

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 523**

51 Int. Cl.:

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2001 E 10161855 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 2226385**

54 Título: **Variantes del factor VII de coagulación humana**

30 Prioridad:

13.09.2000 DK 200001361

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.11.2013

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
Thurgauerstrasse 36/38
8050 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**PERSSON, EGON y
OLSEN, OLE HVILSTED**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 429 523 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes del factor VII de coagulación humana

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a nuevas variantes de factor de coagulación VIIa humano con actividad coagulante al igual que constructos de ácidos nucleicos que codifican tales variantes, vectores y células huésped que comprenden y expresan el ácido nucleico, composiciones farmacéuticas, usos y métodos de tratamiento.

10

Antecedentes de la invención

15

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

20

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

25

30

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

35

40

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

45

50

[0006] European Patent No. 200,421 (ZymoGenetics) hace referencia a la secuencia de nucleótidos que codifica el factor VII humano y la expresión recombinante de factor VII en células mamíferas.

55

[0007] Dickinson et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 14379-14384) hace referencia a la identificación de residuos de superficie que median en la unión del factor tisular y la actividad catalítica del factor VIIa. La mutagénesis de escaneado de alanina fue utilizada para establecer una lista extensiva de los 112 residuos que están implicados funcionalmente en la interacción del cofactor (es decir, factor tisular (TF)) y la activación del factor X (FX).

60

[0008] Iwanaga et al. (Thromb. Haemost. (supplement August 1999), 466, abstract 1474) hace referencia a variantes de FVIIa donde los residuos 316-320 son eliminados o los residuos 311-322 se sustituyen por los residuos correspondientes de tripsina.

[0009] Existe, no obstante, todavía una necesidad de variantes del factor VIIa con actividad coagulante, variantes con alta

actividad que puedan ser administradas en dosis relativamente bajas, y variantes que no produzcan efectos secundarios indeseables tales como la activación sistémica del sistema de coagulación y sangrado, respectivamente, asociado a terapias convencionales.

5 Descripción de la invención

[0010] La invención proporciona polipéptidos del factor de coagulación VIIa con actividad coagulante, concretamente, variantes del polipéptido del factor VII de SEC ID n°: 1 comprendiendo una sustitución del Met en posición 298 con Arg, Gln o Asn. Los polipéptidos del factor VII de la invención pueden comprender además la sustitución de al menos uno de los aminoácidos en las posiciones restantes en el dominio de proteasa.

[0011] En otro aspecto, la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido del factor VII de la invención.

[0012] En otro aspecto, la invención proporciona un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante del factor VII.

[0013] En otro aspecto, la invención proporciona un vector recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos que codifica una variante de FVIIa.

[0014] En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos o el vector.

[0015] En otro aspecto, la invención proporciona un animal transgénico que contiene y expresa el constructo de ácidos nucleicos.

[0016] En otro aspecto, la invención proporciona una planta transgénica que contiene y expresa el constructo de ácidos nucleicos.

[0017] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir el polipéptido del factor VII de la invención, el método que comprende el cultivo de una célula que comprende el constructo de ácidos nucleicos en un medio de crecimiento apropiado bajo condiciones que permiten la expresión del constructo de ácidos nucleicos y la recuperación del polipéptido resultante del medio de cultivo.

[0018] En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir la variante del factor VII de la invención, el método que comprende el cultivo de una célula que comprende el constructo de ácidos nucleicos en un medio de crecimiento apropiado bajo condiciones que permiten la expresión del constructo de ácidos nucleicos y la de recuperación del polipéptido resultante del medio de cultivo.

[0019] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir el polipéptido del factor VII, el método que comprende la recuperación del polipéptido de la leche producida por el animal transgénico.

[0020] En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir la variante del factor VII, el método que comprende la recuperación de la variante de leche producida por el animal transgénico.

[0021] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir el polipéptido del factor VII, el método que comprende el cultivo de una célula de una planta transgénica que comprende el constructo de ácidos nucleicos, y la recuperación del polipéptido de la planta resultante.

[0022] En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir la variante del factor VII, el método que comprende el cultivo de una célula de una planta transgénica que comprende el constructo de ácidos nucleicos, y la recuperación de la variante de la planta resultante.

[0023] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una variante del polipéptido del factor VII de SEC ID n°: 1 que comprende una sustitución del Met en la posición 298 con Arg, Gln o Asn y, opcionalmente, una sustitución de uno o más residuo(s) de aminoácido adicionales en las posiciones restantes en el dominio de proteasa; para la preparación de un medicamento para el tratamiento de episodios hemorrágicos o para la mejora del sistema hemostático normal.

[0024] En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una variante del polipéptido del factor VII de SEC ID n°: 1 que comprende una sustitución del Met en la posición 298 con Arg, Gln o Asn y, opcionalmente, una sustitución de uno o más residuo(s) de aminoácido adicionales en las posiciones restantes en el

dominio de proteasa con (uno) otros residuo(s) de aminoácidos; y opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

[0025] En una forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el aminoácido correspondiente a Lys en la posición 157 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por un aminoácido diferente.

[0026] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el aminoácido correspondiente a Lys en la posición 337 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por un aminoácido diferente.

[0027] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el aminoácido correspondiente a Asp en la posición 334 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por un aminoácido diferente.

[0028] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el aminoácido correspondiente a Ser en la posición 336 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por un aminoácido diferente.

[0029] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el aminoácido correspondiente a Val en la posición 158 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por un aminoácido diferente.

[0030] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el aminoácido correspondiente a Glu en la posición 296 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por un aminoácido diferente.

[0031] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio de proteasa ha sido sustituido por un aminoácido diferente.

[0032] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde como mucho 20 aminoácidos adicionales en las posiciones restantes en el dominio de proteasa han sido sustituidos por aminoácidos diferentes.

[0033] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 159-170 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por un aminoácido diferente.

[0034] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 290-312 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por un aminoácido diferente.

[0035] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde al menos un aminoácido correspondiente a un aminoácido en una posición seleccionada de 330-339 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por un aminoácido diferente.

[0036] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicha Lys en la posición 157 de SEC ID NO:1 ha sido sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.

[0037] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicha Lys en la posición 337 de SEC ID NO:1 ha sido sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.

[0038] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho Asp en la posición 334 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, y Glu.

[0039] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicha Ser en la posición 336 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, y Glu.

[0040] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicha Val en la posición 158 de SEC ID NO:1 ha sido sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.

[0041] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho Glu en la posición 296 de SEC ID NO:1 ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Lys, y Val.

[0042] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde el aminoácido ha

sido sustituido por un aminoácido diferente que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.

5

[0043] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho polipéptido del factor VII es factor VII humano.

[0044] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido, donde dicho polipéptido del factor VII es factor VIIa humano.

10

[0045] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es-[M298Q]-FVII.

[0046] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es un polipéptido seleccionado independientemente del grupo que consiste en [V158T/M298Q]-FVII, [E296V/M298Q]-FVII, y [V158D/M298Q]-FVII.

15

[0047] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es [V158D/E296V/M298Q]-FVII.

[0048] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del factor VII es [V158D/E296V/M298Q/K337A]-FVII.

20

[0049] En otra forma de realización, uno o más de los residuos de Lys en la posición 157 y el residuo de Lys en la posición 337 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.

25

[0050] En otra forma de realización, uno o más de los residuo de Lys en la posición 157 y el residuo de Val en la posición 158 y el residuo de Glu en la posición 296 y el residuo de Met en la posición 298 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.

30

[0051] En otra forma de realización, el residuo de Lys en la posición 157 y uno o más de los residuos de Val en la posición 158 y el residuo de Glu en la posición 296 y el residuo de Met en la posición 298 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.

35

[0052] En otra forma de realización, uno o más de los residuos de Lys en la posición 157 y el residuo de Asp en la posición 334 y el residuo de Ser en la posición 336 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.

[0053] En otra forma de realización, el residuo de Lys en la posición 157 y uno o más de los residuos de Asp en la posición 334 y el residuo de Ser en la posición 336 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.

40

[0054] En otra forma de realización, uno o más de los residuos de Lys en la posición 337 y el residuo de Val en la posición 158 y el residuo de Glu en la posición 296 y el residuo de Met en la posición 298 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.

45

[0055] En otra forma de realización, el residuo de Lys en la posición 337 y uno o más residuos de Val en la posición 158 y el residuo de Glu en la posición 296 y el residuo de Met en la posición 298 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.

[0056] En otra forma de realización, uno o más de los residuos de Lys en la posición 337 y el residuo de Asp en la posición 334 y el residuo de Ser en la posición 336 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.

50

[0057] En otra forma de realización, el residuo de Lys en la posición 337 y uno o más residuos del Asp en la posición 334 y el residuo de Ser en la posición 336 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.

55

[0058] En otra forma de realización, uno o más de los residuos de Val en la posición 158 y el residuo de Glu en la posición 296 y el residuo de Met en la posición 298 y uno o más de los residuos de Asp en la posición 334 y el residuo de Ser en la posición 336 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.

60

[0059] En otra forma de realización, el residuo de Lys en la posición 157 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.

