374Y/L305V/S314E, F374Y/L305V/K337A/S314E, F374Y/K337A/V158T, F374Y/K337A/M298Q, F374Y/K337A/E296V, F374Y/K337A/V158D, F374Y/V158D/S314E, F374Y/V158D/M298Q, F374Y/V158D/E296V, F374Y/V158T/S314E, F374Y/V158T/M298Q, F374Y/V158T/E296V, F374Y/E296V/S314E, F374Y/S314E/M298Q, F374Y/E296V/M298Q, F374Y/L305V/K337A/V158D, F374Y/L305V/K337A/E296V, F374Y/L305V/K337A/M298Q, F374Y/L305V/K337A/V158T, F374Y/L305V/K337A/S314E, F374Y/L305V/V158D/E296V, F374Y/L305V/V158D/M298Q, F374Y/L305V/V158D/S314E, F374Y/L305V/E296V/M298Q, F374Y/L305V/E296V/V158T, F374Y/L305V/E296V/S314E, F374Y/L305V/M298Q/V158T, F374Y/L305V/M298Q/S314E, F374Y/L305V/V158T/S314E, F374Y/K337A/S314E/V158T, F374Y/K337A/S314E/E296V, F374Y/K337A/S314E/V158D, F374Y/K337A/V158T/M298Q, F374Y/K337A/V158T/E296V, F374Y/K337A/M298Q/E296V, F374Y/K337A/M298Q/V158D, F374Y/K337A/E296V/V158D, F374Y/V158D/S314E/M298Q, F374Y/V158D/S314E/E296V, F374Y/V158D/M298Q/E296V, F374Y/V158T/S314E/E296V, F374Y/V158T/S314E/M298Q, F374Y/V158T/M298Q/E296V, F374Y/E296V/S314E/M298Q, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E, F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A, F374Y/L305V/M298Q/K337A, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E, F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A, F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T, F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E, F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E, F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E, S52A, S60A; R152E, S344A, P11Q/K33E, T106N, K143N/N145T, V253N, R290N/A292T, G291 N, R315N/V317T, y K143N/N145T/R315N/V317T; o teniendo sustituciones, adiciones o eliminaciones en la secuencia de aminoácidos de 233Tr a 240Asn, o teniendo sustituciones, adiciones o eliminaciones en la secuencia de aminoácidos de 304Arg a 329Cys.

[0071] En otra forma de realización, los polipéptidos del factor VII de la invención son polipéptidos del factor VII, donde la constante de disociación K_D de dicho polipéptido del factor VII es superior a 5 nM, tal como superior a 7 nM, tal como superior a 10 nM, tal como superior a 20 nM, tal como superior a 30 nM, tal como superior a 50 nM, tal como superior a 100 nM, tal como superior a 200 nM, tal como superior a 300 nM, tal como superior a 400 nM, tal como superior a 500 nM, tal como superior a 1 μ M.

[0072] En una forma de realización el constructo polinucleótido de la invención es un vector.

[0073] El término "un polinucleótido" denota un polímero monocatenario o bicatenario de desoxirribonucleótido o bases de ribonucleótidos leído del final 5' al 3'. Polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar de fuentes naturales, sintetizados in vitro, u obtenidos a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula polinucleótida es dada aquí en términos de nucleótidos (abreviado "nt") o pares de base (abreviado "bp"). El término "nucleótidos" se usa para tanto para moléculas monocatenarias como bicatenarias dónde el contexto permite. Cuando el término se aplica para moléculas bicatenarias se usa para indicar longitud total y será entendida de ser equivalente al término "pares de base". Será reconocido por expertos en la técnica que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en la longitud y que sus extremidades se pueden escalonar como resultado de escisión enzimática; así todos nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido bicatenario no pueden ser pareados. Tales extremidades no-pareadas en general no exceden 20 nt en longitud.

[0074] 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 replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando introducido en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el cromosoma(s) en que ha sido integrado. La elección de vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que va a ser introducida. Vectores incluyen, pero no de forma limitativa a vectores plásmidos, vectores fágicos, virus o vectores cósmidos. Vectores normalmente contienen 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.

[0075] En una forma de realización, la célula huésped eucariota de la invención es de origen mamífero.

[0076] En otra forma de realización, la célula huésped eucariota de la invención es seleccionada del grupo que consiste en células CHO, células BHK o células HEK.

[0077] El término "una célula huésped eucariota", como se utiliza en este caso, representa cualquier célula, incluyendo células híbridas, en las que se puede expresar ADN heterólogo. Células huésped típicas incluyen, pero no de forma limitativa a células de insecto, células de levadura, células mamíferas, incluyendo células humanas, tal como células BHK, CHO, HEK y COS. Practicando la presente invención, las células huésped que son cultivadas son preferiblemente células mamíferas, más preferiblemente una línea celular mamífera establecida, incluyendo, sin limitación, líneas celulares CHO (p. ej., ATCC CCL 61), COS-1 (p. ej., ATCC CRL 1650), baby hamster kidney (BHK) y H EK293 (p. ej., ATCC CRL 1573 Graham et al, J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977).

[0078] Una línea celular BHK preferida es la línea celular tk- ts13 BHK (Waechter and Baserga, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79: 1106-1110, 1982), de ahora en adelante referido como células BHK 570. La línea celular BHK 570 está disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, bajo Número de acceso de ATCC CRL 10314. Una línea celular tk- ts13 BHK está también disponible del ATCC bajo número de acceso CRL 1632.

[0079] 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 and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 77:4216-4220, 1980). También son útiles células 3T3, células Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células. En una forma de realización la célula huésped eucariota es de origen mamífero. En otra forma de realización la célula huésped eucariota es seleccionada del grupo que consiste en células CHO, células BHK o células HEK.

[0080] El término "tratamiento", como se utiliza en este caso, significa la administración de una cantidad eficaz de un compuesto terapéuticamente activo de la invención con el propósito de prevenir cualquier estado de síntomas de enfermedad a desarrollar o con el propósito de curar o aliviar tales síntomas o estados de enfermedad ya desarrollados. El término "tratamiento" tiene por tanto por objeto incluir tratamiento profiláctico.

[0081] El término "mejora del sistema haemostático normal" significa una mejora de la capacidad para generar trombina.

[0082] Como se utiliza en este caso, el término "trastornos de sangrado" refleja cualquier defecto, congénito, adquirido o inducido, de origen celular o molecular que se manifiesta en sangrados. Ejemplos son deficiencias factoras de coagulación (p. ej. hemofilia A y B o deficiencia de factores de coagulación XI o VII), inhibidores de factores de coagulación, función de plaqueta defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand.

[0083] El término "episodios de sangrado" tiene por objeto incluir sangrado descontrolado y excesivo que es un problema mayor ambos en relación con cirugía y otras formas de daño de tejido. Sangrado descontrolado y excesivo puede ocurrir en sujetos con un sistema de coagulación normal y sujetos con trastornos de coagulación o de sangrado. Deficiencias de factor de coagulación (hemofilia A y B, deficiencia de factor de coagulación XI o VII) o inhibidores de factor de coagulación pueden ser la causa de trastornos de sangrado. Sangrados excesivos también ocurren en temas con una cascada de coagulación de sangre de funcionamiento normal (no deficiencias de factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación) y pueden ser provocados por una función de plaqueta defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. En tales casos, los sangrados pueden ser similares a los sangrados provocados por hemofilia debido a que el sistema hemostático, como en la hemofilia, carece o tiene coagulación esencial anormal "compuestos" (tal como plaquetas o proteína de factor de von Willebrand) que causa sangrados mayores. En sujetos que experimentan daño tisular extenso en asociación con cirugía o traumatismo grande, el mecanismo hemostático normal se puede vencer por la demanda de hemostasis inmediata y éstas pueden desarrollar sangrado a pesar de un mecanismo hemostático normal. Alcanzando satisfactoriamente hemostasis también es un problema cuando los sangrados ocurren en órganos tal como el cerebro, región de 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 la cirugía laparoscópica. Común para todas estas situaciones es la dificultad de proporcionar hemostasis por técnicas quirúrgicas, (suturas, clips, etc.) que también es el caso cuando el sangrado es difuso (gastritis hemorrágica y sangrado uterino profuso). Sangrados agudos y profusos pueden también ocurrir en sujetos en terapia anticoagulante en los que una hemostasis defectuosa ha sido inducida por la terapia dada. Tales sujetos pueden necesitar intervenciones quirúrgicas en el caso de que el efecto anticoagulante tiene que ser contrarrestado rápidamente. Prostatectomía retropública radical es un procedimiento comúnmente realizado para sujetos con cáncer de próstata localizado. La operación es frecuentemente complicada por pérdida de sangre significativa y a veces masiva. La pérdida de sangre considerable durante prostatectomía está principalmente relacionada con la situación anatómica complicada, con varios sitios densamente vascularizados que no son fácilmente accesibles 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 se les da terapia anticoagulante para prevenir enfermedad tromboembólica. Tal terapia puede incluir heparina, otras formas de proteoglicanos, warfarina u otras formas de antagonistas de K de vitamina al igual que aspirina y otros inhibidores de agregación plaquetaria.

