

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 967**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2002 E 02717998 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 1373493**

54 Título: **Derivados del Factor VII de coagulación**

30 Prioridad:

**22.03.2001 DK 200100477**

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

**05.12.2013**

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 2 432 967 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

Derivados del Factor VII de coagulación

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a nuevos derivados del Factor VII de coagulación humana, polipéptidos del Factor VII, así como a constructos de polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, vectores y células huésped que comprenden y que expresan el polinucleótido, composiciones farmacéuticas que comprenden derivados del Factor VII, usos y métodos de tratamiento.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] La coagulación de la sangre es un proceso que consiste en una interacción compleja de varios componentes (o factores) sanguíneos que eventualmente originan un coágulo de fibrina. Generalmente, los componentes sanguíneos que participan en lo que se ha 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 sido sometidos a tal conversión se conocen generalmente como "factores activos", y son designados por la adición de la letra "a" al nombre del factor de coagulación (p. ej., Factor VIIa).

[0003] La iniciación del proceso hemostático es mediada por la formación de un complejo entre el factor tisular, expuesto como resultado de una herida en la pared del vaso, y el Factor VIIa. Entonces, este complejo convierte los Factores IX y X a sus formas activas. El Factor Xa convierte cantidades limitadas de protrombina a trombina en la célula portadora del factor tisular. La trombina activa las plaquetas y los Factores V y VIII convirtiéndolos en Factores Va y VIIIa, ambos cofactores en el proceso adicional que conduce al estallido completo de la trombina. Este proceso incluye la generación del Factor Xa por el Factor IXa (en complejo con el Factor VIIIa) y ocurre en la superficie de plaquetas activadas. La trombina convierte finalmente el fibrinógeno a fibrina dando como resultado la formación de un coágulo de fibrina.

[0004] El Factor VII es un rastreo de glicoproteína de plasma que circula en la sangre como un zimógeno monocatenario. El zimógeno es catalíticamente inactivo. El Factor VII monocatenario se puede convertir a Factor VIIa bicatenario mediante 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. La conversión del Factor VII zimógeno en la molécula activada bicatenaria ocurre por escisión de un enlace peptídico Arg<sub>152</sub>-Ile<sub>153</sub> interno.

[0005] Con frecuencia es conveniente estimular o bloquear selectivamente 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 del factor de coagulación (p. ej., hemofilia A y B o deficiencia de Factores XI o VII de coagulación) o inhibidores del factor de coagulación. El Factor VIIa también ha sido usado para controlar un sangrado excesivo en sujetos con una cascada de coagulación sanguínea que funciona normalmente (sin deficiencias o inhibidores del factor de coagulación contra cualquiera de los factores de coagulación). Dicho sangrado puede, por ejemplo, ser provocado por una función defectuosa de las plaquetas, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. El sangrado también es un problema principal junto con la cirugía y otras formas de daño tisular.

[0006] La Patente Europea n.º 200, 421 (ZymoGenetics) se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor VII humano y la expresión recombinante del Factor VII en células de mamífero.

[0007] Dickinson et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 93,14379-14384, 1996) se refiere a polipéptidos del Factor VII donde Lys157, Val158, Glu296, Met298, Asp334, Ser336 o Lys337 han sido individualmente sustituidos por Ala. Iwanaga et al. (Thromb. Haemost. (suplemento de agosto 1999), 466, resumen 1474) se refiere a variantes del Factor VIIa donde los residuos 316-320 son eliminados o los residuos 311-322 son sustituidos por los residuos correspondientes de tripsina.

[0008] Los anticoagulantes tales como heparina, cumarina, derivados de cumarina, derivados de indandiona u otros agentes se pueden utilizar para bloquear selectivamente la cascada de coagulación en un paciente, por ejemplo, durante la diálisis de riñón, o para tratar la trombosis venosa profunda, coagulación intravascular diseminada (DIC, por sus siglas en inglés), y un huésped de otros trastornos médicos. Por ejemplo, el tratamiento de heparina o tratamiento extracorpóreo con ión citrato (Pat. EE. UU n.º 4,500,309) se puede utilizar en la diálisis para prevenir la coagulación durante el curso del tratamiento. La heparina se utiliza también en la prevención de la trombosis venosa profunda en pacientes sometidos a cirugía.

[0009] No obstante, el tratamiento con heparina y otros anticoagulantes puede tener efectos secundarios indeseables. Generalmente, los anticoagulantes disponibles actúan en todo el cuerpo, actuando preferentemente en un sitio del coágulo en concreto. La heparina, por ejemplo, puede causar un sangrado abundante. Además, con una vida media de aproximadamente 80 minutos, la heparina se depura rápidamente de la sangre, necesitando una administración

- frecuente. Ya que la heparina actúa como un cofactor para la antitrombina III (AT III), y la AT III disminuye rápidamente en el tratamiento DIC, con frecuencia es difícil mantener la dosis de heparina apropiada, precisando un control continuo de la AT III y los niveles de heparina. La heparina no produce ningún efecto si la disminución de AT III es extrema. Además, el uso prolongado de la heparina también puede aumentar la agregación plaquetaria y reducir el conteo de plaquetas, y se ha visto implicado en el desarrollo de la osteoporosis. Los derivados de indandiona también puede tener efectos secundarios tóxicos.
- [0010] Además de los anticoagulantes brevemente descritos más arriba, se ha descubierto que diferentes proteínas de origen natural tienen actividad anticoagulante. Por ejemplo, Reutelingsperger (Pat. EE. UU. n.º 4,736,018) aisló proteínas anticoagulantes de la arteria aorta bovina y de las arterias y vena umbilical. Maki et al. (Pat. EE. UU. n.º 4,732,891) describen proteínas anticoagulantes derivadas de placenta humana. Además, se ha propuesto la AT III como un anticoagulante terapéutico (Schipper et al., Lancet 1 (8069): 854-856 (1978); Jordan, Pat. EE. UU. n.º 4,386,025; Bock et al., Pat. EE. UU. n.º 4,517,294).
- [0011] En aproximadamente el 30% o más de pacientes tratados por angioplastia, endarterectomía o injertos de bypass, trombosis y/o proliferación de células musculares lisas en la íntima, causa reoclusión de los vasos y consecuente fallo de la cirugía reconstructiva. Este cierre de los vasos después de la cirugía es conocido como restenosis. Se cree que la restenosis se origina a partir de una interacción compleja de procesos biológicos que incluyen deposición de plaquetas y formación de trombos, liberación de factores mitogénicos y quimiotácticos, y la migración y proliferación de células del músculo liso vascular en la íntima del segmento arterial dilatado.
- [0012] La inhibición de la acumulación de plaquetas en sitios de la herida mecánica pueden limitar el índice de restenosis en sujetos humanos. Mientras la acumulación de plaquetas ocurre en sitios de heridas vasculares agudas, la generación de trombina en estos sitios puede ser responsable para la activación de las plaquetas y su posterior acumulación.
- [0013] La Solicitud Internacional n.º WO 92/15686 se refiere al Factor VIIa inactivado, ácido polinucleico y líneas celulares de mamífero para la producción del Factor VIIIa inactivado, y a composiciones que comprenden el Factor VIIa inactivado para inhibir la coagulación de la sangre.
- [0014] La Solicitud Internacional n.º WO 94/27631 se refiere a métodos para inhibir la restenosis vascular, la actividad del factor tisular y la deposición de plaquetas.
- [0015] La Solicitud Internacional n.º WO 96/12800 se refiere a un método para el tratamiento de cierre agudo de una arteria coronaria que comprende al individuo, una composición que comprende el Factor VIIa inactivado junto con un activador tisular plasminógeno o estreptoquinasa.
- [0016] La mayoría de las proteínas introducidas en la circulación son depuradas rápidamente del sujeto mamífero por los riñones. Este problema puede ser parcialmente superado mediante la administración de una mayor cantidad de la proteína o mediante la administración reiterada. No obstante, unas dosis más altas de la proteína pueden producir anticuerpos que pueden enlazar e inactivar la proteína y/o facilitar la depuración de la proteína del cuerpo del sujeto. La administración reiterada de la proteína terapéutica no es esencialmente efectiva y puede ser peligrosa puesto que puede provocar una respuesta alérgica.
- [0017] Algunos intentos de resolver los problemas asociados a terapias de proteínas incluyen la microencapsulación, sistemas de administración de liposomas, administración de proteínas de fusión y modificación química. El más prometedor de ellos ha sido hasta la fecha la modificación de la proteína terapéutica mediante el enlace covalente de polímeros de óxido de polialquileno, particularmente polietilenglicoles (PEG). Por ejemplo, la Pat. EE. UU. n.º 4,179,337 describe el uso de PEG o polipropilenglicol acoplado a proteínas para proporcionar una composición de polipéptido soluble en agua no inmunogénico fisiológicamente activa. Nucci et al. describen diferentes proteínas que han sido modificadas por adición de PEG incluyendo adenosina deamidasa, L-asparaginasa, interferón alfa 2b (IFN- $\alpha$ 2b), superóxido de dismutasa, estreptoquinasa, activador tisular plasminógeno (tPA), uroquinasa, uricasa, hemoglobina, interleucinas, interferones, TGF-beta, EGF y otros factores de crecimiento (Nucci et al., 1991, Adv. Drug Delivery Rev. 4:133-151). Algunos de estos intentos han dado como resultado una vida media más larga de las proteínas y la reducción de la inmunogenicidad de la proteína.
- [0018] Típicamente, la PEGilación de proteínas implica activar el PEG con un grupo funcional que reaccionará con residuos de lisina en la superficie de la proteína. Si se lleva a cabo la modificación de la proteína, normalmente se pierde la actividad de la proteína. Los procedimientos de modificación que permiten la PEGilación parcial de la proteína normalmente resultan sólo aproximadamente el 50% de pérdida de la actividad y la vida media del suero aumentada inmensamente, de modo que la dosis efectiva total de la proteína es inferior.
- [0019] Los desarrollos recientes en los métodos de PEGilación de proteína emplean reactivos PEG activados que reaccionan con grupos tiol de la proteína, dando como resultado la unión covalente de PEG a una cisteína, cuyo residuo fue insertado en el lugar de una lisina de origen natural de la proteína. Shaw et al. (Pat. EE. UU. n.º 5,166,322) describen variantes específicas de IL-3 que tienen una cisteína introducida en sitios específicos en la secuencia de

aminoácidos de origen natural. Los compuestos reactivos de sulfhidrido (p. ej., polietilenglicol activado) se fijan a continuación a estas cisteínas por reacción con la variante de IL-3. Katre et al. (Pat. EE. UU. n.º 5,206,344) describen variantes específicas de IL-2 que contienen una cisteína introducida en un sitio específico en la secuencia de aminoácidos de origen natural. La variante IL-2 reacciona posteriormente con un reactivo de polietilenglicol activado para unir esta fracción a una cisteína.

[0020] Sigue existiendo una necesidad en la técnica de polipéptidos del Factor VII mejorados con actividad anticoagulante o procoagulante prolongada. En particular, existe una necesidad de polipéptidos del Factor VII que ha aumentado la vida media del suero sin los efectos secundarios indeseables tales como la activación sistémica del sistema de coagulación y sangrado, respectivamente, asociado a terapias convencionales, y que se pueden administrar a dosis relativamente bajas de modo que se evitan las administraciones reiteradas de una cantidad más grande de la proteína.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0021] La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos del Factor VII de coagulación con la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa de tipo salvaje y con derivados del Factor VII con el aumento de la vida media del suero.

[0022] Las áreas en la molécula del Factor VIIa han sido identificadas donde se permiten los cambios en la estructura primaria al igual que otras modificaciones sin influir o reducir la actividad biológica del Factor VIIa. Las áreas en la estructura del Factor VIIa que han sido identificadas para no ser implicadas en la unión con el factor tisular o el Factor X, incluyen las posiciones de aminoácido desde 247-260 y desde 393-406 de la SEC ID n.º: 1. Específicamente los aminoácidos en las posiciones Q250, R396 y P406 de la secuencia SEC ID n.º: 1 han sido analizados para la introducción de residuos de cisteína (Cys). La introducción de residuos Cys va seguida de la conjugación con un grupo químico, por ejemplo polietilenglicol (PEG), para aumentar la vida media en la circulación del derivado del Factor VII. Una cisteína también ha sido introducida en la secuencia C-terminal de SEC ID n.º: 1 (referida como 407C), que va seguida de la conjugación de PEG. De modo que esta adición de una cisteína en la secuencia C-terminal de la SEC ID n.º: 1 se da sin reducción en la actividad proteolítica de polipéptidos del Factor VIIa. Estos derivados del Factor VII, por ejemplo, un polipéptido del Factor VII conjugado con una molécula de PEG, son útiles de forma terapéutica en situaciones donde se desea un efecto prolongado de los polipéptidos del Factor VII, por ejemplo en situaciones donde la administración reiterada o la administración de una cantidad más grande del polipéptido del Factor VII es inconveniente o problemática. Además, los polipéptidos del Factor VIIa de la presente invención con aminoácidos introducidos (p. ej., un residuo Cys) capaces de ser conjugados con un grupo químico en posiciones en la molécula del Factor VIIa, que no influyen en la actividad proteolítica, se pueden utilizar para introducir cualquier grupo funcional de un conjugado del Factor VII.

[0023] En un aspecto, se describe un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico ha sido insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje. Debe entenderse que el aminoácido se puede insertar en la secuencia SEC ID n.º: 1, sin sustituir a ningún aminoácido. La inserción de un aminoácido puede estar en la misma posición en la secuencia SEC ID n.º: 1, donde un aminoácido es posteriormente sustituido. De este modo, en una forma de realización, la inserción de aminoácidos es seguida de una sustitución de aminoácidos o viceversa.

[0024] En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado en un grupo químico ha sido añadido al C-terminal de la SEC ID n.º: 1.

[0025] El término "un aminoácido" como se utiliza en este caso significa uno o más aminoácidos. Debe entenderse que el aminoácido que reemplaza el aminoácido o que se inserta o se añade al polipéptido del Factor VII es capaz de ser conjugado con cualquier grupo químico que aumentará el peso molecular real del polipéptido del Factor VII. Esta conjugación con el grupo químico incluye pero de forma no limitativa la unión covalente de polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol, dextrano, de poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de propileno/óxido de etileno, polipropilenglicol, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol) y alcohol polivinílico, ácidos colomínicos u otros polímeros basados en carbohidratos, polímeros de aminoácidos y derivados de biotina.