- [0060] En otra forma de realización, el residuo de Lys en la posición 337 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.
- 5 [0061] En otra forma de realización, uno o más de los residuos de Val en la posición 158 y el residuo de Glu en la posición 296 y el residuo de Met en la posición 298 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.
- 10 [0062] En otra forma de realización, uno o más de los residuos de Asp en la posición 334 y el residuo de Ser en la posición 336 de SEC ID NO:1 ha(han) sido sustituido por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos.
- 15 [0063] En otra forma de realización, el residuo de Lys en la posición 157 ha sido sustituido por Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp o Glu; y/o el residuo de Lys en la posición 337 ha sido sustituido por Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp o Glu; y/o el residuo de Val en la posición 158 ha sido sustituido por Ser, Thr, Asn, Gln, Asp o Glu; y/o el residuo de Glu en la posición 296 ha sido sustituido por Arg, Lys o Val; y/o el residuo de Met en la posición 298 ha sido sustituido por Arg, Gln o Asn; y/o el residuo de Asp en la posición 334 ha sido sustituido por Glu; y/o el residuo de Ser en la posición 336 ha sido sustituido por Gly.
- 20 [0064] En otra forma de realización, el residuo de Val en la posición 158 y el residuo de Glu en la posición 296 y el residuo de Met en la posición 298 son los únicos residuos de aminoácidos que han sido sustituidos.
- 25 [0065] En otra forma de realización, la proporción entre la actividad de una variante según la invención y la actividad del polipéptido del factor VII nativo mostrado en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 1,25 cuando se evalúa en el "Ensayo de Hidrólisis *In Vitro*" definido aquí. En otra forma de realización, la proporción es al menos aproximadamente 2.0 en otra forma de realización, al menos aproximadamente 4.0.
- [0066] En otra forma de realización, el residuo de Gln en la posición 312 en el dominio de proteasa no ha sido sustituido.
- 30 [0067] En otra forma de realización, la célula huésped recombinante es de origen mamífero. En otra forma de realización, la célula se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células BHK o células HEK.
- [0068] En otra forma de realización, como mucho 20 residuos de aminoácidos adicionales en las posiciones restantes en el dominio de proteasa (posiciones 153-406) han sido sustituidos. En una forma de realización, como mucho 15 residuos de aminoácidos adicionales son sustituidos; en otra forma de realización, como mucho 10 residuos de aminoácidos son sustituidos; en otra forma de realización, como mucho 5 residuos de aminoácidos son sustituidos.
- 35 [0069] En otra forma de realización, unos o varios de los residuos de aminoácidos en posiciones 157, 337, 158, 296, 298, 334, o 336 es/son el único residuo(s) de aminoácidos que se ha/han sustituido.
- 40 [0070] En otra forma de realización, uno o ambos residuos de Lys en la posición 157 y en la posición 337 se ha/han sustituido por un residuo de aminoácido neutro, o uno de los residuos ha sido sustituido por un residuo de aminoácido cargado negativamente, o un residuo de Lys ha sido sustituido por un residuo de aminoácido neutro y un residuo de Lys ha sido sustituido por un residuo de aminoácido cargado negativamente.
- 45 [0071] En otra forma de realización, uno o ambos residuos de Asp en la posición 334 y el residuo de Ser en la posición 336 se ha/han sustituido por un residuo de un aminoácido capaz de formar enlaces de hidrógeno y/o capaz de formar puentes salinos, o unos o ambos de los residuos es/son sustituidos por un residuo de aminoácido pequeño.
- 50 [0072] En otra forma de realización, el residuo de Lys en la posición 157 ha sido sustituido por un residuo de aminoácido seleccionado de una lista de Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Arg, His, Asp, y Gln. En otra forma de realización, el residuo de Lys en la posición 157 ha sido sustituido por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, y Glu.
- 55 [0073] En otra forma de realización, el residuo de Lys en la posición 337 ha sido sustituido por un residuo de aminoácido seleccionado de una lista de Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Arg, His, Asp o Gln. En otra forma de realización, el residuo de Lys en la posición 337 ha sido sustituido por Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp o Glu.
- 60 [0074] En otra forma de realización, el residuo de Val en la posición 158 ha sido sustituido por un residuo de aminoácido seleccionado de una lista de Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln. En otra forma de realización, el residuo de Val en la posición 158 ha sido sustituido por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Thr, Asn, Gln, Asp y Glu.

[0075] En otra forma de realización, el residuo de Glu en la posición 296 ha sido sustituido por un residuo de aminoácido seleccionado de una lista de Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Lys, Arg, His, Asp o Gln. En otra forma de realización, el residuo ha sido sustituido por Arg, Lys o Val.

[0076] En otra forma de realización, el residuo de Asp en la posición 334 ha sido sustituido por Gly y Glu.

[0077] En otra forma de realización, el residuo de Ser en la posición 336 que ha sido sustituido por Gly y Glu.

[0078] En otra forma de realización de la invención la proporción entre la actividad de la variante y la actividad del polipéptido del factor VII nativo mostrada en la SEC ID NO:1 es al menos aproximadamente 1,25 cuando se evalúa en el "Ensayo de Hidrólisis *In Vitro*" tal y como se define aquí (ejemplo 11). En otra forma de realización, la proporción es al menos aproximadamente 2.0 en otra forma de realización, al menos aproximadamente 4.0.

[0079] En otro aspecto, la invención proporciona variantes de FVIIa que tienen mayor actividad independiente del factor tisular en comparación con FVIIa nativos. En una forma de realización similar, la mayor actividad no está acompañada por cambios en la especificidad de sustrato. En una forma de realización, la unión de las variantes al factor tisular no se ven perjudicadas (en comparación con FVIIa de tipo salvaje); en otra forma de realización, las variantes tienen al menos la actividad del factor VIIa de tipo salvaje cuando se une al factor tisular.

[0080] En otra forma de realización, las variantes del factor VII, además de las sustituciones de aminoácidos ya realizadas en las posiciones 157, 158, 296, 298, 334, 336 o 337 y los reemplazos opcionales de aminoácidos en otro lugar en el dominio de proteasa, también se han sustituido algunos residuos de aminoácidos en el dominio Gla N-terminal (residuos 1-37). En una forma de realización, uno o varios de los residuos de aminoácidos en posiciones 10 y 32 (en referencia a SEC ID NO:1) del factor VII es/son sustituidos por otro residuo de aminoácido que se puede codificar por constructos de ácidos nucleicos. En una forma de realización, el residuo de aminoácido Pro en la posición 10 se sustituye por Gln, Arg, His, Gln, Asn o Lys; y/o el residuo de aminoácido Lys en la posición 32 se sustituye por Glu, Gln o Asn.

Breve descripción de los dibujos

[0081] La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos completa del factor VII de coagulación humano nativo (SEC ID NO:1).

[0082] En la presente especificación, los aminoácidos se representan usando abreviaturas, como se indica en la tabla 1, aprobadas por IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Los aminoácidos y similares que tienen isómeros representados por el nombre o las siguientes abreviaturas están en forma natural L a menos que se indique lo contrario. Además, los extremos izquierdo y derecho de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, el N- y C-terminales a menos que se especifique lo contrario.

Tabla 1: Abreviaturas para los aminoácidos:

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

Treonina	Thr	T
----------	-----	---

5 [0083] Se acaba de descubrir que las variantes de FVIIa donde al menos uno de los residuos de aminoácidos Lys157; Val158; Glu296; Met298; Asp334; Ser336 o Lys337 (y opcionalmente uno o más residuos adicionales) es/son sustituidos por otro residuo de aminoácido tienen actividad coagulante.

10 [0084] Los residuos se localizan en un área que se cree que afecta a la inserción del amino terminal del dominio de proteasa y así a la formación de la conformación catalíticamente activa del factor VIIa que depende de un puente salino entre el grupo amino terminal de Ile153 y la cadena lateral de Asp343. Los reemplazos pueden eliminar repulsiones electrostáticas, añadir enlaces de hidrógeno o de otra manera facilitar la inserción del amino terminal.

15 [0085] Debido a la mayor actividad inherente de la variante de factor VIIa descrita en comparación con el FVIIa nativo, se prevee que una dosis inferior sea adecuada para obtener una concentración funcionalmente adecuada en el sitio de acción y así será posible administrar una dosis inferior al sujeto con episodios hemorrágicos o necesidad de mejora del sistema hemostático normal.

20 [0086] Como se ha discutido brevemente anteriormente, ha sido supuesto por los presentes inventores que al sustituir uno o más de los residuos de Lys en la posición 157 y el residuo de Lys en la posición 337 y el residuo de Val en la posición 158 y el residuo de Glu en la posición 296 y el residuo de Met en la posición 298 y el residuo de Asp en la posición 334 y el residuo de Ser en la posición 336, el factor VIIa logrará espontáneamente una conformación más activa que normalmente tiene que ser inducida por el factor tisular. Tales variantes del factor VIIa muestran una actividad inherente que puede ser terapéuticamente útil en situaciones donde la actividad procoagulante es independiente de factor tisular (Generación de factor Xa en la superficie de las plaquetas) tal como por ejemplo, cuando altas dosis de NovoSeven® son administradas.

25 [0087] La sustitución de residuos de aminoácidos adicionales en el dominio de proteasa pueden, además del efecto ha obtenido por la sustitución de uno o más de los residuos de Lys en la posición 157 y el residuo de Lys en la posición 337 y el residuo de Val en la posición 158 y el residuo de Glu en la posición 296 y el residuo de Met en la posición 298 y el residuo de Asp en la posición 334 y el residuo de Ser en la posición 336, facilitar además la formación de la conformación activa de la molécula. Se cree, no obstante, que los efectos más pronunciados se verán cuando las mutaciones mencionadas anteriormente se realizan en la proximidad (tridimensional o secuencial) de estos siete residuos.

35 [0088] La sustitución de unos residuos de aminoácidos en el dominio Gla N-terminal (residuos 1-37) del factor VII puede proveer la proteína con una afinidad sustancialmente más alta hacia los fosfolípidos de membrana, tales como fosfolípidos de membrana de células productoras de factor tisular o de plaquetas. Así, en las variantes del factor VII mencionadas anteriormente, además de la sustitución de aminoácidos ya realizada en las posiciones 157, 158, 296, 298, 334, 336 o 337 y los reemplazos de aminoácidos opcionales en otro lugar en el dominio de proteasa, pueden también sustituirse algunos residuos de aminoácidos en el dominio Gla N-terminal, obteniendo así una proteína con una actividad aumentada al igual que una afinidad aumentada hacia los fosfolípidos de membrana en comparación con el factor VII nativo. Preferiblemente los residuos de aminoácidos en posiciones 10 y 32 (en referencia a SEC ID NO:1) del factor VII se pueden sustituir por otros residuos de aminoácido que se pueden codificar por constructos de ácidos nucleicos. Ejemplos de residuos de aminoácidos preferidos para ser incorporados en las posiciones mencionadas anteriormente son: el residuo de aminoácido Pro en la posición 10 se sustituye por Gln, Arg, His, Gln, Asn o Lys; y/o el residuo de aminoácido Lys en la posición 32 se sustituye por Glu, Gln o Asn.

45 [0089] Otros residuos en el dominio Gla, basados en las diferentes afinidades por los fosfolípidos y secuencias de las proteínas del plasma dependientes de la vitamina K, también se pueden considerar para la sustitución. En el presente contexto las indicaciones de tres letras de los aminoácidos han sido usados en su significado convencional. A menos que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionados aquí son L-aminoácidos.

50 [0090] El término "dominio GLA N-terminal" significa la secuencia de aminoácidos 1-37 de FVII.

[0091] El término "dominio de proteasa" significa la secuencia de aminoácidos 153-406 de FVII (la cadena pesada de FVIIa).

55 [0092] La indicación de tres letras "GLA" significa ácido 4-carboxiglutámico (γ -carboxiglutamato).

[0093] El término "residuo de aminoácido neutro" (a pH 6-8) está destinado a comprender aminoácidos seleccionados de la lista de Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln.

60 [0094] El término "aminoácido pequeño" está destinado a comprender aminoácidos seleccionados entre Gly, Glu y Ala.

