

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 032**

51 Int. Cl.:

C07K 1/113 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2006 E 06763772 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1893631**

54 Título: **Compuestos de FVIIA diméricos y multiméricos**

30 Prioridad:

17.06.2005 EP 05105362
08.12.2005 EP 05111854

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ØSTERGAARD, HENRIK y
STENNICKE, HENNING, RALF

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 434 032 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

Compuestos de FVIIa diméricos y multiméricos.

CAMPO DE LA INVENCION

5 **[0001]** La presente invención se refiere a nuevos compuestos de FVIIa, métodos para su síntesis, composiciones farmacéuticas que comprenden los nuevos compuestos, así como su uso en el tratamiento de trastornos de la coagulación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 **[0002]** El factor de coagulación VIIa (FVIIa) es el iniciador clave de la hemostasia. Es una proteína de plasma de 50 kDa con una vida media circulatoria funcional alrededor de 1-3 horas. El zimógeno, el FVII, es una proteína monocatenaria que es catalíticamente inactiva y puede ser convertida en el FVIIa bicatenario catalíticamente activa mediante la escisión de un enlace peptídico interno de Arg₁₅₂-Ile₁₅₃. El FVIIa se utiliza ampliamente como proteína terapéutica para el tratamiento de diversos trastornos de la coagulación que pueden ser causados por deficiencias de factores de coagulación o inhibidores del factor de coagulación. El FVIIa se ha utilizado también para controlar el sangrado excesivo observado en sujetos con una cascada de coagulación de sangre que funciona de forma normal. Tal sangrado puede, por ejemplo, ser causado por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand, así como durante la cirugía y otras formas de daño tisular.

20 **[0003]** Para muchas de las aplicaciones terapéuticas de FVIIa es deseable llevar a cabo el tratamiento usando variantes de FVIIa con propiedades mejoradas en relación con el FVIIa nativo. Un área donde las variantes de FVIIa con actividad biológica mejorada son deseables es el tratamiento de hemorragias no controladas que son parcial o totalmente refractarias a la terapia con rFVIIa convencional debido a la potencia subóptima del FVIIa. En la actualidad las, así llamadas, variantes del FVIIa súper activas se pueden dividir en dos clases según su modo de acción. Un grupo abarca variantes con la mejora de la actividad proteolítica resultante de un cambio en el equilibrio conformacional de la proteína hacia el estado catalíticamente competente, véase, por ejemplo, Persson et al. (2001a), (2001b), (2002), (2004) y Soejima et al. (2002). El otro grupo es principalmente variantes con dominios GLA optimizados que muestran un aumento de la afinidad para fosfolípidos aniónicos de membranas (Shah et al. (1998), Nelsestuen et al. (2001) y Harvey et al. (2003)). Se cree que una unión de fosfolípidos mejorada sirve para localizar y concentrar el FVIIa en la membrana de las plaquetas activadas en el sitio de la lesión vascular fomentando con ello la hemostasia.

30 **[0004]** La modificación covalente, por ejemplo, mediante pegilación o unión de lípidos, se ha aplicado con éxito en varios productos farmacéuticos basados en proteínas para mejorar sus perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos. La conjugación a través de cisteínas nativas o desarrolladas por ingeniería genética proporciona un atractivo medio de modificación específica del sitio debido a la rareza de este aminoácido en la superficie de las proteínas, en particular aquellas secretadas por la célula, así como la alta selectividad de la química de acoplamiento de tioles. La falta de tioles libres en el Factor VIIa nativo ha dado lugar a la propuesta de que la prolongación de la vida media en circulación podría lograrse mediante la modificación, por ejemplo, pegilación, de cisteínas expuestas a disolvente desarrolladas por ingeniería genética, véase, por ejemplo, el documento WO 02/077218 A1 y WO 01/58935 A2 .

40 **[0005]** Por lo tanto, el documento WO 01/58935 A2 divulga conjugados de FVIIa con fracciones no polipeptídicas y su preparación. En general, se sugiere que la fracción no polipeptídica está conjugada con el polipéptido de FVIIa a través de una cisteína. Asimismo, el documento WO 02/077218 A1 divulga conjugados polipéptidos de FVIIa con grupos químicos y su preparación. En general, se sugiere que el grupo químico está conjugado con el polipéptido de FVIIa a través de una cisteína.

[0006] En la práctica, sin embargo, este enfoque no siempre garantiza compuestos de FVIIa con la combinación óptima de perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos, es decir, alta actividad, vida media circulatoria prolongada, etc.

45 **[0007]** Por lo tanto, existe una necesidad de compuestos del FVIIa mejorados que muestren una alta actividad específica, una vida media de plasma prolongada, así como propiedades físico-químicas aceptables en relación con la fabricación, manipulación y formulación.

[0008] El documento WO 03/076461 divulga antagonistas diméricos del factor tisular y su uso en el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades vasculares y enfermedades inflamatorias.

50 **[0009]** El documento SE 9501285A divulga un proceso para la producción *in vitro* de proteínas de disulfuro reticulado biológicamente activas y apropiadamente plegadas que utilizan una mezcla de una proteína disulfuro oxidoreductasa (p. ej. proteína disulfuro isomerasa (PDI)), una glutarredoxina y un tampón redox. La referencia se centra en cisteínas involucradas en enlaces disulfuro intramoleculares.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] Con el fin de superar las limitaciones anteriormente mencionadas de los compuestos conocidos del FVIIa, la presente invención proporciona ahora compuestos diméricos y multiméricos del FVIIa que comprenden al menos dos polipéptidos del FVIIa conectados covalentemente de manera que retengan la actividad catalítica intrínseca de los polipéptidos del FVIIa. Tales compuestos de FVIIa han mostrado sorprendentemente ser súper activos y se cree que presentan una mayor afinidad por la membrana como resultado del efecto de avidéz que surge cuando dos o más polipéptidos del FVIIa están unidos covalentemente.

[0011] En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto del FVIIa en el que dos polipéptidos del FVIIa están conectados covalentemente para formar un compuesto dímero del FVIIa. En una forma de realización, los polipéptidos del FVIIa están conectados covalentemente a través de cisteínas desarrolladas por ingeniería genética en dichos polipéptidos del FVIIa. En otra forma de realización, dos polipéptidos idénticos del FVIIa están conectados covalentemente para formar un compuesto dímero del FVIIa.

[0012] En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto dimérico o multimérico del FVIIa que comprende un enlazador entre los polipéptidos constituyentes de FVIIa.

[0013] El término "retener la actividad catalítica intrínseca" se refiere a la propiedad de que los polipéptidos diméricos o multiméricos de FVIIa tienen sustancialmente la misma actividad peptidolítica que la de los polipéptidos constituyentes de FVIIa, por ejemplo, una concentración de sitio activo que es al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 80 %, tal y como se mide por el ensayo divulgado en el presente documento.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0014]

Figura 1: Identificación de los tioles de bajo peso molecular que participan en disulfuros mixtos con FVIIa 407C. La proteína fue incubada en presencia de TCEP y SBD-f para liberar y derivatizar los tioles unidos al Cys407 desarrollado por ingeniería genética en la preparación de FVIIa 407C. Tioles derivatizados con SBD se separaron mediante HPLC de fase inversa y se detectaron mediante fluorescencia (longitudes de onda de excitación y emisión de 386 y 516 nm, respectivamente). Trazas de HPLC de FVIIa de tipo salvaje y una serie de compuestos de tiol de bajo peso molecular (10 pmol de cada uno; norma indicada) se muestran para su comparación. Los valores máximos marcados con asterisco surgen de impurezas en la cisteamina comercialmente disponible. Los dos asteriscos indican un valor máximo de identidad desconocida en la traza de HPLC de FVIIa 407C. Los porcentajes sobre cada punto máximo indican la cantidad de una especie de tiol determinado (identificados a partir de su tiempo de retención) en relación con la cantidad de FVIIa 407C analizado. En base a los tiempos de retención, se puede concluir que los principales tioles conjugados con FVIIa 407C son el glutatión, la cisteína y la homocisteína. Abreviaturas: GSH (glutatión), γ -GC (γ -glutamilcisteína), CG (cisteinilglicina), Cys (cisteína), Hcy (homocisteína) y Cya (cisteamina).

Figura 2: Actividad amidolítica residual de FVIIa incubado a pH 7 en presencia de concentraciones variables de glutatión reducido y oxidado (dado por la proporción $[GSH]^2/[GSSG]$), 1 μ M de levadura glutaredoxina 1 (yGrx1p), y bien nada (círculos abiertos) o p-aminobenzamidina 25 mM (cuadrados abiertos). Todas las muestras se dejaron equilibrar durante 3,5 horas a 30 °C antes de medir la actividad amidolítica. Las actividades amidolíticas se normalizan a 1 para FVIIa totalmente activo.

Figura 3: Titulación redox de disulfuro mixto entre FVIIa Cys407 y glutatión. El FVIIa 407C se dejó equilibrar en tampón de pH 7 con proporciones variables de glutatión reducido y oxidado (dado por la proporción $[GSH]/[GSSG]$) y 10 μ M de E. coli glutaredoxina 2 (Grx2). Después de equilibrar durante 5 horas a 30 °C, se detectó y cuantificó FVIIa 407C libre por HPLC después de la alquilación con maleimida PEG5K. Las áreas de los valores máximos se normalizan a 1 para FVIIa totalmente 5k-pegilado.

Figura 4: Actividad amidolítica residual (líneas punteadas) y la fracción de FVIIa 407C con un grupo tiol libre de Cys407 (línea continua) en equilibrio en un tampón redox que consta de GSH 0,5 mM, concentraciones variables de GSSG, y, o bien ningún (- PABA) o p-aminobenzamidina 25 mM (+ PABA). Las curvas fueron dibujadas usando Eq. 2 y 4, K_{ox} valores de 93 (-PABA) y 166 mM (+PABA), respectivamente, y a K_{sox} valor de 1.02. El área sombreada indica el intervalo de concentración de GSSG resultante en > 90 % de actividad residual y > 90 % de tiol 407C libre.

Figura 5: Como en la Figura 4 pero con GSH 0.25 mM en su lugar. El área sombreada indica el intervalo de concentración de GSSG resultante en > 90 % de actividad residual y > 90 % de tiol FVIIa 407C libre.

Figura 6: Como en la Figura 4 pero con GSH 1.0 mM en su lugar. El área sombreada indica el intervalo de concentración de GSSG resultante en > 90 % de actividad residual y > 90 % de tiol FVIIa 407C libre.

Figura 7: Análisis por HPLC de FVIIa 407C antes (línea punteada) y después de la reducción selectiva (línea de rayas y puntos), y después de la modificación con PEG20k-maleimida (línea continua). 407C, 407C-SR, y 407C-PEG20k indican valores máximos que representan tiol conjugado libre de bajo peso molecular y FVIIa 407C 20k-pegilado, respectivamente. Los asteriscos indican valores máximos de identidad desconocida probablemente representando especies hiper-pegiladas. La integración de los valores máximos dio 89 % libre de FVIIa 407C al final de la etapa de reducción frente al 11 % en el material no tratado. Después de la alquilación de tioles, el 85 % del FVIIa 407C se convirtió en la especie de mono-pegilado.

Figura 8: Análisis SDS-PAGE reductor (panel derecho) y no reductor (panel izquierdo) de FVIIa 407C (línea A), FVIIa 407C- PEG5k (línea B), FVIIa 407C-PEG20k (línea C), FVIIa 407C-PEG40k (línea D), y FVIIa 407C-PEG3.4k-FVIIa 407C (línea E).

Figura 9: Análisis SDS-PAGE reductor (panel derecho) y no reductor (panel izquierdo) de FVIIa 407C (línea A), FVIIa 407C PEG3.4k FVIIa-407C (línea B), FVIIa 407C-407C PEG20k-FVIIa (línea C).

Figura 10: (A) Análisis SDS-PAGE reductor de FVIIa R396C tratado con 2.5 (línea A) o 5.0 mM (línea B) ácido trifenílfosfina-3,3',3"-trisulfónico (PPh₃ S₃) durante 16,3 hrs a temperatura ambiente y luego marcado con PEG20k-maleimida. Línea C contiene FVIIa sin tratar como referencia. (B) Actividades relativas amidolíticas de FVIIa R396C antes (actividad 100 %) y 16,3 horas después de la incubación con PPh₃ S₃.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0015] Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención proporciona compuestos diméricos y multiméricos de FVIIa que comprenden al menos dos polipéptidos de FVIIa conectados covalentemente de una forma tal para mantener la actividad catalítica intrínseca de los polipéptidos de FVII. En una forma de realización el compuesto dimérico o multimérico de FVIIa tiene una concentración de sitio activo que es al menos 70 %, preferiblemente al menos 80 %, de la concentración de sitio activo de los polipéptidos constituyentes de FVIIa tal y como se mide mediante el ensayo divulgado en el presente documento (véase Ejemplo 1). En otra forma de realización, el compuesto dimérico o multimérico de FVIIa tiene un aumento de la actividad biológica en comparación con la actividad biológica de los polipéptidos constituyentes de FVIIa.

[0016] En un aspecto preferido de la invención, dos polipéptidos de FVIIa están conectados covalentemente para formar un compuesto dímero de FVIIa. El compuesto dímero de FVIIa resultante tiene así un peso molecular que suele ser mayor que aprox. 100 kDa.

[0017] En otro aspecto, la invención proporciona compuestos multiméricos de FVIIa que comprende al menos tres polipéptidos de FVIIa conectados covalentemente de una forma tal para mantener la actividad catalítica intrínseca de los polipéptidos de FVIIa.

Polipéptidos de FVIIa

[0018] Un número de diferentes polipéptidos de FVIIa puede estar conectado covalentemente para formar compuestos diméricos o multiméricos de FVIIa según la presente invención.

[0019] El término "polipéptido del Factor VII" o "polipéptido de FVII" tal como se utiliza en el presente documento significa la molécula inactiva de Factor VII zimógeno monocatenario, así como variantes de las misma. El Factor VII zimógeno monocatenario es un polipéptido que comprende 406 residuos de aminoácidos, 10 de los cuales son residuos de ácido glutámico γ -carboxilado, residuos asparagines N-glicosilados (n.º 145 y n.º 322), y residuos de serina O-glicosilada en la posición 52 y 60. Las formas variantes de FVII abarcan i.a. moléculas en las que uno o más residuos de aminoácidos han sido sustituidos, añadidos o eliminados, moléculas con distinto número de residuos GLA, moléculas con un patrón de glicosilación modificado o incompleto. Ejemplos no limitativos de modificaciones de los residuos de aminoácidos son amidación, alquilación, acilación y pegilación.

[0020] El término "polipéptido del Factor VIIa" o "polipéptido de FVIIa" tal como se utiliza en el presente documento significa la molécula activa de Factor VIIa bicatenario, así como variantes de la misma. El Factor VIIa bicatenario es un polipéptido producido a partir de FVII mediante la hidrólisis del enlace peptídico Arg₁₅₂-Ile₁₅₃ de FVII. El FVIIa también comprende 406 residuos de aminoácidos, 10 de los cuales son residuos de ácido glutámico γ -carboxilados, residuos asparagines N-glicosilados (n.º 145 y n.º 322), y residuos de serina O-glicosilada en la posición 52 y 60. Las formas variantes de FVIIa abarcan i.a. moléculas en las que uno o más residuos de aminoácidos han sido sustituidos, añadidos o eliminados, moléculas con distinto número de residuos GLA, moléculas con un patrón de glicosilación modificado o incompleto.

[0021] El término "GLA" tal y como se utiliza en este documento significa ácido 4-carboxiglutámico (γ -carboxiglutamato).