[0084] En una forma de realización de la invención, el sangrado se une con hemofilia A o B. En otra forma de realización, el sangrado se une con hemofilia con inhibidores adquiridos. En otra forma de realización, el sangrado se une con trombocitopenia. En otra forma de realización, el sangrado se une con enfermedad de von Willebrand. En otra forma de realización, el sangrado se une con daño de tejido severo. En otra forma de realización, el sangrado se une con traumatismo severo. En otra forma de realización, el sangrado se une con cirugía. En otra forma de realización, el sangrado se une con cirugía laparoscópica. En otra forma de realización, el sangrado se une con gastritis hemorrágica. En otra forma de realización, el sangrado es profuso sangrado uterino. En otra forma de realización, el sangrado se produce en órganos con una posibilidad limitada para hemostasis mecánica. En otra forma de realización, el sangrado se produce en el cerebro, región de oído interno u ojos. En otra forma de realización, el sangrado se une con el proceso de tomar biopsias. En otra forma de realización, el sangrado se une con terapia anticoagulante.

[0085] El término "sujeto" como se utiliza en este caso se destina para referirse a cualquier animal, en particular mamíferos, tal como seres humanos, y puede, si es apropiado, ser usado de forma intercambiable con el término "paciente".

[0086] La terminología para sustituciones de aminoácido usada aquí es como sigue. La primera letra representan el aminoácido naturalmente presente a una posición de SEC ID n°: 1. El siguiente número representa la posición en SEC ID n°: 1. La segunda letra representa el aminoácido diferente sustituyendo para el aminoácido natural. Un ejemplo es S43N, donde una serina en la posición 43 de SEC ID n°: 1 se sustituye por una asparagina. En otro ejemplo, K62E/I69A, la lisina en la posición 62 de SEC ID n°: 1 se sustituye por un ácido glutámico y la isoleucina en la posición 69 de SEC ID n°: 1 se sustituye por una alanina en el mismo polipéptido de factor VII. I69A-FVII así significa FVII humano de tipo salvaje, donde una isoleucina en la posición 69 de SEC ID n°: 1 ha sido sustituida por una alanina.

[0087] En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de un polipéptido de factor VII con una afinidad de enlace de factor tisular inferior a factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante y sustancialmente la misma actividad o actividad aumentada en comparación con factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante; en el tratamiento terapéutico de sangrados, donde la exposición de TF es alta, tal como indicaciones donde hay un riesgo de rotura de placa, quebradura de placa después procedimientos de angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA), sepsis, u otras complicaciones de sangrado, donde condiciones inflamatorias donde se ven cantidades aumentadas de factor tisular. En una forma de realización los sangrados, donde la exposición de TF es alta es un trastorno de coagulación, tal como coagulación intravascular diseminada (DIC).

[0088] La presente invención también encierra métodos y composiciones que proporcionan terapias de combinación en las que el polipéptido de factor VII con una afinidad de enlace de factor tisular inferior que factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante y sustancialmente la misma actividad o actividad aumentada en comparación con factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante se administra con otro compuesto procoagulante, compuesto antifibrinolítico o regulador de compuestos anticoagulantes. Compuestos adecuados incluyen, sin limitación, FVIII (tal como Refacto® (Genetics Institute), Kogenate FS® (Bayer), Monoclate-P® (Aventis Behring), Factor XIII (ver, por ejemplo, WO 01/85198); inhibidores de inhibidor de ruta de factor de tejido (inhibidores TFPI) (ver, por ejemplo, WO 01/85199); Factor IX (ver, por ejemplo, WO 02/062376); inhibidor de fibrinólisis activable de trombina (TAFI) (ver, por ejemplo, PCT/DK02/00734; PAI-1 (ver, por ejemplo, PCT/DK02/00735; Factor V (ver, por ejemplo, PCT/DK02/00736); inhibidores de proteína C (ver, por ejemplo, PCT/DK02/00737); trombomodulina (ver, por ejemplo, PCT/DK02/00738); inhibidores de proteína S (ver, por ejemplo, PCT/DK02/00739); inhibidores activadores plasminógenos tisulares (ver, por ejemplo, PCT/DK02/00740); alfa2-antiplasmina (ver, por ejemplo, PCT/DK02/00741); aprotinina (ver, por ejemplo, PCT/DK02/00742); ácido tranexámico (ver, por ejemplo, PCT/DK02/00751); ácido aminocaproico de epsilon (ver, por ejemplo, PCT/DK02/00752); protrombina, trombina, Factor VII Factor X, Factor XI y, portadores de oxígeno fibrinógenos artificiales (tal como POLYHEME®, Nortfield lab), coloides (tal como Hextend, BioTime, Inc), Desmopressin (tal como Comprimidos de DDAVP® (Desmopressin acetato) Adventis Pharmaceuticals), concentraciones complejas de protrombina activada (es decir, Bebulin, Proplex-T, Profilone, Autoplex, FEIBA), Clopidogrel, Ticlopidine, glicoproteína IIB/IIIA antagonistas (Abciximab), LMWH, Warfarina. Streptokinase, activador plasminógeno tisular (tPA) / mutantes de tPA.

[0089] En una forma de realización el polipéptido de factor VII con una afinidad de enlace de factor tisular inferior a factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante y sustancialmente la misma actividad o actividad aumentada en comparación con factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante es como descrito en cualquiera de solicitudes de patente internacionales WO 99/20767, WO 00/66753, WO 01/58935, WO 03/93465 y WO 04/029091, cada una de las cuales es por la presente incorporada por referencia en su totalidad.

[0090] En la presente especificación, aminoácidos son representados usando abreviaturas, como indicados en la tabla 1, aprobados por comisión IUPAC-IUB en la nomenclatura bioquímica (CBN). Aminoácido y similares teniendo isómeros representados por nombre o las siguientes abreviaturas están en forma L natural a menos que se indique lo contrario. Además, a las extremidades izquierda y derecha de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, el N- y C-terminales a menos que se indique lo contrario.

Tabla 1: Abreviaturas para 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
Cisteina	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 glutamínico	Glu	E
Acido aspártico	Asp	D
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T

[0091] La invención también se refiere a un método de preparación de polipéptidos de factor VII humano como se ha mencionado anteriormente. Los polipéptidos de factor VII humano son preferiblemente producidos por técnicas de DNA recombinantes. Con este fin, secuencias de ADN que codifican factor VII humano se pueden aislar preparando un genómico o genoteca de ADNc y seleccionando para codificación de secuencias de ADN para todos o parte de la proteína por hibridación usando sondas oligonucleótidas sintéticas de acuerdo con técnicas estándar (f. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Para este fin, la secuencia de ADN que codifica la proteína es preferiblemente de origen humano, es decir, derivado de un ADN genómico humano o genoteca de ADNc.

[0092] Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos de factor VII humano pueden también ser preparadas sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo el método de fosfoamidita descrito por Beaucage and Carutens, 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, oligonucleótidos son sintetizados, por ejemplo en un sintetizador de ADN automático, purificado, anillado, ligado y clonado en vectores adecuados.

[0093] Las secuencias de ADN pueden también ser preparadas por reacción de cadena de polimerasa usando cebadores, por ejemplo como se describe en US 4,683,202, Saiki et al., Science 239 (1988), 487 - 491, o Sambrook et al., supra.

[0094] Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos de factor VII humano son normalmente insertadas en un vector recombinante que puede ser cualquier vector, que puede convenientemente ser sometido a procedimientos de ADN recombinantes, y la elección de vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que va a ser introducida. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector, que existe como una entidad extracromosómica, la replicación de la cual es independiente de replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando introducido en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y replicado junto con el cromosoma(s) en el que ha sido integrado.

[0095] El vector es preferiblemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica los polipéptidos de factor VII humano es operativamente enlazado 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, "operativamente enlazado" indica que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan en concierto para sus fines previstos, por ejemplo transcripción se inicia en un promotor y procede a través de la codificación de secuencia de ADN para el polipéptido.

[0096] 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 bien de manera homóloga o bien heteróloga a la célula huésped.

[0097] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el polipéptido de factor VII humano en células mamíferas son el promotor SV40 (Subramani et al., Mol. Cell Biol. 1 (1981), 854 -864), el MT-1 (gen de metalotioneína) promotor (Palmiter et al., Science 222 (1983), 809 - 814), el promotor CMV (Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985) o el promotor tardío mayor de adenovirus 2 (Kaufman and Sharp, Mol. Cell. Biol. 2:1304-1319, 1982).

[0098] Un ejemplo de un promotor adecuado para uso en las 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.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 de gen inmediato temprano de baculovirus 1 (US 5,155,037; US 5,162,222), o el promotor de gen retardado-temprano de baculovirus 39K (US 5,155,037; US 5,162,222).

[0099] 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 dehidrogenasa alcohólicos (jYoung et al., in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender et al, eds.), Plenum Press, New York, 1982), o el TPI1 (US 4,599,311) o promotores ADH2-4c (Russell et al., Nature 304 (1983), 652 - 654).

[0100] Ejemplos de promotores adecuados para uso en las 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 la amilasa *A. oryzae* TAKA, proteínasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, α -amilasa *A. niger* neutro, α -amilasa *A. niger* ácido estable, glucoamilasa *A. niger* o *A. awamori* (*gluA*), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, isomerasa triosafosfato de *A. oryzae* o acetamidasa de *A. nidulans*. Preferidos son la amilasa de TAKA y promotores *gluA*. Promotores adecuados son mencionados en por ejemplo EP 238 023 y EP 383 779.