[0095] El término "residuo de aminoácido cargado negativamente" (a pH 6-8) está destinado a comprender aminoácidos seleccionados de Asp y Glu.

5 [0096] El término "polipéptido del factor VII" como se utiliza en este caso hace referencia a cualquier proteína comprendiendo la secuencia de aminoácidos 1- 406 del factor VII humano nativo (SEC ID n°: 1) o variantes de la misma. Esto incluye pero no está limitado al factor VII humano, factor VIIa humano y variantes de los mismos.

10 [0097] El término "Factor VII" como se utiliza en este caso está destinado a comprender la molécula del zimógeno monocatenario inactivo del factor VII al igual que la molécula de Factor VII bicatenaria activada (Factor VIIa). Éste incluye proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos 1-406 del factor VII humano nativo o factor VIIa. También incluye proteínas con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal modificado incluyendo deleciones o adiciones de aminoácidos N-terminales mientras aquellas proteínas retengan sustancialmente la actividad del factor VIIa. El término "factor VIIa", o "FVIIa" como se utiliza en este caso significa un producto que consiste en la forma activada (factor VIIa). "Factor VIIa" o "Factor VII" en la definición anterior también incluye variaciones alélicas naturales que pueden existir y se dan de un individuo a otro. También, el grado y la ubicación de la glicosilación u otras modificaciones postraduccionales pueden variar dependiendo de las células huésped elegidas y la naturaleza del entorno celular huésped.

20 [0098] Los términos "variantes" o "variante", como se utilizan en este caso, están destinados a designar el factor VII con la secuencia de SEC ID NO:1, donde uno o más aminoácidos de la proteína progenitora han sido sustituidos por otros aminoácidos 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 en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la proteína progenitora o en ambos. La "variante" o "variantes" dentro de esta definición tienen actividad de FVII en su forma molecular bicatenaria activada. En una forma de realización una variante es idéntica en un 65 % a la secuencia de SEC ID NO:1. En una forma de realización una variante es idéntica en un 80 % a la secuencia de SEC ID NO:1. En otra forma de realización una variante es idéntica en un 90 % a la secuencia de SEC ID NO:1. En otra forma de realización una variante es idéntica en un 95 % a la secuencia de SEC ID NO:1.

30 [0099] Como se utiliza en este caso el término "constructo de ácido nucleico" está destinado a hacer referencia a cualquier molécula de ácido nucleico de ADNc, ADN genómico, ADN sintético, ADN semi sintético, origen de ARN u origen mixto. El término "constructo" está destinado a indicar un segmento de ácido nucleico que puede ser uni- o bicatenario, y que se puede basar en una secuencia de nucleótidos completa o parcial que existe naturalmente y que codifica el polipéptido de interés. El constructo puede contener opcionalmente segmentos de otro ácido nucleico. De una manera similar, el término 35 "residuo de aminoácido que puede ser codificado por constructos de ácido nucleico" cubre residuos de aminoácidos que se pueden codificar por los constructos de ácido nucleico definidos anteriormente, es decir aminoácidos tales como Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.

40 [0100] El término "un aminoácido diferente" como se utiliza en este caso significa un aminoácido que es diferente del aminoácido naturalmente presente en esa posición. Este incluye pero no limita a aminoácidos que se pueden codificar por un constructo de ácidos nucleicos. Preferiblemente el aminoácido diferente está en la forma natural L y se puede codificar por un constructo de ácidos nucleicos. Un ejemplo específico es L-cisteína (Cys).

45 [0101] En el presente contexto, el término "tratamiento" está destinado a incluir tanto la prevención de un sangrado previsto, tal como en cirugía, como la regulación de un sangrado ya existente, tal como en los traumatismos, con el propósito de inhibir o minimizar el sangrado. La administración profiláctica de la variante del factor VIIa según la invención está así incluida en el término "tratamiento".

50 [0102] El término "actividad" como se utiliza en este caso significa la capacidad de un polipéptido del factor VII o una variante del mismo para convertir su sustrato Factor X al Factor Xa activo. La actividad de un polipéptido del factor VII se puede medir con el "Ensayo de Proteólisis *In Vitro*". El término "actividad inherente" también incluye la capacidad para generar trombina en la superficie de las plaquetas activadas en ausencia de factor tisular.

55 [0103] El término "mejora del sistema hemostático normal" significa un realce de la capacidad para generar trombina.

[0104] Como se utiliza en este caso el término "trastorno hemorrágico" refleja cualquier defecto congénito, inducido o adquirido, de origen molecular o celular que se manifiesta en sangrados. Ejemplos son las deficiencias de factor de coagulación (p. ej. hemofilia A y B o deficiencia de factores de coagulación XI o VII), inhibidores de factores de coagulación, actividades defectuosas de las plaquetas, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand.

[0105] El término "episodios hemorrágicos" está destinado a incluir sangrado descontrolado y excesivo que es un problema importante tanto en relación a la cirugía como en otras formas de daño del tejido. El sangrado descontrolado y excesivo puede ocurrir en sujetos con un sistema de coagulación normal y sujetos con trastornos de coagulación o sangrado. Deficiencias del factor de coagulación (hemofilia A y B, deficiencia de factores de coagulación XI o VII) o inhibidores de factores de coagulación pueden ser la causa de los trastornos hemorrágicos. Los sangrados excesivos también ocurren en sujetos con una cascada de coagulación sanguínea que funciona de forma normal (sin deficiencias de factores de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación) y pueden estar causados por una actividad defectuosa de las plaquetas, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. En tales casos, los sangrados se pueden comparar a los sangrados provocados por la hemofilia debido a que el sistema hemostático, como en la hemofilia, carece o presenta "compuestos" de coagulación esenciales anormales (tales como plaquetas o proteínas de factor de von Willebrand) que causan sangrados importantes. En sujetos que experimentan un daño tisular extenso en asociación con una cirugía o un gran traumatismo, el mecanismo hemostático normal se puede ver sobrepasado por la demanda de hemostasis inmediata y se puede desarrollar sangrado a pesar de un mecanismo hemostático normal. Lograr una hemostasis satisfactoria también es un problema cuando los sangrados ocurren en órganos tales como el cerebro, la región del oído interno y los ojos con posibilidades limitadas 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. Es común para todas estas situaciones 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). Los sangrados profusos y agudos también pueden ocurrir en sujetos sometidos a terapia anticoagulante en quienes una hemostasis defectuosa ha sido inducida por la terapia aplicada. Tales sujetos pueden necesitar intervenciones quirúrgicas en caso de que el efecto anticoagulante deba ser contrarrestado de forma rápida. La prostatectomía retro púbica radical es un procedimiento comúnmente realizado para sujetos con cáncer de próstata localizado. La operación es frecuentemente complicada por la pérdida de sangre significativa y a veces masiva. La pérdida de sangre considerable durante la prostatectomía está principalmente relacionada con la situación anatómica complicada, con varios sitios densamente vascularizados que no son fácilmente accesibles para la hemostasis quirúrgica, y que pueden conllevar un sangrado difuso de un área grande. Otra situación que puede causar problemas en el caso de hemostasis insatisfactoria es cuando los sujetos con un mecanismo hemostático normal son sometidos a una terapia anticoagulante para prevenir enfermedades tromboembólicas. Tal terapia puede incluir heparina, otras formas de proteoglicanos, warfarina u otras formas de antagonistas de la vitamina K al igual que aspirina y otros inhibidores de agregaciones plaquetarias.

[0106] En una forma de realización de la invención, el sangrado está asociado a hemofilia. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a hemofilia con inhibidores adquiridos. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a trombocitopenia. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a la enfermedad de von Willebrand. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a un daño de tejido severo. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a un traumatismo severo. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a una cirugía. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a una cirugía laparoscópica. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a gastritis hemorrágica. En otra forma de realización, el sangrado es sangrado uterino profuso. En otra forma de realización, el sangrado se produce en órganos con posibilidades limitadas de hemostasis mecánica. En otra forma de realización, el sangrado se produce en el cerebro, región del oído interno u ojos. En otra forma de realización, el sangrado está asociado al proceso de tomar biopsias. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a una terapia anticoagulante.

[0107] El término "sujeto" como se utiliza en este caso está destinado a hacer referencia a cualquier animal, en particular mamíferos, tales como seres humanos, y puede, donde fuera apropiado, ser usado de forma intercambiable con el término "paciente".

[0108] Como se utiliza en este caso el término "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la variante del factor VII de la invención.

50 Preparación de variantes del factor VII

[0109] Las variantes del factor VII descritas aquí se pueden producir mediante técnicas de ácido nucleico recombinante. En general, una secuencia clonada de ácidos nucleicos de factor VII de tipo salvaje se modifica para codificar la proteína deseada. Esta secuencia modificada se inserta luego en un vector de expresión, que es sucesivamente transformado o modificado en células huésped. Se prefieren células eucarióticas más altas, en particular células mamíferas cultivadas, como células huésped. El nucleótido completo y las secuencias de aminoácidos para el factor VII humano son conocidos (Véase U.S. 4,784,950, donde la clonación y la expresión del factor VII humano recombinante está descrita). La secuencia del factor VII bovino está descrita en Takeya et al., J. Biol. Chem. 263:14868-14872 (1988).

[0110] Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos se pueden realizar por una variedad de técnicas. La modificación de la secuencia de ácidos nucleicos puede ser por mutagénesis de sitio específico.

Las técnicas para la mutagénesis de sitio específico se conocen bien en la técnica y están descritas en, por ejemplo, Zoller and Smith (DNA 3:479-488, 1984) or "Splicing by extension overlap", Horton et al., Gene 77, 1989, pp. 61-68. Así, utilizando el nucleótido y las secuencias de aminoácidos de factor VII, uno puede introducir las alteración(s) elegidas. Asimismo, procedimientos para preparar un constructo de ADN utilizando la reacción en cadena de polimerasa utilizando cebadores específicos son conocidos por personas expertas en la técnica (cf. PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, USA).

[0111] El constructo de ácidos nucleicos que codifica la variante del factor VII de la invención puede ser adecuadamente de origen genómico u origen de ADNc, por ejemplo obtenido por preparación de una librería genómica o de ADNc y escaneado en busca de secuencias de ADN que codifiquen todo o parte del polipéptido por hibridación utilizando sondas sintéticas de oligonucleótidos conforme a las técnicas estándar (cf. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

[0112] El constructo de ácidos nucleicos que codifica la variante del factor VII también se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo el método de fosfoamidita descrito por Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. Según el método de fosfoamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo en un sintetizador automático de ADN, purificado recocado, ligado y clonado en vectores adecuados.