[0022] El término "polipéptido" tal y como se utiliza en este documento significa un compuesto que comprende al menos cinco residuos de aminoácidos constituyentes conectados covalentemente por enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de los aminoácidos codificados por el código genético y pueden ser aminoácidos naturales que no son codificados por el código genético, así como aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos naturales que no son codificados por el código genético son por ejemplo, hidroxiprolina, ácido γ -carboxi-glutámico, ornitina, phophoserine, D-alanina, ácido D-glutámico. Lo aminoácidos sintéticos comprenden los aminoácidos fabricados por síntesis orgánica, por ejemplo, D-isómeros de los aminoácidos codificados por el código genético y Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (terc-butilglicina), y β -alanina. Un polipéptido puede comprender una única cadena peptídica o puede comprender más de una cadena polipeptídica, de tal manera que el FVII sea una sola cadena y FVIIa sean dos cadenas unidas por enlaces disulfuro.

[0023] El término "derivado de Factor VIIa " o "derivado de FVIIa", tal y como se utiliza en este documento, tiene la intención de designar a un polipéptido FVIIa que presenta sustancialmente una actividad biológica igual o mejor en relación con el factor VIIa de tipo salvaje, en el que uno o más de los aminoácidos ácidos del péptido progenitor han sido modificados genéticamente y/o químicamente y/o enzimáticamente, por ejemplo, por alquilación, glicosilación, desglucosilación, pegilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similar. Esto incluye pero no se limita a Factor VIIa pegilado, Factor VIIa humano cisteína-pegilado y variantes de los mismos.

[0024] El término "Factor VIIa pegilado" (y similares) significa un polipéptido del Factor VIIa conjugado con una molécula de PEG. Se ha de entender que la molécula de PEG puede estar unida a cualquier parte del polipéptido de Factor VIIa incluyendo cualquier residuo de aminoácido o fracción de carbohidrato del polipéptido del Factor VIIa. El término "Factor VIIa cisteína-pegilado" significa el polipéptido de Factor VIIa que tiene una molécula de PEG conjugada a un grupo sulfhidrilo de una cisteína no nativa del polipéptido del Factor VIIa.

[0025] Ejemplos no limitantes de derivados del Factor VIIa incluyen los derivados de FVIIa GlicoPegilados como se divulga en el documento WO 03/31464 y las solicitudes de patentes estadounidenses US 20040043446, US 20040063911, US 20040142856, US 20040137557, y US 20040132640 (Neose Technologies, Inc.); conjugados de FVIIa como se divulga en el documento WO 01/04287, la solicitud de patente de EE.UU. 20030165996, los documentos WO 01/58935, WO 03/93465 (Maxygen ApS) y WO 02/02764, solicitud de patente EE.UU. 20030211094 (Universidad de Minnesota).

[0026] El término "actividad biológica mejorada" se refiere a polipéptidos de FVIIa con i) sustancialmente la misma o mayor actividad proteolítica en comparación con el Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante o ii) a polipéptidos de FVIIa sustancialmente la misma o mayor actividad de unión TF en comparación con el Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante o iii) a polipéptidos de FVIIa con sustancialmente la misma o mayor vida media en el plasma sanguíneo en comparación con el Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante.

[0027] El término "Factor VIIa humano pegilado" significa Factor VIIa humano, que tiene una molécula de PEG conjugada con un polipéptido de Factor VIIa humano. Se ha de entender que la molécula de PEG puede estar unida a cualquier parte del polipéptido de Factor VIIa incluyendo cualquier residuo de aminoácido o fracción de carbohidrato del polipéptido del Factor VIIa. El término "Factor VIIa humano cisteína-pegilado" significa Factor VIIa humano que tiene una molécula de PEG conjugada con grupo sulfhidrilo de una cisteína introducida en el Factor VIIa humano.

[0028] Los ejemplos no limitantes de variantes del Factor VIIa que tienen sustancialmente la misma o mayor actividad proteolítica en comparación con el Factor VIIa humano de tipo recombinante incluyen S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino et al., Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); variantes de FVIIa que presentan una mayor estabilidad proteolítica como se divulga en la patente de EE.UU. n.º 5,580,560; Factor VIIa que ha sido proteolíticamente escindido entre los residuos 290 y 291 o entre los residuos 315 y 316 (Mollerup et al., Biotechnol. Bioeng. 48:501-505, 1995); formas oxidadas del Factor VIIa (Kornfelt et al., Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999); variantes de FVIIa como se divulga en PCT/DK02/00189 (correspondientes a WO 02/077218); y variantes de FVIIa que muestran una mayor estabilidad proteolítica como se divulga en el documento WO 02/38162 (Scripps Research Institute); variantes de FVIIa que tienen un dominio Gla modificado y muestran una mejor unión a membrana como se divulga en los documentos WO 99/20767, patentes estadounidenses US 6017882 y US 6747003, solicitud de patente estadounidense 20030100506 (Universidad de Minnesota) y WO 00/66753, solicitud de patente estadounidense US 20010018414, US 2004220106, y US 200131005, patentes estadounidenses US 6762286 y US 6693075 (Universidad de Minnesota); y variantes de FVIIa como se divulga en el documento WO 01/58935, patente estadounidense US 6806063, solicitud de patente estadounidense 20030096338 (Maxygen ApS), WO 03/93465 (Maxygen ApS), WO 04/029091 (Maxygen ApS), WO 04/083361 (Maxygen ApS), y WO 04/111242 (Maxygen ApS), así como en WO 04/108763 (Canadian Blood Services).

[0029] Los ejemplos no limitantes de variantes de FVIIa que tienen aumento de la actividad biológica en comparación con el FVIIa de tipo salvaje incluyen variantes de FVIIa tal y como se divulga en el documento WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, PCT/DK02/00635 (correspondiente a WO 03/027147), solicitud de patente danesa PA 2002 01423 (correspondiente a WO 04/029090), solicitud de patente danesa PA 2001 01627 (correspondiente a WO 03/027147); WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes de FVIIa con una actividad mejorada como se divulga en el documento JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.).

[0030] Ejemplos específicos de polipéptidos de Factores VIIa "desarrollados por ingeniería genética" son aquellos divulgados en el documento WO 02/077218 A1 (Novo Nordisk A/S) y WO 01/58935 A2 (Maxygen ApS) páginas 21-24.

[0031] Particularmente interesantes son los polipéptidos de FVIIa en los que se ha introducido un residuo de cisteína. Los ejemplos de posiciones, en las que los residuos de cisteína se pueden introducir incluyen, pero no se limitan a, las posiciones en los sitios de degradación proteolítica o en sus proximidades. Así, en una forma realización interesante de la invención el residuo(s) de cisteína a introducir, preferiblemente mediante sustitución, se selecciona de entre el grupo constituido por I30C, K32C, D33C, A34C, T37C, K38C, W41C, Y44C, S45C, D46C, L141C, E142C, K143C, R144C, L288C, D289C, R290C, G291C, A292C, S314C, R315C, K316C, V317C, L390C, M391C, R392C, S393C, E394C, P395C, R396C, P397C, G398C, V399C, L401C, R402C, A403C, P404C y combinaciones de los mismos, en particular seleccionados del grupo que consiste en K32C, Y44C, K143C, R290C, R315C, K341C, R392C, R396C, R402C y combinaciones de los mismos. En otra forma de realización interesante de la invención, el residuo(s) de cisteína es / son introducidos en una posición que en el hFVII de tipo salvaje está ocupada por un residuo de serina o treonina que tiene al menos 25% de su cadena lateral expuesta a la superficie. Por ejemplo, en el polipéptido del factor VII se introduce un residuo de cisteína, preferiblemente por sustitución, en al menos una posición seleccionada de entre el grupo constituido por S12, S23, S43, S45, S52, S53, S60, S67, T83, S103, T106, T108, S111, S119, S126, T128, T130, S147, T185, S214, S222, S232, T233, T238, T239, T255, T267, T293, T307, S320, T324, S333, S336, T370 y S393. Incluso más preferible, el residuo de cisteína se introduce en al menos una posición de hFVII que contiene un residuo S, siendo la posición seleccionada de entre el grupo que consiste en S12, S23, S43, S45, S52, S53, S60, S67, S103, S111, S119, S126, S147, S214, S222, S232, S320, S333, S336 y S393. En otra forma de realización el residuo(s) de cisteína es / son introducidos en una posición que en el hFVII de tipo salvaje está ocupada por un residuo de serina o treonina que tiene al menos 50 % de su cadena lateral expuesta a la superficie. Por ejemplo, en el polipéptido del factor VII se introduce un residuo de cisteína, preferiblemente por sustitución, en al menos una posición seleccionada de entre el grupo constituido por S23, S43, S52, S53, S60, S67, T106, T108, S111, S119, S147, S214, T238, T267 y T293, incluso más preferible, una posición seleccionada de entre el grupo constituido por S23, S43, S52, S53, S60, S67, S111, S119, S147 y S214. En otra forma de realización, se introduce un residuo de cisteína en al menos una posición seleccionada de entre cualquiera de las posiciones anteriormente mencionadas, que no está situada en una región de sitio activo. Preferiblemente, la posición es una ocupada por un residuo T o un residuo S. Por ejemplo, el polipéptido del Factor VII comprende un residuo de cisteína introducido en al menos una posición seleccionada de entre el grupo constituido por S12, S23, S43, S45, S52, S53, S60, S67, T83, S103, T106, T108, S111, S119, S126, T128, T130, S147, T185, S214, S222, T255, T267, T307, S320, S333, S336, T370 y S393 (que tiene más del 25% de su cadena lateral expuesta a la superficie), en particular seleccionada de entre el grupo constituido por S12, S23, S43, S45, S52, S53, S60, S67, S103, S111, S119, S126, S147, S214, S222, S320, S333, S336 y S393 (ocupado por un residuo S), y, más preferible, de entre el grupo constituido por S23, S43, S52, S53, S60, S67, T106, T108, S111, S119, S147, S214 y T267 (que tiene más del 50 % de su cadena lateral expuesta a la superficie), en particular de entre el grupo constituido por S23, S43, S52, S53, S60, S67, S111, S119, S147 y S214 (ocupado por un residuo S). En otra forma de realización, se introduce un residuo de cisteína en al menos una posición seleccionada de entre cualquiera de las posiciones anteriormente mencionadas, que no está situada en una región de sitio de unión del factor tisular. Preferiblemente, la posición es una ocupada por un residuo T o un residuo S. Por ejemplo, el polipéptido del Factor VII comprende un residuo de cisteína introducido en al menos una posición seleccionada de entre el grupo constituido por S12, S23, S45, S52, S53, S67, T83, S103, T106, T108, S111, S119, S126, T128, T130, S147, T185, S214, S222, S232, T233, T238, T239, T255, T267, T293, S320, T324, S333, S336, T370 y S393 (que tiene más del 25% de su cadena lateral expuesta a la superficie), en particular seleccionada de entre el grupo constituido por S12, S23, S45, S52, S53, S67, S103, S111, S119, S126, S147, S214, S222, S232, S320, S333, S336 y S393 (ocupado por un residuo S), y, más preferible, de entre el grupo constituido por S23, S52, S53, S67, T106, T108, S111, S119, S147, S214, T238, T267 y T293 (que tiene más del 50 % de su cadena lateral expuesta a la superficie), en particular de entre el grupo constituido por S23, S52, S53, S67, S111, S119, S147 y S214 (ocupado por un residuo S). En otra forma de realización, se introduce un residuo de cisteína en al menos una posición seleccionada de entre cualquiera de las posiciones anteriormente mencionadas, que no está situada en una región de sitio de unión del factor tisular ni en una región de sitio activo. Preferiblemente, la posición es una ocupada por un residuo T o un residuo S. Por ejemplo, el polipéptido del Factor VII comprende un residuo de cisteína introducido en al menos una posición seleccionada de entre el grupo constituido por S12, S23, S45, S52, S53, S67, T83, S103, T106, T108, S111, S119, S126, T128, T130, S147, T185, S214, S222, T255, T267, S320, S333, S336, T370 (que tiene más del 25% de su cadena lateral expuesta a la superficie), en particular seleccionada de entre el grupo constituido por S12, S23, S45, S52, S53, S67, S103, S111, S119, S126, S147, S214, S222, S320, S333, S336 y S393 (ocupado por un residuo S), y, más preferible, de entre el grupo constituido por S23, S52, S53, S67, T106, T108, S111, S119, S147, S214 y T267 ((que tiene más del 50 % de su cadena lateral expuesta a la superficie), en particular de entre el grupo constituido por S23, S52, S53, S67, S111, S119, S147 y S214 (ocupado por un residuo S).

[0032] Otros ejemplos útiles incluyen de polipéptidos del factor VIIa incluyen aquellos en donde un aminoácido en una posición seleccionada de entre 247-260, 393-405 o 406, en particular R396, Q250 o P406, o K157, V158, M298, L305, D334 S336, K337 o F374 se ha sustituido por una cisteína, o cuando una cisteína se ha introducido en el terminal, por ejemplo Factor VIIa 407C.

[0033] En una serie de realizaciones preferidas, el polipéptido de FVIIa es FVIIa 407C, una variante de FVIIa 407C, FVIIa P406C, una variante de FVIIa P406C, FVIIa R396C, una variante de FVIIa R396C, FVIIa Q250C o una variante de

5 **[0041]** En una forma de realización particularmente preferida, los compuestos diméricos o multiméricos de FVIIa comprenden al menos dos polipéptidos de FVIIa que están conectados covalentemente a través de cisteínas desarrolladas por ingeniería genética en dichos polipéptidos de FVIIa. Para la síntesis de tales compuestos diméricos o multiméricos de FVIIa que comprenden polipéptidos de FVIIa conectados a través de cisteínas, el método divulgado a continuación para producir selectivamente polipéptidos de FVIIa reducidos es útil. En otra forma de realización, los compuestos diméricos o multiméricos de FVIIa según la invención comprenden un enlazador entre los polipéptidos de FVIIa constituyentes. Una clase de tales enlazadores son los enlazadores que tienen la estructura que resulta de una reacción que implica un PEG reactivo con cisteína bivalente. Uno de tales enlazadores preferidos tiene la estructura que resulta de una reacción que implica maleimida-PEG-maleimida, por ejemplo, maleimida-PEG2kD-maleimida, maleimida-PEG3.4kD-maleimida, maleimida-PEG5kD-maleimida, maleimida-PEG10kD-maleimida, y maleimida-PEG20kD-maleimida. En otra forma de realización, dicho enlazador comprende una secuencia de aminoácidos.

[0042] En aún otra forma de realización, los compuestos diméricos o multiméricos de FVIIa según la invención comprenden polipéptidos de FVIIa que están conectados covalentemente a través de aminas libres.

15 **[0043]** En aún otra forma de realización, los compuestos diméricos o multiméricos FVIIa según la invención comprenden polipéptidos de FVIIa que están conectados covalentemente a través de glicanos naturales o de desarrollado por ingeniería genética unidos a dichos polipéptidos de FVIIa.

20 **[0044]** En aún otra forma de realización, los compuestos diméricos o multiméricos de FVIIa según la invención comprenden al menos dos polipéptidos de FVIIa que están conectados covalentemente a través de una estructura química resultante de una reacción de acoplamiento catalizada por enzimas, por ejemplo, mediante transglutaminasa o sortasa.

[0045] En la situación en la que los compuestos diméricos o multiméricos comprenden polipéptidos de FVIIa conectados covalentemente a través de cisteínas desarrolladas por ingeniería genética, se seleccionan polipéptidos de FVIIa preferidos de entre FVIIa 407C, una variante de FVIIa 407C, FVIIa P406C, una variante de FVIIa P406C, FVIIa R396C, una variante de FVIIa R396C, FVIIa Q250C y una variante de FVIIa Q250C.

25 **[0046]** También dentro del alcance de la presente invención se encuentran los conjugados entre los compuestos diméricos o multiméricos de FVIIa y un grupo transportador, tales como albúmina de suero humano o una variante de la mismo, una fracción de PEG, una fracción lipófila, etc.