[0026] Preferiblemente el grupo químico es un polímero hidrosoluble, biocompatible, no tóxico y no inmunogénico. Preferiblemente el grupo químico es hidrosoluble en todas las proporciones.

[0027] Esta sustitución, inserción o adición de aminoácidos, y conjugación con un grupo químico se compara, sin reducción sustancial de actividad procoagulante de la forma activada del derivado del Factor VII, con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

[0028] El término "polipéptido del Factor VII" como se utiliza en este caso significa cualquier proteína que comprende la secuencia de aminoácidos 1-406 del Factor VII humano nativo (SEC ID n.º: 1) o variantes de las mismas. Este incluye pero de forma no limitativa el Factor VII humano, el Factor VIIa humano y las variantes de los mismos.

[0029] Los términos "Factor VII" o "FVII" como se utilizan en este caso significa un producto que consiste en la forma inactivada (Factor VII). El término "Factor VIIa" o "FVIIa" como se utiliza en este caso significa un producto que consiste en la forma activada (Factor VIIa). Este incluye proteínas que poseen 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 que incluye deleciones o adiciones de aminoácidos N-terminal mientras aquellas proteínas retienen sustancialmente la actividad del Factor VIIa. El "Factor VII" o "Factor VIIa" en la definición anterior también incluyen variaciones alélicas naturales que pueden existir y tienen lugar de un individuo a otro. También, el grado y ubicación de la glicosilación u otras modificaciones postraduccionales pueden variar dependiendo de las células huésped elegidas y la naturaleza del entorno celular huésped.

[0030] Los términos "variante" o "variantes", como se utilizan en este caso, se destinan a designar el Factor VII humano con la secuencia SEC ID n.º: 1, donde uno o más aminoácidos de la proteína original han sido sustituidos por otro aminoácido y/o donde uno o más aminoácidos de la proteína original 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 original. Dicha adición puede tener lugar bien en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la proteína original o a ambos.

[0031] El término "sustancialmente la misma actividad o actividad incrementada comparada con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje", como se utiliza en este caso, significa una actividad de más del 70% de la actividad del Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje. En una forma de realización, la actividad supone más del 80% de la actividad del Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje. En otra forma de realización la actividad supone más del 90% de la actividad del Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje. En otra forma de realización la actividad supone más del 100% de la actividad del Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje. En otra forma de realización la actividad supone más del 120% de la actividad del Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje. En otra forma de realización la actividad supone más del 200% de la actividad del Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje. En otra forma de realización la actividad supone más del 400% de la actividad del Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

[0032] El término "derivado del Factor VII", como se utiliza en este caso, se destina a designar un polipéptido del Factor VII con la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, en la que unos o varios aminoácidos del péptido original han sido químicamente modificados, por ejemplo, por alquilación, PEGilación, acilación, formación de éster o formación de amidas o similares. Esto incluye, pero no se limita al Factor VIIa humano PEGilado, al Factor VIIa humano de cisteína PEGilado y a variantes de los mismos.

[0033] El término "Factor VIIa humano PEGilado", significa Factor VIIa con una molécula de PEG conjugada con un aminoácido del polipéptido del Factor VIIa humano.

[0034] El término "Factor VIIa humano de cisteína PEGilada" significa Factor VIIa con una molécula de PEG conjugada con un grupo sulfhidrilo de una cisteína introducida en el Factor VIIa humano.

[0035] El término "un aminoácido diferente" como se utiliza en este caso significa uno o más aminoácidos diferentes de este aminoácido presente naturalmente en esa posición. Esto incluye pero no se limita a aminoácidos que pueden ser codificados por un polinucleótido. Preferiblemente, el aminoácido diferente se encuentra en forma de L natural y puede ser codificado por un polinucleótido. Un ejemplo específico es L-cisteína (Cys).

[0036] El término "actividad" como se utiliza en este caso significa la capacidad de un polipéptido del Factor VII de convertir su sustrato de Factor X al Factor Xa activo. La actividad de un polipéptido del Factor VII se puede medir con el "Ensayo de Proteólisis *In Vitro*" (véase el ejemplo 6).

[0037] El término "polietilenglicol" o "PEG" significa un compuesto de polietilenglicol o un derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento, fracciones de acoplamiento o activación (p. ej., con tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, o preferiblemente con una fracción de maleimida). Compuestos tales como maleimida monometoxi PEG son ilustrativos de compuestos de PEG activado de la invención.

[0038] El término "un grupo químico" como se utiliza en este caso significa uno o más grupos químicos.

[0039] En otro aspecto, se describe un derivado del Factor VII que comprende un polipéptido del Factor VII con la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido se ha insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma y donde el aminoácido se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons y donde el derivado del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en

comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

[0040] La invención se refiere a un derivado del Factor VII que comprende un polipéptido del Factor VII con la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde el polipéptido del Factor VII tiene la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje donde un aminoácido ha sido añadido al C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o de la variante de la misma y donde el aminoácido se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons y donde el derivado del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

[0041] En otro aspecto, se describe una composición que comprende un derivado del Factor VII que comprende un polipéptido del Factor VII con la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido ha sido insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma y donde el aminoácido se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons y donde el derivado del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

[0042] La invención se refiere a una composición que comprende un derivado del Factor VII que comprende un polipéptido del Factor VII con la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde el polipéptido del Factor VII tiene la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje donde un aminoácido ha sido añadido al C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o de la variante de la misma y donde el aminoácido se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons y donde el derivado del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

[0043] En otro aspecto, se describe una composición farmacéutica que comprende un derivado del Factor VII que comprende un polipéptido del Factor VII con la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido ha sido insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma y donde el aminoácido se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons y donde el derivado del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje; y opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

[0044] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un derivado del Factor VII que comprende un polipéptido del Factor VII con la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido ha sido añadido al C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma y donde el aminoácido se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons y donde el derivado del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje; y opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

[0045] En otro aspecto, se describe un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico ha sido insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

[0046] En otro aspecto, la invención se refiere a un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha añadido al C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma.

[0047] En una forma de realización, el constructo polinucleótido es un vector.

[0048] El término "un polinucleótido" denota un polímero monocatenario o bicatenario de base desoxirribonucleótida o ribonucleótida leído del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar de fuentes naturales, sintetizarse in vitro u obtenerse a partir de una combinación de moléculas sintéticas y naturales. La longitud de una molécula polinucleótida se da aquí en términos de nucleótidos (abreviado como "nt") o pares de bases (abreviado como "pb"). El término "nucleótidos" se usa para ambas moléculas monocatenarias y bicatenarias donde el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias se usa para indicar la longitud total y se entenderá como equivalente al término "pares de bases". Los expertos en la técnica reconocerán que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en la longitud y que sus extremidades se pueden empalmar como resultado de una escisión enzimática; de este modo, todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido bicatenario pueden no ser pares. Dichas extremidades impares no exceden generalmente de 20 nt en la longitud.

[0049] El término "vector", como se utiliza en este caso, significa cualquier entidad de ácido nucleico capaz de la amplificación en una célula huésped. De este modo, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado. La elección de vector dependerá frecuentemente de la célula huésped en la que debe introducirse. Los vectores incluyen, pero de forma no limitativa vectores plásmidos, vectores fágicos, virus o vectores cósmidos. Los vectores contienen normalmente un origen de replicación y al menos un gen seleccionable, es decir, un gen que codifica un producto que es fácilmente detectable o cuya presencia es esencial para el crecimiento celular.

[0050] En otro aspecto, se describe una célula huésped eucariótica que comprende un constructo polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

[0051] En otro aspecto, se describe una célula huésped eucariótica que comprende un constructo polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma.

[0052] El término "una célula huésped eucariótica", como se utiliza en este caso, representa cualquier célula, incluyendo células híbridas, en las que se puede expresar ADN heterólogo. Las células huésped típicas incluyen, pero no se limitan a células de insectos, células de levadura, células mamíferas, incluyendo células humanas, tales como células BHK, CHO, HEK, y COS. En la práctica de la presente invención, las células huésped que son cultivadas son preferiblemente células mamíferas, más preferiblemente una línea celular de mamífero establecida, incluyendo sin limitación, líneas celulares CHO (p. ej., ATCC CCL 61), COS-1 (p. ej., ATCC CRL 1650), riñón de cría de hámster (BHK) y HEK293 (p. ej., ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977).

[0053] Una línea celular BHK preferida es la tk- ts13 BHK (Waechter y Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 79: 1106-1110, 1982), de ahora en adelante referidas como células BHK 570. La línea celular BHK 570 está disponible en American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, con el número de acceso ATCC CRL 10314. Una línea celular tk<sup>-</sup> ts13 BHK está disponible también con el número de acceso ATCC CRL 1632.

[0054] Otras líneas celulares adecuadas incluyen, sin limitarse a ellas, células Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9,1) y DUKX (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 77:4216-4220, 1980). También son útiles las células 3T3, las células Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células. En una forma de realización, la célula huésped eucariótica es de origen mamífero. En otra forma de realización, la célula huésped eucariótica se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células BHK o células HEK.

[0055] En otro aspecto, se describe un animal transgénico que expresa el constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

[0056] En otro aspecto, se describe un animal transgénico que expresa el constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma.

[0057] En otro aspecto, se describe una expresión de planta transgénica el constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

[0058] En otro aspecto, se describe una planta transgénica que expresa el constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma.

[0059] En otro aspecto, se describe un método para producir un polipéptido del Factor VII, el método comprende el cultivo en un medio de crecimiento apropiado de una célula huésped eucariótica que comprende el constructo

5 polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje bajo condiciones que permiten la síntesis de proteína del constructo polinucleótido y la recuperación del polipéptido del Factor VII del medio de cultivo.

10 [0060] En otro aspecto, se describe un método para producir un polipéptido del Factor VII, el método que comprende el cultivo en un medio de crecimiento apropiado de una célula huésped eucariótica que comprende el constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma bajo condiciones que permiten la síntesis de proteína del constructo polinucleótido y la recuperación del polipéptido del Factor VII del medio de cultivo.

15 [0061] En otro aspecto, se describe un método para producir un polipéptido del Factor VII, el método comprende la recuperación del polipéptido del Factor VII de la leche producido por un animal transgénico que expresa un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico ha sido insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VII recombinante humano de tipo salvaje.

20 [0062] En otro aspecto, un método para producir un polipéptido de Factor VII, el método comprende la recuperación del polipéptido de Factor VII de la leche producido por un animal transgénico que expresa un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido de Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma.

25 [0063] En otro aspecto, se describe un método para producir un polipéptido del Factor VII, el método que comprende el cultivo de una célula de una planta transgénica que expresa un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje y la recuperación del polipéptido del Factor VII de la planta transgénica.

30 [0064] En otro aspecto, se describe un método para producir un polipéptido del Factor VII, el método comprende el cultivo de una célula de una planta transgénica que expresa un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma y la recuperación del polipéptido del Factor VII de la planta transgénica.

35 [0065] En otro aspecto, se describe un método para producir un derivado del Factor VII que incluye las etapas de:  
 40 a) producción de un polipéptido del Factor VII;  
 b) conjugación del polipéptido del Factor VII con un grupo químico;  
 c) aplicación del derivado del Factor VII a una cromatografía de intercambio de cationes o columna de filtración en gel; y  
 45 d) elución del derivado del Factor VII.

50 [0066] En otra forma de realización del método para la producción del polipéptido del Factor VII comprende el cultivo en un medio de crecimiento apropiado de una célula huésped eucariótica que comprende el constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico ha sido insertado en la secuencia de SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma a una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje bajo condiciones que permiten la síntesis de proteína del constructo polinucleótido y la recuperación del polipéptido del Factor VII del medio de cultivo.

55 [0067] En otra forma de realización, el método para la producción del polipéptido del Factor VII comprende el cultivo en un medio de crecimiento apropiado de una célula huésped eucariótica que comprende el constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma bajo condiciones que permiten la síntesis de proteína del constructo polinucleótido y la recuperación del polipéptido del Factor VII del medio de cultivo.

5 [0068] En otra forma de realización, los métodos para producir el polipéptido del Factor VII comprenden la recuperación del polipéptido del Factor VII de la leche producido por un animal transgénico que expresa un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

10 [0069] En otra forma de realización, el método para la producción del polipéptido del Factor VII comprende la recuperación del polipéptido del Factor VII de la leche producido por un animal transgénico que expresa un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma.

15 [0070] En otra forma de realización, el método para la producción del polipéptido del Factor VII comprende el cultivo de una célula de una planta transgénica que expresa un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico ha sido insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje, y la recuperación del polipéptido del Factor VII de la planta transgénica.

20 [0071] En otra forma de realización, el método para la producción del polipéptido del Factor VII comprende el cultivo de una célula de una planta transgénica que expresa un constructo polinucleótido que codifica un polipéptido del Factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, y la recuperación del polipéptido del Factor VII de la planta transgénica.

25 [0072] El término "tratamiento", como se utiliza en este caso, significa la administración de una cantidad eficaz de un compuesto terapéuticamente activo de la invención con el propósito de evitar cualquier síntoma o desarrollar enfermedades o con el propósito de curar o aliviar tales síntomas o estados de enfermedad ya desarrollada. Se pretende que el término "tratamiento" aquí incluya tratamiento profiláctico.

[0073] El término "mejora del sistema hemostático normal" significa una mejora de la capacidad para generar trombina.

30 [0074] Tal y como se utiliza en este caso el término "trastorno hemorrágico" refleja cualquier falta, congénita, adquirida o inducida, de origen celular o molecular manifestada en los sangrados. Algunos ejemplos son deficiencias del factor de coagulación (p. ej., hemofilia A y B o deficiencia de los Factores de coagulación XI o VIII), inhibidores del factor de coagulación, función defectuosa de las plaquetas, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand.