[0101] Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos de factor VII humano pueden también, si es necesario, ser operativamente conectadas a un terminador adecuado, tal como el terminador 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). El vector puede también contener un conjunto de sitios de empalme ARN localizados abajo del promotor y arriba del sitio de inserción para la secuencia de factor VII misma. Sitios de empalme ARN preferidos se pueden obtener de genes de adenovirus y/o 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 adenovirus 5 Elb, el terminador de gen de hormona de crecimiento humana (DeNoto et al. Nuc. Acids Res. 9:3719-3730, 1981) o la señal de poliadenilación del I gen de Factor VI humano o el gen o de factor VII bovino. Los vectores de expresión pueden también incluir una secuencia líder no codificante vírica, tal como el líder tripartita de adenovirus 2, localizado entre el promotor y los sitios de empalme ARN; y secuencias potenciadoras, tal como el intensificador SV40.

[0102] El vector recombinante puede comprender además una secuencia de ADN permitiendo al vector de replicarse en la célula huésped en cuestión. Un ejemplo de tal una secuencia (cuando la célula huésped es una célula mamífera) es el origen SV40 de replicación.

[0103] Cuando la célula huésped es una célula de levadura, secuencias adecuadas permitiendo al vector de replicarse son los genes de replicación de plásmido de levadura 2 μ REP 1-3 y origen de replicación.

[0104] El vector puede también comprender una etiqueta seleccionable, por ejemplo un gen el producto del cual complementa un defecto en la célula huésped, tal como el gen codificando para hidrofolato-reductasa (DHFR) o el gen TPI Pombe de Schizosacaromices (descrito por P.R. Russell, gen 40, 1985, págs. 125-130), o un que confiere resistencia a un medicamento, por ejemplo ampicilina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

Para hongos filamentosos, marcadores seleccionables incluyen *amdS*, *pyrG*, *argB*, *niaD* o *sC*.

[0105] Para dirigir los polipéptidos de factor VII humano de la presente invención en la vía secretora de las células huésped, una secuencia de señal secretora (también conocido 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 los polipéptidos de factor VII humano en el marco de lectura correcto. Secuencias señal secretoras

son comúnmente situadas 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 secreción de células de levadura, la secuencia señal secretora puede codificar cualquier péptido de señal, que asegura dirección eficaz de los polipéptidos de factor VII humano expresados en la vía secretora de la célula. El péptido de señal puede ser péptido de señal producido de forma natural, o una parte funcional del mismo, o puede ser un péptido sintético. Péptidos de señal adecuados se ha descubierto 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 modificado (ccf. L.A. Valls et al., Cell 48, 1987, pp. 887-897), el péptido de señal de levadura BAR1 (cf. WO 87/02670), o el péptido de señal de proteasa aspártica de levadura 3 (YAP3) (cf. M. Egel-Mitani et al., Yeast 6, 1990, pp. 127-137).

[0107] Para secreción eficaz en la levadura, una secuencia que codifica un péptido líder puede también ser insertada abajo de la secuencia de señal y arriba de la secuencia de ADN que codifica los polipéptidos de factor VII humano. La función del péptido líder es de permitir al péptido expresado de 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 los polipéptidos de 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 líder alfa-factor de levadura (el uso del cual es descrito 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, que es a decir un péptido líder no encontrado en la naturaleza. Péptidos líder sintéticos pueden, por ejemplo, ser contruidos 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 glucoamilasa *Aspergillus* sp., un gen que codifica una lipasa o proteasa de *Rhizomucor miehei* o una lipasa *Humicola lanuginosa*. El péptido de señal es preferiblemente derivado de un gen que codifica una amilasa de *A. oryzae* TAKA, una α -amilasa *A. niger* neutro, una amilasa *A. niger* estable de ácido, o glucoamilasa *A. niger*. Péptidos señal adecuados son descritos en, por ejemplo EP 238 023 y EP 215 594.

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

[0110] Los procedimientos usados para enlazar la codificación de secuencias de ADN para los polipéptidos de factor VII humano, el promotor y opcionalmente el terminador y/o secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados con la información necesaria para replicación, se conocen por personas expertas en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

[0111] Métodos de transfectar células mamíferas y secuencias de ADN de expresión introducidas en las células son descritas en por ejemplo K 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] 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 pueden estar bajo el control de diferentes promotores o el mismo promotor, ésta disposición que produce un mensaje bicistrónico. Constructos de este tipo se conocen en la técnica (por ejemplo, Levinson and Simonsen, EEUU Pat. n.º. 4,713,339). Puede también ser ventajoso añadir ADN adicional, conocido como "DNA portador", a la mezcla que se introduce en las células.

[0113] Después de que las células hayan absorbido el ADN, éstas crecen en un medio de crecimiento apropiado, típicamente 1-2 días, para iniciar la expresión del gen de interés. Como se utiliza en este caso el término medios "medio de crecimiento apropiado" significa un medio con nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión de los polipéptidos de 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 μ g/ml a aproximadamente 5 μ g/ml. Selección de medicamento es luego aplicada para seleccionar para el crecimiento de células que están expresando el marcador seleccionable en una forma estable. Para células que han sido modificadas con una etiqueta seleccionable amplificable la concentración de medicamento se puede aumentar para seleccionar para un número de copia aumentado de las secuencias clonadas, así aumentando niveles de expresión.

Clones de células transfectadas establemente son luego seleccionadas para expresión del polipéptido de factor VII humano de interés.

[0114] La célula huésped en la que las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos de factor VII humano son introducidas, puede ser cualquier célula, que es capaz de producir los polipéptidos de factor VII humano

postranslacionalmente modificado e incluye levadura, hongos y células eucariotas más altas.

[0115] Ejemplos de líneas celulares mamíferas para uso en la presente invención son el COS-1 (ATCC CRL 1650), riñón de cría de hámster (BHK) y líneas celulares 293 (ATCC CRL 1573 Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Una línea celular BHK preferida la línea celular tk- ts13 BHK (Waechter and Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 79:1106-1110, 1982, incorporada aquí por referencia), de ahora en adelante referido como células BHK 570.

La línea celular BHK 570 ha sido depositada con la Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852, bajo número de acceso ATCC CRL 10314. Una línea celular BHK tk-ts13 está también disponible del ATCC bajo número de acceso CRL 1632. Además, un número de otras líneas celulares se puede 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. EEUU 77:4216-4220, 1980).

[0116] 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 transformar células de levadura con ADN heterólogo y producir polipéptidos heterólogos de ellas son descritos, por ejemplo en US 4,599,311, US 4,931,373, US 4,870,008, 5,037,743, y US 4,845,075, todos lo cuales son por la presente incorporados por referencia. Células transformadas se seleccionan por un fenotipo determinado por una etiqueta seleccionable, resistencia de medicamento común 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 US 4,931,373. Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos de 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*, tal como *K. lactis*, *Hansenula*, por ejemplo *H. polymorpha*, o *Pichia*, por ejemplo *P. pastoris* (cf. Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, pp. 3459-3465; US 4,882,279).

[0117] 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 es descrito 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.

[0118] Cuando un hongo filamentoso se usa como la célula huésped, se puede transformar con el constructo de ADN de la invención, convenientemente integrando el constructo de ADN en el cromosoma huésped para obtener una célula huésped recombinante. Esta integración es generalmente considerada de ser una ventaja ya que es más posible que la secuencia de ADN sea mantenida establemente en la célula. Integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped se pueden realizar según métodos convencionales, por ejemplo por recombinación homóloga o heteróloga.

[0119] Transformación de células de insecto y producción de polipéptidos heterólogos en estos se pueden realizar como se describe en US 4,745,051; US 4,879,236; US 5,155,037, 5,162,222; EP 397,485) todos lo cuales son incorporados aquí por referencia. La línea celular de insecto usado como el huésped puede adecuadamente ser una línea celular de lepidópteros, tal como células *Spodoptera frugiperda* o Células *trichoplusia ni* (cf. US 5,077,214). Condiciones de cultivo puede adecuadamente ser como se describe en, por ejemplo, WO 89/01029 o WO 89/01028, o cualquiera de las referencias mencionadas.

[0120] La célula huésped transformada o transfectada anteriormente descrita es luego cultivada en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones que permiten expresión del polipéptido de factor VII humano después del cual todo o parte del péptido resultante puede ser recuperado del cultivo. El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huésped, tal como medios mínimos o complejos con suplementos apropiados. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se puede preparar según recetas publicadas (p. ej. en catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo). El polipéptido de factor VII humano producido por las células puede luego ser recuperado del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo la separación de las células huésped del medio por centrifugación o filtración, precipitación de los componentes proteico acuosos del sobrenadantes o filtrados mediante una sal, por ejemplo sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de gel filtración, cromatografía de afinidad, o similar, dependiendo del tipo de polipéptido en cuestión.

[0121] Para la preparación de polipéptidos de factor VII humano recombinante, se usa una secuencia de ADN de factor VII de tipo salvaje clonado. Esta secuencia se puede modificar para codificar una variante del Factor VII deseada. El nucleótido completo y secuencias de aminoácidos para factor VII humano son conocidos. Ver EEUU Pat. n°. 4,784,950, que es incorporado aquí por referencia, dónde la clonación y expresión de factor VII humano recombinante es descrita. La secuencia de factor VII bovino es descrita en Takeya et al., J. Biol. Chem, 263:14868-14872 (1988), que se incorpora por referencia aquí.

[0122] Las alteraciones de secuencia de aminoácidos se pueden realizar por una variedad de técnicas. Modificación de la secuencia de ADN puede ser por mutagénesis de sitio específica. Técnicas para mutagénesis de sitio específica se conocen bien en la técnica y son descritas por, por ejemplo, Zoller and Smith (ADN 3:479-488, 1984). Así, usando el

nucleótido y secuencias de aminoácidos de factor VII, uno puede introducir las alteraciones de elección.