[0047] En general, se prefiere preparar un compuesto dimérico o multimérico de FVIIa según la invención mediante un método que comprende los pasos:

- 30 a) síntesis) y purificación de dichos polipéptidos de FVIIa;
- b) síntesis de dicho compuesto por acoplamiento de dichos polipéptidos de FVIIa;
- c) aislamiento de dicho compuesto dimérico o multimérico de FVIIa.

[0048] Cuando se emplea la química de acoplamiento de cisteína se prefiere preparar un compuesto dimérico o multimérico de FVIIa según la invención mediante un método que comprende los pasos:

- 35 a) síntesis) y purificación de dichos polipéptidos de FVIIa;
- b) reducción selectiva del residuo de cisteína en los polipéptidos de FVIIa que van a ser enlazados;
- c) síntesis de dicho compuesto dimérico o multimérico de FVIIa mediante el acoplamiento de dichos polipéptidos de FVIIa con residuos de cisteína reducidos en presencia de un enlazador activado;
- d) aislamiento de dicho compuesto dimérico o multimérico de FVIIa.

40 **[0049]** En una forma de realización preferida del método, el paso b) comprende la reducción selectiva del residuo de cisteína en el polipéptido de FVIIa mediante la reacción con un tampón redox o un agente reductor de triarilfosfina (véase la sección a continuación sobre la reducción selectiva).

Reducción selectiva de una cisteína no nativa de monómero de FVIIa.

45 **[0050]** Como se ha mencionado anteriormente, cuando el compuesto dimérico o multimérico de FVIIa es para ser sintetizado a partir de las moléculas de FVIIa o moléculas de FVII a través de cisteínas no nativas, puede ser necesario reducir selectivamente las cisteínas no nativas en los polipéptidos de FVII o FVIIa antes del acoplamiento. Los

polipéptidos de FVII y FVIIa comprenden típicamente una o más fracciones de cisteína conjugados a través de un puente disulfuro a un tiol de bajo peso molecular (RS-Cys), sin estar dicha fracción/fracciones implicadas en los puentes S-S intramoleculares (Cys-S-S-Cys) cuando el polipéptido de FVIIa está en su forma activa.

Reducción selectiva usando tampón redox.

5 **[0051]** Un método para la reducción selectiva comprende el paso de permitir que el polipéptido de FVIIA tiol-conjugado de bajo peso molecular reaccione con una mezcla que comprende un tampón redox.

10 **[0052]** Cuando se usa en este documento, el término "tampón redox" tiene la intención de significar un par redox tiol/disulfuro en una proporción que se reduce lo suficiente para afectar al polipéptido de FVII o FVIIa de bajo peso molecular mezcla de disulfuro tiol(es) (RS-Cys) y al mismo tiempo suficientemente oxidante para preservar la integridad de los enlaces disulfuro nativos en el polipéptido FVIIa.

15 **[0053]** Preferiblemente, el tampón redox comprende un par redox de tiol/disulfuro de bajo peso molecular. Por el término "de bajo peso molecular" se entiende que la forma tiol del par redox tiene un peso molecular de a lo sumo 500 g/mol. Ejemplos ilustrativos de tales pares redox son los seleccionados a partir de (i) glutatión reducido y oxidado y (ii) y-glutamylcisteína reducida y oxidada, (iii) cisteinilglicina reducida y oxidada, (iv) cisteína reducida y oxidada, (v) N-acetilcisteína reducida y oxidada, (vi) cisteamina, y (vii) dihidrolipoamida/lipoamida, preferiblemente de (i) glutatión reducido y oxidado.

[0054] Las condiciones redox óptimas se pueden determinar mediante la realización de una valoración redox de la proteína como es sabido por la persona experta en la técnica y como se demuestra en las Figuras 2, 3, y 4; véase también Gilbert (1995).

20 **[0055]** En una forma de realización, el tampón redox es un par redox de glutatión reducido y oxidado, y la concentración del glutatión reducido está en el intervalo de 0-100 mM, y la proporción entre glutatión reducido y glutatión oxidado está en el intervalo de 2-200.

25 **[0056]** En otra forma de realización, el tampón redox es un par redox de glutatión reducido y oxidado, y la concentración del glutatión reducido está en el intervalo de 0-100 mM, por ejemplo, 0,01-50 mM, y la concentración del glutatión oxidado está en el intervalo de 0-5 mM, por ejemplo 0,001-5 mM. Para los polipéptidos del Factor VII, la concentración del glutatión reducido está preferiblemente en el intervalo de 0-5 mM, por ejemplo 0,01-2 mM, y la concentración del glutatión oxidado está en el intervalo de 0,001-2 mM, por ejemplo 0,001-0,200 mM.

30 **[0057]** Dado que el glutatión y otros tioles de bajo peso molecular son generalmente pobres reductores/-oxidantes en términos de cinética de reacción, un catalizador redox tiol/disulfuro se incluye más preferiblemente en la mezcla en conjunción con el tampón redox con el fin de aumentar la velocidad de la reacción.

35 **[0058]** Catalizadores redox tiol/disulfuro adecuados para ser incluidos en la mezcla incluyen glutaredoxinas tipo ditiol y de tipo monotiol. Las glutaredoxinas y sus funciones se describen de forma general en Fernandes et al. (2004). Ejemplos útiles de glutaredoxinas son las seleccionadas de Grx1, Grx2 or Grx3 de *Escherichia coli* (Holmgren et al., 1995), Grx1p, Grx2p, Grx3p, Grx4p, y Grx5p de *Saccharomyces cerevisiae* (Luikenhuis et al. 1998; Rodriguez-Manzanque et al., 1999; Grant, 2001), Grx1 y Grx2 de *Homo sapiens* (Padilla et al. 1995; Lundberg et al., 2001), y variantes de las mismas. Las variantes incluyen, pero no se limitan a, glutaredoxinas de tipo ditiol en las que la cisteína C-terminal en el motivo CXXC ha sido sustituida por otro aminoácido típicamente serina (véase Yang et al., 1998).

[0059] El catalizador redox (en particular, una glutaredoxina) se utiliza preferiblemente en una concentración de 0,001-20 μ M.

40 **[0060]** Se prefiere que la mezcla no comprenda una proteína disulfuro isomerasa (PDI).

[0061] El tampón redox puede comprender además otros componentes tales como sales, tampones de pH, etc, y el método de la invención puede llevarse a cabo a cualquier temperatura que sea adecuada para la proteína de FVIIa en cuestión, por ejemplo, una temperatura en el intervalo de -5 °C a 50 °C, tal como en el intervalo de 0 °C a 25 °C, por supuesto, depende de la estabilidad de la proteína en las condiciones dadas.

45 Reducción selectiva usando un agente reductor de triarilfosfina.

[0062] Otro método para la reducción selectiva comprende el paso de permitir que la proteína de FVIIA tiol-conjugado de bajo peso molecular reaccione con un agente reductor de triarilfosfina.

[0063] El término "agente reductor de triarilfosfina" tiene la intención de significar una triarilfosfina opcionalmente

sustituida con uno o más sustituyentes.

5 **[0064]** Los grupos arilo del agente reductor de triarilfosfina se seleccionan preferentemente de entre fenilo, naftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, antracilo, phenanthracyl, pirenilo, benzopyrenyl, fluorenilo y xantenilo, en particular fenilo, y en formas de realización seleccionadas, los grupos arilo son preferiblemente idénticos. En la realización actualmente más interesante, los tres grupos arilo son fenilo. Ejemplos de sustituyentes, que pueden estar presentes en los grupos arilo, en particular los grupos fenilo, son típicamente aquellos seleccionados entre ácido sulfónico, ácido carboxílico, C₁₋₆ -alquilo, C₁₋₆ -alcoxi, y C₁₋₆ -alcoxi-C₁₋₆ -alquilo, o C₃₋₆ -alquileo (que representa un anillo con dos átomos de carbono arilo vecinos) o C₂₋₆ -alquienoxi (que representa un anillo con dos átomos de carbono arilo vecinos) or C₁₋₄ -alquienoxi-C₁₋₄ -alquileo (que representa un anillo con dos átomos de carbono arilo vecinos).

10 **[0065]** En una forma de realización, al menos un arilo (por ejemplo fenilo) tiene al menos un sustituyente seleccionado entre ácido sulfónico y ácido carboxílico, en particular ácido sulfónico; dicho sustituyente está dispuesto preferiblemente en la posición meta con respecto al enlace al átomo de fósforo.

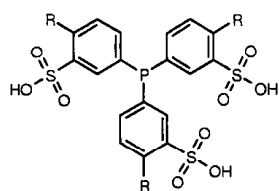
15 **[0066]** Preferiblemente, todos los tres grupos arilo tienen un sustituyente de ácido sulfónico, por ejemplo, todos los tres grupos arilo tienen un sustituyente de ácido sulfónico y al menos un sustituyente adicional, en particular al menos un sustituyente en la posición para con respecto al enlace al átomo de fósforo, en particular un sustituyente de oxígeno en esta posición para.

[0067] Actualmente se cree que los grupos arilo de los agentes reductores preferidos no tienen ningún sustituyente en la posición orto con respecto al enlace al átomo de fósforo.

20 **[0068]** El término "C₁₋₆ -alquilo" pretende abarcar residuos de hidrocarburos saturados lineales o ramificados que tienen 1-6 átomos de carbono. Ejemplos particulares son metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, n-hexilo, etc. Asimismo, el término "C₁₋₄ -alquilo" abarca residuos de hidrocarburos saturados lineales o ramificados que tienen 1-4 átomos de carbono. Los términos "C₁₋₆ -alquileo", "C₂₋₆ -alquileo", etc. representan los birradicales correspondientes a "C₁₋₆ -alquilo", "C₂₋₆ -alquilo", respectivamente.

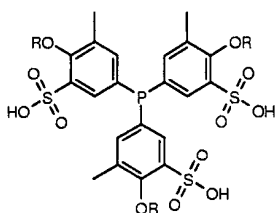
25 **[0069]** Los agentes reductores de triarilfosfina adecuados son aquellos que tienen un equilibrio útil entre el potencial de reducción y el impedimento estérico. La naturaleza química del agente reductor de triarilfosfina está dictada por su capacidad para escindir la proteína de peso molecular bajo-disulfuro mixto tior (RS-Cys) preservando al mismo tiempo la integridad de los enlaces disulfuro nativos en la proteína. Actualmente compuestos muy interesantes son los ácidos trisulfónico de triarilfosfina, como ácido trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfónico y análogos de los mismos. Ejemplos ilustrativos en el presente documento son agentes reductores de triarilfosfina seleccionados de ácido trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfónico y análogos de los mismos, por ejemplo, uno de los seleccionados de los compuestos 9-11 a continuación:

30



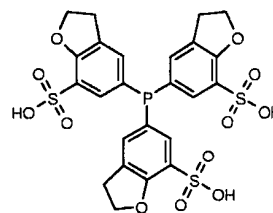
R = H, Me, Et, Pr, 2-Pr, Bu, MeO, EtO, PrO, 2-PrO, BuO.

9



R = Me, Et, Pr, 2-Pr, Bu.

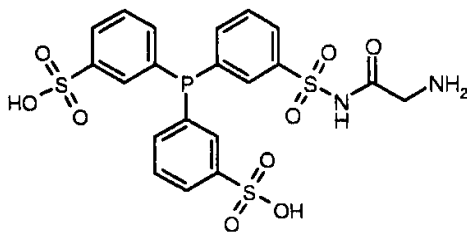
10



11

[0070] El agente reductor de triarilfosfina se utiliza preferiblemente en una concentración de 0,001-100 mM, tal como 0,01-50 mM o 0,1-25 mM.

35 **[0071]** En una forma de realización interesante, el agente reductor de triarilfosfina se inmoviliza a un soporte sólido. Esto facilitará la fácil separación del agente reductor de la proteína. En general, el agente reductor de triarilfosfina, tal como el compuesto 9-11, puede ser inmovilizado por medios conocidos por la persona experta en la técnica, por ejemplo, mediante la introducción de un grupo de enlace en uno de los grupos arilo. El reactivo de triarilfosfina 12 es un ejemplo de una variante de enlazable 1.



12

5 [0072] La reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura en el intervalo de -40 °C, tal como a temperatura ambiente, durante un período de entre 5 segundos y varios días, como puede ser el caso. La reacción puede ser seguida por HPLC con el fin de confirmar la conversión. El disolvente es preferiblemente un tampón acuoso, que incluye opcionalmente codisolventes tales como DMSO o DMF. El disolvente también puede comprender sales, por ejemplo, sales de calcio.

[0073] En una variante, el agente reductor de triarilfosfina se utiliza en combinación con un inhibidor de la proteína, por ejemplo un inhibidor de bolsa S₁ de sitio activo, véase más adelante.

10 [0074] En una forma de realización actualmente preferida, el método para la reducción selectiva de un polipéptido de FVII o FVIIa que comprende una o más fracciones de cisteína conjugadas a través de un puente disulfuro a un tiol de bajo peso molecular (RS-Cys), dicha fracción/fracciones no están involucradas en puentes intramoleculares S-S (Cys-S-S-Cys) cuando el polipéptido FVIIa está en su forma activa, comprendiendo el método el paso de permitir que el polipéptido de FVII o FVIIa tiol-conjugado de bajo peso molecular reaccione con una mezcla que comprende glutatión reducido y oxidado y una glutarredoxina, y el paso simultáneo y/o posterior de conjugar con un grupo químico al menos uno de las fracciones de cisteína reducida selectivamente (HS-Cys).

15 [0075] En otra forma de realización actualmente preferida, el método para la reducción selectiva de un polipéptido de FVII o FVIIa que comprende una o más fracciones de cisteína conjugadas a través de un puente disulfuro a un tiol de bajo peso molecular (RS-Cys), sin estar dicha fracción/fracciones involucradas en puentes intramoleculares S-S (Cys-S-S-Cys) cuando el polipéptido de FVIIa se encuentra en su forma activa, comprendiendo el método el paso de permitir que el polipéptido de FVIIa tiol-conjugado de bajo peso molecular reaccione con una mezcla que comprende un compuesto de ácido triarilfosfina-3,3', 3"-trisulfónico y un inhibidor de bolsa de sitio activo S₁, y el paso simultáneo y/o posterior conjugar con un grupo químico al menos una de las fracciones de cisteína (HS-Cys) reducida selectivamente.

El polipéptido de FVIIa

25 [0076] Se cree que la estrategia de reducción selectiva utilizando un tampón redox como se describe anteriormente es aplicable generalmente a polipéptidos de FVII o FVIIa desarrollados por ingeniería genética que comprenden al menos una cisteína no nativa, en particular, tales proteínas que tienen cisteínas desarrolladas por ingeniería genética que no están implicadas en puentes intramoleculares S-S (Cys-S-S-Cys) cuando la proteína se encuentra en su forma activa, y por lo tanto estando potencialmente en forma tiol-conjugada de bajo peso molecular (RS-Cys).

30 [0077] El término "forma tiol-conjugada (RS-Cys) de bajo peso molecular" y términos similares tienen la intención de significar que un grupo tiol de una cisteína del polipéptido de FVIIa en cuestión está conjugado con un compuesto que tiene un grupo tiol, donde dicho compuesto tiene un peso molecular de menos de 500 Da. Ejemplos de tales compuestos son glutatión, gamma-glutamilcisteína, cisteinilglicina, cisteína, homocisteína, N-acetilcisteína, cisteamina, etc.

35 [0078] El término "forma activa" se refiere a la forma (o formas) de la proteína en la que es capaz de realizar una acción deseable, por ejemplo, como catalizador (enzima), zimógeno, o como un cofactor, etc. A la "forma activa" se hace referencia a veces como la "forma plegada correctamente".

[0079] En una forma de realización interesante, una parte sustancial del polipéptido de FVIIa (es decir, al menos el 50%) se encuentra en su forma activa cuando se lleva a cabo la reacción de reducción selectiva.