[0113] Además, el constructo de ácidos nucleicos puede ser de origen mixto sintético y genómico, mixto sintético y ADNc o mixto genómico y ADNc preparado por fragmentos ligantes de origen sintético, genómico u origen de ADNc (según convenga), los fragmentos correspondientes a varias partes del constructo de ácido nucleico entero, conforme a técnicas estándar.

[0114] El constructo de ácido nucleico es preferiblemente un constructo de ADN,

[0115] Las secuencias de ADN para el uso en la producción de variantes del factor VII según la presente invención codificarán típicamente un pre-pro polipéptido en el amino terminal del factor VII para obtener un tratamiento postraduccion (p. ej. gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico) y una secreción desde la célula huésped apropiados. El pre-pro polipéptido puede ser el del factor VII u otra proteína plasmática dependiente de vitamina K, 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 las variantes del factor VII donde aquellas modificaciones significativamente no perjudiquen la capacidad de la proteína para actuar como coagulante. Por ejemplo, las variantes del factor VII pueden también ser modificadas en el sitio de activación por ruptura para inhibir la conversión del zimógeno factor VII en su forma bicitenaria activada, como se describe generalmente en U.S. 5,288,629 .

[0116] Los vectores de expresión para el uso en la expresión de las variantes de factor VII comprenderán un promotor capaz de dirigir la transcripción de un gen clonado o ADNc. Los promotores preferidos para el uso en células mamíferas cultivadas incluyen promotores víricos y promotores celulares. Entre los promotores víricos se incluyen el promotor SV40 (Subramani et al., Mol. Cell. Biol. 1:854-864, 1981) y el promotor CMV (Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985). Un promotor vírico particularmente preferido es el promotor tardío mayor del adenovirus 2 (Kaufman and Sharp, Mol. Cell. Biol. 2:1304-1319, 1982). Entre los promotores celulares se incluye el promotor de gen kappa de ratón (Bergman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7041-7045, 1983) y el promotor de V_H de ratón (Loh et al., Cell 33:85-93, 1983). Un promotor celular particularmente preferido es el promotor de metalotioneína-I de ratón (Palmiter et al., Science 222:809-814, 1983). Los vectores de expresión también pueden contener un conjunto de sitios de empalme de ARN localizados secuencia abajo del promotor y secuencia arriba del sitio de inserción para la secuencia del factor VII misma. Los sitios de empalme de ARN preferidos se pueden obtener de adenovirus y/o genes de inmunoglobulina. Está también contenida en los vectores de expresión una señal de poliadenilación localizada secuencia abajo del sitio de inserción. Entre las señales de poliadenilación particularmente preferidas se incluyen la señal de poliadenilación tardía o temprana de SV40 (Kaufman and Sharp, *ibid.*), la señal de poliadenilación de la región de adenovirus 5 Elb, el terminador de gen de la hormona del crecimiento humana (DeNoto et al. Nucl. Acids Res. 9:3719-3730, 1981) o la señal de poliadenilación del gen de factor VII humano o el gen de Factor VII bovino. Los vectores de expresión también pueden incluir una secuencia líder vírica no codificante, como la líder tripartita de adenovirus 2, localizada entre el promotor y los sitios de empalme de ARN; y secuencias potenciadoras, tales como el SV40 intensificador.

[0117] Secuencias de ADN clonadas se introducen en células mamíferas cultivadas mediante, por ejemplo, transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler et al., Cell 14:725-732, 1978 ; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603-616, 1981 ; Graham and Van der Eb, Virology 52d:456-467, 1973) o electroporación (Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982). Para identificar y seleccionar células que expresen el ADN exógeno, un gen que confiere un fenotipo seleccionable (un marcador seleccionable) es generalmente introducido en las células con el gen o ADNc de interés. Entre los marcadores seleccionables preferidos se incluyen genes que confieren resistencia a fármacos tales como neomicina, higromicina, y

metotrexato. El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Un marcador seleccionable amplificable preferido es una secuencia dihidrofolato-reductasa (DHFR). Los marcadores seleccionables han sido revisados por Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA). El experto en la técnica será capaz fácilmente de elegir marcadores seleccionables adecuados.

5

[0118] Los 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, la última disposición produce un mensaje bicistónico. Constructos de este tipo se conocen en la técnica (por ejemplo, Levinson and Simonsen, U.S. 4,713,339). También puede ser ventajoso añadir ADN adicional, conocido como "ADN transportador," a la mezcla que se introduce en las células.

10

[0119] Después de que las células hayan absorbido el ADN, se crecen en un medio de crecimiento apropiado, típicamente durante 1-2 días, para iniciar la expresión del gen de interés. El medio usado para el cultivo de las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para crecer las células huésped, tales como medios mínimos o complejos que contienen suplementos apropiados. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej. en catálogos de the American Type Culture Collection). Los medios se preparan usando los procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, references for bacteria and yeast; Bennett, J.W. and LaSure, L., editors, More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, CA, 1991). Los medios de crecimiento generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, azúcares esenciales, vitaminas, sales, fosfolípidos, proteínas y factores de crecimiento. Para la producción de variantes del factor VII gamma-carboxiladas, el medio contendrá vitamina K, preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml. La selección del medicamento se aplica luego para seleccionar el crecimiento de células que están expresando el marcador seleccionable en una forma estable. Para células que han sido modificadas con un marcador seleccionable amplificable la concentración de medicamento se puede aumentar para seleccionar un mayor número de copias de las secuencias clonadas, aumentando así los niveles de expresión. Clones de células transfectadas de forma estable son luego seleccionados para la expresión de la variante del factor VII deseada.

15

20

25

[0120] Entre las líneas celulares de mamífero preferidas se incluyen las líneas celulares CHO (ATCC CCL 61), COS-1 (ATCC CRL 1650), riñón de cría de hámster (BHK) y 293 (ATCC CRL 1573 Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Una línea celular preferida de BHK es la línea celular tk⁻ ts13 BHK (Waechter and Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982), de ahora en adelante denominada como células BHK 570. La línea celular BHK 570 está disponible de la American Type Culture Collection, 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. Además, varias otras líneas celulares pueden ser utilizadas, incluyendo Hep I de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Hep II de rata (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. USA 77:4216-4220, 1980).

30

35

[0121] La tecnología de animal transgénico se puede emplear para producir las variantes del factor VII de la invención. Se prefiere producir las proteínas en las glándulas mamarias de un mamífero hembra huésped. La expresión en la glándula mamaria y la secreción posterior de la proteína de interés en la leche supera muchas dificultades encontradas en el aislamiento de proteínas de otras fuentes. La leche es fácilmente recogida, disponible en grandes cantidades, y bioquímicamente bien caracterizada. Además, las principales proteínas de la leche están presentes en la leche en altas concentraciones (típicamente de aproximadamente 1 a 15 g/l).

40

45

[0122] Desde un punto de vista comercial, es claramente preferible usar como huésped una especie que tenga una producción de leche grande. Mientras que los animales más pequeños tales como ratones y ratas se pueden usar (y se prefieren en la fase de prueba de principio), se prefiere usar mamíferos de ganado incluyendo, pero no limitando a, cerdos, cabras, reses. Las ovejas se prefieren particularmente debido a factores tales como la historia previa de transgénesis en esta especie, producción de leche, coste y la disponibilidad preparada del equipamiento para la recolección de la leche de oveja (véase, por ejemplo, WO 88/00239 para una comparación de factores que influyen la elección de especies huésped). Es generalmente deseable seleccionar una raza de animal huésped que ha sido criada para uso lácteo, tal como la oveja de Frisia oriental, o introducir materia prima láctea por cría de la línea transgénica a una fecha más tardía. De cualquier manera, animales de estado de salud conocido y bueno deberían ser usados.

50

55

[0123] Para obtener expresión en la glándula mamaria, un promotor de transcripción de un gen de proteína de la leche es utilizado. Entre los genes de proteína de la leche se incluyen aquellos genes que codifican caseínas (véase U.S. 5,304,489), beta-lactoglobulina, a-lactoalbúmina, y proteína ácida de lactosuero. Se prefiere el promotor de beta-lactoglobulina (BLG). En el caso del gen de beta-lactoglobulina ovina, una región de al menos 406 pares de bases anteriores a la secuencia flanqueante 5' del gen será generalmente utilizada, aunque partes más grandes de la secuencia flanqueante 5', hasta aproximadamente 5 kbp, son preferidos, tales como un segmento de ADN -4.25 kbp que circunda el promotor flanqueante 5'

60

y una porción no codificante del gen de beta-lactoglobulina (véase Whitelaw et al., Biochem. J. 286: 31-39 (1992)). Fragmentos Similares de ADN promotor de otras especies son también adecuadas.

5 [0124] Otras regiones del gen de beta-lactoglobulina también se pueden incorporar en constructos, como también regiones genómicas del gen a ser expresado. Se acepta generalmente en la técnica que intrones carentes de constructos, por ejemplo, se expresen de forma pobre en comparación con aquellos que contienen tales secuencias de ADN (véase Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 836-840 (1988); Palmiter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 478-482 (1991); Whitelaw et al., Transgenic Res. 1: 3-13 (1991); WO 89/01343 ; and WO 91/02318). A este respecto, se prefiere generalmente, donde sea posible, usar secuencias genómicas que contienen todos o algunos de los intrones nativos de un gen que codifica la proteína o polipéptido de interés, así la inclusión extra de al menos algunos intrones de, p. ej, el gen de beta-lactoglobulina, es preferida. Una región tal es un segmento de ADN que mantiene la eliminación de intrones y poliadenilación del ARN desde la región 3' no codificante del gen de beta-lactoglobulina de ovino. Cuando se sustituye por las secuencias naturales no codificantes 3' de un gen, este segmento de beta-lactoglobulina ovina puede tanto mejorar como estabilizar los niveles de expresión de la proteína o polipéptido de interés. Dentro de otras formas de realización, la región circundante a la iniciación ATG de la secuencia de la variante del factor VII se sustituye con las correspondientes secuencias de un gen de proteína específica de leche. Tal sustitución proporciona un entorno de iniciación tisular específica putativa para mejorar la expresión. Es conveniente reemplazar las secuencias no codificantes pre-pro y 5' de la variante del factor VII enteras con aquellas de, por ejemplo, el gen BLG, aunque regiones más pequeñas pueden ser sustituidas.

20 [0125] Para la expresión de variantes del factor VII en animales transgénicos, una variante de codificación de segmento de ADN que codifica la variante de Factor VII se enlaza operativamente a segmentos de ADN adicionales requeridos para su expresión para producir unidades de expresión. Tales segmentos adicionales incluyen el promotor mencionado arriba, al igual que secuencias que proveen la terminación de la transcripción y poliadenilación del 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 Factor VII modificado. La secuencia de señal secretora puede ser una secuencia de señal secretora de Factor VII nativo o puede ser la de otra proteína, tal como una proteína de la leche (véase, por ejemplo, von Heijne, Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986) ; y Meade et al., U.S. 4,873,316).