[0123] Secuencias de ADN para uso en la presente invención típicamente codificarán un pre-pro péptido al terminal amino de la proteína de Factor VI I para obtener tratamiento apropiado postraslacional (p. ej. gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico) y secreción de la célula huésped. El pre-pro péptido puede ser el de factor VII o otra proteína plasmática K dependiente vitamínica, tal como factor IX, factor X, protrombina, proteína C o proteína S. Como será apreciado por expertos en la técnica, modificaciones adicionales pueden ser hechas en la secuencia de aminoácidos de factor VII donde aquellas modificaciones significativamente no perjudican la capacidad de la proteína para actuar como un factor de coagulación. Por ejemplo, factor VII en la tríada catalítica puede también ser modificado en el sitio de escisión de activación para inhibir la conversión de factor VII de zimógeno en su forma bicatenaria activada, como generalmente descrito en la patente estadounidense n°. 5,288,629, incorporada aquí por referencia.

[0124] En la presente invención, tecnología animal transgénica se puede emplear para producir el polipéptido factor VII humano. 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. Leche es fácilmente recogida, disponible en cantidades grandes, y bien caracterizada bioquímicamente. Además, las proteínas de leche mayores están presente en la leche a concentraciones altas (típicamente de aproximadamente 1 a 15 g/l). Desde un punto de vista comercial, es claramente preferible usar como el huésped unas especies que tienen una producción de leche grande. Mientras animales más pequeños tal como ratones y ratas pueden ser usados (y se prefieren a la comprobación de fase de principio), en la presente invención se prefiere usar mamíferos de ganado, incluyendo, pero no limitado a cerdos, cabras, ovejas, vacas. Ovejas son particularmente preferidas debido a tales factores como la historia precedente de transgénesis en estas especies, producción de leche, coste y la disponibilidad preparada de equipamiento para recolectar leche de oveja. Ver publicación WIPO WO 88/00239 para una comparación de factores que influyen la elección de especie huésped. Es generalmente deseable seleccionar una raza de animal huésped que ha sido criado para uso lácteo, tal como oveja de Frisia oriental, o para introducir materia prima de lechería por cultivo de la línea transgénica a una fecha más tardía. De cualquier manera, animales de estado de salud conocido, bueno, deberían ser usados.

[0125] Para obtener expresión en la glándula mamaria, se usa un promotor de transcripción de un gen de proteína de la leche. Genes de proteína de leche incluyen aquellos genes que codifican caseínas (ver EEUU Pat. n°. 5,304,489, incorporada aquí por referencia), beta-lactoglobulina, alfa-lactalbumina, y proteína ácida de lactosuero. El promotor de beta-lactoglobulina (BLG) es preferido. En el caso del gen de beta-lactoglobulina ovina, una región de al menos el proximal 406 bp de 5' secuencia flanqueante del gen será generalmente usada, aunque partes más grandes de la 5' secuencia flanqueante, hasta aproximadamente 5 kbp, son preferidas, tal como aproximadamente 4,25 kbp segmento de ADN que circunda el 5' promotor flanqueante y parte no codificante del gen de beta-lactoglobulina. Ver Whitelaw et al., Biochem J. 286: 31-39 (1992)). Fragmentos similares de promotor de ADN de otras especies son también adecuados.

[0126] Otras regiones del gen de beta-lactoglobulina pueden también ser incorporadas en constructos, como pueden regiones genómicas del gen a ser expresadas. Es generalmente aceptado en la técnica que intrones carentes de constructos, por ejemplo, expreso mal en la comparación con aquellos que contienen tales secuencias de ADN (ver Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 85: 836-840 (1988); Palmiter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 88: 478-482 (1991); Whitelaw et al., Transgenic Res. 1: 3-13 (1991); WO 89/01343; y WO 91/02318, cada uno de los cuales es incorporado aquí por referencia). A este respecto, es generalmente preferido, cuando sea 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 beta-lactoglobulina, es preferido. Una tal región es un segmento de ADN que proporciona para eliminación de intrones y poliadenilación de ARN de la 3' región no codificante del gen de beta-lactoglobulina ovino. Cuando sustituido para las secuencias de un gen natural 3' no codificantes, este segmento de beta-lactoglobulina ovina puede tanto mejorar y estabilizar niveles de expresión de la proteína o polipéptido de interés. Dentro de otras formas de realización, la región que circunda la iniciación ATG de la secuencia que codifica el polipéptido de factor VII humano se sustituye con secuencias correspondientes de un gen de proteína específico de leche. Tal sustitución proporciona un entorno de iniciación putativo tisular específico para mejorar expresión. Es conveniente reemplazar el total de la pre-pro secuencia del polipéptido de Factor VI I humano y 5' secuencias no codificantes con aquellas de, por ejemplo, el gen BLG, aunque regiones más pequeñas pueden ser sustituidas.

[0127] Para la expresión de un polipéptido de factor VII humano en animales transgénicos, un segmento de ADN que codifica el polipéptido de factor VII humano es operativamente enlazado a segmentos de ADN adicionales requeridos para su expresión para producir unidades de expresión. Tales segmentos adicionales incluyen el promotor arriba mencionado, al igual que secuencias que proveen para terminación de transcripción y poliadenilación de ARNm. Las unidades de expresión incluirán además un segmento de ADN que codifica una secuencia de señal secretora operativamente enlazada al segmento que codifica el polipéptido de factor VII humano. La secuencia de señal secretora puede ser una secuencia de señal secretora nativa del polipéptido de factor VII humano o puede ser aquella de otra proteína, tal como una proteína de leche. Ver, por ejemplo, von Heinje, Nuc. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986); y Meade et al., U.S. Pat. No. 4,873,316, que son incorporados aquí por referencia.

[0128] Construcción de unidades de expresión para uso en animales transgénicos es convenientemente realizado

insertando una secuencia que codifica el polipéptido de factor VII humano en un plásmido o vector de fago con los segmentos de ADN adicionales, aunque la unidad de expresión se puede construir por esencialmente cualquier secuencia de ligaduras. Es particularmente conveniente proporcionar un vector con un segmento de ADN que codifica una proteína de leche y reemplazar la secuencia codificante para la proteína de leche con aquella del polipéptido de factor VII humano, creando así una fusión de gen que incluye las secuencias de control de expresión del gen de proteína de leche. De cualquier manera, clonando las unidades de expresión en plásmidos u otros vectores facilita la amplificación del polipéptido de factor VII humano. Amplificación es convenientemente realizada en células huésped bacterianas (p. ej. *E. coli*), así los vectores típicamente incluirán un origen de replicación y una etiqueta seleccionable funcional en células huésped bacterianas.

[0129] La unidad de expresión es luego introducida en huevos fertilizados (incluyendo embriones de fase temprana) de las especies huésped elegidas. Introducción de ADN heterólogo se puede realizar por una de diferentes vías, incluyendo microinyección (p. ej. EEUU Pat. n.º. 4,873,191), infección retroviral (Jaenisch, *Science* 240: 1468-1474 (1988)) o integración dirigida al sitio usando células madre (ES) embrionarias (revisto 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 dejan que se desarrollen. Descendencia que lleva el ADN introducido en su línea germinal puede pasar el ADN en su descendiente en la forma normal, mendeliana, permitiendo el desarrollo de rebaños transgénicos.

[0130] Procedimientos generales para producir 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. Pat. Nos. 4,873,191 and 4,873,316; WIPO publications WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; and GB 87/00458, que son incorporados aquí por referencia. Técnicas para introducir secuencias de ADN extranjeras 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); y Brinster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4438-4442 (1985). Estas técnicas fueron posteriormente adaptadas para uso con animales más grandes, incluyendo especies de ganado (ver por ejemplo, WIPO publications 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 o ganados transgénicos, 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 ser empleada. Producción en plantas transgénicas puede también ser empleada. Expresión puede ser generalizada o dirigida a un órgano particular, tal como un tubérculo. Ver, Hiatt, 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 la publicación de la Oficina Europea de Patentes EP 255,378.

[0131] Factor VII producido según la presente invención se puede purificar por cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpo de anti- factor VII. Se prefiere que la columna de inmunoabsorción comprenda un anticuerpo monoclonal de especificidad alta. El uso de anticuerpos monoclonales calcio-dependientes, como se describe por Wakabayashi et al., *J. Biol. Chem.* 261: 11097-11108; (1986) y Tim et al., *Biochem.* 27: 7785-7793; (1988), incorporado por referencia aquí, es particularmente preferido. Purificación adicional se puede conseguir por medios de purificación convencionales químicos, tal 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 del Factor VII descrito aquí (ver, generalmente, Scopes, R., *Protein Purification*, Springer- Verlag, N.Y., 1982)). Factor VII substancialmente puro de al menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad, es preferido, y 98 a 99% o más homogeneidad es más preferido, para usos farmacéuticos. Una vez purificado, parcialmente o a homogeneidad como deseada, el factor VII puede luego ser usado terapéuticamente.

[0132] Conversión de factor VII monocatenario a factor VIIa activo bicatenario puede ser conseguido usando factor XIIa como descrito por Hedner y Kisiel (1983, *J. Clin. Invest.* 71: 1836-1841), o con otras proteasas con especificidad de tipo tripsina (Kisiel and Fujikawa, *Behring Inst. Mitt.* 73: 29-42, 1983)). Alternativamente factor VII se puede autoactivar pasando éste a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, tal como mono Q.RTM. (Pharmacia Fire Chemicals) o similares (Bjoern et al., 1986, *Research Disclosures* 269:564-565)). Las moléculas de factor VII de la presente invención y composiciones farmacéuticas de las mismas son particularmente útiles para administración a seres humanos para tratar una variedad de condiciones implicando coagulación intravascular.