40 [0080] El polipéptido de FVIIa es generalmente un polipéptido "desarrollado por ingeniería genética" que en comparación con el FVIIa nativo incluye al menos una cisteína no nativa. Tales polipéptidos "desarrollados por ingeniería genética" se preparan preferiblemente mediante técnicas recombinantes, como será evidente para la persona experta en la técnica, véase también los documentos WO 02/077218 A1 y WO 01/58935 A2 .

Inhibidor de la proteína.

[0081] En una forma de realización interesante, la mezcla comprende además un inhibidor del polipéptido de FVIIa. Mediante la inclusión de un inhibidor en la mezcla, se cree que la conformación de la proteína es algo estabilizada mediante lo cual los enlaces disulfuro intramoleculares tienen una menor tendencia a ser reducidos por el tampón redox. Preferiblemente, el inhibidor de la proteína es un inhibidor del sitio activo.

[0082] En el caso de un polipéptido de FVIIa, la presencia de un inhibidor del sitio activo que se extiende en la bolsa de unión S₁ puede ser necesaria durante la reacción de reducción selectiva para proteger de la reducción los enlaces disulfuro internos en la región del sitio activo. Inhibidores útiles para este propósito incluyen benzamidas, tales como 4-aminobenzamida, argininas, y otros análogos más potentes, véase, por ejemplo, los divulgados en el documento WO 05/016365 A3 aquellos divulgados por Aventis in el documento EP 1162 194 A1, cf. en particular aquellos definidos en las reivindicaciones 1-6 y en las secciones [0009]-[0052], y en el documento EP 1 270 551 A1, cf. en particular las reivindicaciones 1 y 2 y las secciones [0010]-[0032].

Conjugados

[0083] Un propósito importante de los métodos de reducción selectiva descritos anteriormente es para liberar un grupo de cisteína que se puede utilizar para la unión (conjugación) de un grupo químico, por ejemplo, una fracción no polipeptídica.

[0084] Por lo tanto, en una forma de realización importante, el método comprende además el paso simultáneo y/o posterior de conjugar al menos una de la fracción/fracciones de cisteína (HS-Cys) reducida selectivamente con un grupo químico.

[0085] Se debe entender que la conjugación de las al menos una fracción de cisteína reducida selectivamente con un grupo químico puede llevarse a cabo simultáneamente, es decir, mediante la adición de uno o más reactivos que conducen a la conjugación a la mezcla que comprende el tampón redox, o en un paso subsiguiente, por ejemplo, después de la purificación y/o aislamiento de la proteína reducida selectivamente.

[0086] También debe entenderse que la conjugación puede llevarse a cabo en un polipéptido de FVIIa antes de la síntesis del compuesto dimérico o polimérico de FVIIa, o puede llevarse a cabo después de que el compuesto dimérico o polimérico de FVIIa haya sido sintetizado.

[0087] En una forma de realización, el grupo químico es un grupo transportador, es decir, un grupo que, en el momento de la conjugación a los polipéptidos de FVIIa aumenta la vida media en circulación de dicho polipéptido de FVIIa, en comparación con el polipéptido no modificado. El principio específico detrás del efecto retardador puede ser causado por el aumento de tamaño, el blindaje de secuencias de péptidos que pueden ser reconocidos por peptidasas o anticuerpos, o enmascaramiento de glicanos de tal manera que no sean reconocidos por los receptores específicos de glicano presentes en, por ejemplo, el hígado o en los macrófagos, previniendo o disminuyendo el aclaramiento. El efecto retardador del grupo transportador puede también, por ejemplo, ser causada por la unión a componentes de la sangre tales como la albúmina, o la adhesión no específica a tejido vascular. La glicoproteína conjugada debería preservar sustancialmente su actividad biológica.

[0088] En una forma de realización de la invención, el grupo transportador se selecciona del grupo que consiste en:

(a) Un radical molecular orgánico cargado (15-1.000 Da), que puede contener uno o más ácidos carboxílicos, aminas, ácidos sulfónicos, tetrazoles, acilsulfonamidas, ácidos fosfónicos, o una combinación de los mismos.

(b) Una molécula hidrófila neutra de bajo peso molecular (15-1.000 Da), tal como ciclodextrina, o una cadena de polietileno que puede opcionalmente ramificado.

(c) Una molécula hidrofóbica de bajo peso molecular (15-1.000 Da) tal como un ácido graso o ácido cólico o derivados de los mismos.

(d) Polietilenglicol con un peso molecular medio de 2.000-60.000 Da.

(e) Un polímero de precisión bien definido tal como un dendrímero con una masa molecular exacta que van desde los 700 a 20.000 Da, o más preferible entre 700-10.000 Da.

(f) Un polipéptido sustancialmente no inmunogénico tal como albúmina o un anticuerpo o parte de un anticuerpo que contiene opcionalmente un dominio Fc.

(g) Un polímero orgánico de alto peso molecular tal como dextrano.

5 **[0089]** En otra forma de realización de la invención, el grupo transportador se selecciona del grupo que consiste en dendrímeros, óxido de polialquileno (PAO), incluyendo polialquilenglicol (PAG), tal como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), PEG ramificados, alcohol polivinílico (PVA), policarboxilato, poli-vinilpirrolidona, polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico, y dextrano, incluyendo carboximetil-dextrano. En una forma de realización particularmente interesante de la invención, el grupo transportador es un grupo PEG.

[0090] El término "polímero ramificado", o indistintamente "polímero dendrítico", "dendrímico" o "estructura dendrítica" significa un polímero orgánico montado a partir de una selección de bloques de construcción de monómeros, de los cuales algunos contienen ramificaciones.

10 **[0091]** En una forma de realización de la invención, el grupo transportador es uno seleccionado de entre el grupo que consiste en proteína de suero de unión a ligandos, tales como compuestos que se unen a la albúmina, como los ácidos grasos, el ácido graso C5-C24, diácido alifático (por ejemplo C5-C24). Otros ejemplos de grupos transportadores incluyen pequeñas moléculas orgánicas que contienen fracciones que en condiciones fisiológicas alteran las propiedades de carga, tales como ácidos carboxílicos o aminas, o sustituyentes neutros que impiden el reconocimiento
15 específico de glicanos tales como sustituyentes alquilo más pequeños (por ejemplo, alquilo C1-C5). En una forma de realización de la invención el grupo transportador es albúmina.

[0092] En una forma de realización, el grupo químico es un no polipéptido.

[0093] En una forma de realización interesante, el grupo químico es un polietilenglicol (PEG), en particular uno que tiene un peso molecular medio en el intervalo de 500-100.000, tales como 1.000-75.000, o 2.000-60.000.

20 **[0094]** La conjugación se puede llevar a cabo como se divulga en los documentos WO 02/077218 A1 y WO 01/58935 A2.

[0095] Particularmente interesante es el uso de PEG como un grupo químico para la conjugación con la proteína. El término "polietilenglicol" o "PEG" se refiere a un compuesto de polietilenglicol o un derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento, fracciones de acoplamiento o activación (por ejemplo, con tiol, triflato, tresilato, azirdine, oxirano, piridilditio, vinilsulfona, o preferiblemente con una fracción de maleimida). Los compuestos tales como
25 maleimido monometoxi PEG son ejemplares de compuestos de PEG activados de la invención.

[0096] El PEG es una molécula de polímero adecuado, ya que sólo tiene unos pocos grupos reactivos capaces de reticulación en comparación con polisacáridos tales como el dextrano. En particular, PEG monofuncionales, por ejemplo, metoxipolietilenglicol (mPEG), es de interés ya que su química de acoplamiento es relativamente simple (sólo un grupo reactivo está disponible para la conjugación con grupos de unión en el polipéptido de FVIIa). Por consiguiente, el riesgo de reticulación se elimina, los conjugados de polipéptidos de FVIIa resultantes son más homogéneos y la reacción de las moléculas de polímero con el polipéptido FVIIa es más fácil de controlar.
30

[0097] Para efectuar la unión covalente de la molécula(s) de polímero con el polipéptido FVIIa, los grupos terminales hidroxilo de la molécula de polímero se proporcionan en forma activada, es decir, con grupos funcionales reactivos. Moléculas poliméricas activadas adecuadas están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Shearwater Corp., Huntsville, Ala., EE.UU., o de PolyMASC Pharmaceuticals plc, UK. Alternativamente, las moléculas de polímero pueden ser activadas por métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, como se divulga en el documento WO 90/13540. Los ejemplos específicos de moléculas poliméricas activadas lineales o ramificadas para su uso en la presente invención se describen en los catálogos de Shearwater Corp. de 1997 y 2000 (Functionalized Biocompatible Polymers for Research and pharmaceuticals, Polyethylene Glycol and Derivatives, incorporados aquí por referencia). Ejemplos específicos de polímeros PEG activados incluyen los siguientes PEG lineales: NHS-PEG (por ejemplo SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG, y SCM-PEG), y NOR-PEG, BTC-PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO-PEG, y PEG ramificados tales como PEG2- NHS y aquellos divulgados en U.S. Pat. No. 5,932,462 y U.S. Pat. No. 5,643,575, los cuales se incorporan ambos aquí por referencia. Además, las siguientes publicaciones, incorporadas en este documento por referencia, divulgan moléculas de polímero útiles y/o químicas de pegilación: EE.UU. Pat. No. 5,824,778, U.S. Pat. No. 5,476,653, WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, U.S. Pat. No. 4,902,502, U.S. Pat. No. 5,281,698, U.S. Pat. No. 5,122,614, U.S. Pat. No. 5,219,564, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO 95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, U.S. Pat. No. 5,736,625, WO 98/05363, EP 809 996, U.S. Pat. No. 5,629,384, WO 96/41813, WO 96/07670, U.S. Pat. No. 5,473,034, U.S. Pat. No. 5,516,673, EP 605 963, U.S. Pat. No. 5,382,657, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 y EP 154 316 .
40
45
50

[0098] La conjugación del polipéptido FVIIa y las moléculas de polímero activadas se lleva a cabo mediante el uso de

cualquier método convencional, por ejemplo, como se describe en las siguientes referencias (que también describen procedimientos adecuados para la activación de moléculas de polímero): R.F. Taylor, "Protein immobilisation. Fundamental and applications", Marcel Dekker, N.Y. ; S. S. Wong, (1992), "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Rat on; G. T. Hermanson et al., (1993), "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, N.Y.). El experto en la materia será consciente de que el método de activación y/o química de conjugación que se utilizará depende del grupo(s) de unión del polipéptido (ejemplos de los cuales se dan más arriba), así como los grupos funcionales del polímero (por ejemplo, siendo amina, hidroxilo, carboxilo, aldehído, sulfhidrilo, succinimidilo, maleimida, vinil sulfona o haloacetato). La pegilación puede dirigirse hacia la conjugación a todos los grupos de unión disponibles en el polipéptido FVIIa (es decir, tales grupos de unión que están expuestos en la superficie del polipéptido FVIIa) o puede dirigirse hacia uno o más grupos de unión específicos, por ejemplo, el grupo amino N-terminal (U.S. Pat. No. 5,985,265). Además, la conjugación puede conseguirse en un solo paso o de una manera paso a paso (por ejemplo, como se describe en el documento WO 99/55377).

[0099] Se entenderá que la pegilación se diseña con el fin de producir la molécula óptima con respecto al número de moléculas de PEG unidas, el tamaño y la forma de tales moléculas (por ejemplo, si son lineales o ramificadas), y en donde en los polipéptidos tales moléculas se unen. El peso molecular del polímero a utilizar se elegirá teniendo en cuenta el efecto que se desea lograr. Por ejemplo, si el propósito primario de la conjugación es conseguir un conjugado que tenga un alto peso molecular y un tamaño más grande (por ejemplo, para reducir el aclaramiento renal), se puede elegir conjugar una o unas pocas moléculas de polímero de alto peso molecular o un número de moléculas de polímero con un peso molecular más pequeño para obtener el efecto deseado. Sin embargo, se utilizarán preferiblemente varias moléculas de polímero con un peso molecular inferior.

[0100] Además, se ha encontrado que se obtienen resultados ventajosos cuando el tamaño aparente (también referido como el "peso molecular aparente" o "masa aparente") de al menos una parte importante del conjugado de la invención es al menos aproximadamente 50 kDa, tal como al menos aproximadamente 55 kDa, tal como al menos aproximadamente 60 kDa, por ejemplo, al menos aproximadamente 66 kDa. Se cree que esto se debe al hecho de que el aclaramiento renal se elimina sustancialmente para los conjugados que tienen un tamaño aparente suficientemente grande. En el presente contexto, el "tamaño aparente" de un polipéptido de FVIIa se determinó por el método de SDS-PAGE.

[0101] Por otra parte, se ha informado de que el exceso de conjugación de polímero puede conducir a una pérdida de actividad del polipéptido de FVIIa al que se conjuga el grupo químico (por ejemplo, una fracción no polipeptídica) (véase más adelante). Este problema puede ser eliminado, por ejemplo, mediante la eliminación de los grupos de fijación situados en el sitio funcional o mediante el bloqueo reversible del sitio funcional antes de la conjugación a fin de que el sitio funcional del polipéptido de FVIIa se bloquee durante la conjugación. Específicamente, la conjugación entre el polipéptido de FVIIa y el grupo químico (por ejemplo, fracción no polipeptídica) puede llevarse a cabo bajo condiciones en las que el sitio funcional del polipéptido de FVIIa es bloqueado por una molécula ayudante, por ejemplo, factor tisular capaz de unirse al sitio funcional del polipéptido de FVIIa o un inhibidor de la proteasa serina. Preferiblemente, la molécula ayudante es una, que reconoce específicamente un sitio funcional del polipéptido de FVIIa, tal como un receptor, en particular, factor tisular, ya sea de longitud completa o una forma adecuadamente truncada de factor tisular o dos moléculas, siendo una factor tisular y siendo la otra un péptido o péptido inhibidor de unión a y protegiendo de este modo el área alrededor de la tríada catalítica (preferiblemente definida como residuos de aminoácidos dentro de 10 Å de cualquier átomo en la tríada catalítica).

[0102] Alternativamente, la molécula auxiliar puede ser un anticuerpo, en particular, un anticuerpo monoclonal que reconoce el polipéptido FVIIa. En particular, la molécula auxiliar puede ser un anticuerpo monoclonal neutralizante.

[0103] El polipéptido FVIIa es preferiblemente para interactuar con la molécula auxiliar antes de efectuar la conjugación. (A menudo, es incluso ventajoso utilizar la misma molécula auxiliar (por ejemplo, un inhibidor) como la utilizada en los pasos en los que se reducen los disulfuros mixtos.) Esto asegura que el sitio funcional del polipéptido FVIIa está blindado o protegido y por lo tanto no disponible para la derivatización por el grupo químico (por ejemplo, una fracción no polipeptídica), tal como un polímero.

[0104] Después de su elución de la molécula auxiliar, el conjugado del grupo químico y la proteína se pueden recuperar con al menos un sitio funcional parcialmente conservado.

50 Composiciones farmacéuticas.

[0105] Los compuestos diméricos y multiméricos de FVIIa según la presente invención son aplicables en forma de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos de sangrado o episodios de sangrado en un sujeto o para la mejora del sistema hemostático normal. Ejemplos de sujetos en necesidad de tal tratamiento son, por ejemplo, sujetos que reciben tratamiento para la hemofilia A o B.

[0106] En otro aspecto, la presente invención incluye dentro de su alcance composiciones farmacéuticas que

comprenden un compuesto dimérico o multimérico de FVIIa, como un ingrediente activo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 **[0107]** Opcionalmente, la composición farmacéutica de la invención puede comprender un compuesto dimérico o multimérico de FVIIa en combinación con uno o más de otros compuestos que exhiben actividad anticoagulante, por ejemplo, inhibidores de la agregación plaquetaria.