30 [0126] La construcción de unidades de expresión para el uso en animales transgénicos se realiza convenientemente por inserción de una secuencia de variante del factor VII en un plásmido o vector fago con los segmentos de ADN adicionales, aunque la unidad de expresión se puede construir esencialmente por cualquier secuencia de ligaduras. Es particularmente conveniente proporcionar un vector con un segmento de ADN que codifica una proteína de la leche y reemplazar la secuencia que codifica la proteína de la leche con aquella de un polipéptido de la variante del factor VII; creando así una fusión de gen que incluye las secuencias de control de expresión del gen de proteína de la leche. De cualquier manera, clonar las unidades de expresión en plásmidos u otros vectores facilita la amplificación de la secuencia de la variante de factor VII. La amplificación es convenientemente realizada en células huésped bacterianas (p. ej. *E. coli*), así los vectores incluirán típicamente un origen de replicación y un marcador seleccionable funcional en células huésped bacterianas. La unidad de expresión es luego introducida en huevos fertilizados (incluyendo embriones de fase temprana) de la especie de huésped elegida. La introducción de ADN heterólogo se puede realizar por una de diferentes vías, incluyendo la microinyección (p. ej. U.S. Patent No. 4,873,191), infección retroviral (Jaenisch, Science 240: 1468-1474 (1988)) o integración dirigida al sitio utilizando células madre embrionarias (ES) (revisado 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 permite que llegue a término. La descendencia que lleva el ADN introducido en su línea germinal puede pasar el ADN a su progenie en la forma normal mendeliana, permitiendo el desarrollo de greyes transgénicos. Los procedimientos generales para producir animales transgénicos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986 ; Simons et al., Bio/Technology 6: 179-183 (1988); Wall et al., Biol. Reprod. 32: 645-651 (1985); Buhler et al., Bio/Technology 8: 140-143 (1990); Ebert et al., Bio/Technology 9: 835-838 (1991); Krimpenfort et al., Bio/Technology 9: 844-847 (1991); Wall et al., J. Cell. Biochem. 49: 113-120 (1992); U.S. 4,873,191 ; U.S. 4,873,316 ; WO 88/00239 , WO 90/05188 , WO 92/11757 ; and GB 87/00458). Las técnicas para introducir secuencias de DNA extrañas en mamíferos y sus células germinales fueron originalmente desarrolladas en ratón (Véase, por ejemplo, Gordon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380- 7384 (1980); Gordon and Ruddle, Science 214: 1244-1246 (1981); Palmiter and Brinster, Cell 41: 343-345 (1985); Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442 (1985); and Hogan et al. (*ibid.*)). Estas técnicas fueron posteriormente adaptadas para su uso con animales más grandes, incluyendo especies de ganado (véase, por ejemplo, WO 88/00239, WO 90/05188, and WO 92/11757 ; and Simons et al., Bio/Technology 6: 179-183 (1988)). Para resumir, en la vía más eficaz utilizada hasta la fecha en la generación de ratones o ganado transgénicos, varios cientos de moléculas lineales del ADN de interés se inyectan en uno de los pronúcleos de un huevo fertilizado según técnicas establecidas. La inyección de ADN en el citoplasma de un cigoto puede también ser empleada.

60 [0127] La producción en plantas transgénicas también puede ser empleada. La expresión puede ser generalizada o dirigida a un órgano particular, tal como un tubérculo (véase, 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) ; and EP 0 255 378).

[0128] Las variantes del factor VII de la invención son recuperadas del medio de cultivo celular o de la leche. Las variantes del factor VII de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no restringido a, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatoenfoco, y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparativo (IEF), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989). Preferiblemente, se pueden purificar por cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpos anti-factor VII. El uso de anticuerpos monoclonales dependientes de calcio, como está descrito por Wakabayashi et al., J. Biol. Chem. 261:11097-11108, (1986) and Thim et al., Biochemistry 27: 7785-7793, (1988), es particularmente preferido. Una purificación adicional se puede conseguir por medios de purificación química convencional, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento. Otros métodos de purificación, incluyendo la precipitación de citrato de bario, se conocen en la técnica, y se pueden aplicar a la purificación de las nuevas variantes del factor VII aquí descritas (véase, por ejemplo, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982).

[0129] Para usos terapéuticos se prefiere que las variantes del factor VII de la invención sean sustancialmente puras. Así, en una forma de realización preferida de la invención las variantes del factor VII de la invención se purifican hasta al menos aproximadamente un 90 a 95% de homogeneidad, preferiblemente al menos aproximadamente un 98% de homogeneidad. La pureza se puede evaluar por ejemplo por electroforesis en gel y secuenciación de aminoácidos aminotermiales.

[0130] La variante del factor VII se divide en su sitio de activación para convertirse en su forma bicatenaria. La activación se puede realizar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos por Osterud, et al., Biochemistry 11:2853-2857 (1972); Thomas, U.S. Patent No. 4,456,591 ; Hedner and Kisiel, J. Clin. Invest. 71:1836-1841 (1983); or Kisiel and Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73:29-42 (1983). Alternativamente, como está descrito por Bjoem et al. (Research Disclosure, 269 September 1986, pp. 564-565), el factor VII se puede activar pasando éste a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, tal como Mono Q® (Pharmacia fine Chemicals) o similar. La variante del factor VII activada resultante puede luego ser formulada y administrada como se describe a continuación.

Ensayos

[0131] La invención también proporciona ensayos adecuados para seleccionar variantes preferidas de factor VIIa según la invención. Estos ensayos se pueden realizar como una simple prueba *in vitro* preliminar.

[0132] Así, el ejemplo 11 divulga aquí una simple prueba (titulada "Ensayo de Hidrólisis *In Vitro*") de la actividad de las variantes de factor VIIa de la invención. Basado en el mismo, las variantes de factor VIIa que son de interés particular son tales variantes donde la proporción entre la actividad de la variante y la actividad del factor VII nativo mostrados en la Fig. 1 está por encima de 1.0, por ejemplo al menos aproximadamente 1.25, preferiblemente al menos aproximadamente 2.0, tal como al menos aproximadamente 3.0 o, más preferido incluso, al menos aproximadamente 4.0 cuando se evalúa en el "Ensayo de Hidrólisis *In Vitro*" aquí definido.

[0133] La actividad de las variantes puede también ser medida usando un sustrato fisiológico tal como factor X (Ensayo de Proteólisis *In Vitro*, véase ejemplo 12), adecuadamente a una concentración de 100-1000 nM, donde el factor Xa generado es medido después de la adición de un sustrato cromogénico adecuado (por ejemplo S-2765). Además, el ensayo de actividad se puede realizar a temperatura fisiológica.

[0134] La capacidad de las variantes de FVIIa para generar trombina pueden ser medidas también en un ensayo que comprende todos los factores de coagulación pertinentes e inhibidores a concentraciones fisiológicas (menos el factor VIII cuando se imitan las condiciones de hemofilia) y plaquetas activadas (como se describe en p. 543 en Monroe et al. (1997) Brit. J. Haematol. 99, 542-547).

Administración y composiciones farmacéuticas

[0135] Las variantes del factor VII según la presente invención se pueden utilizar para controlar trastornos de sangrado que tienen diferentes causas tales como deficiencias del factor de coagulación (p. ej. hemofilia A y B o deficiencia de los factores de coagulación XI o VII) o inhibidores de los factores de coagulación, o se pueden utilizar para controlar el sangrado excesivo que tiene lugar en sujetos con una cascada de coagulación sanguínea de funcionamiento normal (sin deficiencias de factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación). Los sangrados pueden estar causados por una actividad defectuosa de las plaquetas, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. También se pueden observar en sujetos en quién una actividad fibrinolítica aumentada se ha inducido por varios estímulos.

[0136] En sujetos que experimentan daño tisular extenso en la asociación con cirugía o gran traumatismo, el mecanismo hemostático se puede ver sobrepasado por la demanda de hemostasis inmediata y pueden desarrollar sangrados a pesar

de un mecanismo hemostático normal. Lograr una hemostasis satisfactoria es también un problema cuando los sangrados ocurren en órganos tales como el cerebro, región del oído interno y los ojos y también puede ser un problema en casos de sangrados difusos (gastritis hemorrágica y sangrado uterino profuso) cuando es difícil 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 proveer hemostasis por técnicas quirúrgicas, (sutura, clips, etc.). Los sangrados profusos y agudos también pueden ocurrir en sujetos sometidos a terapia anticoagulante en quienes una hemostasis defectuosa se ha inducido por la terapia dada. Tales sujetos pueden necesitar intervenciones quirúrgicas en caso de que el efecto anticoagulante deba ser contrarrestado de forma rápida. Otra situación que puede causar problemas en el caso de hemostasis insatisfactoria es cuando los sujetos con un mecanismo hemostático normal son sometidos a terapia anticoagulante para prevenir enfermedades tromboembólicas. Tales terapias pueden incluir heparina, otras formas de proteoglicanos, warfarina u otra forma de antagonistas de la vitamina K al igual que aspirina y otros inhibidores de agregación plaquetaria.

[0137] Una activación sistémica de la cascada de coagulación puede llevar a coagulación intravascular diseminada (CID). No obstante, tales complicaciones no se han observado en sujetos tratados con dosis altas de FVIIa recombinante debido a un proceso hemostático de la especie localizado inducido por la formación del complejo entre FVIIa y TF expuesto en sitio de lesión de la pared del vaso. Las variantes del factor VII según la invención pueden así ser usadas también en sus formas activadas para controlar tales sangrados excesivos asociados a un mecanismo hemostático normal.

[0138] Para los tratamientos en relación con intervenciones deliberadas, las variantes del factor VII de la invención serán administradas típicamente dentro del periodo de aproximadamente 24 horas antes de que se realice la intervención, y luego durante prácticamente 7 días o más. La administración como coagulante puede ser a través de una variedad de vías como se describe en este caso.

[0139] La dosis de las variantes del factor VII varían 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 sujeto de 70 kg como dosis de carga y de mantenimiento, dependiendo del peso del sujeto y de la gravedad de la enfermedad.