[0133] La invención también proporciona ensayos adecuados para seleccionar polipéptidos de factor VIIa preferidos y derivados de factor VIIa según la invención. Estos ensayos se pueden realizar como una simple prueba preliminar in vitro.

[0134] Así, ejemplo 3 aquí divulga una simple prueba (titulada "Ensayo de hidrólisis In Vitro") para la actividad de polipéptidos de factor VIIa de la invención. Basado sobre el mismo, polipéptidos de factor VIIa que son de interés particular son tales polipéptidos donde la proporción entre la actividad de la variante y la actividad de factor VII humano nativo mostrado en Fig. 1 es aproximadamente 1,0 o más alto, cuando evaluado en el "Ensayo de hidrólisis In Vitro" aquí definido.

[0135] La actividad de los polipéptidos puede también ser medida usando un sustrato fisiológico tal como factor X ("Ensayo de proteólisis In Vitro") (ver ejemplo 4), adecuadamente a una concentración de 100-1000 nM, dónde el Factor Xa generado es medido después la adición de un sustrato cromogénico adecuado (p. ej. S-2765). Además, el ensayo de actividad puede hacerse funcionar a temperatura fisiológica.

[0136] La capacidad de los polipéptidos de factor VIIa procoagulantes para generar trombina puede también ser medida en un ensayo que comprende todos factores de coagulación pertinentes e inhibidores a concentraciones fisiológicas (menos factor VIII imitando condiciones de hemofilia A) y plaquetas activadas (como descrito en p. 543 en Monroe et al. (1997) Brit. J. Haematol. 99, 542-547 que es por la presente incorporada como referencia).

[0137] Los polipéptidos de factor VII procoagulantes según la presente invención se pueden utilizar para controlar trastornos de sangrado que tienen diferentes causas tal como deficiencias de factor de coagulación (p. ej. hemofilia A y B o deficiencia de factor de coagulación XI o VII) o inhibidores de factor de coagulación, o ellos se pueden utilizar para controlar sangrado excesivo ocurriendo en sujetos con una cascada de coagulación de sangre de funcionamiento normal (no deficiencias de factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación). Los sangrados se pueden provocar por una función de plaqueta defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. Ellos puede también ser vistos en sujetos en los que una actividad fibrinolítica aumentada ha sido inducida por varios estímulos.

[0138] En sujetos que experimentan daño tisular extenso en asociación con cirugía o traumatismo grande, el mecanismo hemostático se puede vencer por la demanda de hemostasis inmediata y éstas puede desarrollar sangrados a pesar de un mecanismo hemostático normal. Alcanzando hemostasis satisfactoria es también un problema cuando los sangrados ocurren en órganos tal 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, (suturas, clips, etc.). Sangrados agudos y profusos pueden también ocurrir en sujetos en terapia anticoagulante en los que una hemostasis defectuosa ha sido inducida por la terapia dada. Tales sujetos pueden precisar intervenciones quirúrgicas en caso de que el efecto anticoagulante tiene 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 son dados terapia anticoagulante para prevenir enfermedad tromboembólica. Tal terapia puede incluir heparina, otras formas de proteoglicanos, warfarina u otras formas de K-antagonistas de vitamina al igual que aspirina y otros inhibidores de agregación plaquetaria.

[0139] Una activación sistémica de la cascada de coagulación puede llevar a coagulación intravascular diseminada (DIC). No obstante, tales complicaciones no se han visto en sujetos tratados con dosis altas de factor VIIa recombinante debido a un localizado proceso hemostático de la especie inducido por la formación compleja entre factor VIIa y TF expuesto al sitio de herida de pared de vaso. Los polipéptidos del factor VII procoagulantes según la invención pueden así también ser usados en su forma activada para controlar tales sangrados excesivos asociados a un mecanismo hemostático normal.

[0140] Para tratamiento en relación con intervenciones deliberadas, los polipéptidos del factor VII procoagulantes de la invención típicamente serán administrados dentro de aproximadamente 24 horas antes de realizar la intervención, y por lo menos 7 días o más a partir de entonces. Administración como un coagulante puede ser por una variedad de vías como se describe en este caso.

[0141] La dosis de los polipéptidos del factor VII varía de aproximadamente 0,05 mg a 500 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 1 mg a 200 mg/día, y más preferiblemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 175 mg/día para un 70 kg sujeto como carga y dosis de mantenimiento, dependiendo de la gravedad de la enfermedad.

[0142] Las composiciones farmacéuticas son principalmente destinadas para administración parenteral para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas son administradas parenteralmente, es decir, por vía intravenosa, subcutáneamente, o intramuscularmente, o se puede administrar por infusión continua o pulsátil. Las composiciones para administración parenteral comprenden el polipéptido de factor VII de la invención en combinación con, preferiblemente disuelto en, un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Una variedad de portadores acuosos pueden ser utilizados, tal como agua, agua tamponada, 0,4% solución salina, 0,3% glicina y similares. Los polipéptidos del factor VII de la invención pueden también ser formulados en las preparaciones de liposoma para entrega u orientación a los sitios de herida. Preparaciones de liposoma son generalmente descritas en, por ejemplo, EEUU 4,837,028, EEUU 4,501,728, y EEUU 4,975,282. Las composiciones se pueden esterilizar por técnicas de esterilización, convencionales, bien conocidas. Las soluciones acuosas resultantes se pueden empaquetar para uso o filtrar bajo condiciones asépticas y liofilizar, la preparación liofilizada siendo combinada con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares aceptables farmacéuticamente según sea necesario para aproximar condiciones fisiológicas, tal como ajuste de pH y agentes amortiguadores, agentes de ajuste de tonicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc.

[0143] La concentración de polipéptido del factor VII en estas formulaciones pueden variar mucho, es decir, de menos de aproximadamente 0,5% en peso, normalmente a o al menos aproximadamente 1 % en peso hasta tanto como 15 o 20% en peso y será seleccionado principalmente por volúmenes fluidos, viscosidades, etc., conforme al modo particular de administración seleccionado.

[0144] Así, una composición típica farmacéutica para infusión intravenosa podría estar compuesta para contener 250 ml de solución de Ringer estéril y 10 mg del polipéptido de factor VII. Métodos reales para preparar composiciones administrables parenteralmente será conocidas o evidentes para los expertos en la técnica y son descritas con más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990).

[0145] Las composiciones con los polipéptidos del factor VII de la presente invención se puede administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, composiciones se administran a un sujeto ya sufriendo de 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 es definida como "cantidad terapéuticamente eficaz". Como será entendido 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 estado general del sujeto. En general, no obstante, la cantidad eficaz variará de aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 500 mg del polipéptido de factor VII al día para un sujeto de 70 kg, con dosificaciones de aproximadamente 1,0 mg hasta aproximadamente 200 mg del polipéptido de factor VII al día siendo más comúnmente usado.

[0146] Hay que tener en cuenta que los materiales de la presente invención pueden generalmente ser empleados en la enfermedad seria o estados de herida, es decir, situaciones de amenaza vital o de amenaza vital potenciales. En tales casos, vista la minimización de sustancias extrañas y defecto general de inmunogenicidad de polipéptidos de factor VII humano en seres humanos, es posible y se pueden sentir deseables por el médico tratante para administrar un exceso sustancial de estas composiciones de factor VII variantes.

[0147] En aplicaciones profilácticas, composiciones con el polipéptido de factor VII de la invención se administran a un sujeto susceptible para o de otra manera a riesgo de un estado de enfermedad o herida para mejorar la capacidad coagulante propia del sujeto. Tal cantidad se define a ser un "dosis profilácticamente eficaz". En aplicaciones profilácticas, las cantidades precisas otra vez dependen del estado de salud y peso del sujeto, pero la dosis generalmente varía de aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 500 mg al día para un sujeto de 70 kilogramos, más comúnmente de aproximadamente 1,0 mg hasta aproximadamente 200 mg al día para un sujeto de 70 kilogramos.

[0148] Administraciones únicas o múltiples 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, los polipéptidos de factor VII se pueden administrar por uso de infusión continua por ejemplo un sistema de bomba portátil.

[0149] Entrega Local del polipéptido de factor VII de la presente invención, tal como, por ejemplo, aplicación tópica se puede realizar, por ejemplo, mediante una pulverización, perfusión, catéteres de doble balón, stent, incorporados en injertos o stents vasculares, hidrogeles usados para revestir catéteres de globo, u otros métodos bien establecidos. De cualquier manera, las composiciones farmacéuticas deberían proporcionar una cantidad suficiente de polipéptido de factor VII para eficazmente tratar el sujeto.

[0150] Polipéptidos de factor VII inactivados de la presente invención son capaces de enlazar con factor tisular de superficie de la célula. Por ejemplo, DEGR-factor VIIa enlaza factor tisular de superficie de la célula con una afinidad equivalente o más alta que factor VIIa de tipo salvaje. DEGR-factor VIIa, no obstante, no tiene actividad enzimática, aún éste se enlaza a factor tisular y actúa como un antagonista competitivo para factor VIIa de tipo salvaje, así inhibiendo los pasos posteriores en la ruta extrínseca de coagulación conduciendo a la generación de trombina.