10 **[0108]** Los compuestos de la invención se pueden formular en la composición farmacéutica que comprende los compuestos y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Tales portadores incluyen agua, solución salina fisiológica, etanol, polioles, por ejemplo, glicerol o propilenglicol, o aceites vegetales. Como se usa en este documento, "portadores farmacéuticamente aceptables" abarca también cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antifúngicos, conservantes, agentes isotónicos y similares. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional es incompatible con el ingrediente activo y su uso previsto, se contempla su uso en las composiciones de la presente invención.

15 **[0109]** Las composiciones se pueden preparar mediante técnicas convencionales y aparecen en formas convencionales, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, soluciones o suspensiones. El portador farmacéutico empleado puede ser un portador sólido o líquido convencional. Ejemplos de portadores sólidos son lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio y ácido esteárico. Ejemplos de portadores líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva y agua. Del mismo modo, el portador o diluyente puede incluir cualquier material de retardo conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera. Las formulaciones también pueden incluir agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes conservantes, agentes aromatizantes o agentes edulcorantes. Las formulaciones de la invención pueden formularse de manera que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo tras la administración al paciente empleando procedimientos bien conocidos en la técnica.

25 **[0110]** Las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar y mezclar, si se desea, con agentes auxiliares, emulsionantes, sal para influir en la presión osmótica, tampones y/o sustancias colorantes y similares, que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos.

[0111] La vía de administración puede ser cualquier vía, que transporte eficazmente el compuesto activo al sitio de acción apropiado o deseado, tal como oral o parenteral, por ejemplo, rectal, transdérmica, subcutánea, intranasal, intramuscular, tópica, intravenosa, intrauretral, solución oftálmica o una pomada, prefiriéndose la vía oral.

30 **[0112]** Si se usa un portador sólido para la administración oral, la preparación puede ser en comprimidos, colocado en una cápsula de gelatina dura en forma de polvo o pelet o puede estar en la forma de una pastilla o comprimido para chupar. La cantidad de portador sólido puede variar ampliamente, pero normalmente será de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1 g. Si se usa un portador líquido, la preparación puede estar en forma de un jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda o líquido inyectable estéril tal como una suspensión o solución líquida acuosa o no acuosa.

35 **[0113]** Para la administración nasal, la preparación puede contener un compuesto de fórmula (I) disuelto o suspendido en un portador líquido, en particular un portador acuoso, para aplicación en aerosol. El portador puede contener aditivos tales como agentes de solubilización, por ejemplo, propilenglicol, tensioactivos, potenciadores de la absorción tales como lecitina (fosfatidilcolina) o ciclodextrina, o conservantes tales como parabenos.

[0114] Para la aplicación parenteral, son particularmente adecuadas las soluciones o suspensiones inyectables, preferiblemente soluciones acuosas con el compuesto activo disuelto en aceite de ricino polihidroxilado.

40 **[0115]** Las tabletas, grageas, o cápsulas que tienen talco y/o un portador carbohidrato o aglutinante o similar son particularmente adecuadas para la aplicación oral. Portadores preferibles para tabletas, grageas, o cápsulas incluyen lactosa, almidón de maíz y/o almidón de patata. Un jarabe o elixir puede utilizarse en los casos en que un portador endulzado puede ser empleado.

[0116] Una tableta típica, que puede prepararse por técnicas convencionales de formación de tabletas, contiene

Núcleo:

Compuesto activo (como compuesto libre o sal del 10 mg mismo)

Dióxido de silicio coloidal (Areosil®) 1.5 mg

Celulosa, microcryst. (Avicel®) 70 mg

Goma de celulosa modificada (Ac-Di-Sol®) 7.5 mg

Estearato de magnesio

45

Recubrimiento:

HPMC	aprox. 9 mg
*Mywacett® 9-40 T	aprox. 0.9 mg
*Monoglicérido acilado usado como plastificante para recubrimiento de película.	

[0117] Los compuestos de la invención se pueden administrar a un mamífero, especialmente un ser humano en necesidad de tal tratamiento, prevención, eliminación, alivio o mejora de diferentes enfermedades o trastornos trombolíticos o coagulopático como se mencionó anteriormente. Estos mamíferos también incluyen animales, tanto animales domésticos, por ejemplo, las mascotas del hogar, como los animales no domésticos como fauna.

5 **[0118]** Por lo general, las formas de dosificación adecuadas para la administración oral, nasal, pulmonar o transdérmica comprenden de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 100 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 50 mg de los compuestos de la fórmula I mezclado con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 **[0119]** Los compuestos se pueden administrar concurrentemente, simultáneamente, o junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, ya sea por vía oral, rectal, o parenteral (incluyendo la subcutánea). Los compuestos están a menudo, y preferiblemente, en la forma de un metal alcalino o sal de metal alcalinotérreo de los mismos.

15 **[0120]** Los rangos de dosificación adecuados varían, como se ha indicado anteriormente, en función del modo exacto de administración, la forma en que se administra, la indicación hacia la cual se dirige la administración, el sujeto implicado y el peso corporal del sujeto implicado, y la preferencia y experiencia del médico o veterinario responsable.

[0121] La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la protección. Las características descritas en la descripción anterior y en los ejemplos siguientes pueden, tanto por separado o en cualquier combinación de los mismos, ser material para realizar la invención en diversas formas de la misma.

20 EJEMPLOS

Ejemplo 1

25 **[0122]** *Materiales* - Glutación reducido y oxidado (GSH y GSSG, respectivamente), cisteína (Cys), DL- homocisteína (hCy), cisteinilglicine (CG), y γ -glutamilmcisteína (γ -GC) fueron comprados de Sigma. Cisteamina (Cya) y sal de amonio del ácido 7-fluorobenzofurazan-4-sulfónico(SBD-f) fueron obtenidas de Fluka. Tris(2-carboxietil)fosfina(TCEP) fue comprada de Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Sustrato cromogénico S-2288 se obtuvo de Chromogenix (Milán, Italia). PEG5k-maleimida (2E2M0H01), PEG20k-maleimida (2E2M0P01), PEG40k-maleimida (2D3Y0T01), y maleimida-PEG3.4k-maleimida (2E2E0F02) fueron comprados de Nektar Therapeutics (Huntsville, AL). Cetona de d-Phe-Phe-Arg-clorometilo fue comprada de Bachem. Ácido trifetilfosfina-3,3',3"-trisulfónico se obtuvo de Aldrich. FX y FXa derivados de plasma humano se obtuvieron de Enzyme Research Laboratories Inc. (South Bend, IN). Biotina-óxido de polietileno-yodoacetamida (Biotin-PEO-yodoacetamida) procedente de Sigma (Misuri, EE.UU). Se preparó factor tisular soluble 1-219 (sTF) según procedimientos publicados (Freskgard et al., 1996). Se preparó sTF (1-219) Glu219→Cys (E219C) esencialmente como se describe previamente (Owenius et al., 1999). La expresión y purificación del FVIIa recombinante se realizaron como se describe previamente (Tim et al., 1988 Persson y Nielsen, 1996). Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico o mejor.

35 **[0123]** *Determinación de la concentración* - La concentración de GSSG en soluciones madre se determinó por su absorción a 248 nm usando un coeficiente de extinción de $381 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chau y Nelson, 1991). La concentración de GSH y otros tioles de bajo peso molecular se determinó utilizando el reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico)) y $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como el coeficiente de extinción molar de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico a 412 nm (Riddles et al., 1979).

40 **[0124]** *Cuantificación de GSSG por HPLC* - La cuantificación de GSSG se realizó esencialmente como se describe en otra parte (Takahashi y Creighton, 1996). Brevemente, 50 μl de la muestra templada ácido se cargaron en una columna de fase inversa C18 (Luna C18(2) 100 Å, tamaño de partícula 3 μm , 4,6x50mm; Phenomenex Inc., Torrance, CA) mantenida a 30 °C. Después de 5 min de ejecución isocrática al 100% de eluyente A (0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) en agua), GSSG se eluyó mediante un gradiente lineal de 0-5% de eluyente B (0,085% (v/v) de TFA en acetonitrilo) en 5 min a una velocidad de flujo de 1 ml/min y se detectaron mediante absorción a 214 nm. La concentración de GSSG se determinó relacionando el área del valor máximo calculada (software Millenium32 v4.0, Waters) con una curva estándar elaborada con cantidades conocidas de GSSG. Se observó linealidad en el rango de 2 a 25 nmol GSSG.

5 **[0125]** *Análisis de FVIIa 407C modificado con tiol por HPLC* – Especies de FVIIa 407C libres y modificadas con tiol fueron analizadas por HPLC usando una columna de fase inversa C3 (Zorbax 300SB-C3, 2,1x150mm, tamaño de partícula 5 µm; Agilent Technologies, Dinamarca) mantenida a 45 °C. La tasa de flujo fue de 0,5 ml/min y las fases móviles consistían en 0,1% (v/v) de TFA en agua (eluyente A) y 0,085% (v/v) de TFA en acetonitrilo (eluyente B). Después de la inyección de 25 µl de la muestra templada de ácido, el sistema se ejecutó isocráticamente a 30% de eluyente B durante 5 min, seguido por gradientes lineales de 38 a 41,5% de eluyente B durante 20 minutos y 41,5 a 55% de eluyente B durante 20 min. El eluato se monitorizó por fluorescencia (longitudes de onda de excitación y emisión de 280 y 348 nm, respectivamente).

10 **[0126]** *Construcción de ADN que codifica FVII 407C mutante* - Un constructo de ADN que codifica FVIIa 407C se construyó como se describe en el documento WO 02/077218 A1.

[0127] *Construcción de ADN que codifica FVII Q250C mutante* - Un constructo de ADN que codifica FVIIa Q250C se construyó como se describe en el documento WO 02/077218 A1.

[0128] *Construcción de ADN que codifica FVII R396C mutante* - Un constructo de ADN que codifica FVIIa R396C se construyó como se describe en el documento WO 02/077218 A1.

15 **[0129]** *Expresión y purificación de FVII 407C* - Células BHK fueron transfectadas esencialmente como se describe anteriormente (Thim et al, 1988; Persson y Nielsen, 1996) para obtener la expresión de la variante de FVIIa 407C. El polipéptido del Factor VII se purificó como sigue:

20 El medio condicionado se cargó en una columna de 25 ml de Q Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, GE Healthcare) después de la adición de EDTA 5 mM, Triton X-100 al 0,1% y Tris 10 mM, el ajuste del pH a 8,0 y ajuste de la conductividad a 10-11 mS/cm añadiendo agua. La elución de la proteína fue realizada por un gradiente de Tris 10mM, NaCl 50 mM, Triton X-100 al 0,1%, pH 8,0 a Tris 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 25 mM, Triton X-100 al 0,1%, pH 7,5. Las fracciones que contienen el FVIIa 407C se agruparon, y se aplicaron a una columna de 25 ml que contiene el anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a Sepharose 4B activada con CNBr (Amersham Biosciences, GE Healthcare). La columna fue equilibrada con HEPES 50 mM, pH 7,5, que contiene CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y 0,02% de Triton X-100. Después de lavar con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo 2 M de NaCl, el material unido se eluyó con tampón de equilibrado que contiene EDTA 10 mM en lugar de CaCl₂. Antes del almacenamiento, el FVIIa 407C se transfirió a HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, tampón de pH 7,0 mediante diálisis. El rendimiento de cada paso fue seguido por mediciones ELISA del factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

[0130] *Expresión y purificación de FVII Q250C* - Células BHK fueron transfectadas esencialmente como se describe anteriormente (Thim et al, 1988; Persson y Nielsen, 1996) para obtener la expresión de la variante de FVIIa Q250C. El polipéptido del Factor VII se purificó como sigue:

35 El medio condicionado se cargó en una columna de 25 ml de Q Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, GE Healthcare) después de la adición de EDTA 5 mM, Triton X-100 al 0,1% y Tris 10 mM, el ajuste del pH a 8,0 y ajuste de la conductividad a 10-11 mS/cm mediante la adición de agua. La elución de la proteína fue realizada por un gradiente de Tris 10mM, NaCl 50 mM, Triton X-100 al 0,1%, pH 8,0 a 10 mM Tris, NaCl 50 mM, 25 mM CaCl₂, Triton X-100 al 0,1%, pH 7,5. Las fracciones que contienen el FVIIa 407C se agruparon, y se aplicaron a una columna de 25 ml que contiene el anticuerpo monoclonal F1A2 (Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca) acoplado a Sepharose 4B activada con CNBr (Amersham Biosciences, GE Healthcare). La columna fue equilibrada con HEPES 50 mM, pH 7,5, que contiene CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y 0,02% de Triton X-100. Después de lavar con tampón de equilibrado y tampón de equilibrado conteniendo 2 M de NaCl, el material unido se eluyó con tampón de equilibrado que contiene EDTA 10 mM en lugar de CaCl₂. Antes del almacenamiento, FVIIa Q250C se transfirió a HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, tampón de pH 7,0 mediante diálisis. El rendimiento de cada paso fue seguido por mediciones ELISA del factor VII y la proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE.

[0131] *Expresión y purificación de FVII R396C* – La expresión y purificación de FVIIa R396C se realizó tal como se describe en el documento WO 02/077218 A1.

50 **[0132]** *Clonación y expresión de glutaredoxinas* – Las secuencias de codificación del ADN para la *Escherichia coli* glutaredoxina 2 (Grx2) y *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxina 1 (yGrx1p) fueron amplificadas por PCR usando Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN) según las recomendaciones del fabricante y los pares de cebadores oHOJ98-f/oHOJ98-r y oHOJ11-f/oHOJ11-r, respectivamente, introduciendo sitios de restricción de flanqueo *NdeI* y *XhoI* (las secuencias de cebadores se enumeran en la Tabla 1).

Tabla 1 - Oligos de ADN utilizados para la construcción de plásmidos pHOJ294, 210, y 286 que expresan *E.coli*

glutaredoxina 2 (Grx2), *S.cerevisiae* glutaredoxina 1 (yGrx1p), y yGrx1p C30S, respectivamente. Los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* se muestran en negrita.

Cebador	Plásmido	Objetivo	Secuencia (5'→3')
oHOJ11-f	pHOJ210	yGrx1p	GGGCGGCC ATAT GGTATCTCAAGAAACTATC
oHOJ11-r	pHOJ210	yGrx1p	GCCCCGG CTCGAG ATTTGCAAGAATAGGTTCTAAC
oHOJ98-f	pHOJ294	Grx2	GCCGCCGG CCATATGA AGCTATACATTTACGATCACTGCC
oHOJ98-r	pHOJ294	Grx2	CCGCCGCC CTCGAGA ATCGCCATTGATGATAACAAATTGATTTGTG
oHOJ88-f	pHOJ286	yGrx1p C30S	GTTTAGGGCTGCATGCGAGTATGGACAGTACG
oHOJ88-r	pHOJ286	yGrx1p C30S	CGTACTGTCCATACTCGCATGCAGCCCTAAAC

5 **[0133]** La plantilla de ADN genómico para las reacciones de PCR se preparó a partir de *E.coli* y *S.cerevisiae* de acuerdo con los procedimientos publicados (Grimberg et al., 1989; Hoffman y Winston, 1987). Los productos de PCR purificados se cortaron con *NdeI* y *XhoI* y se ligaron a continuación en los correspondientes sitios de pET-24a(+) (Novagen) para dar pHOJ294 y pHOJ210, respectivamente. Puesto que los codones de parada fueron proporcionados por el vector, los dos genes estaban equipados con extensiones 3' vector-derivadas que codifican etiquetas de afinidad C-terminales LEHHHHHH. El plásmido pHOJ286 codificando yGrx1p Cys30Ser (yGrx1p C30S) fue construido por QuickChange® mutagénesis dirigida al sitio utilizando cebadores oHOJ88-f/oHOJ88-r y pHOJ210 como plantilla de 10 acuerdo con las instrucciones del fabricante (Stratagene, La Jolla, CA). La identidad correcta de todas las secuencias clonadas se verificó por secuenciación del ADN.