[0140] Las composiciones farmacéuticas están destinadas principalmente a la administración parenteral para el 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 pulsátil o continua. Las composiciones para la administración parenteral comprenden las variantes del factor VII de la invención en combinación con, preferiblemente disuelto en, un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Una variedad de portadores acuosos puede ser utilizada, tales como agua, agua tamponada, solución salina al 0.4%, glicina al 0.3% y similares. Las variantes del factor VII de la invención pueden ser formuladas también en las preparaciones de liposoma para la liberación o selección de los sitios de herida. Las preparaciones de liposoma están descritas generalmente en, por ejemplo, U.S. 4,837,028 , U.S. 4,501,728 , and U.S. 4,975,282. Las composiciones se pueden esterilizar por, técnicas de esterilización convencional bien conocidas. Las soluciones acuosas resultantes se pueden empaquetar para el uso o filtrarse bajo condiciones asépticas y liofilizarse, la preparación liofilizada se combina con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y agentes tamponadores, agentes de ajustes de tonicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc.

[0141] La concentración de variante del factor VII en estas formulaciones pueden variar mucho, es decir, desde menos de aproximadamente 0,5% en peso, normalmente a o al menos aproximadamente 1% en peso hasta llegar a 15 o 20% en peso y será seleccionado principalmente por volúmenes fluidos, viscosidades, etc., conforme al modo particular de administración seleccionado.

[0142] Así, una composición farmacéutica típica para infusión intravenosa podría ser elaborada para contener 250 ml de solución Ringer estéril y 10 mg de la variante del factor VII. Métodos reales para preparar composiciones administrables parenteralmente serán conocidos o aparentes para los expertos en la técnica y están descritos con más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990).

[0143] Las composiciones con las variantes del factor VII de la presente invención se pueden administrar para tratamientos terapéuticos y/o profilácticos. En usos terapéuticos, las composiciones se administran a un sujeto que ya sufre una enfermedad, como se ha descrito anteriormente, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como "cantidad terapéuticamente efectiva". Como será entendido por el experto en la técnica las cantidades eficaces para este propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o herida al igual que del peso y del estado general del sujeto. En general, no obstante, la

cantidad eficaz variará de aproximadamente 0.05 mg hasta aproximadamente 500 mg de la variante del factor VII al día para un sujeto de 70 kg, con dosificaciones de aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 200 mg de la variante del factor VII al día que son más comúnmente usadas.

5 [0144] Hay que tener en cuenta que los materiales de la presente invención pueden ser empleados generalmente en las enfermedades serias o estados de herida, esto es, situaciones de amenaza o potencial amenaza para la vida. En tales casos, a la vista de la minimización de sustancias externas y la carencia general de inmunogenicidad de variantes de factor VII humano en seres humanos, es posible y puede ser deseable por el médico responsable del tratamiento administrar un exceso sustancial de estas composiciones de variante del factor VII.

10 [0145] En aplicaciones profilácticas, las composiciones con la variante del factor VII de la invención se administran a un sujeto susceptible de o de otra manera en riesgo de un estado de enfermedad o herida para mejorar la capacidad coagulante propia del sujeto. Tal cantidad se define como una "dosis profilácticamente efectiva." En aplicaciones profilácticas, las cantidades precisas una vez más dependen del estado de salud y de peso del sujeto, pero la dosis generalmente varía de aproximadamente 0.05 mg a aproximadamente 500 mg al día para un sujeto de 70 kilos, más comúnmente de aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 200 mg al día para un sujeto de 70 kilos.

15 [0146] Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones se pueden llevar a cabo con niveles de dosis y patrones que se seleccionan por el médico responsable del tratamiento. Para sujetos ambulatorios que requieren niveles de mantenimiento diario, las variantes del factor VII se pueden administrar por infusión continua utilizando por ejemplo un sistema de bomba portátil.

20 [0147] La liberación local de la variante del factor VII de la presente invención, tal como, por ejemplo, la aplicación tópica puede ser realizada, por ejemplo, mediante una pulverización, perfusión, catéteres de doble balón, stent, incorporado en injertos vasculares o espirales, hidrogeles utilizados para revestir los catéteres de globo, u otros métodos bien establecidos. De cualquier manera, las composiciones farmacéuticas deberían proporcionar una cantidad de variante del Factor VII suficiente para tratar el sujeto eficazmente.

25 [0148] La presente invención está posteriormente ilustrada por los siguientes ejemplos que, no obstante, no deben ser interpretados como una limitación del alcance de protección. Las características descritas en la descripción precedente y en los siguientes ejemplos pueden, tanto separadamente como en cualquier combinación de lo mismo, ser material para hacer efectiva la invención en formas diversas de la misma.

35 Ejemplos

[0149] La terminología para las sustituciones de aminoácidos usada los siguientes ejemplos es de la siguiente manera. La primera letra representa el aminoácido naturalmente presente en una posición de SEC ID NO:1. El siguiente número representa la posición en la SEC ID NO:1. La segunda letra representa el aminoácido diferente que sustituye (que reemplaza) al aminoácido natural. Un ejemplo es M298Q, donde una metionina en la posición 298 de SEC ID NO:1 se sustituye por una glutamina. En otro ejemplo, V158T/M298Q, la valina en la posición 158 de SEC ID NO:1 se sustituye por una treonina y la metionina en la posición 298 de SEC ID NO:1 se sustituye por una glutamina en el mismo polipéptido del factor VII.

45 Ejemplo 1

[0150] ADN que codifica [V158T/M298Q]-FVII, [K157A]-FVII, [E296V]-FVII, [E296V/M298Q]-FVII y [V158D/E296V]- FVII, [V158D/M298Q]-FVII, [V158D/M298K]-FVII, [V158D/E296V/M298Q]-FVII, [M298Q]-FVII, [S336G]-FVII, [K337A]-FVII, [V158D/E296V/M298Q/K337A]-FVII.

50 [0151] Un constructo de ADN que codifica [V158T/M298Q]-FVII, [K157A]-FVII, [E296V]-FVII, [E296V/M298Q]-FVII y [V158D/E296V]-FVII, [V158D/M298Q]-FVII, [V158D/M298K]-FVII, [V158D/E296V/M298Q]-FVII, [M298Q]-FVII, [V158D/E296V/M298Q/K337A]-FVII, [S336G]-FVII, y [K337A]-FVII fueron preparados por mutagénesis dirigida al sitio que usa un vector de ADN bicatenario, superenrollado con un inserto de interés y dos cebadores sintéticos conteniendo la mutación deseada. Los siguientes pares de cebador fueron usados:

Para [K157A]-FVII:

5'-CCG AAT TGT GGG GGG CGC GGT GTG CCC CAA AGG G-3' (SEC ID NO:2)

60 5'-CCC TTT GGG GCA CAC CGC GCC CCC CAC AAT TCG G-3' (SEC ID NO:3)

Para [V158D]-FVII:

5 5'-GTG GGG GGC AAG GAC TGC CCC AAA GGG G-3' (SEC ID NO:4)
5'-CCC CTT TGG GGC AGT CCT TGC CCC CCA C-3' (SEC ID NO:5)

Para [V158T]-FVII:

10 5'-GTG GGG GGC AAG ACG TGC CCC AAA GGG G-3' (SEC ID NO:6)
5'-CCC CTT TGG GGC ACG TCT TGC CCC CCA C-3' (SEC ID NO:7)

15 Para [E296V/M298Q]-FVII:

5'-GCC ACG GCC CTG GTG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3' (SEC ID NO:8) 5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG
GAG CAC CAG GGC CGT GGC-3' (SEC ID NO:9)

20 Para [M298Q]-FVII:

5'-GCC CTG GAG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3' (SEC ID NO:10)
5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CTC CAG GGC-3' (SEC ID NO:11)

25 Para [M298K]-FVII:

5'-GCC CTG GAG CTC AAG GTC CTC AAC GTG-3'(SEC ID NO:12)

30 5'-CAC CTT GAG GAC CTT GAG CTC CAG GGC-3' (SEC ID NO:13)

Para [S336G]-FVII:

5'-GGC TAC TCG GAT GGC GGC AAG GAC TCC TGC AAG-3 (SEC ID NO:14)

35 5'-CTT GCA GGA GTC CTT GCC GCC ATC CGA GTA GCC-3' (SEC ID NO:15)

Para [K337A]-FVII:

40 5'-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3' (SEC ID NO:16)

5'-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3' (SEC ID NO:17)

45 [0152] Los cebadores oligonucleótidos, cada complementario a cadenas opuestas del vector, fueron extendidos durante la variación cíclica de la temperatura mediante Pfu ADN polimerasa. En la incorporación de los cebadores, un plásmido mutado conteniendo muescas alternadas fue generado. Después del ciclo de temperatura, el producto fue tratado con DpnI que es específico para ADN metilado y hemimetilado para digerir el molde de ADN parental y para seleccionar el ADN sintetizado que contiene mutaciones.

50 [0153] Los procedimientos para preparar un constructo de ADN utilizando la reacción en cadena de la polimerasa utilizando unos cebadores específicos son conocidos por personas expertas en la técnica (cf. PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, USA).

Ejemplo 2

55 Preparación de [V158T/M298Q]-FVII.

[0154] Células BHK fueron transfectadas esencialmente tal y como se describe anteriormente (Thim et al. (1988) Biochemistry 27, 7785- 7793 ; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante [V158T/M298Q]-FVII. La variante del factor VII fue purificada de la siguiente manera:

[0155] El medio acondicionado fue cargado sobre una columna de 25 mL de Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) después de la adición de EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 0,1% y Tris 10 mM, se ajusta el pH a 8,0 y se ajusta la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada pasando de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 al 0.1%, pH 8.0 a Tris 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 25 mM, Tritón X-100 al 0.1%, pH 8.0. Las fracciones que contienen [V158T/M298Q]-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna de 25 ml que contiene un anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Denmark) acoplado a sefarosa 4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con Hepes 50 mM, pH 7.5, que contiene CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y Tritón X-100 al 0.02%. Después del lavado con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo NaCl 2 M, el material ligado fue eluido con tampón de equilibrado conteniendo EDTA 10 mM en vez de CaCl₂. Antes del uso o del almacenamiento, se añade un exceso de CaCl₂ sobre EDTA o [V158T/M298Q]-FVII fue transferido a un tampón conteniendo Ca²⁺. El rendimiento de cada paso fue seguido por medidas de ELISA de Factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 3

Preparación de [K157A]-FVII.