35 [0075] El término "episodios hemorrágicos" incluye un sangrado descontrolado y excesivo que es el principal problema relacionado con la cirugía y con otras formas de daño tisular. Un sangrado descontrolado y excesivo puede ocurrir en sujetos con un sistema de coagulación normal y en sujetos con trastornos de coagulación o de sangrado. Las deficiencias del factor de coagulación (hemofilia A y B, deficiencia de factores de coagulación XI o VII) o inhibidores del factor de coagulación pueden ser la causa de trastornos hemorrágicos. Los sangrados excesivos también ocurren en sujetos con una cascada de coagulación sanguínea que funcione normalmente (sin deficiencias del factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación) y pueden ser provocados por una función defectuosa de las plaquetas, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. En tales casos, los sangrados pueden ser parecidos a los sangrados provocados por la hemofilia porque el sistema hemoestático, como en la hemofilia, carece o tiene "compuestos" de coagulación esencial anormal (tales como plaquetas o proteína del Factor von Willebrand) que causan sangrados más importantes. En sujetos que experimentan daños tisulares extensivos asociados a la cirugía o un traumatismo grande, el mecanismo hemoestático normal puede verse desbordado por la demanda inmediata de hemostasis y puede desarrollar el sangrado a pesar de poseer un mecanismo hemoestático normal. El hecho de conseguir una hemostasis satisfactoria también es un problema cuando los sangrados ocurren en órganos como el cerebro, la región interna del oído y los ojos con limitada posibilidad 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 la hemostasis mediante técnicas quirúrgicas (sutura, clips, etc.) que también es el caso cuando el sangrado está difundido (gastritis hemorrágica y sangrado uterino profuso). Los sangrados agudos y profusos pueden también ocurrir en sujetos bajo terapia anticoagulante en los que se haya inducido una hemostasis defectuosa por la terapia dada. Estos sujetos pueden precisar intervenciones quirúrgicas en caso de que el efecto anticoagulante tenga que ser contrarrestado rápidamente. La prostatectomía retropúbica radical es un procedimiento realizado de forma común en sujetos con cáncer de próstata localizado. La operación es frecuentemente complicada por una 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 resultar en un sangrado de una área grande. Otra situación que puede causar problemas en el caso de una hemostasis no satisfactoria es cuando se da una terapia anticoagulante a los sujetos con

un mecanismo homeostático normal para prevenir una enfermedad tromboembólica. Esta terapia puede incluir la heparina, otras formas de proteoglicanos, warfarina u otras formas de antagonistas de la vitamina K así como la aspirina y otros inhibidores de la agregación plaquetaria.

5 [0076] En otro aspecto, se describe el uso de un derivado del Factor VII que comprende un polipéptido del Factor VII con la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido se ha insertado en la  
10 secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma y donde el aminoácido se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons y donde el derivado del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad comparada con el Factor VII recombinante humano de tipo salvaje para la preparación de un medicamento para el tratamiento de episodios hemorrágicos o para la mejora del sistema hemostático normal.

15 [0077] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un derivado del Factor VII que comprende un polipéptido del Factor VII con la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido se ha añadido al C-terminal de la SEC ID n.º: 1 y donde el aminoácido se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons y donde el derivado del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad comparado con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje para la preparación de un medicamento para el tratamiento de episodios hemorrágicos o para la mejora del sistema hemostático normal, donde

20 [0078] el sangrado está asociado a hemofilia A o B. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a la hemofilia con inhibidores adquiridos. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a la 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 tisular 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 una gastritis hemorrágica. En otra forma de realización, el sangrado es sangrado uterino profuso. En otra forma de realización, el sangrado se produce en órganos con una limitada posibilidad de homeostasis mecánica. En otra forma de realización, el sangrado se produce en el cerebro, en la región interna del oído o los ojos. En otra forma de realización, el sangrado está asociado con el proceso de tomar biopsias. En otra forma de realización, el sangrado está asociado a una terapia anticoagulante.

25 [0079] El término "sujeto" como se utiliza en este caso pretende significar cualquier animal, en particular mamíferos, tales como seres humanos, y, cuando sea apropiado, puede ser usado de forma intercambiable con el término "paciente".

30 [0080] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un derivado del Factor VII que comprende un polipéptido del Factor VII con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido se ha insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma y donde el aminoácido se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons y donde el derivado del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje para la preparación de un medicamento para el tratamiento de episodios hemorrágicos o para la mejora del sistema hemostático normal.

35 [0081] En otro aspecto, se describe el uso de un derivado del Factor VII que comprende un polipéptido del Factor VII con la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido se ha añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma y donde el aminoácido se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons y donde el derivado del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje para la preparación de un medicamento para el tratamiento de episodios hemorrágicos o para la mejora del sistema hemostático normal.

40 [0082] En otro aspecto, se describe un método para el tratamiento de episodios hemorrágicos o trastornos hemorrágicos en un sujeto o para la mejora del sistema hemostático normal, el método comprende la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un derivado del Factor VII que comprende un polipéptido del Factor VII con la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido se ha insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma y donde el aminoácido se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons y donde el derivado del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

45 [0083] En otro aspecto, se describe un método para el tratamiento de episodios hemorrágicos o trastornos hemorrágicos en un sujeto o para la mejora del sistema hemostático normal, el método que comprende la administración a un sujeto con la necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un derivado del Factor VII que comprende un polipéptido del Factor VII con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido se ha añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma y

donde el aminoácido se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons y donde el derivado del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

5 [0084] En otro aspecto, se describe el uso de un derivado del Factor VII inactivado, donde un polipéptido del Factor VII inactivado comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje y con una modificación en su centro catalítico, esta modificación inhibe la capacidad del polipéptido del Factor VII de activar el Factor X o IX del plasma, es posteriormente conjugado con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII inactivado con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons para la preparación de un medicamento para inhibir la formación de trombos en un paciente.

15 [0085] En otro aspecto, se describe el uso de un derivado del Factor VII inactivado, donde un polipéptido del Factor VII inactivado comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico ha sido añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma y con una modificación en su centro catalítico, esta modificación inhibe la capacidad del polipéptido del Factor VII de activar el Factor X o IX del plasma, es posteriormente conjugado con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII inactivado con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons para la preparación de un medicamento para inhibir la formación de trombos en un paciente.

25 [0086] En otro aspecto, se describe un método para inhibir la formación de trombos en un paciente que comprende la administración tópica en un sitio vascular susceptible a la formación de trombos en el paciente de una dosis terapéuticamente efectiva de una composición que incluye un derivado del Factor VII inactivado, donde un polipéptido del Factor VII inactivado comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha insertado en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje y con una modificación en su centro catalítico, esta modificación inhibe la capacidad del polipéptido del Factor VII de activar el Factor X o IX del plasma, es posteriormente conjugado con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII inactivado con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons.

35 [0087] En otro aspecto, se describe un método para inhibir la formación de trombos en un paciente que comprende la administración tópica en un sitio vascular susceptible a la formación de trombos en el paciente de una dosis terapéuticamente efectiva de una composición que incluye un derivado del Factor VII inactivado, donde un polipéptido del Factor VII inactivado comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde un aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico se ha añadido al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma y con una modificación en su centro catalítico, esta modificación inhibe la capacidad del polipéptido del Factor VII de activar el Factor X o IX del plasma, es posteriormente conjugado con un grupo químico que aumenta el peso molecular real del polipéptido del Factor VII inactivado con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 daltons.

45 [0088] El grupo químico es sustancialmente neutral.

[0089] El término "neutral" como se utiliza en este caso se refiere al grupo químico que es biocompatible, lo cual significa que es hidrosoluble, no tóxico y no inmunogénico. Los grupos químicos que son sustancialmente neutrales dentro de esta definición incluye, pero no de forma limitativa, polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol, dextrano, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de propileno/óxido de etileno, polipropilenglicol, polioles polioxetilados (por ejemplo, glicerol) y alcohol polivinílico, ácidos colomínicos u otros polímeros basados en carbohidratos, polímeros de aminoácidos, y derivados de biotina.

55 [0090] En otra forma de realización, el grupo químico es hidrosoluble.

[0091] En otra forma de realización, el grupo químico tiene un peso molecular de aproximadamente 1000 daltons hasta aproximadamente 80 000 daltons.

60 [0092] En otra forma de realización, el grupo químico tiene un peso molecular de aproximadamente 5000 daltons hasta aproximadamente 60 000 daltons.

[0093] En otra forma de realización, el grupo químico tiene un peso molecular de aproximadamente 10 000 daltons hasta aproximadamente 40 000 daltons.

65 [0094] En otra forma de realización, el grupo químico tiene un peso molecular de aproximadamente 500 daltons hasta aproximadamente 20 000 daltons.

- [0095] En otra forma de realización, el grupo químico tiene un peso molecular de aproximadamente 500 daltons hasta aproximadamente 5000 daltons.
- 5 [0096] En otra forma de realización, el grupo químico tiene un peso molecular de aproximadamente 750 daltons hasta aproximadamente 5000 daltons.
- [0097] En otra forma de realización, el grupo químico es polietilenglicol.
- 10 [0098] En otra forma de realización, el grupo químico es seleccionado de entre una a seis moléculas de polietilenglicol.
- [0099] En una forma de realización preferida, el grupo químico es una molécula de polietilenglicol.
- [0100] En otra forma de realización, el grupo químico es monometoxipolietilenglicol.
- 15 [0101] En otra forma de realización, el grupo químico es dextrano.
- [0102] En otra forma de realización, el grupo químico es poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol.
- 20 [0103] En otra forma de realización, el grupo químico es homopolímeros de propilenglicol.
- [0104] En otra forma de realización, el grupo químico es óxido de polipropileno.
- [0105] En otra forma de realización, el grupo químico es polipropilenglicol.
- 25 [0106] En otra forma de realización, el grupo químico es un poliol polioxetilado. En otra forma de realización, el grupo químico es alcohol polivinílico.
- [0107] En otra forma de realización, el grupo químico es ácido colomínico.
- 30 [0108] En otra forma de realización, el grupo químico es un polímero basado en carbohidratos.
- [0109] En otra forma de realización, el grupo químico es un polímero de aminoácidos. En otra forma de realización, el grupo químico es un derivado de la biotina.
- 35 [0110] En otra forma de realización, el grupo químico se conjuga con un grupo sulfhidrilo libre presente en el aminoácido sustituido por un aminoácido, insertado en o añadido al polipéptido.
- [0111] En otra forma de realización, el grupo químico se conjuga con una cisteína.
- 40 [0112] En una forma de realización, el aminoácido sustituido insertado o adicionado es capaz de ser conjugado con un grupo químico.
- [0113] En otra forma de realización, el aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico es un aminoácido con un grupo sulfhidrilo libre.
- 45 [0114] En otra forma de realización, el aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico es una cisteína.
- [0115] En otra forma de realización, el aminoácido sustituido, insertado o adicionado es un sulfhidrilo que contiene un aminoácido tal como una cisteína.
- 50 [0116] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha insertado un aminoácido en una posición seleccionada de 247-260, 393-405 o 406 de la SEC ID n.º: 1.
- 55 [0117] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a R396 de la SEC ID n.º: 1 por un aminoácido diferente.
- [0118] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente al Q250 de la SEC ID n.º: 1 por un aminoácido diferente.
- 60 [0119] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente al P406 de la SEC ID n.º: 1 por un aminoácido diferente.
- 65 [0120] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII se ha insertado un aminoácido adicional capaz de ser conjugado con un grupo químico en la secuencia SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma en una posición, donde el

polipéptido del Factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.

- 5 [0121] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha añadido otro aminoácido capaz de ser conjugado con un grupo químico al N-terminal o C-terminal de la SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma.
- [0122] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha añadido un aminoácido al C-terminal de la SEC ID n.º: 1.
- 10 [0123] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha añadido un aminoácido al N-terminal de la SEC ID n.º: 1.
- [0124] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha añadido una cisteína.
- 15 [0125] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha insertado una cisteína.
- [0126] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K157, V158, E296, M298, L305, D334, S336, K337 y F374 de la SEC ID n.º: 1 por otro aminoácido, este aminoácido aumenta la actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.
- 20 [0127] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, el aminoácido correspondiente a K157 de la SEC ID n.º: 1 ha sido sustituido con un aminoácido seleccionado independientemente de G, V, S, T, N, Q, D y E.
- [0128] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a V158 de la SEC ID n.º: 1 con un aminoácido seleccionado independientemente de S, T, N, Q, D y E.
- 25 [0129] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a V158 de la SEC ID n.º: 1 por un aminoácido seleccionado independientemente de T y D.
- [0130] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a E296 de la SEC ID n.º: 1 por un aminoácido seleccionado independientemente de R, K y V.
- 30 [0131] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a E296 de la SEC ID n.º: 1 por V.
- 35 [0132] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a M298 de la SEC ID n.º: 1 por un aminoácido seleccionado independientemente de R, K, Q y N.
- [0133] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a M298 de la SEC ID n.º: 1 por Q.
- 40 [0134] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a L305 de la SEC ID n.º: 1 por un aminoácido seleccionado independientemente de A, V, L, I, M, F, W, P, G, S, T, C, Y, N, E, K, R, H, D y Q.
- 45 [0135] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a L305 de la SEC ID n.º: 1 por V.
- [0136] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a D334 de la SEC ID n.º: 1 por E.
- 50 [0137] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a S336 de la SEC ID n.º: 1 por G.
- [0138] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a K337 de la SEC ID n.º: 1 por un aminoácido independientemente seleccionado de A, G, V, S, T, N, Q, D y E.
- 55 [0139] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a K337 de la SEC ID n.º: 1 por A.
- 60 [0140] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a F374 de la SEC ID n.º: 1 por un aminoácido seleccionado independientemente de A, V, L, I, M, F, W, P, G, S, T, C, Y, N, E, K, R, H, D y Q.
- 65 [0141] En otra forma de realización del polipéptido del Factor VII, se ha sustituido el aminoácido correspondiente a F374 de la SEC ID n.º: 1 por P.

[0142] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es Factor VII humano.

[0143] En otra forma de realización de la invención, el polipéptido del Factor VII es Factor VIIa humano.

5

[0144] En la presente especificación, los aminoácidos son representados usando las abreviaturas, indicadas en la tabla 1, aprobadas por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB (CBN, por sus siglas en inglés). Los aminoácidos y similares con isómeros representados por nombre o las siguientes abreviaturas están en forma natural de L a menos que se indique lo contrario. Además, en los extremos izquierdo y derecho de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, el N-terminal y C-terminal a menos que se especifique de otra manera.