15 **[0134]** Para la expresión, se introdujeron pHOJ210, 286, y 294 plásmidos en las células químicas competentes BL21(DE3) (Stratagene, La Jolla, CA). Transformantes frescos durante la noche se inocularon en 500 ml de caldo terrífico ((Sambrook y col., 1989)) y 30 µg/ml de kanamicina a una OD600 inicial de 0,02. Los cultivos se cultivaron a 37 °C en matraces con deflectores a 230 rpm hasta la fase semilogarítmica (OD600 3-4), en cuyo momento la temperatura se bajó a 25 °C y la expresión de la proteína fue inducida por isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,1 mM. Después de la expresión durante la noche, las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en 50 ml de tampón de lisis (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0), y se lisaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación. El lisado aclarado se cargó en una columna de Ni-NTA Superflow de 20 ml (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) equilibrada con tampón de lisis a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Después de lavar con tampón de lisis, la proteína unida se eluyó con un gradiente lineal de imidazol 0-200 mM en tampón de lisis. Las fracciones valor máximo se agruparon, se trataron con ditiotreitól 20 mM durante 20 min antes de una diálisis extensiva contra Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. Las proteínas se almacenaron a -80°C se consideraron que eran >90% puros por SDS-PAGE. Las 20 concentraciones se calcularon mediante la absorbancia a 280 nm utilizando coeficientes de extinción de 5240 M⁻¹ cm⁻¹ (yGrx1p y yGrx1p C30S) y 21740 M⁻¹ cm⁻¹ (Grx2).

30 **[0135]** *Identificación de tioles de bajo peso molecular que participan en disulfuros mixtos con FVIIa 407C* - La detección HPLC de tioles SBD-derivados de bajo peso molecular fluorescentes se realizó según lo descrito por Oe et al. (1998) con modificaciones menores. En pocas palabras, la reducción de disulfuro y la posterior derivatización de los tioles liberados se realizó mediante la incubación de 25 µl de 10 µM FVIIa 407C (o FVIIa de tipo salvaje) en Tris-HCl 160 mM, EDTA 8 mM, tampón de pH 9,6 con 5 µl TCEP 14 mM (en agua) y 10 µl 0,3% SBD-f (en agua) a 60 °C durante 60 min. Posteriormente, la derivatización se terminó por adición de 2 µl HCl 5 M y las muestras se colocaron a 4 °C hasta su posterior análisis (dentro de 24 horas). El análisis por HPLC se llevó a cabo mediante la inyección de alícuotas de 25 µl de las muestras en una columna C18(2) de fase inversa (Luna, 100 Å, tamaño de partícula 3,5 µm, 150x4,6 mm; Phenomenex Inc., Torrance, CA) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C. Tioles SBD-derivatizados se separaron mediante elución isocrática usando una fase móvil que consiste en Na-citrato 75 mM, pH 2,90 y 2% de metanol y detectado por la fluorescencia emitida a 516 nm en la excitación a 386 nm. La 35 identificación de los valores máximos se realizó por comparación de los tiempos de retención con los de una serie de compuestos de tiol de bajo peso molecular conocidos preparados según el procedimiento descrito anteriormente para el FVIIa 407C. Las curvas de calibración para la cuantificación de GSH, γ-GC, GC, Cys, Hcy, y Cya se obtuvieron mediante la variación de la concentración de cada tiol de 0,4 a 3,5 µM en la mezcla de reacción final.

40 **[0136]** A partir de este análisis, se puede concluir que los principales tioles de bajo peso molecular conjugados con FVIIa 407C son el glutatión, la cisteína y la homocisteína. Los resultado se presentan en la Figura 1.

45 **[0137]** *Valoración redox de FVIIa* - Para identificar las condiciones apropiadas para la reducción selectiva de mutantes de FVIIa Cys, se evaluó la estabilidad estructural de FVIIa en tampones con potenciales redox definidos obtenidos mediante la variación de las concentraciones de GSH y GSSG esencialmente como se describe en otra parte (Loferer et al., 1995). Dado que se ha demostrado que la reducción de los dos enlaces disulfuro más lábiles en FVIIa se asocia con una pérdida de la actividad amidolítica y unión sTF (Higashi et al., 1997), la integridad estructural de FVIIa se monitorizó por su capacidad de hidrolizar el sustrato cromogénico S-2288 en presencia de sTF.

5 **[0138]** La valoración redox de FVIIa (1 μM) se llevó a cabo en HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 5 mM, tampón de pH 7,0 (completamente purgado con nitrógeno) que contiene 50 μM GSSG y variando las concentraciones de GSH (0 - 34 mM). Además, una serie de muestras contenía *p*-aminobenzamidina 25 mM, un inhibidor del sitio activo de FVIIa que ocupa la bolsa S_1 (Sichler et al., 2002; Persson et al., 2004). Para reducir el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio, las reacciones se realizaron en presencia de 1 μM yGrx1p actuando como un catalizador redox (Ostergaard et al., 2004). Después de equilibrar las muestras durante 3,5 horas a 30 °C bajo atmósfera de nitrógeno, la actividad amidolítica residual se determinó como se describe a continuación. Al mismo tiempo, una parte alícuota de la mezcla de reacción se inactivó mediante un volumen igual de HCl 100 mM, y la concentración de equilibrio de GSSG se determinó por HPLC como se describe en *materiales y métodos*.

10 **[0139]** Para la medición de la actividad amidolítica residual, 20 μl de las muestras equilibradas se diluyeron 20 veces en tampón de ensayo (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 7,4) que contiene yodoacetamida 10 mM para alquilar rápidamente tioles libres y evitar la posterior oxidación de tiol. El ensayo de actividad se llevó a cabo en placas de microtitulación de poliestireno (Nunc, Dinamarca) en un volumen final de 200 μl de tampón de ensayo que contiene sTF 80 nM y se inactivó a una concentración final de FVIIa 10 nM. Después de 15 minutos de preincubación a temperatura ambiente, se añadió sustrato cromogénico S-2288 1 mM y se hizo un seguimiento continuo de la absorbancia a 405 nm durante 20 min en un espectrofotómetro de microplacas 340 Spectramax™ equipado con el software SOFTmax PRO (v2.2; Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). La actividad amidolítica se presentó como la pendiente de las curvas de progreso lineal después de la sustracción en blanco.

20 **[0140]** Los datos se analizaron en términos de la siguiente reacción (Ec. 1), donde FVIIa se convierte en FVIIa inactivado (denominado FVIIai) por reducción reversible de un único enlace disulfuro intramolecular:



[0141] La constante de equilibrio aparente para la reacción inversa (K_{ox}) puede estimarse a partir de la siguiente relación (Ec. 2)

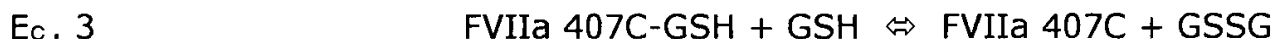
25
$$\text{Ec. 2} \quad f = a_{\text{max}} / (1 + [\text{GSH}]^2 / ([\text{GSSG}] K_{ox}))$$

donde f es la actividad amidolítica residual a un determinado $[\text{GSH}]^2/[\text{GSSG}]$, y a_{max} es la actividad amidolítica limita a bajo $[\text{GSH}]^2/[\text{GSSG}]$.

30 **[0142]** El ajuste de los datos de valoración redox a la Ec. 2 por regresión no lineal de mínimos cuadrados utilizando software Kaleidagraph (v3.6, Synergy software) produjo aparente K_{ox} 's de 93 ± 6 mM y 166 ± 16 mM en ausencia o presencia de *p*-aminobenzamidina 25 mM, respectivamente (Figura 2).

35 **[0143]** *Valoración redox de FVIIa 407C-glutación disulfuro mixto* - La estabilidad del disulfuro mezclado entre el glutatión y Cys407 se midió mediante la incubación de 13 μM FVIIa 407C en HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 10 mM, pH 7,0 que contiene GSH 0,5 mM y variando las concentraciones de GSSG (5-500 μM). Además, todas las muestras contenían 10 μM GRX2 para catalizar la reacción. Después de 5 horas de equilibrado a 30 °C, una alícuota de 50 μl se inactivó con HCl 100 mM y la concentración de equilibrio de GSSG se determinó por HPLC como se describe en *materiales y métodos*. Para medir la cantidad relativa de FVIIa 407C deglutatiónilado, tioles libres se marcaron con PEG5K mediante la combinación de 20 μl de cada muestra con 15 μl PEG5K-maleimida 1,6 mM. Después de 18 min de incubación a temperatura ambiente, se añadió N-etilmaleimida a una concentración final de 25 mM para suprimir competitivamente la pegilación (no específica) adicional de la proteína durante el procesamiento subsiguiente. FVIIa 407C PEG5K-modificado en cada muestra se detectó y se cuantificó por HPLC como se describe en *material y métodos*.

40 **[0144]** Los datos se analizaron según la siguiente reacción (Ec. 3), donde FVIIa 407C glutatiónilado (FVIIa 407C-GSH) reacciona con GSH para dar GSSG y FVIIa 407C libre.



45 **[0145]** La constante de equilibrio aparente para la reacción inversa denominada K_{scox} , puede estimarse a partir de la siguiente relación (Ec. 4)

Ec . 4

$$A_{407C-PEG5k} = A_{\max}([GSH]/[GSSG])/([GSH]/[GSSG] + K_{\text{scox}})$$

donde $A_{407C-PEG5k}$ es el área de valor máximo de FVIIa 407C 5k-pegilado a una proporción dada de $[GSH]/[GSSG]$, y A_{\max} es el área de valor máximo de limitación a $[GSH]/[GSSG]$ alto.

5 **[0146]** Un gráfico de las áreas de valor máximo medidas frente a la proporción de $[GSH]/[GSSG]$ en equilibrio se muestra en la Figura 3. El ajuste de Ec. 4 a los datos por regresión no lineal de mínimos cuadrados utilizando software Kaleidagraph (v3.6, Synergy software) produjo un aparente K_{scox} de 1,0, muy similar al medido para una serie de otras proteínas glutationiladas (Gilbert, 1995).

10 **[0147]** *Identificación de las condiciones de reducción óptimas* - Se identificaron óptimas condiciones de glutatión redox de apoyo a la reducción selectiva de los disulfuros FVIIa 407C-mixtos a partir de gráficas de los siguientes parámetros como una función de $[GSSG]$: (1) la actividad amidolítica residual en la presencia o ausencia de p-aminobenzamidina usando la Eq. 2 y valores K_{ox} estimados, y (2) la fracción de proteína reducido selectivamente partir de la ecuación. 4 y K_{scox} . Por razones prácticas, la concentración de GSH se ajustó a 0,5 mM. Como se muestra en la Figura 4, una concentración de GSSG entre aproximadamente 15 y 60 μM en presencia de GSH 0,5 mM da como resultado >90 % de actividad residual y >90 % de Cys407 libre. El rango óptimo $[GSSG]$ de trabajo depende de varios parámetros, incluida la concentración de GSH (como se ejemplifica en las Figuras 3-5), los valores de K_{ox} y K_{scox} (no se muestra), y la pérdida de la actividad amidolítica permitido durante la reacción de reducción.

15 **[0148]** *La reducción selectiva y la modificación PEG5K, PEG20k, y PEG40k de FVIIa 407C* - La modificación tiol de FVIIa 407C se puede dividir en tres pasos consecutivos: (A) una reacción de reducción catalizada por glutaredoxina, (B) alquilación específica de tiol, y (C) purificación. Al final de cada paso, una pequeña alícuota de la mezcla de reacción se inactivó con 10% (v/v) de ácido fórmico y se analizó por HPLC como se describe en *material y métodos* y se ejemplifica en la Figura 7.

20 (A) FVIIa 407C (4,8 mg) se incubó 4,5 horas a 30 °C en un volumen total de 4,4 ml de HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 10 mM, tampón de pH 7,0 que contiene GSH 0,5 mM, GSSG 15 μM , p-aminobenzamidina 25 mM y GRX2 10 μM . La concentración inicial de GSSG estuvo en el extremo inferior del intervalo óptimo de trabajo (área sombreada en la Figura 4) para compensar la formación de GSSG durante la reacción. (B) Posteriormente, tioles libres fueron modificados mediante la adición de PEG5K-maleimida, PEG20k-maleimida, o PEG40k-maleimida (disuelto en agua) a una concentración final de 0,8 mM. Se permitió a la tiol alquilación proceder durante 15 min a temperatura ambiente con enfriamiento rápido con cisteína 0,5 mM. (C) Se añadió EDTA en exceso de calcio (concentración final 20 mM) y todo el contenido se cargó en una columna HiTrap Q FF de 1 ml (Amersham Biosciences, GE Healthcare) equilibrada con tampón A (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) para capturar FVIIa 407C. Después de lavado con tampón A, una elución de un solo paso de la proteína unida se realizó con tampón B (GlyGly 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 10 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 7,0) directamente en una columna HiLoad Superdex 200 16/60 pg (Amersham Biosciences) montada en frente de la columna HiTrap. Especies pegiladas y no pegiladas se separaron a una velocidad de flujo de 1 ml/min y se detectaron por absorción a 280 nm.

25 **[0149]** *Reducción selectiva y PEG3.4 o PEG20k-reticulación de FVIIa 407C* - La reducción selectiva se llevó a cabo mediante la incubación de 4,8 mg de FVIIa 407C a 30 °C durante 4,5 horas en un volumen total de 4,4 ml de HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 10 mM, tampón de pH 7,0 que contiene GSH 0,5 mM, GSSG 10 μM , p-aminobenzamidina 25 mM, y GRX2 10 μM . A continuación, se añadió EDTA en exceso de calcio (concentración final 20 mM) y todo el contenido se cargó en una columna HiTrap Q FF de 1 ml (Amersham Biosciences, GE Healthcare) equilibrada en tampón A (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) para capturar FVIIa 407C. Después de lavar con tampón A para eliminar el tampón de glutatión unido y Grx2p, el FVIIa 407C se eluyó en un solo paso con tampón B (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 10 mM, pH 7,0). La concentración de FVIIa 407C en el eluato se determinó por absorbancia a 248 nm usando un coeficiente de extinción de $62 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La reticulación se llevó a cabo en presencia de aproximadamente 0,6 equivalente de maleimida-PEG3.4k-maleimida o maleimida-PEG20k-maleimida durante 1,5 horas a temperatura ambiente. (C) Se añadió EDTA en exceso de calcio (concentración final 20 mM) y todo el contenido se cargó en una columna HiTrap Q FF de 1 ml (Amersham Biosciences, GE Healthcare) equilibrada en tampón A (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) para capturar FVIIa 407C. Después de lavado con tampón A, una elución de un solo paso de la proteína unida se realizó con tampón B (GlyGly 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 10 mM, Tween 80, pH 7,0) directamente en una columna HiLoad Superdex 200 16/60 pg (Amersham Biosciences) para separar especies pegiladas y no pegiladas. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min y se detectaron proteínas por absorción a 280 nm.

30 **[0150]** *Análisis SDS-PAGE de FVIIa 407C, FVIIa 407C-PEG5k, FVIIa 407C-PEG20k, FVIIa 407C-PEG40k, y FVIIa 407C-PEG3.4k-FVIIa 407C* - Compuestos 5k, 20k, 40k, y 3.4k-pegilados y FVIIa 407C (aprox. 1,5 μg de cada uno) se analizaron mediante SDS-PAGE de reducción y no reducción en un gel 4-12% Bis-Tris NuPAGE® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) ejecutado 200 V durante 35 min en un tampón MES (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) según las recomendaciones del fabricante. Los geles se lavaron con agua y se tiñeron con Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) según las recomendaciones del fabricante. Los geles se

muestran en la Figura 8.