[0156] Células BHK fueron transfectadas esencialmente tal y como se describe anteriormente (Thim et al. (1988) Biochemistry 27, 7785- 7793; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante [K157A]-FVII. La variante del factor VII fue purificada de la siguiente manera:

[0157] El medio acondicionado fue cargado sobre una columna de 25 ml de Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) después de la adición de EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 0,1% y Tris 10 mM, se ajusta el pH a 8,0 y se ajusta la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada pasando de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 0.1%, pH 8.0 a Tris 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 25 mM, Tritón X-100 al 0.1%, pH 8.0. Las fracciones que contienen [K157A]-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna de 25 ml que contiene un anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a sefarosa 4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con Hepes 50 mM, pH 7.5, que contiene CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y Tritón X-100 al 0.02%. Después del lavado con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo NaCl 2 M, el material ligado fue eluido con tampón de equilibrado conteniendo EDTA 10 mM en vez de CaCl₂. Antes del uso o almacenamiento, un exceso de CaCl₂ fue añadido sobre EDTA o [K157A]-FVII fue transferido a un tampón con Ca²⁺. El rendimiento de cada paso fue seguido por medidas de ELISA de Factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 4

Preparación de [V158D/M298Q]-FVII.

[0158] Células BHK fueron transfectadas esencialmente tal y como se describe anteriormente (Thim et al. (1988) Biochemistry 27, 7785- 7793; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante [V158D/M298Q]-FVII. La variante del factor VII fue purificada de la siguiente manera:

[0159] El medio acondicionado fue cargado sobre una columna de 25 ml de Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) después de la adición de EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 0,1% y Tris 10 mM, se ajusta el pH a 8,0 y se ajusta la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada pasando de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 0.1%, pH 8.0 a Tris 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 25 mM, Tritón X-100 al 0.1%, pH 8.0. Las fracciones que contienen [V158D/M298Q]-FVIII fueron agrupadas y aplicadas a una columna de 25 ml que contiene un anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a sefarosa 4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con Hepes 50 mM, pH 7.5, que contiene CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y Tritón X-100 al 0.02%. Después del lavado con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo NaCl 2 M, el material ligado fue eluido con tampón de equilibrado conteniendo EDTA 10 mM en vez de CaCl₂. Antes del uso o almacenamiento, un exceso de CaCl₂ fue añadido sobre EDTA o [V158D/M298Q]-FVII fue transferido a un tampón conteniendo Ca²⁺. El rendimiento de cada paso fue seguido por medidas de ELISA de factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 5

Preparación de [V158D/M298K]-FVII.

[0160] Las células BHK fueron transfectadas esencialmente tal y como se describe anteriormente (Thim et al. (1988) Biochemistry 27, 7785- 7793; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante [V158D/M298K]-FVII. La variante del factor VII fue purificada de la siguiente manera:

[0161] El medio acondicionado fue cargado sobre una columna de 25 ml de Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech)

después de la adición de EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 0,1% y Tris 10 mM , se ajusta el pH a 8,0 y se ajusta la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada pasando de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 0.1 % , pH 8.0 a Tris 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 25 mM , Tritón X-100 al 0.1%, pH 8.0. Las fracciones que contienen [V158D/M298K]-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna de 25 ml que contiene un anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a sefarosa 4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con Hepes 50 mM , pH 7.5, que contiene CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y Tritón X-100 al 0.02%. Después del lavado con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo NaCl 2 M, el material ligado fue eluido con tampón de equilibrado conteniendo EDTA 10 mM en vez de CaCl₂. Antes del uso o almacenamiento, un exceso de CaCl₂ fue añadido sobre EDTA o [V158D/M298K]-FVII fue transferido a un tampón conteniendo Ca²⁺. El rendimiento de cada paso fue seguido por medidas de ELISA de Factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 6

Preparación de [V158D/E296V/M298Q]-FVII.

[0162] Las células BHK fueron transfectadas esencialmente tal y como se describe anteriormente (Thim et al. (1988) Biochemistry 27, 7785- 7793 ; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante [V158D/E296V/M298Q]- FVII. La variante del Factor VII fue purificada de la siguiente manera:

[0163] El medio acondicionado fue cargado sobre una columna de 25 ml de Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) después de la adición de EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 0,1% y Tris 10 mM, se ajusta el pH a 8,0 y se ajusta la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada pasando de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 0.1 % , pH 8.0 a Tris 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 25 mM , Tritón X-100 al 0.1%, pH 8.0. Las fracciones que contienen [V158D/E296V/M298Q]-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna de 25 ml que contiene un anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a sefarosa 4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con Hepes 50 mM , pH 7.5, que contiene CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y Tritón X-100 al 0.02%. Después del lavado con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo NaCl 2 M, el material ligado fue eluido con tampón de equilibrado conteniendo EDTA 10 mM en vez de CaCl₂. Antes del uso o almacenamiento, un exceso de CaCl₂ fue añadido sobre EDTA o [V158D/E296V/M298Q]-FVII fue transferido a un tampón conteniendo Ca²⁺. El rendimiento de cada paso fue seguido por medidas de ELISA de Factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 7

Preparación de [M298Q]-FVII.

[0164] Las células BHK fueron transfectadas esencialmente tal y como se describe anteriormente (Thim et al. (1988) Biochemistry 27, 7785- 7793 ; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante [M298Q]-FVII. La variante del Factor VII fue purificada de la siguiente manera:

[0165] El medio acondicionado fue cargado sobre una columna de 25 ml de Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) después de la adición de EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 0,1% y Tris 10 mM , se ajusta el pH a 8,0 y se ajusta la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada pasando de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 0.1 % , pH 8.0 a Tris 10 mM , NaCl 50 mM, CaCl₂ 25 mM , Tritón X-100 al 0.1%, pH 8.0. Las fracciones que contienen [M298Q]-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna de 25 ml que contiene un anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a sefarosa 4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con Hepes 50 mM , pH 7.5, que contiene CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y Tritón X-100 al 0.02%. Después del lavado con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo NaCl 2 M, el material ligado fue eluido con tampón de equilibrado conteniendo EDTA 10 mM en vez de CaCl₂. Antes del uso o almacenamiento, un exceso de CaCl₂ fue añadido sobre EDTA o [M298Q]-FVII fue transferido a un tampón conteniendo Ca²⁺. El rendimiento de cada paso fue seguido por medidas de ELISA de Factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 8

Preparación de [S336G]-FVII.

[0166] Las células BHK fueron transfectadas esencialmente tal y como se describe anteriormente (Thim et al. (1988) Biochemistry 27, 7785- 7793 ; Persson and Nielsen (1996) FEBS Lett. 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante [S336G]-FVII. La variante del Factor VII fue purificada de la siguiente manera:

[0167] El medio acondicionado fue cargado sobre una columna de 25 ml de Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) después de la adición de EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 0,1% y Tris 10 mM, se ajusta el pH a 8,0 y se ajusta la conductividad

a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada pasando de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 0.1 % , pH 8.0 a Tris 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 25 mM , Tritón X-100 al 0.1%, pH 8.0. Las fracciones que contienen [S336G]-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna de 25 ml que contiene un anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a sefarosa 4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con Hepes 50 mM , pH 7.5, que contiene CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y Tritón X-100 al 0.02%. Después del lavado con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo NaCl 2 M, el material ligado fue eluido con tampón de equilibrado conteniendo EDTA 10 mM en vez de CaCl₂. Antes del uso o almacenamiento, un exceso de CaCl₂ fue añadido sobre EDTA o [S336G]-FVII fue transferida a un tampón conteniendo Ca²⁺. El rendimiento de cada paso fue seguido por medidas de ELISA de Factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 9

Preparación de [K337A]-FVII.

[0168] Las células BHK fueron modificadas esencialmente tal y como se describe anteriormente (Thim et al. (1988) *Biochemistry* 27, 7785-7793; Persson and Nielsen (1996) *FEBS Lett.* 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante [K337A]-FVII. La variante del Factor VII fue purificada de la siguiente manera:

[0169] El medio acondicionado fue cargado sobre una columna de 25 ml de Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) después de la adición de EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 0,1% y Tris 10 mM , se ajusta el pH a 8,0 y se ajusta la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada pasando de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 0.1 % , pH 8.0 a Tris 10 mM , NaCl 50 mM, CaCl₂ 25 mM , Tritón X-100 al 0.1%, pH 8.0. Las fracciones que contienen [K337A]-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna de 25 ml que contiene un anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a sefarosa 4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con Hepes 50 mM , pH 7.5, que contiene CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y Tritón X-100 al 0.02%. Después del lavado con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo NaCl 2 M, el material ligado fue eluido con tampón de equilibrado conteniendo EDTA 10 mM en vez de CaCl₂. Antes del uso o almacenamiento, un exceso de CaCl₂ fue añadido sobre EDTA o [K337A]-FVII fue transferido a un tampón con contenido de Ca²⁺. El rendimiento de cada paso fue seguido por medidas de ELISA de Factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 10

Preparación de [V158D/E296V/M298Q/K337A]-FVII.

[0170] Las células BHK fueron modificadas esencialmente tal y como se describe anteriormente (Thim et al. (1988) *Biochemistry* 27, 7785- 7793 ; Persson and Nielsen (1996) *FEBS Lett.* 385, 241-243) para obtener la expresión de la variante [V158D/E296V/M298Q/K337A]-FVII. La variante del Factor VII fue purificada de la siguiente manera:

[0171] El medio acondicionado fue cargado sobre una columna de 25 ml de Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) después de la adición de EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 0,1% y Tris 10 mM , se ajusta el pH a 8,0 y se ajusta la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada pasando de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 0.1 % , pH 8.0 a Tris 10 mM , NaCl 50 mM, CaCl₂ 25 mM , Tritón X-100 al 0.1%, pH 8.0. Las fracciones que contienen [V158D/E296V/M298Q/K337A]-FVII fueron agrupadas y aplicadas a una columna de 25 ml que contiene un anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a sefarosa 4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con Hepes 50 mM , pH 7.5, que contiene CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y Tritón X-100 al 0.02%. Después del lavado con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo NaCl 2 M, el material ligado fue eluido con tampón de equilibrado conteniendo EDTA 10 mM en vez de CaCl₂. Antes del uso o almacenamiento, un exceso de CaCl₂ fue añadido sobre EDTA o [V158D/E296V/M298Q/K337A]-FVII fue transferido a un tampón conteniendo Ca²⁺. El rendimiento de cada paso fue seguido por medidas de ELISA de Factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

Ejemplo 11

Ensayo de Hidrólisis *In Vitro*

[0172] El factor VIIa (tipo salvaje) nativo y la variante de factor VIIa (ambos de aquí en adelante denominados como "Factor VIIa") se evalúan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se realiza en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Denmark). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida (S-2288, Chromogenix, Sweden), concentración final 1 mM, se añade al factor VIIa (concentración final 100 nM) en Hepes 50 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 0.1 M, CaCl₂ 5 mM y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La absorbancia a 405 nm se mide en continuo en un Lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, USA). La absorbancia desarrollada durante una incubación de