10

**Tabla 1: abreviaturas para aminoácidos:**

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Glicina	Gly	G
Prolina	Pro	P
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Tirosina	Tyr	Y
Triptófano	Trp	W
Histidina	Su	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

[0145] El método se refiere a la preparación de polipéptidos del Factor VII humano como se ha mencionado anteriormente. Los polipéptidos del Factor VII humano se producen preferiblemente mediante técnicas de ADN recombinante. Con este fin, el Factor VII humano de codificación de secuencias de ADN se puede aislar preparando una genoteca o biblioteca de ADNc y selecciona secuencias de ADN que codifican toda o parte de la proteína por hibridación usando sondas de oligonucleótidos sintéticos conforme a las técnicas estándar (véase, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). Para este fin, la secuencia de ADN que codifica la proteína es preferiblemente de origen humano, es decir derivada de un ADN genómico humano o librería de ADNc.

15

20

[0146] Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos del Factor VII humano también se pueden preparar sintéticamente mediante métodos estándar establecidos, por ejemplo el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801-805. Según el método de fosfoamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, purificados, hibridados, ligados y clonados en vectores adecuados.

25

[0147] Las secuencias de ADN también se pueden preparar por reacción en cadena de la polimerasa mediante el uso de cebadores específicos, por ejemplo como se describe en el documento US 4,683,202, Saiki et al., Science 239 (1988), 487-491, o Sambrook et al., *supra*.

30

[0148] Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos del Factor VII humano se insertan normalmente en un vector recombinante que pueden ser cualquier vector, el cual puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección de vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que se introduzca. De este modo, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser de tal modo que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en los que se ha integrado.

35

[0149] El vector es preferiblemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica los polipéptidos del Factor VII humano se enlaza operativamente a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN. En general, el vector de expresión se deriva del ADN plasmídico o vírico, o puede contener elementos de ambos. El término "operablemente ligado" indica que los segmentos están dispuestos de modo que funcionan en consonancia para sus

40

finés previstos, por ejemplo, la transcripción se inicia en un promotor y procede a través de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido.

5 [0150] El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped elegida y puede ser un derivado de proteínas que codifican genes bien heterólogo o bien homólogo a la célula huésped.

10 [0151] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el polipéptido del Factor VII humano en células mamíferas son el promotor SV40 (Subramani et al., Mol. Celular Biol. 1 (1981), 854 -864), el promotor MT-1 (gen de metalotioneína) (Palmiter et al., Science 222 (1983), 809 - 814), el promotor CMV (Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985) o el promotor tardío mayor de adenovirus 2 (Kaufman and Sharp, Mol. Cell. Biol, 2:1304-1319, 1982).

15 [0152] Un ejemplo de un promotor adecuado para el uso en las células de insecto es el promotor de polihedrina (US 4,745,051; Vasuvedan et al., FEBS Lett. 311, (1992) 7 - 11), el promotor P10 (J.M. Vlák et al., J. Gen. Virology 69, 1988, pp. 765- 776), el promotor de la proteína básica del virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (EP 397 485), el promotor del gen temprano inmediato 1 de baculovirus ( US 5,155,037; US 5,162,222), o el promotor de gen retardado-temprano de baculovirus 39K (US 5,155,037; US 5,162,222).

20 [0153] Ejemplos de promotores adecuados para el uso en células huésped de levadura incluyen promotores de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255 (1980), 12073 - 12080; Alber and Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419 - 434) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young et al., in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender et al, eds.), Plenum Press, New York, 1982), o los promotores TP11 (US 4,599,311) o ADH2-4c (Russell et al., Nature 304 (1983), 652 - 654).

25 [0154] Ejemplos de promotores adecuados para el uso en células huésped de hongos filamentosos son, por ejemplo, el promotor ADH3 (McKnight et al., The EMBO J. 4 (1985), 2093 - 2099) o el promotor tpiA. Ejemplos de otros promotores útiles son aquellos derivados del gen que codifica la TAKA-amilasa de *A. oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*,  $\alpha$ -amilasa neutral de *A. niger*,  $\alpha$ -amilasa ácida estable de *A. niger*, glucoamidasas de *A. niger* o *A. awamori* (gluA), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosafosfato isomerasa de *A. oryzae* o acetamidasa de *A. nidulans*.  
30 Se prefieren los promotores TAKA- amilasa y gluA. Promotores adecuados se mencionan en, por ejemplo los documentos EP 238 023 y EP 383 779.

35 [0155] Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos del Factor VII humano pueden estar también, si es necesario, operativamente conectadas a un terminador adecuado, tal como el terminador de la hormona de crecimiento humana (Palmiter et al., Science 222, 1983, pp. 809-814) o los terminadores TP11 (Alber and Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1, 1982, pp. 419-434) o ADH3 (McKnight et al., The EMBO J. 4, 1985, pp. 2093-2099). El vector también puede 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 en sí. Los sitios de empalme de ARN preferidos se pueden obtener de  
40 adenovirus y/o genes de inmunoglobulina. También está contenido 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 Elb del adenovirus 5, el terminador del gen de la hormona del crecimiento humana (DeNoto et al. Nuc. Acids Res. 9:3719-3730, 1981) o la señal de poliadenilación del gen del Factor VII humano o del gen de  
45 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 intensificador SV40.

50 [0156] El vector recombinante puede comprender además una secuencia de ADN que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Un ejemplo de tal secuencia (cuando la célula huésped es una célula mamífera) es el origen de replicación SV40.

55 [0157] Cuando la célula huésped es una célula de levadura, las secuencias adecuadas que permiten que el vector se replique son los genes de replicación REP 1-3 del plásmido 2 $\mu$  de levadura REP 1-3 y el origen de replicación.

[0158] El vector también puede comprender un marcador seleccionable, por ejemplo un gen, el producto del cual complementa un defecto en la célula huésped, tal como el gen codificante para la dehidrofolato reductasa (DHFR) o el gen TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (descrito por P.R. Russell, Gene 40, 1985, pp. 125-130), o uno que confiera  
60 resistencia a un fármaco, por ejemplo ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato. Para hongos filamentosos, los marcadores seleccionables incluyen *amdS*, *pyrG*, *argB*, *niaD* o *sC*.

[0159] Para dirigir los polipéptidos de Factor VII humano de la presente invención a la vía secretora de las células huésped, se puede proporcionar en el vector recombinante una secuencia de señal secretora (también conocida como una secuencia líder, secuencia pre pro o secuencia pre). La secuencia de señal secretora se une a las secuencias de  
65

ADN que codifican los polipéptidos del Factor VII humano en el marco de lectura correcto. Las secuencias de señal secretora se sitúan comúnmente 5' respecto a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia de señal secretora puede ser tal, normalmente asociada a la proteína o puede ser de un gen que codifica otra proteína segregada.

5

[0160] Para la secreción de células de levadura, la secuencia de señal secretora puede codificar cualquier péptido señal que asegure la dirección eficaz de los polipéptidos del Factor VII humano expresados en la vía secretora de la célula. El péptido señal puede ser un péptido señal que existe de forma natural, o una parte funcional del mismo, o este puede ser un péptido sintético. Se ha descubierto que péptidos señal adecuados son el péptido señal factor alfa (véase el documento US 4,870,008), el péptido señal de amilasa salival de ratón (véase O. Hagenbuchle et al., Nature 289, 1981, pp. 643-646), un péptido señal de carboxipeptidasa modificado (véase L.A. Valls et al., Cell 48, 1987, pp. 887-897), péptido señal BAR1 de la levadura (véase el documento WO 87/02670), o el péptido señal de la proteasa aspártica 3 de levadura (YAP3) (véase M. Egel-Mitani et al., Yeast 6, 1990, pp. 127-137).

10

15

[0161] Para la secreción eficaz en levadura, una secuencia que codifica un péptido líder también se puede insertar secuencia abajo de la secuencia de señal y secuencia arriba de la secuencia de ADN que codifica los polipéptidos del Factor VII humano. La función del péptido líder es permitir que el péptido expresado sea dirigido desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi y además a una vesícula secretora para la secreción en el medio de cultivo (es decir, exportación de los polipéptidos del Factor VII humano a través de la pared celular o al menos a través de la membrana celular en el espacio periplásmico de la célula de levadura). El péptido líder puede ser el líder factor alfa de levadura (el uso del cual está descrito en los documentos por ejemplo US 4,546,082, US 4,870,008, EP 16 201, EP 123 294, EP 123 544 y EP 163 529). Alternativamente, el péptido líder puede ser un péptido líder sintético, es decir, un péptido líder no encontrado en la naturaleza. Se pueden construir péptidos líder sintéticos por ejemplo, como se describe en los documentos WO 89/02463 o WO 92/11378.

20

25

[0162] Para el uso en hongos filamentosos, el péptido señal se puede derivar convenientemente de un gen que codifica una amilasa o glucoamilasa de *Aspergillus sp.*, un gen que codifica una lipasa o proteasa de *Rhizomucor miehei* o una lipasa de *Humicola lanuginosa*. El péptido señal es preferiblemente derivado de un gen que codifica TAKA amilasa de *A. oryzae*,  $\alpha$ -amilasa neutral de *A. niger*,  $\alpha$ -amilasa ácida estable de *A. niger*, o glucoamilasa de *A. niger*. Los péptidos señal adecuados están descritos en, por ejemplo los documentos EP 238 023 y EP 215 594.

30

[0163] Para el uso en células de insecto, el péptido señal puede ser derivado convenientemente de un gen de insecto (véase el documento WO 90/05783), tal como el lepidóptero péptido señal de precursor de la hormona adipocinética de *Manduca sexta* (véase el documento US 5,023,328).

35

[0164] Los procedimientos utilizados para enlazar las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos del Factor VII humano, el promotor y opcionalmente el terminador y/o secuencia de señal secretora, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados con la información necesaria para la replicación, son conocidos por las personas expertas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

40

[0165] Se describen métodos de transfectar células mamíferas y de expresar secuencias de ADN introducidas en las células en, por ejemplo, Kaufman and Sharp, J. Mol. Biol. 159 (1982), 601 - 621; Southern and Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 327 - 341; Loyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982), 422 - 426; Wigler et al., Cell 14 (1978), 725; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7 (1981), 603, Graham and van der Eb, Virology 52 (1973), 456; and Neumann et al., EMBO J. 1 (1982), 841 - 845.

45

[0166] 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 se introducen en el mismo plásmido, el marcador seleccionable y el gen de interés pueden estar bajo el control de diferentes promotores o del mismo promotor, la última disposición tiene como resultado un mensaje bicistrónico. Constructos de este tipo se conocen en la técnica (por ejemplo, Levinson y Simonsen, Pat. EE. UU. n.º 4,713,339). También puede ser ventajoso añadir ADN adicional, conocido como "ADN transportador" a la mezcla que se introduce en las células.

50

[0167] Después de que las células hayan absorbido el ADN, se crecen en un medio de crecimiento apropiado, típicamente 1-2 días, para iniciar la expresión el gen de interés. Como se utiliza en este caso el término "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión de los polipéptidos de interés del Factor VII humano. Los medios incluyen generalmente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, azúcares esenciales, vitaminas, sales, fosfolípidos, proteínas y factores de crecimiento. Para la producción de proteínas gamma-carboxiladas, el medio contendrá vitamina K, preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,1  $\mu$ g/ml a aproximadamente 5  $\mu$ g/ml. Se aplica luego una selección farmacológica para seleccionar el crecimiento de células que están expresando el marcador seleccionable de forma estable. Para células que han sido modificadas con un marcador seleccionable amplificable, la concentración farmacológica se puede aumentar para seleccionar un número de copias aumentado de las secuencias clonadas, aumentando así los niveles de expresión. Se seleccionan luego clones de células transfectadas para la expresión del polipéptido de interés del Factor VII humano.

65

[0168] La célula huésped en la que se introducen las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos del Factor VII humano puede ser cualquier célula que sea capaz de producir los polipéptidos del Factor VII humano modificado postranslacional e incluye levadura, hongos y células eucariotas más altas.

[0169] Ejemplos de líneas celulares mamíferas para el uso en la presente invención son las líneas celulares COS-1 (ATCC CRL 1650), riñón de crías de hámster (BHK) y 293 (ATCC CRL 1573 Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72,1977). Una línea celular preferida BHK es la línea celular tk- ts13 BHK (Waechter y Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 79:1106-1110, 1982, incorporada aquí por referencia), de ahora en adelante denominada como células BHK 570. La línea celular BHK 570 ha sido depositada con the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852, bajo el número de acceso de ATCC CRL 10314. Una línea celular tk<sup>-</sup> ts13 BHK está también disponible del ATCC bajo el número de acceso CRL 1632. Además, se pueden utilizar en la presente invención varias otras líneas celulares, incluyendo células Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 61) y DUKX (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220,1980).

[0170] Entre los ejemplos de células de levadura adecuadas se incluyen células de *Saccharomyces spp.* o *Schizosaccharomyces spp.*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces kluyveri*. Métodos para la transformación de células de levadura con ADN heterólogo y la producción de polipéptidos heterólogos se describen, por ejemplo en los documentos US 4,599,311, US 4,931,373, US 4,870,008, 5,037,743, y US 4,845,075, todo lo cual se incorpora como referencia por la presente. Las células transformadas se seleccionan por un fenotipo determinado por una etiqueta seleccionable, comúnmente resistencia farmacológica o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente particular, por ejemplo leucina. Un vector preferido para el uso en levadura es el vector POT1 descrito en el documento US 4,931,373. Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos del Factor VII humano pueden estar precedidas por una secuencia de señal y opcionalmente por una secuencia líder, por ejemplo como se ha descrito anteriormente. Otros ejemplos de células de levadura adecuadas son las cepas de *Kluyveromyces*, tal como *K. lactis*, *Hansenula*, por ejemplo *H. polymorpha*, o *Pichia*, por ejemplo *P. pastoris* (véase Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, págs. 3459-3465; US 4,882,279).

[0171] Ejemplos de otras células fúngicas son las células de hongos filamentosos, por ejemplo *Aspergillus spp.*, *Neurospora spp.*, *Fusarium spp.* o *Trichoderma spp.*, en particular cepas de *A. oryzae*, *A. nidulans* o *A. niger*. El uso de *Aspergillus spp.* para la expresión de proteínas se describe en, por ejemplo, los documentos EP 272 277, EP 238 023, EP 184 438 La transformación de *F. oxysporum* se puede efectuar, por ejemplo, como se describe por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156. La transformación de *Trichoderma spp.* se puede realizar por ejemplo como se describe en el documento EP 244 234.