[0151] *Análisis SDS-PAGE de FVIIa 407C, FVIIA 407C-PEG3.4k-FVIIa 407C, y FVIIa 407C-PEG20k-FVIIa 407C* -Las proteínas (aprox.1 µg cada una) se analizaron mediante SDS-PAGE de reducción y no reducción en un 4-12% Bis-Tris NuPAGE® gel (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) ejecutado 200 V durante 35 min en un tampón MES (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) según las recomendaciones del fabricante. Los geles se lavaron con agua y se tiñeron con Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) según las recomendaciones del fabricante. Los geles se muestran en la Figura 9.

[0152] *Valoración del sitio activo de FVIIa 407C, FVIIA 407C-PEG5k, FVIIa 407C-PEG20k, FVIIa 407C-PEG40k, FVIIA 407C-PEG3.4k-FVIIa 407C, y FVIIa 407C-PEG20k-FVIIa 407C* - Concentraciones sitio activo de FVIIa 407C y compuestos pegilados se determinaron a partir de la pérdida irreversible de la actividad amidolítica al hacer la valoración con los niveles de subestequiométricos de d-Phe-Phe-Arg-clorometil cetona (FFR-cmk) esencialmente como se describe en otra parte (Bock, 1992). En resumen, cada proteína se diluyó en HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,01% Tween 80, tampón de pH 7,0 a una concentración aproximada de 300 nM usando un coeficiente de extinción de 62·10³ M⁻¹ cm⁻¹ a 280 nm. Se combinó proteína diluida (20 µl) con 20 µl STF 1,5 µM y 20 µl FFR-CMK 0-1,2 µM (recién preparada en tampón de materia prima FFR-cmk disuelto en DMSO y se almacenó a -80 °C). Después de la incubación durante la noche a temperatura ambiente, se midió la actividad amidolítica residual.

[0153] El ensayo de actividad se llevó a cabo en placas de microtitulación de poliestireno (Nunc, Dinamarca) en un volumen final de 200 µl de tampón de ensayo (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, Tween 80 al 0.01%, pH 7.4) que contiene sTF 50 nM y aprox. 10 nM FVIIa correspondientes a diluciones de 10 veces de las muestras Después de 15 minutos de preincubación a temperatura ambiente, se añadió sustrato cromogénico S-2288 y se hizo un seguimiento continuo de la absorbancia a 405 nm durante 20 min en un espectrofotómetro de microplacas 340 Spectramax™ equipado con el software SOFTmax PRO (v2.2; Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). La actividad amidolítica se presentó como la pendiente de las curvas de progreso lineal después de la sustracción en blanco. Concentraciones de sitio activo se determinaron por extrapolación, al tiempo que la concentración mínima de FFR-cmk abolía completamente la actividad amidolítica.

[0154] En la Tabla 2 se dan las concentraciones de sitios activos medidos en relación con las absorbancias de las proteínas a 280 nm. Los valores se normalizaron a 100% para el FVIIa 407C.

Tabla 2 - Concentraciones específicas de sitio activo de FVIIa 407C y variantes pegiladas. Las concentraciones específicas de sitio activo se midieron como la concentración de sitio activo mediante valoración FFR-cmk en relación con la absorbancia de las proteínas a 280 nm. Los valores se normalizaron a 100% para el FVIIa 407C.

Proteína	[Sitio activo]/A ₂₈₀
FVIIa 407C	100%
FVIIa 407C-PEG5k	90%
FVIIa 407C-PEG20k	86%
FVIIa 407C-PEG40k	91%
FVIIa 407C-PEG3.4k-FVIIa 407C	95%
FVIIa 407C-PEG20k-FVIIa 407C	90%

[0155] *Análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) de la unión de FVIIa 407C, FVIIa 407C-PEG3.4k-FVIIa 407C, y FVIIa 407C-PEG20k-FVIIa 407C al factor tisular soluble inmovilizado* - La unión de FVIIa 407C y variantes pegiladas al factor tisular soluble inmovilizado se analizó por análisis de resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore 3000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Antes de la inmovilización, el sTF E219C fue biotinilado en su cisteína libre por reacción de la proteína con biotina-PEO-yodoacetamida 2 mM a pH 7,0 durante 20 min. El exceso de reactivo se eliminó posteriormente por filtración en gel en una columna NAP™ 5 (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) equilibrada en tampón HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, P20 0,005%, Biacore AB, Uppsala, Suecia) que contiene CaCl₂ 5mM. El sTF E19C biotinilado se inmovilizó a una densidad de 2,2 fmol/mm² (~50 RU) en celda de flujo 2 de un chip sensor SA (Biacore AB, Uppsala, Suecia). El análisis cinético se realizó a una velocidad de flujo de 30 µl/min en tampón de transferencia (tampón HBS-P que contiene CaCl₂ 5 mM) utilizando la celda de flujo sin tratar 1 para la sustracción automática de referencia en línea. Se analizaron diluciones seriadas de proteína a partir de 100 nM a aprox. 5 nM. Después de 3 min de equilibrado de las celdas de flujo en el tampón de transferencia, una muestra de proteína de 90 µl se inyectó con el comando KINJECT. La fase de disociación duró 9 min y la regeneración se realizó con un pulso de 3 min de EDTA 20 mM en tampón HBS-P. Datos de SPR se ajustaron a un modelo de unión 1:1 de Langmuir usando el software BIAevaluation 4.1 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3 - Análisis de resonancia de plasmón superficial de la unión de FVIIa 407C y variantes diméricas a sTF inmovilizado. Las constantes de disociación (K_D) se calcularon a partir de las constantes de velocidad de asociación

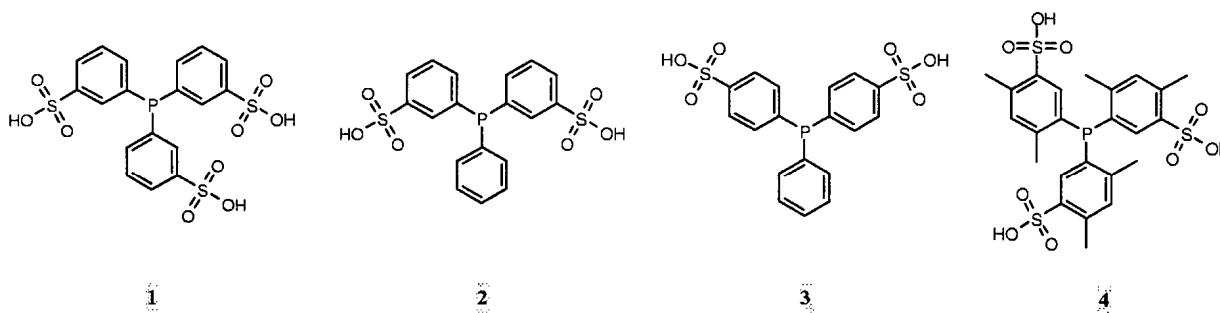
(k_{on}) y disociación (k_{off}) medidas.

Proteína	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	K_D
FVIIa 407C	2.8×10^5	1.5×10^{-3}	5.5 nM
FVIIa 407C-PEG3.4k-FVIIa 407C	3.5×10^5	1.5×10^{-4}	0.4 nM
FVIIa 407C-PEG20k-FVIIa 407C	3.1×10^5	1.6×10^{-4}	0.5 nM

[0156] Reducción de disulfuros de FVIIa R396C-mixtos con ácido trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfónico - Se realizó una reducción a pequeña escala de disulfuros de FVIIa R396C-mixtos usando ácido trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfónico (PPh₃ S₃) de la siguiente manera: FVIIa R396C (4.4 μM) fue tratado con 2.5 o 5.0 mM PPh₃ S₃ en un volumen total de 50 μl tampón de reacción (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,05% Tween 20, pH 7.0) que contenía p-aminobenzamida 50 mM. Después de 16,3 horas de incubación a temperatura ambiente, las mezclas de reacción (30 μl) se desalaron en columnas Spin de Pro•Spin™ (Princeton Separations, Adelphia, New Jersey) rehidratadas en tampón de reacción de acuerdo con las instrucciones del fabricante para eliminar el exceso de agente reductor. Posteriormente, los tioles libres se alquilaron con 0,2 mM de PEG5K-maleimida durante 10 min a temperatura ambiente. Se preparó FVIIa R396C pegilado y no pegilado reduciendo SDS-PAGE en un 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) ejecutado a 200 V durante 35 min en tampón MES de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La tinción del gel con Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El gel se muestra en la Figura 10A.

[0157] La actividad amidolítica de FVIIa R396C antes y después de la incubación con PPh₃S₃ se midió por dilución de 320 veces de la mezcla de reacción en 200 μl (volumen total) HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, 1 mg/ml BSA, tampón de pH 7.4 que contiene STF 50 mM. Después de 15 minutos de preincubación a temperatura ambiente, se añadió sustrato cromogénico S-2288 de 1 mM y se hizo un seguimiento continuo de la absorbancia a 405 nm durante 20 min en placas de microtitulación de poliestireno (Nunc, Dinamarca) usando un espectrofotómetro de microplacas 340 Spectramax™ equipado con el software SOFTmax PRO (v2.2; Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). La actividad amidolítica se presentó como la pendiente de las curvas de progreso lineal después de la sustracción en blanco. Los resultados se muestran en la Figura 10B.

[0158] Reducción selectiva de disulfuros expuestos en un polipéptido del Factor VII - La triarilfosfina disponible comercialmente **1** (sal trisódica de ácido trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfónico de Aldrich) contiene aproximadamente 5% del correspondiente ácido 3,3'-bis-sulfónico **2**. Así, **1** se purificó por HPLC de fase inversa estándar, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo en agua en presencia de ácido trifluoroacético al 0,1%.

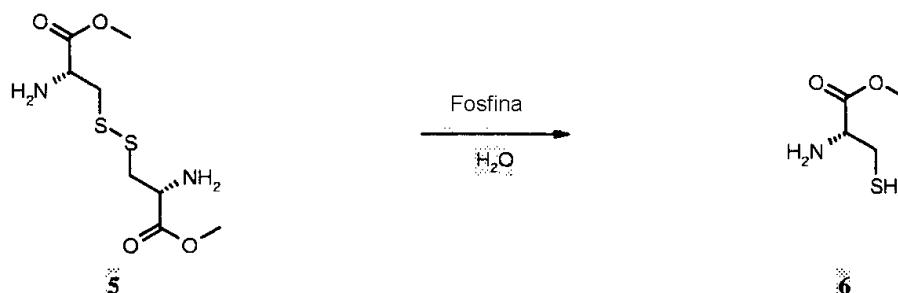


[0159] Se ha demostrado que el ácido trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfónico (2,5 mM) se puede utilizar en combinación con el inhibidor de sitio activo 4-aminobenzamida para reducir el enlace disulfuro expuesto entre el glutatión y el FVIIa R396C esencialmente sin pérdida de la actividad amidolítica. La escisión reductora del enlace disulfuro mixto se demostró mediante la posterior modificación de la cisteína liberada con PEG5K-maleimida.

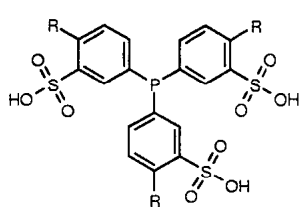
[0160] Triarilfosfinas **1-3** (10 mM) se incubaron individualmente con rFVIIa durante 1 h a temperatura ambiente. En presencia de **1**, rFVIIa conservó la mayor parte de su actividad. En contraste, el ácido 3,3'-bis-sulfónico **2** causó una rápida disminución de la actividad amidolítica de la enzima, al igual que el análogo ácido 4,4'-bis-sulfónico **3** (sal dipotásica de Aldrich), y por lo tanto no se consideró óptimo para la reducción de rFVIIa.

[0161] Además, **1** fue probado para su capacidad para reducir el éster dimetil cistina **5**. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente a una concentración de 15 mM de **1** en agua. El sustrato estaba presente a una concentración de 5 mM. Se demostró por análisis LC-MS que el enlace disulfuro en **5** se redujo en las condiciones dadas.

Esquema 1

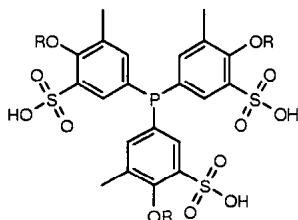


[0162] La triarilfosfina **4** más estéricamente impedida (sal trisódica de Strem) se encontró que era casi no reactivo hacia rFVIIa, lo que sugiere la posibilidad de desarrollar un agente reductor más selectivo. Los compuestos **9-11** representan ejemplos no limitativos de triarilfosfinas que se espera que sean agentes reductores disulfuros selectivos.



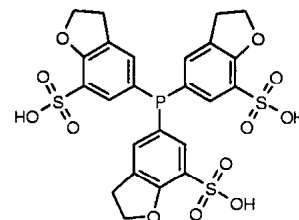
R = H, Me, Et, Pr, 2-Pr, Bu,
MeO, EtO, PrO, 2-PrO, BuO.

9



R = Me, Et, Pr, 2-Pr, Bu.

10



11

Ejemplo 2

[0163] *Materiales* - Plasma deficiente en FVIII se obtuvo de George King Bio-Medical Inc. (Kansas, USA; Prod. no. 0800). Los trombocitos humanos liofilizados fueron adquiridos de Helena Biosciences (UK, Prod. no. 5371). El tampón de reconstitución de trombocitos: Tris Buffered Saline se obtuvo de Helena Biosciences (UK; Prod. no. 5365). Innovin se obtuvo de Dade Behring (Liederbach, Alemania; Prod. no. B4212-50). Sustrato específico de trombina: Z-Gly-Gly-Arg-AMC HCl fluoróforo se obtuvo de Bachem (Weil am Rhein, Alemania; Prod. no. I-1140). La expresión y purificación del FVIIa recombinante (rFVIIa) se realizaron como se describe previamente (Tim et al., 1988 Persson y Nielsen, 1996). Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico o mejor.

[0164] *Determinación de la actividad de tipo rFVIIa de análogos de FVII usando un bioensayo de potencial de trombina endógena (ETP)* - El ensayo de potencial de trombina endógena (ETP) se basa en la determinación a tiempo real de la generación de trombina en una muestra de plasma seleccionada. La muestra de plasma contiene trombocitos liofilizados como fuente superficial de lípidos fisiológica para el ensamblaje de los complejos de protrombinasa y Xasa en la cascada de la coagulación. La actividad de la trombina en tiempo real se determina por la detección continua de un producto fluorescente que aparece a partir de un sustrato específico de la trombina (Hemker et al., 2000; Hemker & Béguin, 2000).

[0165] La concentración de FVIIa y variantes pegiladas se determinaron por medidas de absorbancia a 280 nm. Un valor de 1,36 se tomó como la absorbancia de un 1 mg/ml de solución de proteína (E0.1%).

[0166] Un vial de trombocitos liofilizadas se disolvió en 0,73 ml de tampón de reconstitución (Tris Buffered Saline) y se diluyó adicionalmente a 75.000 trombocitos/ μ l en plasma deficiente de FVIII. Innovin, FVIIa recombinante (rFVIIa), así como muestras de ensayo se diluyeron en tampón de ensayo (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,35, 1,5% de albúmina de suero bovino (BSA)). Sustrato específico de la trombina, Z-Gly-Gly-Arg-AMC, se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) al 60% y se diluyó adicionalmente en un tampón de ensayo que contenía calcio (CaCl₂ 100mM, Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.35). En una placa de microtitulación Costar (96 pocillos, Prod. No. 3631) 10 μ l de rFVIIa (final 0 - 10000 ng/ml), o muestra de ensayo, o en blanco (tampón de ensayo) (10 μ l) se añadieron a los pocillos respectivos. Innovin (10 μ l, final 0,12 pM), y plasma con trombocitos (80 μ l, final 50,000 trombocitos/ μ l) se añadieron a los pocillos respectivos de una placa Costar (96 pocillos, Prod. No. 3631). La placa se incubó durante 10 min a 37 °C en Thermo

Fluorocan Ascent (Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK). El sustrato (20 µl, concentraciones finales: sustrato específico de trombina 0,4 mM, DMSO al 0,5% y CaCl₂ 16,7 mM) se añadió inmediatamente y la fluorescencia se registró de forma continua durante 60 minutos (excitación 390 nm, emisión 460 nm).