[0151] Polipéptidos del factor VII inactivados son particularmente útiles para administración a seres humanos para tratar una variedad de condiciones que implican coagulación intravascular. Por ejemplo, aunque trombosis venosa profunda y embolia pulmonar se puede tratar con anticoagulantes convencionales, los polipéptidos del factor VII inactivados descritos aquí se pueden utilizar para prevenir la incidencia de complicaciones tromboembólicas en los pacientes identificados de alto riesgo, tal como aquellos que van a someterse a cirugía o aquellas con fallo cardíaco congestivo. Además, polipéptidos del factor VII inactivados pueden hacer de un antagonista para inducción mediada de factor de tejido de coagulación, así bloqueando la producción de trombina y la deposición posterior de fibrina. Como tal, polipéptidos de factor VII inactivados pueden ser útiles para inhibir actividad de factor tisular dando como resultado, por ejemplo, en la inhibición de coagulación sanguínea, trombosis o deposición de plaqueta.

[0152] Los polipéptidos del factor VII inactivados pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de hiperplasia íntima, restenosis debido a herida vascular aguda, trombosis venal profunda, trombosis arterial, trombosis post quirúrgica, injerto de derivación de arteria coronaria (CABG), angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), ictus, cáncer, metástasis de tumor, angiogénesis, isquemia/reperfusión, artritis reumatoide, trombolisis, arteriosclerosis y restenosis siguiendo angioplastia, indicaciones crónicas y agudas tal como inflamación, shock séptico, septicemia,

hipotensión, síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto (ARDS), coagulopatía intravascular diseminada (DIC), embolia pulmonar, deposición de plaqueta, infarto de miocardio, o el tratamiento profiláctico de mamíferos con vasos ateroscleróticos a riesgo para trombosis. Heridas vasculares agudas son aquellas que ocurren rápidamente (es decir, sobre días a meses), en el contraste a heridas vasculares crónicas (p. ej. aterosclerosis) que se desarrollan durante una vida. Heridas vasculares agudas frecuentemente se originan de procedimientos quirúrgicos tal como reconstrucción vascular, donde las técnicas de angioplastia, endarterectomía, aterectomía, emplazamiento de injerto vascular o similar son empleados. Hiperplasia puede también ocurrir como una respuesta retardada en la respuesta a, por ejemplo, emplazamiento de injerto o trasplante de órgano. Desde polipéptidos de factor VII inactivados son más selectivos que heparina, generalmente uniendo sólo factor tisular que ha sido expuesto a sitios de herida, y porque polipéptidos de factor VII inactivados no destruyen otras proteínas de coagulación, será más eficaz y menos posible de causar complicaciones de sangrado que heparina cuando se usa profilácticamente para la prevención de trombosis venosa profunda.

[0153] Polipéptidos de factor VII inactivados que mantienen factor tisular uniendo acumulación de plaqueta de inhibición al sitio de herida vascular bloqueando la producción de trombina y la deposición posterior de fibrina.

[0154] Debido a la capacidad de DEGR-factor VII para bloquear generación de trombina y limitar deposición de plaqueta en sitios de herida vascular aguda, polipéptidos del factor VII inactivados que mantienen actividad de unión de factor tisular pero actividad enzimática de factor VIIa de defecto puede utilizarse para inhibir restenosis vascular.

[0155] Composiciones que comprenden polipéptidos de factor VII inactivados son particularmente útiles en métodos para tratar pacientes cuando formulados en composiciones farmacéuticas, dónde se pueden dar a individuos sufriendo de una variedad de estados de enfermedad para tratar condiciones relacionadas de coagulación. Tales polipéptidos de factor VII inactivados, capaces de unir factor tisular pero con una capacidad sustancialmente reducida para catalizar activación de otros factores en la cascada de coagulación, pueden poseer una vida media de plasma más larga y así un periodo correspondientemente más largo de actividad anticoagulante cuando se compara con otros anticoagulantes. Entre las indicaciones médicas para las composiciones de sujeto están aquellas comúnmente tratadas con anticoagulantes, tal como, por ejemplo, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, ictus, coagulación intravascular diseminada (DIC), deposición de fibrina en pulmones y riñones asociados a endotoxemia gram-negativa, e infarto de miocardio. Las composiciones pueden utilizarse para inhibir restenosis vascular como ocurre siguiendo herida mecánica vascular, tal como herida provocada por angioplastia de globo, endarterectomía, aterectomía reductiva, colocación de stent, terapia de láser o rotablación, o como ocurre secundario para injertos vasculares, stents, injertos de baipás o trasplantes de órgano. Las composiciones pueden así ser usadas para inhibir deposición de plaqueta y trastornos asociados. Así, un método de inhibición de coagulación, restenosis vascular o deposición de plaqueta, por ejemplo, comprende administración a un paciente una composición que comprende polipéptidos de factor VII inactivados, tales como aquellos que tienen al menos una sustitución de aminoácido en una tríada catalítica de Ser344; Asp242 y His193, en una cantidad suficiente para eficazmente inhibir coagulación, restenosis vascular o deposición de plaqueta. Los métodos también encuentran uso en el tratamiento de cierre agudo de una arteria coronaria en un individuo (p. ej. infarto de miocardio agudo), que comprende administrar los polipéptidos de factor VII inactivados, que incluyen DEGR- factor VII y factor-FFR VII, en conjunción con activador de plasminógeno tisular o streptokinasa, y puede acelerar trombolisis inducida de tPA. Los polipéptidos del factor VII inactivados son dados antes de, en conjunción con, o administración brevemente siguiente de un agente trombolítico, tal como activador de plasminógeno tisular.

[0156] Composiciones de polipéptidos de factor VII inactivados también tendrán utilidad sustancial en la prevención de émbolos cardiogénicos y en el tratamiento de pulsaciones trombóticas. Debido a su bajo potencial para causar complicaciones de sangrado y su selectividad, polipéptidos del factor VII se pueden dar a víctimas de ictus y puede prevenir la extensión del trombo arterial de oclusión. La cantidad de polipéptidos de factor VII administrado variará con cada paciente dependiendo de la naturaleza y gravedad del ictus, pero dosis generalmente estarán en el intervalo de aquellas sugeridas debajo.

[0157] Polipéptidos del factor VII inactivados y composiciones de las mismas también pueden usarse para inhibir eventos deletéreos asociados a reperfusión isquémica. Isquemia severa a un tejido, órgano o extremidad se puede deber a una reducción en el flujo sanguíneo y puede estar asociado a traumatismo, manipulación quirúrgica, o presión sanguínea bajada. Una de las complicaciones asociadas con isquemia severa es la sobre-regulación de factor tisular en el sistema arterial. Esta expresión aumentada de factor tisular se cree que estimula una respuesta procoagulante, principalmente en el lecho capilar. Después de reperfusión al tejido isquémico, trombi se puede generar que puede ser bien oclusivo o no oclusivo. La generación de trombi en el lecho arterial, y la deposición de plaquetas a lo largo del trombo, lleva a la generación secundaria de isquemia al tejido. La generación del trombi y la presencia de plaquetas pueden luego causar la generación y liberación de múltiples factores bioactivos, incluyendo aquellos generados de la ruta de coagulación, tal como trombina y Factor X, al igual que factores liberados de plaquetas activadas. Sucesivamente, estos factores pueden inducir la generación de factores adicionales por el endotelial subyacente y células de músculo lisas, o por células mononucleares adyacentes, tal como TNF-alfa y IL-1.

Estos factores, sucesivamente, pueden luego activar las células endoteliales conduciendo a la sobre-regulación de varias moléculas de adhesión asociadas a monocito y unión neutrofílica. La unión y transmigración de monocitos y neutrófilos, la liberación de compuestos bioactivos por estas células, incluyendo la generación de radicales de oxígeno libre, pueden exacerbar el nivel de activación de célula endotelial y daño. En última instancia, si la cascada de eventos

va inverificada, esto puede llevar a complicaciones sistémicas y el potencial para estimular fallo de órgano múltiple. Bloqueando factor tisular según la presente invención administrando un inhibidor específico para factor tisular/Factor VII unión (por ejemplo; FFR-FVIIa), y así bloqueando la iniciación de la ruta extrínseca de coagulación, la iniciación de la cascada de eventos puede ser evitada, eliminando así, o minimizando los eventos deletéreos asociados a isquemia/reperfusión.

[0158] La dosis de polipéptidos del factor VII inactivados para prevención de trombosis venosa profunda está en el intervalo de aproximadamente 50 µg a 500 mg/día, más típicamente 1 mg a 200 mg/día, y más preferiblemente 10 a aproximadamente 175 mg/día para un paciente de 70 kg, y administración debería iniciarse al menos aproximadamente 6 horas antes de cirugía y continuar al menos hasta que el paciente sea ambulatorio. La dosis de polipéptidos de factor VII inactivados en el tratamiento para restenosis variará con cada paciente pero generalmente será en el intervalo de aquellas sugeridas arriba.

[0159] Composiciones que comprenden polipéptidos de factor VII inactivados serán típicamente administradas dentro de aproximadamente 24 horas antes de realizar una intervención, y por lo menos 7 días o más luego. Administración puede ser por una variedad de vías como además es descrito aquí. Las composiciones que comprenden polipéptidos del factor VII inactivados pueden también ser administradas sistémicamente o localmente para la colocación de injertos vasculares (p. ej., revistiendo injertos vasculares arteriales naturales sintéticos o modificados), en sitios de anastomosis, endarterectomía quirúrgica (típicamente endarterectomía de arteria carótida), injertos de baipás, y similares.