[0172] Cuando un hongo filamentosos se usa como célula huésped, se puede transformar con el constructo de ADN de la invención, convenientemente mediante la integración del constructo de ADN en el cromosoma huésped para obtener una célula huésped recombinante. Esta integración se considera generalmente una ventaja ya que es más probable que la secuencia de ADN se mantenga en la célula de forma estable. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped se puede realizar según métodos convencionales, por ejemplo por recombinación homóloga o heteróloga.

[0173] La transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos heterólogos en ellas se puede realizar como se describe en los documentos US 4,745,051; US 4,879,236; US 5,155,037, 5,162,222; EP 397,485) todos los cuales se incorporan aquí como referencia. La línea celular de insecto utilizada como huésped puede ser adecuadamente una línea celular de *Lepidoptera*, tales como células de *Spodoptera frugiperda* o células de *Trichoplusia ni* (véase US 5,077,214). Las condiciones de cultivo pueden ser adecuadamente las que se describe en, por ejemplo, los documentos WO 89/01029 o WO 89/01028, o en cualquiera de las referencias ya mencionadas.

[0174] La célula huésped transformada o modificada descrita anteriormente se cultiva luego en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido del Factor VII humano después de la cual todos o parte de los péptidos resultantes se pueden recuperar del cultivo. El medio utilizado para el cultivo de las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huésped, tales como medios mínimos o complejos que contienen suplementos apropiados. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej. en catálogos de the American Type Culture Collection). El polipéptido de factor VII humano producido por las células puede ser recuperado luego del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo la separación de las células huésped del medio por centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteicos acuosos del sobrenadante o filtración mediante una sal, por ejemplo sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similares, dependiendo del tipo de polipéptido en cuestión.

[0175] Para la preparación de polipéptidos de factor VII recombinante humano, se usa una secuencia clonada de ADN del Factor VII de tipo salvaje. Esta secuencia se puede modificar para codificar una variante del Factor VII deseada. Las secuencias completas de nucleótidos y de aminoácidos para el Factor VII humano son conocidas. Véase Pat. EE. UU.

n.º 4,784,950, que se incorpora aquí por referencia, donde se describe la clonación y la expresión del Factor VII humano recombinante. La secuencia de Factor VII bovino se describe en Takeya et al., J. Biol. Chem, 263:14868-14872 (1988), que se incorpora aquí por referencia.

5 [0176] Las alteraciones en la secuencia de aminoácidos se pueden realizar por una variedad de técnicas. La modificación de la secuencia de ADN se puede realizar por mutagénesis de sitio dirigido. Las técnicas para la mutagénesis de sitio dirigido se conocen bien en la técnica y están descritas por, por ejemplo, Zoller and Smith (DNA 3:479-488, 1984). Así, utilizando las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del Factor VII, uno puede introducir las alteraciones elegidas.

10 [0177] Las secuencias de ADN para el uso en la presente invención codificarán típicamente un péptido pre pro en el extremo amino-terminal de la proteína del factor VII para obtener un procesamiento postraduccional apropiado (p. ej. gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico) y la secreción de la célula huésped. El péptido pre pro puede ser el del Factor VII u otra proteína plasmática dependiente de la vitamina K, tal como factor IX, factor X, protrombina, proteína C o proteína S. Como se apreciará por expertos en la técnica, se pueden realizar modificaciones adicionales en la secuencia de aminoácidos del Factor VII donde aquellas modificaciones no perjudiquen significativamente la capacidad de la proteína para actuar como factor de coagulación. Por ejemplo, el factor VII en la tríada catalítica, también se puede modificar en el sitio de activación de escisión para inhibir la conversión del zimógeno Factor VII a su forma bicatenaria activada, como se describe generalmente en Pat. EE. UU. n.º 5,288,629, incorporada aquí por referencia.

25 [0178] Se puede emplear tecnología transgénica de animales para producir el polipéptido del Factor VII humano. Se prefiere producir las proteínas en las glándulas mamarias de un mamífero hembra huésped. La expresión en la glándula mamaria y la posterior secreción de la proteína de interés en la leche supera muchas dificultades encontradas en el aislamiento de proteínas de otras fuentes. La leche se recoge fácilmente, está disponible en grandes cantidades, y está bien caracterizada bioquímicamente. Además, las principales proteínas de leche están presentes en la leche a altas concentraciones (típicamente de aproximadamente 1 a 15 g/l). 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 la publicación WIPO 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, deberían utilizarse animales de estado de salud conocido y bueno.

35 [0179] 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 caseína (véase Pat. EE. UU. n.º 5,304,489, incorporada aquí por referencia), beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina, y proteína ácida de lactosuero. Se prefiere el promotor de beta-lactoglobulina (BLG). En el caso del gen de beta-lactoglobulina ovina, se utiliza generalmente una región de al menos 406 pb anteriores a la secuencia flanqueante 5' del gen, aunque se prefieren partes más grandes de la secuencia flanqueante 5', hasta aproximadamente 5 kbp, tales como un segmento de ADN de 4.25 kbp que circunda el promotor flanqueante 5' 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 adecuados.

50 [0180] 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); documento WO 89/01343; y documento WO 91/02318, cada uno de los cuales es incorporado aquí por referencia). A este respecto, se prefiere generalmente, donde sea posible, usar secuencias genómicas que contengan 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 la secuencia que codifica el polipéptido del Factor VII humano 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 la secuencia pre pro entera del polipéptido del Factor VII humano y las secuencias 5' no codificantes con aquellas de, por ejemplo, el gen BLG, aunque se pueden sustituir regiones más pequeñas.

65 [0181] Para la expresión de un polipéptido del Factor VII humano en animales transgénicos, un segmento de ADN que codifica el polipéptido del Factor VII humano se enlaza operativamente a segmentos de ADN adicionales requeridos su

- expresión para producir unidades de expresión. Tales segmentos adicionales incluyen el promotor anteriormente mencionado, al igual que secuencias que proveen la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. Las unidades de expresión incluirán además un segmento de ADN que codifica una secuencia señal secretora enlazada operativamente al segmento que codifica el polipéptido del Factor VII humano. La secuencia señal secretora puede ser una secuencia señal secretora nativa del polipéptido del Factor VII humano o puede ser la de otra proteína, tal como una proteína de la leche. Véase, por ejemplo, von Heinje, *Nuc. Acids Res.* 14: 4683-4690 (1986); y Meade et al., *Pat. EE. UU.* n.º 4,873,316, que se incorporan aquí por referencia.
- [0182] La construcción de unidades de expresión para el uso en animales transgénicos se realiza convenientemente por inserción de una secuencia que codifica el polipéptido del Factor VII humano en un vector plásmido o fago que contiene 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 la del polipéptido del Factor VII humano, creando así una fusión de gen que incluye las secuencias de control de expresión del gen de proteína de la leche. De cualquier manera, la clonación de las unidades de expresión en plásmidos u otros vectores facilita la amplificación del polipéptido del Factor VII humano. 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.
- [0183] La unidad de expresión se introduce luego 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. *Pat. EE. UU.* n.º 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 hembras pseudoembarazadas y se permite que se desarrollen. 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.
- [0184] 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); *Pat. EE. UU.* n.º 4,873,191 y 4,873,316; publicaciones WIPO WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; y GB 87/00458, que se incorporan aquí por referencia. Las técnicas para introducir secuencias de ADN 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); y Brinster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4438-4442 (1985). Estas técnicas fueron posteriormente adaptadas para su uso con animales más grandes, incluyendo especies de ganado (véase por ejemplo, publicaciones WIPO WO 88/00239, WO 90/05188, y WO 92/11757; y Simons et al., *Bio/Technology* 6: 179-183 (1988)). Para resumir, en la vía más eficaz 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. También se puede emplear la inyección de ADN en el citoplasma de un cigoto. 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); y la publicación de la oficina europea de patentes EP 255,378.
- [0185] El Factor VII producido según la presente invención se puede purificar por cromatografía de afinidad en una columna de un anticuerpo de anti-Factor VII. Se prefiere que la columna de inmunoabsorción comprenda un anticuerpo monoclonal de especificidad alta. El uso de anticuerpos monoclonales dependientes de calcio, como está descrito por Wakabayashi et al., *J. Biol. Chem.* 261: 11097-11108, (1986) y Thim et al., *Biochem.* 27: 7785-7793, (1988), incorporada por referencia aquí, es particularmente preferido. Se puede conseguir una purificación adicional por medios de purificación química convencional, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento. Otros métodos de purificación, incluyendo precipitación de citrato de bario, se conocen en la técnica, y se pueden aplicar a la purificación del Factor VII descrita aquí (Véase, generalmente, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982). Se prefiere un Factor VII substancialmente puro, de al menos aproximadamente un 90 a 95% de homogeneidad, y es más preferido un 98 a 99% o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos. Una vez purificado, parcialmente o hasta la homogeneidad según se desee, el Factor VII puede luego ser usado terapéuticamente.
- [0186] La conversión de Factor VII monocatenario en Factor VIIa bicatenario activo se puede conseguir utilizando el Factor XIIa como se describe por Hedner y Kisiel (*J. Clin. Invest.* 71: 1836-1841), o con otras proteasas que presentan especificidad de tipo tripsina (Kisiel and Fujikawa, *Behring Inst. Mitt.* 73: 29-42, 1983). Alternativamente el Factor VII se puede autoactivar pasándolo a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, tal como mono Q.RTM. (Farmacia Fire Chemicals) o similar (Bjoern et al., 1986, *Research Disclosures* 269:564-565). Las moléculas de Factor VII de la presente invención y las composiciones farmacéuticas del mismo son particularmente útiles para la administración a seres humanos para tratar una variedad de condiciones que implican coagulación intravascular.

[0187] Se describen ensayos adecuados para seleccionar los polipéptidos del Factor VIIa preferidos y derivados del Factor VIIa. Estos ensayos se pueden realizar como una simple prueba *in vitro* preliminar.

5 [0188] Así, el ejemplo 5 aquí divulga una simple prueba (titulada "Ensayo de Hidrólisis *In Vitro*") de la actividad de los polipéptidos del Factor VIIa de la invención. Basado en lo mismo, los polipéptidos del Factor VIIa que son de interés particular son tales polipéptidos donde la proporción entre la actividad de la variante y la actividad del Factor VII humano nativo mostrada en la Fig. 1 es aproximadamente 1,0 o más alto, cuando se evalúa en el "Ensayo de Hidrólisis *In Vitro*" definido aquí.

10 [0189] La actividad de los polipéptidos también se puede medir utilizando un sustrato fisiológico tal como factor X ("Ensayo de Proteólisis *In Vitro*") (véase ejemplo 6), 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.

15 [0190] La capacidad de los polipéptidos del factor VIIa procoagulantes para generar trombina puede ser también medida en un ensayo que comprende todos factores de coagulación relevantes e inhibidores a concentraciones fisiológicas (menos el factor VIII cuando se imitan las condiciones de hemofilia A) y plaquetas activadas (Monroe et al. (1997) Brit. J. Haematol. 99, 542-547 que se incorpora como referencia por la presente).

20 [0191] Los derivados precoagulantes del Factor VII se pueden utilizar para controlar trastornos hemorrágicos 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 factor de coagulación, o se pueden utilizar para controlar un sangrado excesivo existente 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 se pueden provocar por una actividad defectuosa de las plaquetas, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. También pueden aparecer en sujetos en quién se ha inducido por varios estímulos una actividad fibrinolítica aumentada.

30 [0192] En sujetos que sufren daño tisular extenso asociado a cirugía o un gran traumatismo, el mecanismo hemostático se puede ver desbordado por la demanda de hemostasis inmediata y pueden desarrollar sangrados 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 y también pueden 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 ha sido inducida por la terapia dada. Tales sujetos pueden precisar de intervenciones quirúrgicas en el caso de que el efecto anticoagulante deba ser contrarrestado rápidamente. Otra situación que puede causar problemas en el caso de hemostasis insatisfactoria es cuando los sujetos con un mecanismo hemostático normal son 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 .

45 [0193] Una activación sistémica de la cascada de coagulación puede llevar a una coagulación intravascular diseminada (DIC). 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. Los derivados precoagulantes del Factor VII según la invención pueden así utilizarse también en sus formas activadas para controlar tales sangrados excesivos asociados a un mecanismo hemostático normal.

50 [0194] 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 se puede realizar a través de una variedad de vías como se describe en este caso .

55 [0195] La dosis de los derivados 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 de la gravedad de la enfermedad.

60 [0196] 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 el derivado de Factor VII de la invención en combinación con, preferiblemente disuelto en, un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Se puede utilizar una variedad de soportes acuosos, tales como agua, agua

65

5 tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares. Los derivados del Factor VII de la invención también pueden ser formulados en las preparaciones de liposoma para ser entregadas o dirigirse a los sitios de herida. Las preparaciones de liposoma están generalmente descritas en, por ejemplo, los documentos U.S. 4,837,028, U.S. 4,501,728, y U.S. 4,975,282. Las composiciones se pueden esterilizar por técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las soluciones acuosas resultantes se pueden empaquetar para el uso o se pueden filtrar bajo condiciones asépticas y liofilizadas, combinándose la preparación liofilizada 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.

10 [0197] La concentración del derivado del factor VII en estas formulaciones puede variar mucho, es decir, desde menos de aproximadamente un 0,5% en peso, normalmente o al menos aproximadamente un 1% en peso hasta llegar a un 15 o 20% en peso y será seleccionado principalmente por volúmenes fluidos, viscosidades, etc., conforme al modo particular de administración seleccionado.

15 [0198] Así, una composición farmacéutica típica para infusión intravenosa podría ser elaborada para contener 250 ml de solución de Ringer estéril y 10 mg del polipéptido del Factor VII. Métodos reales para preparar composiciones administrables parentalmente 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).

20 [0199] Las composiciones que contienen los derivados del Factor VII 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.

25 En general, no obstante, la cantidad eficaz variará de aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 500 mg del derivado del Factor VII al día para un sujeto de 70 kg, con dosis de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 200 mg del derivado del Factor VII al día siendo más comúnmente usadas.