20 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo de blanco que no contiene enzima, se utiliza para calcular la proporción entre las actividades de variante y factor VIIa de tipo salvaje:

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

5

Ejemplo 12

Ensayo de Proteólisis *In Vitro*

10 [0173] El factor VIIa (tipo salvaje) nativo y variante de factor VIIa (ambos de aquí en adelante denominados como "Factor VIIa") se evalúan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se realiza en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Denmark). El factor VIIa (10 nM) y el factor X (0.8 microM) en 100 microL de Hepes 50 mM, pH 7.4, que contiene NaCl, 0.1 M , CaCl₂ 5 mM y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, se incuban durante 15 min. La escisión del factor X es luego detenida por la adición de 50 microL de Hepes 50 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 0.1 M, EDTA 20 mM y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La cantidad de factor Xa generado se mide por adición de el sustrato cromogénico Z-D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Sweden), concentración final 0.5 mM. La absorbancia a 405 nm se mide en continuo en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, USA). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo de blanco que no contiene FVIIa, se utiliza para calcular la proporción entre las actividades proteolíticas de la variante y el factor VIIa de tipo salvaje:

20

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

Ejemplo 13

25 [0174] Actividades relativas de las variantes de FVIIa medidas en los ensayos descritos en los ejemplos 11 y 12

25

Variante	Proporción en el ejemplo 11	Proporción en el ejemplo 12
K157A	0.9	No determinado
V158T/M298Q-FVIIa	3.8	10
V158D/M298Q-FVIIa	2.0	2.7
V158D/M298K-FVIIa	0.3	No determinado
V158D/E296V/M298Q-FVIIa	7.8	28
M298Q-FVIIa	3.4	5.5
V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIa	11.0	47
S336G-FVIIa	0.6	No determinado
K337A-FVIIa	3.9	4.4
peso-FVIIa	1.0	1.0

Listado de secuencias

[0175]

30

SEC ID NO. 1 (la secuencia de aminoácidos del factor de coagulación humano nativo VII):

ES 2 429 523 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 429 523 T3

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-Lys-Asp-Ser-Cys-Lys-Gly-
 325 330 335 340

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

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

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

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

5 SEC ID NO:2 (cebador de ADN para la preparación de [K157A]-FVII:
 5'-CCG AAT TGT GGG GGG CGC GGT GTG CCC CAA AGG G-3' (SEC ID NO:2)

SEC ID NO:3 (cebador de ADN para la preparación de [K157A]-FVII:
 5'-CCC TTT GGG GCA CAC CGC GCC CCC CAC AAT TCG G-3'(SEC ID NO:3)

10 SEC ID NO:4 (cebador de ADN para la preparación de [V158D]-FVII:
 5'-GTG GGG GGC AAG GAC TGC CCC AAA GGG G-3' (SEC ID NO:4)

SEC ID NO:5 (cebador de ADN para la preparación de [V158D]-FVII:
 5'-CCC CTT TGG GGC AGT CCT TGC CCC CCA C-3' (SEC ID NO:5)

15 SEC ID NO:6 (cebador de ADN para la preparación de [V158T]-FVII:
 5'-GTG GGG GGC AAG ACG TGC CCC AAA GGG G-3' (SEC ID NO:6)

20 SEC ID NO:7 (cebador de ADN para la preparación de [V158T]-FVII:
 5'-CCC CTT TGG GGC ACG TCT TGC CCC CCA C-3' (SEC ID NO:7)

SEC ID NO:8 (cebador de ADN para la preparación de [E296V/M298Q]-FVII:
 5'-GCC ACG GCC CTG GTG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3' (SEC ID NO:8)

25 SEC ID NO:9 (cebador de ADN para la preparación de [E296V/M298Q]-FVII:
 5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CAC CAG GGC CGT GGC-3' (SEC ID NO:9)

SEC ID NO:10 (cebador de ADN para la preparación de [M298Q]-FVII:
 5'-GCC CTG GAG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3'(SEC ID NO:10)

30 SEC ID NO:11 (cebador de ADN para la preparación de [M298Q]-FVII:
 5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CTC CAG GGC-3' (SEC ID NO:11)

ES 2 429 523 T3

SEC ID NO:12 (cebador de ADN para la preparación de [M298K]-FVII:
5'-GCC CTG GAG CTC AAG GTC CTC AAC GTG-3' (SEC ID NO:12)

5 SEC ID NO:13 (cebador de ADN para la preparación de [M298K]-FVII:
5'-CAC CTT GAG GAC CTT GAG CTC CAG GGC-3' (SEC ID NO:13)

SEC ID NO:14 (cebador de ADN para la preparación de [S336G]-FVII:
5'-GGC TAC TCG GAT GGC GGC AAG GAC TCC TGC AAG-3' (SEC ID NO:14)

10 SEC ID NO:15 (cebador de ADN para la preparación de [S336G]-FVII:
5'-CTT GCA GGA GTC CTT GCC GCC ATC CGA GTA GCC-3' (SEC ID NO:15)

SEC ID NO:16 (cebador de ADN para la preparación de [K337A]-FVII:
5'-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3' (SEC ID NO:16)

15 SEC ID NO:17 (cebador de ADN para la preparación de [K337A]-FVII:
5'-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3' (SEC ID NO:17)

Listado de secuencias

20 [0176]

<110> Novo Nordisk A/S

25 <120> VARIANTES DEL FACTOR VII DE COAGULACIÓN HUMANA

<130> 6224.215-EP

<140> PCT/DK01/00596<141> 2001-09-13

30 <160> 17

<170> PatentIn version 3.3

35 <210> 1
<211> 406
<212> PRT
<213> Factor VII de coagulación humana
<220>

40 <221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(406)
<223> Xaa significa ácido 4-carboxiglutámico (gamma-carboxiglutamato)

<400> 1

ES 2 429 523 T3

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

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

Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110

Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125

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

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

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

Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190

His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205

Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220

Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240

His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 2
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador de ADN para la preparación de [K157A]-FVII

 <400> 2
 10 ccgaattgtg gggggcgcgg tgtgcccaa aggg 34

 <210> 3
 <211> 34
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de ADN para la preparación de [K157A]-FVII

 <400> 3
 20 cccttgggg cacaccgcg cccccacaat tcgg 34

 <210> 4
 <211> 28
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de ADN para preparación de [v158D]-FVII
 30
 <400> 4
 gtggggggca aggactgccc caaagggg 28

 <210> 5
 <211> 28
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> Cebador de ADN para preparación de [v158D]-FVII

 <400> 5
 ccccttggg gcagtcctg ccccccac 28

 <210> 6
 <211> 28
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> Cebador de ADN para la preparación de [V158T]-FVII

 <400> 6
 55 gtggggggca agacgtgccc caaagggg 28

 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>

<223> Cebador de ADN para la preparación de [V158T]-FVII

<400> 7
ccccttggg gcacgtctg ccccccac 28

5
<210> 8
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

10
<220>
<223> Cebador de ADN para la preparación de [E296V/M298Q]-FVII

<400> 8
15 gccacggccc tggctcca ggtctcaac gtgccc 36

<210> 9
<211> 36
<212> ADN
20 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador de ADN para la preparación de [E296V/M298Q]-FVII

25 <400> 9
gggcacgttg aggacctga gcaccagggc cgtggc 36

<210> 10
<211> 30
30 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de ADN para la preparación de [M298Q]-FVII

35 <400> 10
gccctggagc tccagtcct caacgtgccc 30

<210> 11
40 <211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
45 <223> Cebador de ADN para la preparación de [M298Q]-FVII

<400> 11
gggcacgttg aggacctga gctccagggc 30

50 <210> 12
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> Cebador de ADN para la preparación de [M298K]-FVII

<400> 12
60 gccctggagc tcaagtcct caacgtg 27

<210> 13

<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Cebador de ADN para la preparación de [M298K]-FVII

<400> 13
caccttgagg accttgagct ccagggc 27

10 <210> 14
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador de ADN para preparación de [S336G]-FVII

<400> 14
20 ggctactcgg atggcggcaa ggactcctgc aag 33

<210> 15
<211> 33
<212> ADN
25 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador de ADN para la preparación de [S336G]-FVII

30 <400> 15
cttgaggag tccttgccgc catccgagta gcc 33

<210> 16
<211> 28
35 <212> ADN
<213> Artificial

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

40 <400> 16
cggatggcag cgcgactcc tgcaaggg 28

<210> 17
45 <211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
50 <223> Cebador de ADN para la preparación de [K337A]-FVII

<400> 17
cccttgagg agtccgcgct gccatccg 28

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante del polipéptido del factor VII de SEC ID nº: 1 comprendiendo una sustitución de la Met en la posición 298 con Arg, Gln o Asn.
2. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 1, donde la Val en la posición 158 se sustituye con un aminoácido diferente.
- 10 3. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 2, donde dicha Val en la posición 158 se sustituye con Ser, Thr, Asn, Gln o Glu; o donde la Met en la posición 298 se sustituye con Arg o Asn y la Val en la posición 158 se sustituye con Asp.
4. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, donde el Glu en la posición 296 se sustituye con un aminoácido diferente.
- 15 5. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 4, donde dicho Glu en la posición 296 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Lys y Val.
6. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la Lys en la posición 337 se sustituye con un aminoácido diferente.
- 20 7. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 6, donde dicha Lys en la posición 337 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Val, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp y Glu.
- 25 8. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde al menos un aminoácido en las posiciones restantes en el dominio de proteasa se sustituye por un aminoácido diferente.
9. Polipéptido del factor VII según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es V158D/E296V/M298Q-FVIIa.
- 30 10. Constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del factor VII tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos definido en la reivindicación 10.
- 35 12. Animal transgénico no humano que contiene y expresa el constructo de ácidos nucleicos definido en la reivindicación 10.
13. Método para producir el polipéptido del factor VII definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, dicho método comprendiendo el cultivo de una célula, tal y como se define en la reivindicación 11, en un medio de crecimiento apropiado, bajo condiciones que permiten la expresión del constructo de ácidos nucleicos y la recuperación del polipéptido resultante del medio de cultivo.
- 40 14. Composición farmacéutica que comprende una variante del polipéptido del factor VII tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 15. Polipéptido del factor VII definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para el uso en el tratamiento de episodios hemorrágicos o para uso en la mejora del sistema hemostático normal.

FIGURA 1. La secuencia de aminoácidos para el factor VII de coagulación humano y nativo

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

GLA-GLA-Gln-Cys-Ser-Phe-GLA-GLA-Ala-Arg-GLA-Ile-Phe-Lys-Asp-Ala-GLA-A
 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

ES 2 429 523 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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