[0160] En el tratamiento de trombosis venosa profunda establecida y/o embolia pulmonar, la dosis de polipéptidos del factor VII varía de aproximadamente 50 µg a 500 mg/día, más típicamente 1 mg a 200 mg/día, y más preferiblemente 10 mg a aproximadamente 175 mg/día para un paciente de 70 kg como carga y dosis de mantenimiento, dependiendo del peso del paciente y la gravedad de la enfermedad. Debido a la probabilidad inferior de complicaciones de sangrado de infusiones de polipéptidos de factor VII inactivados, polipéptidos de factor VII inactivados pueden reemplazar o bajar la dosis de heparina durante o después cirugía en conjunción con trombectomías o embolectomías.

[0161] En casos de bacteriemia aguda, endotoxemia o DIC, al paciente se le da una dosis de carga de un polipéptido de factor VII de al menos aproximadamente 50 µg a 500 mg/día, más típicamente 1 mg a 200 mg/día, y más preferiblemente 10 mg a aproximadamente 175 mg/día para un paciente de 70 kg, con dosis de mantenimiento posteriores en el intervalo de 50 µg a 500 mg/día, típicamente 1 mg a 200 mg/día para un paciente de 70 kg.

[0162] Preferiblemente, el polipéptido de Factor VII tiene una vida media ($t_{1/2}$) que se mejora relativamente a la vida media del factor VII no conjugado del cual éste fue derivado. Preferiblemente, la vida media del polipéptido de factor VII se mejora por al menos 1,5-pliegue a 2-pliegue, más preferiblemente de aproximadamente 2-pliegue a 3-pliegue, incluso más preferiblemente de aproximadamente 5-pliegue a 10-pliegue, óptimamente aproximadamente 100-pliegue, normalmente aproximadamente 6-pliegue relativamente a la vida media del factor VII progenitor inmodificado.

[0163] Métodos Generales de pegar polietilenglicol a proteínas son descritos dentro de EEUU Pat. n°. 4,179,337 expedido Dec. 18, 1979 (incorporada aquí por referencia para revelar métodos de pegar polietilenglicol a proteínas). Además, otros métodos de pegar polietilenglicol son descritos dentro de EEUU Pat. n°. 5,122,614 expedido Jun. 16, 1992, también incorporada aquí por referencia para revelar métodos de pegar polietilenglicol a proteínas. Maleimido-PEG es quizás el reactivo más útil para PEGilación de cisteína, pero otras químicas están disponibles para modificación de cisteína específica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0164] La presente invención es descrita con mayor detalle en los ejemplos con referencia a los dibujos anexos donde

Fig. 1 la estructura de factor VII de coagulación humano correctamente procesado, aminoácidos 1 a 406, con residuos de Glu carboxilados de gama (γ) y glicosilación (*). La flecha en residuo de aminoácido 152 muestra el sitio dónde factor VII monocaténario se divide para ser convertido a factor VII bicaténario activado (FVIIa).

Fig. 2 La secuencia de ácido de amina completa de factor de coagulación humano VII (SEC ID NO:1) nativo (tipo salvaje)

[0165] La presente invención es posteriormente ilustrada 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, ambos separadamente y en cualquier combinación de la misma, ser material para la realización de la invención en formas diversas de las mismas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Construcción de ADN que codifica FVII-(S43N), FVII-(K62E), FVII-(Q64E), FVII-(I69F), FVII-(K62E/I69A), FVII-(Q64E/I69A), FVII-(Q62E/Q64E/I69A), FVII-(K62E/I69F), FVII-(Q64E/I69F), FVII-(K62E/Q64E/I69F), FVII-(S43C), FVII-

(I69C), FVII-(Q64C), FVII-(M306C), FVII-(R277C), FVII-(I69N/F71T), FVII-(F71N/L73T), FVII-(R277N), y FVII-(D309N/L311T):

[0166] Constructos de ADN que codifican FVII-(S43N), FVII-(K62E), FVII-(Q64E), FVII-(I69F), FVII-(K62E/I69A), de FVII-(Q64E/I69A); FVII-(Q62E/Q64E/I69A), FVII-(K62E/I69F), FVII-(Q64E/I69F), FVII-(K62E/Q64E/I69F), FVII-(S43C), FVII-(I69C), FVII-(Q64C), FVII-(M306C), FVII-(R277C), FVII-(I69N/F71T), FVII-(F71N/L73T), FVII-(R277N), y FVII-(D309N/L311T) fueron preparados por mutagénesis dirigida usando un vector superenrollado de aDN bicatenario con inserto de FVI humano y dos cebadores sintéticos con la mutación deseada. Los siguientes cebadores fueron usados:

Para FVII-(S43N):

5'- GGACGAAGCTGTTCTGGATTAACACTACAGTGATGGGGACCAG-3' (SEC ID NO:2)

5'- CTGGTCCCCATCACTGTAGTTAATCCAGAACAGCTTCGTCC-3'(SEC ID NO:3)

Para FVII-(K62E):

5'- GGGGGCTCCTGCGAGGACCAGCTCCAG-3'(SEC ID NO:4)

5'- CTGGAGCTGGTCCTCGCAGGAGCCCC-3'(SEC ID NO:5)

Para FVII-(Q64E):

5'- GGGCTCCTGCAAGGACGAGCTCCAGTCCTATATCTGC-3'(SEC ID NO:6)

5'- GCAGATATAGGACTGGAGCTCGTCCTTGCAGGAGCCC-3'(SEC ID NO:7)

Para FVII-(I69F):

5'- CCAGCTCCAGTCCTATTTCTGCTTCTGCCTCCC-3'(SEC ID NO:8)

5'- GGGAGGCAGAAGCAGAAATAGGACTGGAGCTGG-3'(SEC ID NO:9)

Para FVII-(K62E/I69A):

5'- GGGGGCTCCTGCGAGGACCAGCTCCAGTCCTATGCCTGCTTCTGCCTC-3'(SEQ ID NO:10)

5'- GAGGCAGAAGCAGGCATAGGACTGGAGCTGGTCCTCGCAGGAGCCCC-3'(SEQ ID NO:11)

Para FVII-(Q64E/I69A):

5'- GGGCTCCTGCAAGGACGAGCTCCAGTCCTATGCCTGCTTCTGCCTCC-3'(SEQ ID NO:12)

5'- GGAGGCAGAAGCAGGCATAGGACTGGAGCTCGTCCTTGCAGGAGCCC-3'(SEQ ID NO:13)

Para FVII-(K62E/Q64E/I69A):

5'- GGGGGCTCCTGCGAGGACGAGCTCCAGTCCTATGCCTGCTTCTGCCTCC-3'(SEQ ID NO:14)

5'- GGAGGCAGAAGCAGGCATAGGACTGGAGCTCGTCCTCGCAGGAGCCCC-3'(SEQ ID NO:15)

Para FVII-(S43C):

5'-GGACGAAGCTGTTCTGGATTTGCTACAGTGATGGGGAC-3'(SEC ID NO:16)

5'-GTCCCCATCACTGTAGCAAATCCAGAACAGCTTCGTCC-3'(SEC ID NO:17)

Para FVII-(I69C)

5'-CCAGCTCCAGTCCTATTGCTGCTTCTGCCTCCCTG-3'(SEC ID NO:18)

5'-CAGGGAGGCAGAAGCAGCAATAGGACTGGAGCTGG-3'(SEC ID NO:19)

Para FVII-(Q64C)

5'-GGGCTCCTGCAAGGACTGCCTCCAGTCCTATATCTG-3'(SEC ID NO:20)

5'-CAGATATAGGACTGGAGGCAGTCCTTGCAGGAGCCC-3'(SEC ID NO:21)

Para FVII-(R277C)

5'-GGACGCTGGCCTTCGTGTGCTTCTCATTGGTCAGCG-3'(SEC ID NO:22)

5'-CGCTGACCAATGAGAAGCACACGAAGGCCAGCGTCC-3'(SEC ID NO:23)

Para FVII-(M306C)

5'-CAACGTGCCCCGGCTGTGCACCCAGGACTGCCTGC-3'(SEC ID NO:24)

5'-GCAGGCAGTCCTGGGTGCACAGCCGGGGCACGTTG-3'(SEC ID NO:25)

FVII-(I69N/F71T):

5'-CCAGCTCCAGTCCTATACTGCACCTGCCTCCCTGCCTTCG-3'(SEC ID NO:26)

5'-CGAAGGCAGGGAGGCAGGTGCAGTTATAGGACTGGAGCTGG-3'(SEC ID NO:27)

FVII-(F71N/L73T):

5'-CCAGTCCTATATCTGCAACTGCACCCCTGCCTTCGAGGGCCG-3'(SEC ID NO:28)

5'-CGGCCCTCGAAGGCAGGGGTGCAGTTGCAGATATAGGACTGG-3'(SEC ID NO:29)

FVII-(R277N)

5'-GGACGCTGGCCTTCGTGAACTTCTCATTGGTCAGCGG-3'(SEC ID NO:30)

5'-CCGCTGACCAATGAGAAGTTCACGAAGGCCAGCGTCC-3'(SEC ID NO:31)

FVII-(D309N/L311T)

5'-CGGCTGATGACCCAGAACTGCACCCAGCAGTCACGGAAGG-3'(SEC ID NO:32)

5'-CCTTCCGTGACTGCTGGGTGCAGTTCTGGGTCATCAGCCG-3'(SEC ID NO:33)

[0167] Los cebadores oligonucleótidos, cada uno complementario a hilos opuestos del inserto de vector, fueron extendidos durante ciclo de temperatura mediante ADN polimerasa Pfu. En la incorporación de los cebadores, un plásmido mutado con cortes escalonados 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 para ADN sintetizado con mutación.