30 [0200] 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 extrañas y la carencia general de inmunogenicidad de derivados del 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.

35 [0201] En aplicaciones profilácticas, las composiciones con el derivado 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 dependen de nuevo del estado de salud y peso del sujeto, pero las dosis generalmente varían de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 500 mg al día para un sujeto de 70 kg, más comúnmente de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 200 mg al día para un sujeto de 70 kg.

40 [0202] 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, los derivados del Factor VII se pueden administrar por infusión continua utilizando por ejemplo un sistema de bomba portátil.

45 [0203] La liberación local del derivado del factor VII de la presente invención, tal como, por ejemplo, la aplicación tópica se puede realizar, 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 derivado del Factor VII suficiente para tratar al sujeto eficazmente.

50 [0204] Los polipéptidos del Factor VII inactivado son capaces de enlazarse al factor tisular de la superficie celular. Por ejemplo, el Factor VIIa modificado con DEGR se enlaza al factor tisular de superficie de la célula con una afinidad equivalente o más alta que el Factor VIIa de tipo salvaje. El Factor VIIa modificado con DEGR, no obstante, no tiene actividad enzimática, sin embargo se enlaza al factor tisular y actúa como antagonista competitivo del Factor VIIa de tipo salvaje, inhibiendo así los pasos posteriores en la vía extrínseca de coagulación que conducen a la generación de trombina.

55 [0205] Los derivados del Factor VII inactivado son particularmente útiles para la administración a seres humanos para tratar una variedad de condiciones que implican coagulación intravascular. Por ejemplo, aunque la trombosis venosa profunda y la embolia pulmonar se pueden tratar con anticoagulantes convencionales, los derivados del Factor VII

5 inactivado descritos aquí se pueden utilizar para prevenir la incidencia de complicaciones tromboembólicas en los pacientes de riesgo alto identificado, tales como aquellos sometidos a cirugía o aquellos con insuficiencia cardiaca congestiva. Además, los derivados del Factor VII inactivado pueden actuar como antagonistas de la inducción mediada por el factor tisular de coagulación, bloqueando así la producción de trombina y la deposición posterior de fibrina. Como tal, los derivados del Factor VII inactivado pueden ser útiles para inhibir la actividad del factor tisular dando como resultado, por ejemplo, la inhibición de la coagulación sanguínea, trombosis o deposición de plaquetas.

10 [0206] Los derivados de Factor VII inactivado pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de la hiperplasia intimal, reestenosis debida a una herida vascular aguda, trombosis venal profunda, trombosis arterial, trombosis post quirúrgica, bypass de arteria coronaria (CABG, por sus siglas en inglés), angioplastia coronaria transdermal percutánea (PTCA, por sus siglas en inglés), derrame cerebral, cáncer, metástasis tumoral, angiogénesis, isquemia/reperfusión, artritis reumatoide, trombolisis, arteriosclerosis y reestenosis después de angioplastia, indicaciones crónicas y agudas tales como inflamación, choque séptico, septicemia, hipotensión, síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto (ARDS, por sus siglas en inglés), coagulación intravascular diseminada (DIC, por sus siglas en inglés), embolia pulmonar, deposición de plaquetas, infarto de miocardio, o el tratamiento profiláctico de mamíferos con vasos ateroscleróticos en riesgo de trombosis. Las heridas vasculares agudas son las que aparecen rápidamente (es decir, de días a meses), a diferencia de las heridas vasculares crónicas (p. ej. aterosclerosis) que se desarrollan a lo largo de toda la vida. Las heridas vasculares agudas resultan frecuentemente de procedimientos quirúrgicos tales como reconstrucción vascular, donde se utilizan técnicas de angioplastia, endarterectomía, aterectomía, emplazamiento de un injerto vascular o similares.

20 La hiperplasia también puede aparecer como una respuesta retardada en respuesta a, por ejemplo, un emplazamiento de injerto o un trasplante de órganos. Dado que los derivados del Factor VII inactivado son más selectivos que la heparina, uniéndose generalmente sólo al factor tisular que se ha expuesto en los puntos de herida, y ya que los derivados del Factor VII inactivado no destruyen otras proteínas de coagulación, será más eficaz y menos probable de causar complicaciones hemorrágicas que en el caso de la heparina cuando se usa profilácticamente para la prevención de la trombosis venosa profunda.

30 [0207] Los derivados del Factor VII inactivado que mantienen la unión del factor tisular inhiben la acumulación de plaquetas en el punto de herida vascular por bloqueo de la producción de trombina y posterior deposición de fibrina.

35 [0208] Debido a la capacidad del Factor VII modificado con DEGR para bloquear la generación de trombina y limitar la deposición de plaquetas en los puntos de herida vascular aguda, los derivados del Factor VII inactivado que mantienen la actividad de unión al factor tisular pero carecen de la actividad enzimática del Factor VIIa pueden utilizarse para inhibir la reestenosis vascular.

40 [0209] Las composiciones que comprenden derivados del Factor VII inactivado son particularmente útiles en métodos para tratar pacientes cuando están formuladas en composiciones farmacéuticas, donde se puede administrar a individuos que padecen una variedad de estados de enfermedad para tratar condiciones relacionadas con la coagulación. Tales derivados del Factor VII inactivado, capaces de enlazarse al factor tisular pero con una capacidad sustancialmente reducida para catalizar la activación de otros factores en la cascada de coagulación, puede poseer una vida media en plasma más larga y así un periodo correspondientemente más largo de actividad anticoagulante cuando se compara con otros anticoagulantes. Entre las indicaciones médicas para las composiciones para el sujeto están aquellas comúnmente tratadas con anticoagulantes, tales como, por ejemplo, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, derrame cerebral, coagulación intravascular diseminada (DIC), deposición de fibrina en pulmones y riñones asociada a endotoxemia gram-negativa, e infarto de miocardio. Las composiciones pueden utilizarse para inhibir la reestenosis vascular como aparece tras una herida vascular mecánica, tal como una herida provocada por angioplastia con globo, endarterectomía, aterectomía reductiva, colocación de stent, terapia láser o rotablación, o como aparece derivada de injertos vasculares, stent, injertos de bypass o trasplantes de órgano. Las composiciones se pueden usar así para inhibir la deposición de plaquetas y trastornos asociados. Así, un método de inhibir la coagulación, la reestenosis vascular o la deposición de plaquetas, por ejemplo, comprende la administración a un paciente de una composición que comprende derivados del Factor VII inactivado, tales como los que presentan al menos una sustitución de aminoácidos en una tríada catalítica de Ser344; Asp242 e His193, en una cantidad suficiente para inhibir eficazmente la coagulación, reestenosis vascular o deposición de plaquetas. Los métodos también encuentran uso en el tratamiento del cierre agudo de una arteria coronaria en un individuo (p. ej. infarto de miocardio agudo), que comprende la administración de los derivados del Factor VII inactivado, que incluyen Factor VII modificado con DEGR y Factor VII modificado con FFR, conjuntamente con un activador tisular plasminógeno o estreptoquinasa, y pueden acelerar la trombosis inducida por tPA. Los derivados del Factor VII inactivado se administran antes de, conjuntamente con, o brevemente después de un agente trombolítico, tal como el activador tisular plasminógeno.

60 [0210] Las composiciones de los derivados del Factor VII inactivado también tendrán utilidad sustancial en la prevención de embolias cardiogénicas y en el tratamiento de ataques trombóticos. Debido a su bajo potencial para causar complicaciones hemorrágicas y a su selectividad, los derivados del Factor VII se pueden dar a víctimas de derrame cerebral y pueden prevenir la extensión del trombo de oclusión arterial. La cantidad de derivados del Factor VII administrada variará en función de cada paciente dependiendo de la naturaleza y gravedad del derrame cerebral, pero las dosis generalmente estarán en el rango de las que se sugieren a continuación.

[0211] Derivados del Factor VII inactivado y composiciones de los mismos también se pueden usar para inhibir eventos deletéreos asociados a una reperfusión isquémica. La isquemia severa a un tejido, órgano o extremidad se puede deber a una reducción en el flujo sanguíneo y se puede asociar a un traumatismo, manipulación quirúrgica, o disminución de la presión sanguínea. Una de las complicaciones asociadas a la isquemia severa es la sobrerregulación del factor tisular en el sistema arterial. Se cree que el aumento en la expresión del factor tisular estimula una respuesta procoagulante, principalmente en el lecho capilar. Después de la reperfusión al tejido isquémico, se pueden generar trombos que pueden ser bien oclusivos o no oclusivos. La generación de trombos en el lecho arterial, y la deposición de plaquetas a lo largo del trombo, lleva a la generación secundaria de isquemia del tejido. La generación de trombos y la presencia de plaquetas pueden causar luego la generación y liberación de factores bioactivos múltiples, incluyendo aquellos generados por la vía de coagulación, tales como trombina y Factor X, al igual que factores liberados de plaquetas activadas. Sucesivamente, estos factores pueden inducir la generación de factores adicionales por el endotelio subyacente y células del músculo liso, o por células mononucleares adyacentes, tal como TNF-alfa e IL-1. Estos factores, sucesivamente, pueden activar las células endoteliales conduciendo a la sobrerregulación de varias moléculas de adhesión asociadas a monocitos y unión neutrofílica. La unión y trans migración de monocitos y neutrófilos, la liberación de compuestos bioactivos por estas células, incluyendo la generación de radicales libres de oxígeno, puede exacerbar el nivel de activación de las células endoteliales y el daño. En última instancia, si la cascada de eventos no se verifica, esto puede llevar a complicaciones sistémicas y al potencial para estimular un fallo orgánico múltiple. Bloqueando el factor tisular, según la presente invención por administración de un inhibidor específico de la unión factor tisular/Factor VII (por ejemplo; FVIIa modificado con FFR), y bloqueando así la iniciación de la vía extrínseca de coagulación, se puede evitar la iniciación de la cascada de eventos, eliminando así, o minimizando los eventos deletéreos asociados a la isquemia/reperfusión.

[0212] La dosis de derivados de Factor VII inactivado para la prevención de la trombosis venosa profunda se encuentra en el rango de aproximadamente 50 µg a 500 mg/día, más típicamente 1 mg a 200 mg/día, y más preferiblemente de 10 a aproximadamente 175 mg/día para un paciente de 70 kg, y la administración se debería iniciar al menos aproximadamente 6 horas antes de la cirugía y continuar al menos hasta que el paciente se vuelve ambulatorio. La dosis de derivados de Factor VII inactivado en el tratamiento de la reestenosis variará con cada paciente pero generalmente estará en el rango de las sugeridas anteriormente.

[0213] Las composiciones que comprenden derivados de Factor VII inactivado se administrarán típicamente aproximadamente dentro de las 24 horas antes de que se realice una intervención, y prácticamente 7 días o más después. La administración se puede realizar por una variedad de vías como se describe además aquí. Las composiciones que comprenden derivados del Factor VII inactivado pueden administrarse también sistémica o localmente para la colocación de injertos vasculares (p. ej., mediante el revestimiento de injertos vasculares arteriales naturales modificados o sintéticos), en sitios de anastomosis, endarterectomía quirúrgica (típicamente endarterectomía de arteria carótida), injertos de bypass, y similares.

[0214] En el tratamiento de la trombosis venosa profunda establecida y/o embolia pulmonar, la dosis de derivados del Factor VII varía de aproximadamente 50 µg a 500 mg/día, más típicamente de 1 mg a 200 mg/día, y más preferiblemente de 10 mg a aproximadamente 175 mg/día para un paciente de 70 kg como dosis de carga y de mantenimiento, dependiendo del peso del paciente y de la gravedad de la enfermedad. Debido a la menor probabilidad de complicaciones hemorrágicas a partir de infusiones de derivados del Factor VII inactivado, los derivados del Factor VII inactivado pueden reemplazar o bajar la dosis de heparina durante o después de la cirugía conjuntamente con trombectomías o embolectomías.

[0215] En casos de bacteriemia aguda, endotoxemia o DIC, se da al paciente una dosis de carga de un derivado del Factor VII de al menos aproximadamente 50 µg a 500 mg/día, más típicamente de 1 mg a 200 mg/día, y más preferiblemente de 10 mg a aproximadamente 175 mg/día para un paciente de 70 kg, con dosis de mantenimiento después en el rango de 50 µg a 500 mg/día, típicamente de 1 mg a 200 mg/día para un paciente de 70 kg.

[0216] Preferiblemente, el derivado del Factor VII tiene una vida media ( $t_{1/2}$ ) que ha mejorado en relación a la vida media del Factor VII no conjugado a partir del cual se derivó. Preferiblemente, la vida media del derivado del Factor VII se mejora en al menos 1,5 a 2 veces, más preferiblemente de aproximadamente 2 a 3 veces, incluso más preferiblemente de aproximadamente 5 veces a 10 veces, óptimamente aproximadamente 100 veces, normalmente aproximadamente 6 veces en relación a la vida media del Factor VII progenitor no modificado.

[0217] Métodos generales de enlazar polietilenglicol a proteínas se describen en Pat. EE. UU. n.º 4,179,337 expedida 18 Dec. 1979 (incorporada aquí por referencia para revelar métodos de enlazar polietilenglicol a proteínas). Además, otros métodos de enlazar polietilenglicol se describen en Pat. EE. UU. n.º 5,122,614 expedida 16 Jun. 1992, también incorporada aquí por referencia para revelar métodos de enlazar polietilenglicol a proteínas. El Maleimida-PEG es quizás el reactivo más útil para la PEGilación de cisteína, pero otras reacciones químicas están disponibles para modificaciones específicas de cisteína.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0218] La forma de realización se describe en más detalle en los ejemplos con referencia a los dibujos anexos donde

Fig. 1 la estructura del Factor VII de coagulación humana correctamente procesada, aminoácidos 1 a 406, con residuos gamma carboxilados de Glu (γ) y glicosilación (\*). La flecha en el residuo de aminoácido 152 muestra el sitio donde el Factor VII monocatenario se divide para convertirse en el Factor VII bicatenario activado (FVIIa).

5

Fig. 2 construcción de plásmidos para la expresión de polipéptidos del Factor VII recombinante humano. El plásmido pLN174 expresa el Factor VII humano con un propéptido conectado naturalmente asociado al Factor VII.

### Ejemplos

10 [0219] La terminología para las sustituciones de aminoácidos usada los siguientes ejemplos son de la siguiente manera. La primera letra representa el aminoácido naturalmente presente en una posición de la SEC ID n.º: 1. El siguiente número representa la posición en la SEC ID n.º: 1. La segunda letra representa el aminoácido diferente que sustituye al aminoácido natural. Un ejemplo es R396C, donde una arginina en la posición 396 de la SEC ID n.º: 1 se sustituye por una cisteína. En otro ejemplo, V158T/M298Q, la valina en la posición 158 de la SEC ID n.º: 1 se sustituye por una treonina y la metionina en la posición 298 de SEC ID n.º: 1 se sustituye por una glutamina en el mismo polipéptido del Factor VII.

15

### Ejemplo 1

Constructo de ADN que codifica FVII-(R396C), FVII-(Q250C), FVII-(P406C), FVII-(407C), FVII-(V158T/M298Q); FVII-(L305V/M306D/D309S), FVII-(K337A), FVII-(L305V), y FVII-(F374P):

20

[0220] Los constructos de ADN que codifican FVII-(R396C), FVII-(Q250C), FVII-(P406C), FVII-(407C) (una Cys C-terminal adicional), FVII-(M298Q), FVII-(L305V/M306D/D309S), FVII-(K337A), FVII-(L305V), y FVII-(F374P) se prepararon por mutagénesis dirigida al sitio utilizando un vector de ADN bicatenario superenrollado con un inserto de FVII (pLN174) humano y dos cebadores sintéticos con la mutación deseada. Los siguientes cebadores fueron usados:

25

Para FVII-(R396C):

5'-GCG CTC AGA GCC ATG CCC AGG AGT CCT CC-3' (SEC ID n.º: 3)

30

5'-GGA GGA CTC CTG GGC ATG GCT CTG AGC GC-3' (SEC ID n.º: 4)

Para FVII-(Q250C):

5'-GCT CCG CCT GCA CTG TCC CGT GGT CCT CAC TGA CC-3' (SEC ID n.º: 5)

35

5'-GGT CAG TGA GGA CCA CGG GAC AGT GCA GGC GGA GC-3' (SEC ID n.º: 6)

Para FVII-(P406C):

40

5'-GCG AGC CCC ATT TTG CTA GAC TAG AGG ATC TGG G-3' (SEC ID n.º: 7)

5'-CCC AGA TCC TCT AGT CTA GCA AAA TGG GGC TCG C-3' (SEC ID n.º: 8)

45

Para FVII-(407C):

5'-CCT GCG AGC CCC ATT TCC CTG TTA GAC TAG AGG ATC TGG G-3' (SEC ID n.º: 9)

5'-CCC AGA TCC TCT AGT CTA ACA GGG AAA TGG GGC TCG CAG G-3' (SEC ID n.º: 10)

50

Para FVII-(M298Q):

5'-GCC CTG GAG CTC CAG GTC CTC AAC GTG CCC-3' (SEC ID n.º: 11)

55

5'-GGG CAC GTT GAG GAC CTG GAG CTC CAG GGC-3' (SEC ID n.º: 12)

Para FVII-(L305V):

5'-CGT GCC CCG GGT GAT GAC CCA GGA C-3' (SEC ID n.º: 13)

60

5'-GTC CTG GGT CAT CAC CCG GGG CAC G-3' (SEQ ID n.º: 14)

Para FVII-(M306D/D309S):

5'-TCT AGA TAC CCA GTC TTG CCT GCA GCA GTC ACG GAA-3' (SEC ID n.º: 15)

5 5'-TTC CGT GAC TGC TGC AGG CAA GAC TGG GTA TCT AGA-3' (SEC ID n.º: 16)

Para FVII-(K337A):

10 5'-CGG ATG GCA GCG CGG ACT CCT GCA AGG G-3' (SEQ ID n.º: 17)

5'-CCC TTG CAG GAG TCC GCG CTG CCA TCC G-3' (SEQ ID n.º: 18)

Para FVII-(F374P):

15 5'-CCG TGG GCC ACC CTG GGG TGT ACA CC-3' (SEC ID n.º: 19)

5'-GGT GTA CAC CCC AGG GTG GCC CAC GG-3' (SEC ID n.º: 20)

20 [0221] Los oligonucleótidos cebadores, cada uno complementario a cadenas opuestas del inserto de vector, se extendieron durante una 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 progenitor y para seleccionar el ADN sintetizado que contiene mutaciones.

25 [0222] 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 (véase PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, EE. UU.).

### Ejemplo 2

30 Preparación de FVII-(R396C).

[0223] 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 FVII-(R396C). El polipéptido del Factor VII fue purificado de la siguiente manera:

35 [0224] 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 mediante un gradiente de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 al 0,1%, pH 8,0 a Tris 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 25 mM, Tritón X-100 al 0,1%, pH 7,5.  
40 Las fracciones que contienen FVII-(R396C) 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 CaCl<sub>2</sub> 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 CaCl<sub>2</sub>. Antes del uso o del almacenamiento, se añade un exceso de CaCl<sub>2</sub> sobre EDTA o FVII-(R396C) fue transferido a un tampón conteniendo Ca<sup>2+</sup>. 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

50 Preparación de FVII-(M298Q).

[0225] 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 FVII-(V158T/M298Q). El polipéptido del Factor VII fue purificado de la siguiente manera:

55 [0226] 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 mediante un gradiente de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 al 0,1%, pH 8,0 a Tris 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 25 mM, Tritón X-100 al 0,1%, pH 7,5.  
60 Las fracciones que contienen FVII-(V158T/M298Q) fueron agrupadas, se añadió CaCl<sub>2</sub> 10 mM, y se aplicaron 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  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{CaCl}_2$ . Antes del uso o del almacenamiento, se añade un exceso de  $\text{CaCl}_2$  sobre EDTA o FVII-(V158T/M298Q) fue transferido a un tampón conteniendo  $\text{Ca}^{2+}$ . 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 FVII-(L305V/M306D/D309S).

[0227] 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 FVII-(L305V/M306D/D309S). El polipéptido del Factor VII fue purificado de la siguiente manera:

[0228] 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 mediante un gradiente de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, Tritón X-100 al 0,1%, pH 8,0 a Tris 10 mM, NaCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  25 mM, Tritón X-100 al 0,1%, pH 7,5. Las fracciones que contienen FVII- (L305V/M306D/D309S) fueron agrupadas, se añadió  $\text{CaCl}_2$  10 mM, y se aplicaron a una columna de 25 ml que contiene un anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a sefrosa 4B activada por CNBr (Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con Hepes 50 mM, pH 7,5, que contiene  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{CaCl}_2$ . Antes del uso o del almacenamiento, se añade un exceso de  $\text{CaCl}_2$  sobre EDTA o FVII-(L305V/M306D/D309S) fue transferido a un tampón conteniendo  $\text{Ca}^{2+}$ . 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

##### Ensayo de Hidrólisis *In Vitro*

[0229] 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, Dinamarca). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida (S-2288, Chromogenix, Suecia), 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,  $\text{CaCl}_2$  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, EE. UU.). 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:

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

#### Ejemplo 6

##### Ensayo de Proteólisis *In Vitro*

[0230] 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, Dinamarca). 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,  $\text{CaCl}_2$  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 del sustrato cromogénico Z-D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Suecia), concentración final 0,5 mM. La absorbancia a 405 nm se mide en continuo en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EE. UU.). 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:

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

**Ejemplo 7**

Actividades relativas de los polipéptidos del FVIIa medidas en los ensayos descritos en los ejemplos 5 y 6

5 [0231]

Variante	Proporción en el ejemplo 5	Proporción en el ejemplo 6
FVIIa-(M298Q)	3,5 ± 0,2	12 ± 1
FVIIa-(V158D/E296V/M298Q)	7,5 ± 0,4	38 ± 5
FVIIa-(K337A)	4,0 ± 0,2	4,1 ± 0,4
FVIIa-(L305V/M306D/D309S)	3,0 ± 0,1	3,7 ± 0,3
FVIIa-(L305V)	3,2 ± 0,2	3,3 ± 0,2
FVIIa-(F374P)	1,4	<1
FVIIa-(R396C)	1,0	1,0
FVIIa-(Q250C)	1,0	1,5
FVIIa-(P406C)	0,8	1,0
FVIIa-(407C)	1,1	1,4
peso-FVIIa	1,0	1,0

**Ejemplo 8**

10 Conjugación PEG de FVII-(R396C), FVII-(Q250C), FVII-(P406C), FVII-(407C)

[0232] Las variantes del Factor VIIa como se describe en el ejemplo 1, con un grupo tiol libre introducido en cualquiera de las posiciones mencionadas (250, 396,406 o 407 (este último extendido por el extremo C-terminal)) se hacen reaccionar con un exceso 5 veces mayor, en molar, de PEG-vinilsulfona o PEG-maleimida (alternativamente se puede utilizar cualquier otro derivado de PEG que reaccione con sulfhidrilo) en un tampón acuoso durante 3 horas para llevar a cabo la reacción prácticamente hasta la finalización. El peso molecular del derivado de PEG es al menos 10 000. Los FVIIa modificados con PEG resultantes se evalúan en cuanto a la actividad proteolítica y amidolítica como se describe en los ejemplos 5 y 6 y deberían retener la actividad del FVIIa de tipo salvaje humano, o si una Cys se ha introducido en una variante de FVIIa con mayor actividad, la actividad después de la reacción con el derivado de PEG debería permanecer superior que la del FVIIa tipo salvaje humano. El FVIIa conjugado con PEG se separa de la variante no reaccionada y del derivado de PEG libre mediante cromatografía tal como filtración en gel en una columna de Superdex-200 o similar. La conjugación PEG de proteínas en residuos de Cys se conoce por el experto en la técnica y está descrita en diferentes publicaciones incluyendo Goodson, R. J. & Katre, N. V. (1990) Bio/Technology 8, 343 y Kogan, T. P. (1992) Synthetic Comm. 22, 2417.

25

## LISTADO DE SECUENCIAS

[0233]

30

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Derivados de Factor VII de coagulación

<130> 6286-WO

35

<150> DK PA 2001 00477

<151> 2001-03-22

<160> 20

40

<170> Versión de patentIn 3.1

<210> 1

<211> 406

45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

50

<222> (1)..(406)

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

<400> 1

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

ES 2 432 967 T3

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys  
 100 105 110  
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr  
 115 120 125  
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg  
 130 135 140  
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln  
 165 170 175  
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala  
 180 185 190  
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu  
 195 200 205  
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg  
 210 215 220  
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp  
 245 250 255  
 His val val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr  
 260 265 270  
 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> 6098  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> plásmido ADN pLN174

<400> 2

```

ttcgagctct gcactccgcc cgaaaagtgc gctcggctct gccaaaggacg cggggcgcgt      60
gactatgctg gggctggagc aaccgcctgc tgggtgcaaa ccctttgcgc ccggactcgt      120
ccaacgacta taaagagggc aggctgtcct ctaagcgtca cccgggatcc atggtctccc      180
aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct gcagtcttcg      240
taaccagga ggaagcccaa ggcgtcctgc accggcgccg gcgccaac gcgttcttgg      300
aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc tccttcgagg      360
aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt tcttacagtg      420
atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctctgcaag gaccagctcc      480
agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag acgcacaagg      540
atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc agtgaccaca      600
cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca gacggggtgt      660
cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa aaaagaaatg      720
ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg gagtgtccat      780
ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg atcaacacca      840
tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg aacctgatcg      900
cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc cggcgggtgg      960
cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac atcgcgctgc     1020
    
```

tccgcctgca	ccagcccgtg	gtcctcactg	accatgtggt	gccccctctgc	ctgccccgaac	1080
ggacgttctc	tgagaggacg	ctggccttcg	tgcgcttctc	attggtcagc	ggctggggcc	1140
agctgctgga	ccgtggcgcc	acggccctgg	agctcatggt	cctcaacgtg	ccccggctga	1200
tgaccagga	ctgcctgcag	cagtcacgga	aggtgggaga	ctccccaaat	atcacggagt	1260
acatgttctg	tgccggctac	tcggatggca	gcaaggactc	ctgcaagggg	gacagtggag	1320
gcccacatgc	caccactac	cggggcacgt	ggtacctgac	gggcatcgtc	agctggggcc	1380
agggtgcgc	aaccgtgggc	cactttgggg	tgtacaccag	ggtctcccag	tacatcgagt	1440
ggctgcaaaa	gctcatgcgc	tcagagccac	gcccaggagt	cctcctgcga	gccccatttc	1500
cctagactag	aggatctggg	gtggcatccc	tgtgaccctc	ccccagtgcc	tctcctggcc	1560
ctggaagtgt	ccactccagt	gcccaccagc	cttgtcctaa	taaaattaag	ttgcatcatt	1620
ttgtctgact	aggtgtcctt	ctataatatt	atgggggtgga	ggggggtggt	atggagcaag	1680
gggcaagtgt	ggaagacaac	ctgtagggcc	tgcggggtct	attgggaacc	aagctggagt	1740
gcagtggcac	aatcttggct	cactgcaatc	tccgcctcct	gggttcaagc	gattctcctg	1800
cctcagcctc	ccgagttggt	gggattccag	gcatgcatga	ccaggctcag	ctaatttttg	1860
tttttttggg	agagacgggg	ttcaccata	ttggccaggc	tggtctccaa	ctcctaattct	1920
caggtgatct	accacacttg	gcctcccaaa	ttgctgggat	tacaggcgtg	aaccactgct	1980
cccttcctg	tccttctgat	tttaaaataa	ctataccagc	aggaggacgt	ccagacacag	2040
cataggctac	ctggccatgc	ccaaccgggt	ggacatttga	gttgcttgc	tggaactgtc	2100
ctctcatgcg	ttgggtccac	tcagtagatg	cctgttgaat	tcgagctcgc	ccgggctcta	2160
gctagagtcg	acctgcaggc	atgcaagctt	tggcaactggc	cgtcgtttta	caacgctcgtg	2220
actgggaaaa	ccctggcgtt	acccaactta	atcgccttgc	agcacatccc	cctttcgeca	2280
gctggcgtaa	tagcgaagag	gcccgcaccg	atcgccttc	ccaacagttg	cgcagcctga	2340
atggcgaatg	gcgctgatg	cggtattttc	ttccttacgc	atctgtgcgg	tatttcacac	2400
cgcatatggt	gactctcag	tacaatctgc	tctgatgccg	catagttaag	ccagccccga	2460
caccgccea	caccgctga	cgcgccctga	cgggcttgtc	tgctcccggc	atccgcttac	2520
agacaagctg	tgaccgtctc	cgggagctgc	atgtgtcaga	ggttttcacc	gtcatcaccg	2580
aaacgcgcga	gacgaaaggg	cctcgtgata	cgcctatfff	tataggttaa	tgtcatgata	2640
ataatggttt	cttagacgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacccttatt	2700
tgtttatttt	tctaaataca	ttcaaataatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	2760
atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	tgctgccctt	2820
attccctttt	ttgcggcatt	ttgccttctc	gtttttgctc	accagaaaac	gctggtgaaa	2880
gtaaaagatg	ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	2940
agcggtaaga	tccttgagag	tttcgcccc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcactttt	3000
aaagttctgc	tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggg	3060

cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat 3120  
 cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataacat gagtgataac 3180  
 actgcgcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg 3240  
 cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcggttgg gaaccggagc tgaatgaagc 3300  
 cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgacgaa 3360  
 actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 3420  
 ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccggcctt ccggctggct ggtttattgc 3480  
 tgataaatct ggagccgggt agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 3540  
 tggtaaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 3600  
 acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 3660  
 ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat 3720  
 ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaactc ccttaacgtg agttttcgtt 3780  
 ccactgagcg tcagaccccc tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 3840  
 gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgccg 3900  
 gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 3960  
 aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagaccg 4020  
 cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 4080  
 tgtcttaccg ggttggaactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 4140  
 acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 4200  
 ctacagcgtg agctatgaga aagcgcacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggat 4260  
 ccggtaaagc gcagggctcg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 4320  
 tggatcctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 4380  
 tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc 4440  
 ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 4500  
 gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 4560  
 cgcagcagat cagttagcga ggaagcggaa gagcgcctaa tacgcaaacc gcctctcccc 4620  
 gcgcggttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc 4680  
 agtgagcga acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt aggcacccca ggctttacac 4740  
 tttatgctt cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga 4800  
 aacagctatg accatgatta cgaattcatc gatatctaga tccagacatg ataagataca 4860  
 ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtga aaatgcttt atttgtgaaa 4920  
 tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca gttaacaaca 4980  
 acaattgcat tcattttatg tttcaggtt agggggaggt gtgggaggtt ttttaaagca 5040  
 agtaaacct ctacaaatgt ggtatggctg attatgatct aaagccagca aaagtcccat 5100

ggtcttataa aaatgcatag ctttaggagg ggagcagaga acttgaaagc atcttcctgt 5160  
 tagtctttct tctcgtagac ttcaaactta tacttgatgc ctttttctc ctggacctca 5220  
 gagaggacgc ctgggtattc tgggagaagt ttatatttcc ccaaataat ttctgggaaa 5280  
 aacgtgtcac tttcaaattc ctgcatgac cttgtcacia agagtctgag gtggcctggt 5340  
 tgattcatgg cttcctggta aacagaactg cctccgacta tccaaacctat gtctacttta 5400  
 cttgcccaatt ccggttggtc aataagtctt aaggcatcat ccaaactttt ggcaagaaaa 5460  
 tgagctctc gtggtggtc tttgagttct ctactgagaa ctatattaat tctgtccttt 5520  
 aaaggtcgat tcttctcagg aatggagaac caggttttcc taccataat caccagattc 5580  
 tgtttacctt ccaactgaaga ggttggtggtc attccttggga agtacttgaa ctggttctg 5640  
 agcggaggcc agggtaggtc tccgttcttg ccaatccca tattttggga cacggcgacg 5700  
 atgcagttca atggtcgaac catgatggca cggatctcga gctcgcgaaa gctttttgca 5760  
 aaagcctagg cctccaaaaa agcctctca ctacttctgg aatagctcag aggccgaggc 5820  
 ggcctcggcc tctgcataaa taaaaaaaaat tagtcagcca tggggcggag aatgggcgga 5880  
 actgggcgga gttaggggcg ggatgggcgg agttaggggc gggactatgg ttgctgacta 5940  
 attgagatgc atgctttgca tacttctgcc tgctggggag cctggggact ttccacacct 6000  
 ggttgctgac taattgagat gcatgctttg catacttctg cctgctgggg agcctgggga 6060  
 ctttccacac cctaactgac acacattcca caggggaa 6098

5 <210> 3  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
 10 <400> 3  
 gcgctcagag ccatgccag gactctcc 29  
  
 15 <210> 4  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
  
 <400> 4  
 ggaggactcc tggcatgac tctgagcgc 29  
  
 25 <210> 5  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
  
 <400> 5  
 gctccgctg cactgtccc tggctctcac tgacc ???35

<210> 6  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
  
 10 <400> 6  
 ggtcagtgag gaccacggga cagtgcaggc ggagc 35  
  
 <210> 7  
 <211> 34  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
 20  
 <400> 7  
 tttgctaga de gcgagcccca ctgaggatc tggg 34  
  
 <210> 8  
 <211> 34  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Cebador de nucleótido  
  
 <400> 8  
 cccagatcct ctagtctagc aaaatggggc tcgc 34  
  
 35 <210> 9  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
  
 <400> 9  
 45 cctgcgagcc ccatttcct gtagactag aggatctggg 40  
  
 <210> 10  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
  
 <400> 10  
 55 cccagatcct ctagtctaac agggaaatgg ggctcgagg 40  
  
 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
  
 65 <400> 11  
 gccctggagc tccaggtcct caacgtgcc 30

<210> 12  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
  
 10 <400> 12  
 gggcacgttg aggacctgga gctccagggc 30  
  
 <210> 13  
 <211> 25  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
 20  
 <400> 13  
 cgtgccccgg gtgatgacctc aggac 25  
  
 <210> 14  
 25 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Cebador de nucleótido  
  
 <400> 14  
 gtctctgggtc atcaccgagg gcacg 25  
  
 35 <210> 15  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
  
 <400> 15  
 45 tctagatacc cagtcttgcc tgcagcagtc acgga 36  
  
 <210> 16  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
  
 <400> 16  
 55 ttccgtgact tctaga de agactgggta de gctgcaggca 36  
  
 <210> 17  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador de nucleótido  
  
 65 <400> 17  
 cggatggcag cgaggactcc tgcaaggg 28

<210> 18  
<211> 28  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador de nucleótido

10 <400> 18  
ccctgcagg agtccgcgct gccatccg 28

<210> 19  
<211> 26  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador de nucleótido

20 <400> 19  
ccgtgggcca ccctggggtg tacacc 26

<210> 20  
25 <211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
30 <223> Cebador de nucleótido

<400> 20  
ggtgtacacc ccagggtggc ccacgg 26

35

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Polipéptido del factor VII que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º: 1 o una variante de la misma, donde el polipéptido del Factor VII tiene la misma actividad o mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante de tipo salvaje humano donde una cisteína se ha añadido al extremo C-terminal de SEC ID n.º: 1 o de la variante de la misma.
- 10 2. Polipéptido del factor VII según la reivindicación 1, donde la cisteína añadida al C-terminal se conjuga con un grupo químico que aumenta el peso molecular real de dicho polipéptido del Factor VII con aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 100 000 Daltons y donde dicho polipéptido del factor VII tiene sustancialmente la misma actividad o una mayor actividad en comparación con el Factor VIIa recombinante humano de tipo salvaje.
- 15 3. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido del Factor VII según la reivindicación 2 y, un portador farmacéuticamente aceptable.
4. Polipéptido del Factor VII según la reivindicación 2 para el uso en el tratamiento de hemofilia A o B.

20

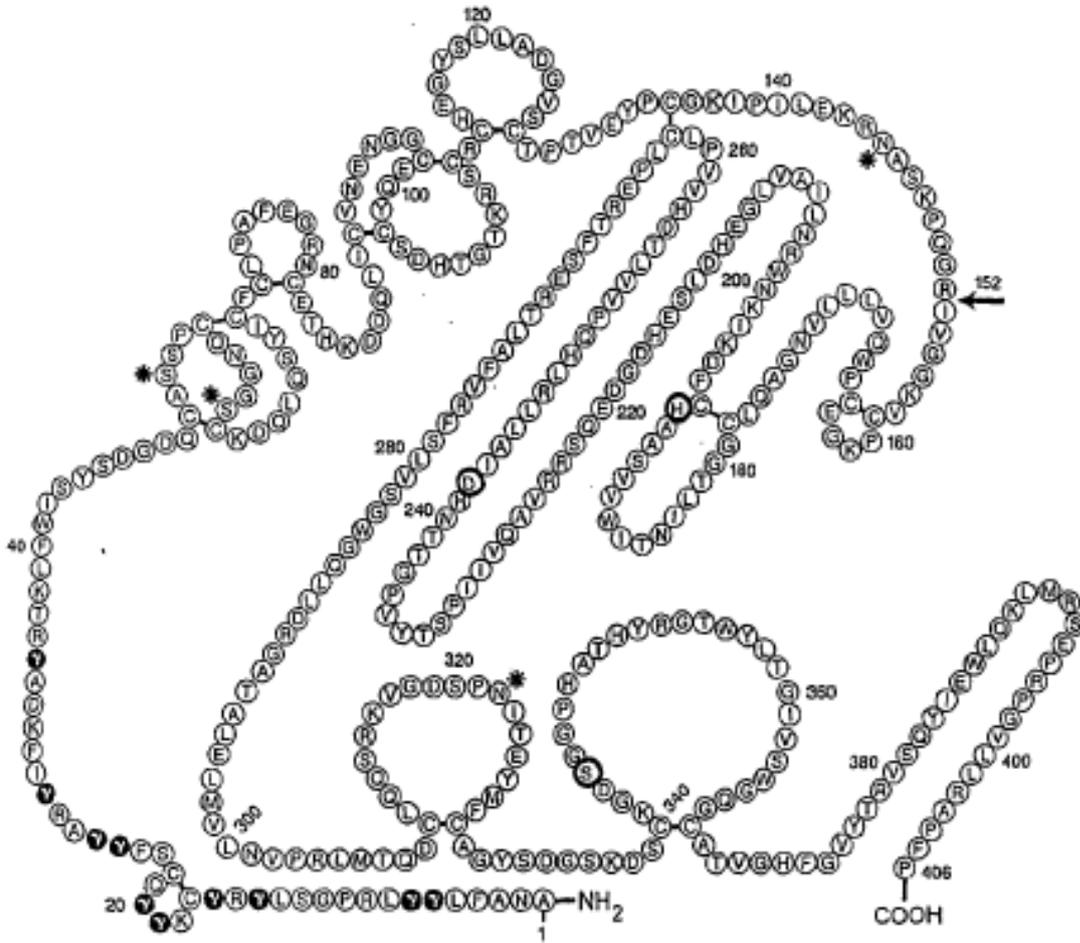


Fig. 1

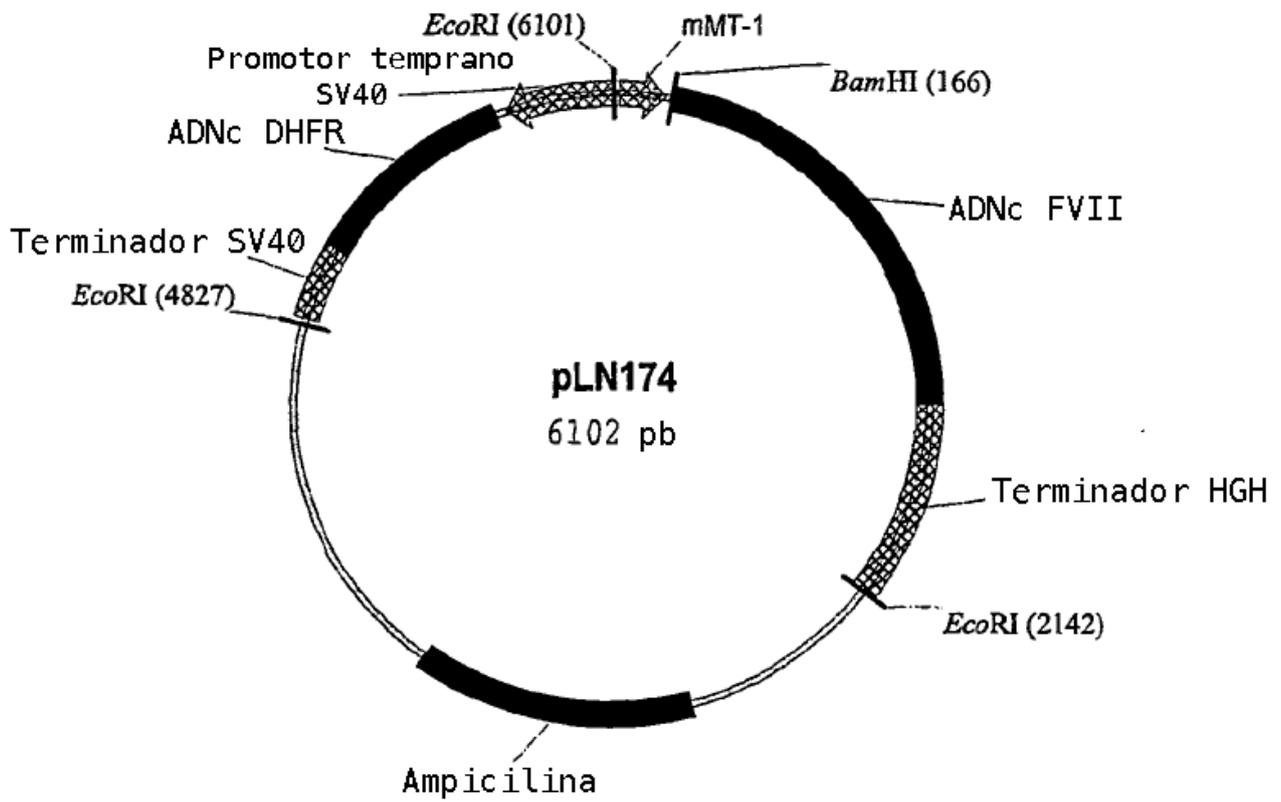


Fig. 2