[0168] Procedimientos para preparar un constructo de ADN usando reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos se conocen para personas expertas en la técnica (cf. PCR Protocols, 1990, Academic press, San Diego, California, USA).

Ejemplo 2

[0169] Preparación de FVII-(S43N), FVII-(K62E), FVII-(Q64E), FVII-(I69F), FVII-(K62E/I69A), de FVII (Q64E/I69A); FVII-(Q62E/Q64E/I69A), FVII-(K62E/I69F), FVII-(Q64E/I69F), FVII-(K62E/Q64E/I69F), de FVII (S43C)); FVII-(I69C), FVII-(Q64C), FVII-(M306C), FVII-(R277C), FVII-(I69N/F71T), FVII-(F71N/L73T), de FVII (R277N), y FVII-(D309N/L311T).

[0170] Células BHK fueron modificadas esencialmente como previamente descrito (Thim et al. (1988) Biochemistry 27, 7785- 7793 ; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243) para obtener expresión del polipéptido de FVII variante. El polipéptido de factor VII fue purificado de la siguiente manera:

[0171] Medio acondicionado fue cargado sobre una columna de 50-ml de Q flujo rápido de sefrosa (Pharmacia Biotech) después de adición de 5 mM EDTA, y 10 mM Tris, ajuste de pH a 8,0 y ajuste de la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. Elución de la proteína fue realizada por un gradiente de 10 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0 a 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 25 mM CaCl_2 , pH 8,0. Las fracciones con el polipéptido de FVII variante fueron agrupadas, y aplicadas a una columna de 25- ml con el anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Denmark) acoplado a sefrosa 4B CNBr-activada (Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con 50 mM Hepes, pH 7,5, con 10 mM CaCl_2 , y 100 mM NaCl. Después de lavado con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado con 2 M NaCl, material ligado fue eluido con tampón de equilibrado con 10 mM EDTA en vez de CaCl_2 . Antes de uso o almacenamiento, exceso CaCl_2 sobre EDTA fue añadido o el polipéptido de FVII variante fue transferido a un tampón con Ca^{2+} . El rendimiento de cada paso fue seguido por medidas ELISA de factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 3

Ensayo de hidrólisis in vitro

[0172] Factor VIIa nativo (tipo salvaje) y Factor VIIa variante (ambos de aquí en adelante referidos como "Factor VIIa") se evalúan en paralelo para directamente comparar sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Denmark). La d-Ile-pro-Arg-p-nitroanilida de sustrato cromogénica (S-2288, Chromogenix, Sweden), concentración final 1 mM, se añade a Factor VIIa (concentración final 100 nM) en 50 mM Hepes, pH 7,4, con 0,1 M NaCl, 5 mM CaCl_2 y 1 mg/ml albúmina de suero bovino. La absorbancia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placa de SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, USA). La absorbancia desarrollada durante una incubación de 20-minutos, después de sustracción de la absorbancia en una forma preliminar bien sin ninguna enzima, se utiliza para calcular la proporción entre las actividades de factor VIIa variante y de tipo salvaje:

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

Ejemplo 4

Ensayo de proteólisis in vitro

[0173] Factor VIIa nativo (tipo salvaje) y Factor VIIa variante (ambos de aquí en adelante referidos como "Factor VIIa") se evalúan en paralelo para directamente comparar sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Denmark). Factor VIIa (10 nM) y Factor X (0,8 microM) en 100 microL 50 mM Hepes, pH 7,4, con 0,1 M NaCl, 5 mM CaCl_2 y 1 mg/ml albúmina de suero bovino, se incuban durante 15 min. Escisión de Factor X es luego detenida por la adición de 50 microL 50 mM Hepes, pH 7,4, con 0,1 M NaCl, 20 mM EDTA y 1 mg/ml albúmina de suero bovino. La cantidad de Factor Xa generado se mide por adición de la z-D-Arg-Gly-Arg-P-nitroanilida de sustrato cromogénica (S-2765, Chromogenix, Sweden), concentración final 0,5 mM. La absorbancia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placa de SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, USA). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, después de sustracción de la absorbancia en una forma preliminar bien sin FVIIa, se utiliza para calcular la proporción entre las actividades proteolíticas de factor VIIa variante y de tipo salvaje:

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

Ejemplo 5

Ensayo de afinidad de enlace TF - ensayo biosensor:

[0174] Polipéptidos de FVII se evalúan en el instrumento Biacore pasando una solución normal del polipéptido de FVII sobre un chip con TF inmovilizado. Esto se sigue por concentraciones diferentes de STF en 10 mM hepes pH 7,4 con 150 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 y 0,0003 % polisorbato 20. Kd's se calculan de los sensorgramas usando el software de evaluación Biacore integrado.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de factor VII que comprende un sitio de N-glicosilación, N-Xaa-S/T, introducido por sustituciones de aminoácidos correspondientes a aminoácidos que comienzan en la posición I69 de la SEC ID nº: 1, donde Xaa es cualquier aminoácido excepto P; en donde dicho sitio de N-glicosilación introducido reduce la afinidad de enlace de factor tisular de dicho polipéptido de factor VII.
2. Polipéptido de factor VII según la reivindicación 1, que es FVII-(I69N/F71T).
3. Polipéptido de factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la constante de disociación K_D de dicho polipéptido del factor VII para factor tisular soluble (STF) es superior a 5 nM, tal como superior a 7 nM, tal como superior a 10 nM, tal como superior a 20 nM, tal como superior a 30 nM, tal como superior a 50 nM, tal como superior a 100 nM, tal como superior a 200 nM, tal como superior a 300 nM, tal como superior a 400 nM, tal como superior a 500 nM, tal como superior a 1 μ M.
4. Polipéptido de factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la constante de disociación K_D de dicho factor VII para factor tisular (TF) es superior a 5 nM.
5. Composición que comprende un polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Constructo polinucleótido que codifica un polipéptido de factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
7. Constructo polinucleótido según la reivindicación 6, que es un vector.
8. Célula huésped eucariota que comprende el constructo polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6-7.
9. Célula huésped eucariota según la reivindicación 8, que es de origen mamífero.
10. Célula huésped eucariota según la reivindicación 9, donde dicha célula es seleccionada del grupo que consiste en células CHO, células BHK o células HEK.
11. Método para la producción del polipéptido de factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo el método el cultivo de una célula huésped eucariota según cualquiera de las reivindicaciones 8-10 en un medio de crecimiento apropiado bajo condiciones que permiten la síntesis de proteínas a partir de dicho constructo polinucleótido y la recuperación de dicho polipéptido de factor VII a partir del medio de cultivo.

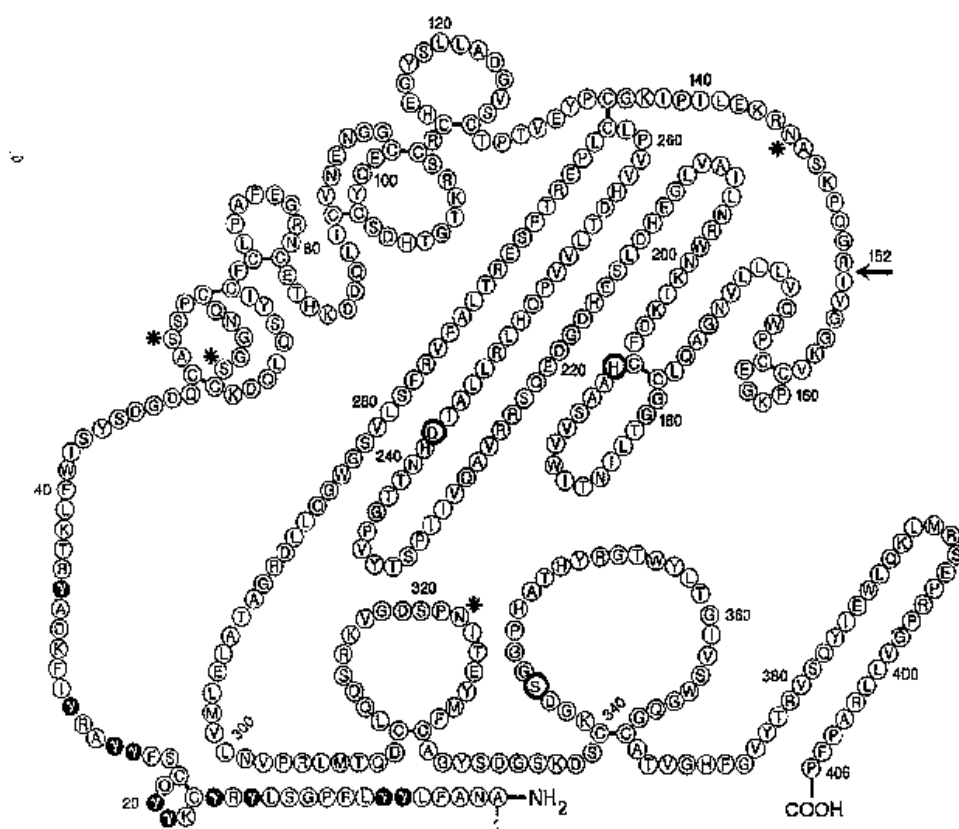


Fig. 1

SEC ID NO:1 (La secuencia de aminoácidos de 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-Ala-Arg-GLA-Ile-Phe-Lys-Asp-Ala-GLA-Arg-
    20              25              30              35

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 2

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
 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-Tys-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

Fig. 2