5 **[0167]** Las curvas de concentración-respuesta se generaron para rFVIIa y análogos de FVII en base a la señal (Área bajo la curva de tiempo-unidad fluorescente durante 60 min). La actividad ETP del análogo relativo al rFVIIa se calculó a partir de las curvas y se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4 - Actividades ETP de moléculas diméricas de FVIIa 407C en relación con el rFVIIa. Las actividades relativas se dan por protómero FVIIa 407C y, por lo tanto, las actividades totales de las moléculas diméricas son el doble de los valores notificados.

Proteína	Actividad relativa ETP
FVIIa 407C-PEG3.4k-FVIIa 407C	620%
FVIIa 407C-PEG20k-FVIIa 407C	270%

10

Referencias

[0168]

15 Bock,P.E. (1992). Active-site-selective labeling of blood coagulation proteinases with fluorescence probes by the use of thioester peptide chloromethyl ketones. I. Specificity of thrombin labeling. *J Biol Chem* 267, 14963-14973 .

Chau,M.H. and Nelson,J.W. (1991). Direct measurement of the equilibrium between glutathione and dithiothreitol by high performance liquid chromatography. *FEBS Lett.* 291, 296-298 .

20

Fernandes, A.P. and Holmgren, A. (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid.Redox.Signal.*, 6, 63-74

25

Freskgard,P.O., Olsen,O.H., and Persson,E. (1996). Structural changes in factor VIIa induced by Ca²⁺ and tissue factor studied using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci* 5, 1531-1540 .

Gilbert,H.F. (1995). Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol.* 251, 8-28 .

30

Grant,C. (2001). MicroReview: Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol. Microbiol.* 39, 533-541

Grimberg,J., Maguire,S., and Belluscio,L. (1989). A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. *Nucleic Acids Res* 17, 8893 .

35

Harvey et al. (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 8363-8369 .

Hemker, H. C. Giesen, P. L. Ramjee, M. Wagenvoort, R. and Beguin, S.. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb.Haem.* 83 (4):589-591, 2000 .

40

Hemker, H. C. and Beguin, S.. Phenotyping the clotting system. *Thromb.Haem.* 84 (5):747-751, 2000 .

Higashi,S., Matsumoto,N., and Iwanaga,S. (1997). Conformation of factor VIIa stabilized by a labile disulfide bond (Cys-310-Cys-329) in the protease domain is essential for interaction with tissue factor. *J. Biol. Chem.* 272, 25724-25730 .

45

Holmgren,A., Åslund,F. (1995) Glutaredoxin, *Method Enzymol.* 252, 283-292

Hoffman,C.S. and Winston,F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272 .

50

Loferer,H., Wunderlich,M., Hennecke,H., and Glockshuber,R. (1995). A bacterial thioredoxin-like protein that is exposed to the periplasm has redox properties comparable with those of cytoplasmic thioredoxins. *J. Biol. Chem.* 270, 26178-26183 .

55

Luikenhuis,S., Perrone,G., Dawes,I.W., and Grant,C.M. (1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* 9, 1081-1091

- Lundberg,M., Johansson,C., Chandra,J., Enoksson,M., Jacobsson,G., Ljung,J., Johansson,M., and Holmgren,A. (2001). Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms. *J Biol Chem* 276, 26269-26275
- 5 Nelsestuen et al. (2001). *J. Biol. Chem.* 276, 39825-39831 .
- Rodriguez-Manzanegue,M.T., Ros,J., Cabisco,E., Sorribas,A., and Herrero,E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 8180-8190
- 10 Oe,T., Ohyagi,T., Naganuma,A. (1998) Determination of γ -glutamylglutathione and other low-molecular-mass thiol compounds by isocratic high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chrom. B*, 708, 285-289
- Ostergaard,H., Tachibana,C., and Winther,J.R. (2004). Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J Cell Biol* 166, 337-345 .
- 15 Owenius,R.I, Osterlund,M., Lindgren,M., Svensson,M., Olsen,O.H., Persson,E., Freskgård,P.-O., Carlsson,U. (1999) Properties of spin and fluorescent labels at a receptor-ligand interface. *Biophys. J.* 77, 2237-2250
- 20 Padilla,C.A., Martinez-Galisteo,E., Barcena,J.A., Spyrou,G., and Holmgren,A. (1995). Purification from placenta, amino acid sequence, structure comparisons and cDNA cloning of human glutaredoxin. *Eur J Biochem* 227, 27-34
- Persson et al. (2001). *J. Biol. Chem.* 276, 29195-29199 .
- 25 Persson et al. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 13583-13588 .
- Persson et al. (2002), *Eur. J. Biochem.*, 379, 497-503 .
- Persson,E., Bak,H., Ostergaard,A., and Olsen,O.H. (2004). Augmented intrinsic activity of Factor VIIa by replacement of residues 305, 314, 337 and 374: evidence of two unique mutational mechanisms of activity enhancement. *Biochem J* 379, 497-503 .
- 30 Persson,E. and Nielsen,L.S. (1996). Site-directed mutagenesis but not gamma-carboxylation of Glu-35 in factor VIIa affects the association with tissue factor. *FEBS Lett* 385, 241-243 .
- 35 Riddles,P.W., Blakeley,R.L., and Zerner,B. (1979). Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)--a reexamination. *Anal. Biochem.* 94, 75-81 .
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory).
- 40 Shah et al. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 4229-4234 .
- Sichler,K., Banner,D.W., D'Arcy,A., Hopfner,K.P., Huber,R., Bode,W., Kresse,G.B., Kopetzki,E., and Brandstetter,H. (2002). Crystal structures of uninhibited factor VIIa link its cofactor and substrate-assisted activation to specific interactions. *J. Mol. Biol.* 322, 591-603 .
- 45 Soejima et al. (2002). *J. Biol. Chem.* 277, 49027 .
- 50 Takahashi,N. and Creighton,T.E. (1996). On the reactivity and ionization of the active site cysteine residues of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* 35, 8342-8353 .
- Thim,L., Bjoern,S., Christensen,M., Nicolaisen,E.M., Lund-Hansen,T., Pedersen,A.H., and Hedner,U. (1988). Amino acid sequence and posttranslational modifications of human factor VIIa from plasma and transfected baby hamster kidney cells. *Biochemistry* 27, 7785-7793 .
- 55 Wang, E.C.W., Hung, S.-H., Cahoon,M., Hedstrom,L. (1997) The role of Cys191-Cys220 disulfide bond in trypsin: new targets for engineering substrate specificity. *Protein Engineering*, 10, 405-411
- 60 Yang,Y., Jao,S., Nanduri,S., Starke,D.W., Mieyal,J.J., and Qin,J. (1998). Reactivity of the human thioltransferase

(glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S mutant and NMR solution structure of its glutathionyl mixed disulfide intermediate reflect catalytic specificity. *Biochemistry* 37, 17145-17156

REIVINDICACIONES

- 5 1. Compuesto de FVIIa multimérico o dimérico que contiene, como mínimo, dos polipéptidos de FVIIa unidos mediante enlace covalente, para retener la actividad catalítica intrínseca de los polipéptidos de FVIIa, donde dicho compuesto tiene una actividad biológica superior a la de los polipéptidos de FVIIa del constituyente, y en el que, al menos, dos polipéptidos de FVIIa están conectados de manera covalente por cisteínas producidas mediante ingeniería genética, en dichos polipéptidos de FVIIa.
- 10 2. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dos polipéptidos de FVIIa se encuentran conectados por enlace covalente para formar un compuesto de FVIIa dimérico.
3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichos polipéptidos de FVIIa conectados por enlace covalente son polipéptidos de FVIIa idénticos.
- 15 4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos dos polipéptidos de FVIIa diferentes se encuentran conectados mediante un enlace covalente.
- 20 5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho compuesto de FVIIa multimérico o dimérico contiene un enlace entre los polipéptidos FVIIa constituyentes.
6. Compuesto según la reivindicación 5, donde dicho enlace tiene la estructura resultante de una reacción con un PEG reactivo de cisteína bivalente.
- 25 7. Compuesto según la reivindicación 5, donde dicho enlace tiene la estructura resultante de una reacción con maleimida-PEG-maleimida.
8. Compuesto según la reivindicación 7, donde dicho maleimida-PEG-maleimida se selecciona del grupo maleimida-PEG2kD-maleimida, maleimida-PEG3.4kD-maleimida, maleimida-PEG5kD-maleimida, maleimida-PEG10kD-maleimida, y maleimida-PEG20kD-maleimida.
- 30 9. Compuesto según la reivindicación 5, donde dicho enlace contiene una secuencia de aminoácidos.
10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho polipéptido de FVIIa es FVIIa 407C.
- 35 11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho polipéptido de FVIIa es una variante de FVIIa 407C.
12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho polipéptido de FVIIa es un FVIIa P406C o una variante de P406C FVIIa.
- 40 13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho polipéptido de FVIIa es un FVIIa R396C o una variante de FVIIa R396C.
14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones, donde dicho polipéptido de FVIIa es un FVIIa Q250C o una variante de FVIIa Q250C.
- 45 15. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichos polipéptidos de FVIIa son variantes de FVIIa con dominios GLA optimizados, por ejemplo combinaciones de Y4 (inserción), P10Q, K32E, D33F, D33E, y A34E.
- 50 16. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichos polipéptidos de FVIIa son variantes de FVIIa con mayor actividad proteolítica intrínseca, por ejemplo M298Q FVIIa, V158D/E296V/M298Q FVIIa, V158D/E296V/M298Q/K337A FVIIa, F374Y/L305V-FVIIa, F374Y/L305V/S314E/K337A-FVIIa, F374Y/L305V/S314E-FVIIa, F374Y/L305V/K337A-FVIIa, L305V/K337A-FVIIa, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVIIa, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVIIa, V158T/M298Q-FVIIa, E296V/M298Q-FVIIa, V158D/E296V-FVIIa, V158D/M298Q-FVIIa, y sus variantes 407C.
- 55 17. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde dicha variante de FVIIa se selecciona del grupo compuesto por L305V-FVIIa, L305V/M306D/D309S-FVIIa, L305I-FVIIa, L305T-FVIIa, F374P-FVIIa, V158T/M298Q-FVIIa, V158D/E296V/M298Q-FVIIa, K337A-FVIIa, M298Q-FVIIa, V158D/M298Q-FVIIa, L305V/K337A-FVIIa, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVIIa, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIa, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVIIa, K157A-FVIIa, E296V-FVIIa, E296V/M298Q-FVIIa, V158D/E296V-FVIIa, V158D/M298K-FVIIa, S336G-FVIIa, L305V/K337A-FVIIa, L305V/V158D-FVIIa, L305V/E296V-FVIIa, L305V/M298Q-FVIIa, L305V/V158T-FVIIa, L305V/K337A/V158T-FVIIa, L305V/K337A/M298Q-FVIIa, L305V/K337A/E296V-FVIIa, L305V/K337A/V158D-FVIIa, L305V/V158D/M298Q-FVIIa, L305V/V158D/E296V-FVIIa, L305V/V158T/M298Q-FVIIa, L305V/V158T/E296V-FVIIa, L305V/E296V/M298Q-FVIIa, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVIIa, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVIIa, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVIIa, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVIIa, L305V/V158T/E296V/K337A-FVIIa, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVIIa,

L305V/V158D/E296V/K337A-FVIIa, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIa, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVIIa, S314E/K316H-FVIIa, S314E/K316Q-FVIIa, S314E/L305V-FVIIa, S314E/K337A-FVIIa, S314E/V158D-FVIIa, S314E/E296V-FVIIa, S314E/M298Q-FVIIa, S314E/V158T-FVIIa, K316H/L305V-FVIIa, K316H/K337A-FVIIa, K316H/V158D-FVIIa, K316H/E296V-FVIIa, K316H/M298Q-FVIIa, K316H/V158T-FVIIa, K316Q/L305V-FVIIa, K316Q/K337A-FVIIa, K316Q/V158D-FVIIa, K316Q/E296V-FVIIa, K316Q/M298Q-FVIIa, K316Q/V158T-FVIIa, S314E/L305V/K337A-FVIIa, S314E/L305V/V158D-FVIIa, S314E/L305V/E296V-FVIIa, S314E/L305V/M298Q-FVIIa, S314E/L305V/V158T-FVIIa, S314E/L305V/K337A/V158T-FVIIa, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVIIa, S314E/L305V/K337A/E296V-FVIIa, S314E/L305V/K337A/V158D-FVIIa, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVIIa, S314E/L305V/V158D/E296V-FVIIa, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVIIa, S314E/L305V/V158T/E296V-FVIIa, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVIIa, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVIIa, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVIIa, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVIIa, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVIIa, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVIIa, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIa, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVIIa, K316H/L305V/K337A-FVIIa, K316H/L305V/V158D-FVIIa, K316H/L305V/E296V-FVIIa, K316H/L305V/M298Q-FVIIa, K316H/L305V/V158T-FVIIa, K316H/L305V/K337A/V158T-FVIIa, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVIIa, K316H/L305V/K337A/E296V-FVIIa, K316H/L305V/K337A/V158D-FVIIa, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVIIa, K316H/L305V/V158D/E296V-FVIIa, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVIIa, K316H/L305V/V158T/E296V-FVIIa, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVIIa, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVIIa, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVIIa, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVIIa, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVIIa, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVIIa, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIa, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVIIa, K316Q/L305V/K337A-FVIIa, K316Q/L305V/V158D-FVIIa, K316Q/L305V/E296V-FVIIa, K316Q/L305V/M298Q-FVIIa, K316Q/L305V/V158T-FVIIa, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVIIa, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVIIa, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVIIa, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVIIa, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVIIa, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVIIa, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVIIa, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVIIa, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVIIa, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVIIa, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVIIa, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVIIa, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVIIa, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVIIa, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVIIa, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVIIa y sus variantes 407C.

18. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichos polipéptidos de FVIIa están pegilados.
19. Compuesto que consiste en una combinación de albúmina de suero humano o una variante de la misma y un compuesto de FVIIa multimérico o dimérico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
20. Composición farmacéutica que contiene un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-19 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
21. Uso de un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-19, para la producción de un medicamento para el tratamiento de trastornos de sangrado o episodios de sangrado en un sujeto o para la mejora del sistema hemostático normal.
22. Método para la preparación de un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-19, dicho método consta de las siguientes etapas:
- a) síntesis y purificación de dichos polipéptidos de FVIIa;
 - b) síntesis de dicho compuesto por acoplamiento de dichos polipéptidos de FVIIa;
 - c) aislamiento de dicho compuesto de FVIIa multimérico o dimérico.
23. Método para la preparación de un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-19, dicho método consta de las siguientes etapas:
- a) síntesis y purificación de dichos polipéptidos de FVIIa;
 - b) reducción selectiva del residuo de cisteína en los polipéptidos de FVIIa que van a unirse;
 - c) síntesis de dicho compuesto de FVIIa multimérico o dimérico por acoplamiento de dichos polipéptidos de FVIIa con residuos de cisteína reducida en presencia de un enlace activado;
 - d) aislamiento de dicho compuesto de FVIIa multimérico o dimérico.
24. Método según la reivindicación 23, donde el paso b) incluye reducción selectiva del residuo de cisteína en el polipéptido de FVIIa por reacción con un tampón redox o un agente reductor como la triarilfosfina.

Figura 1

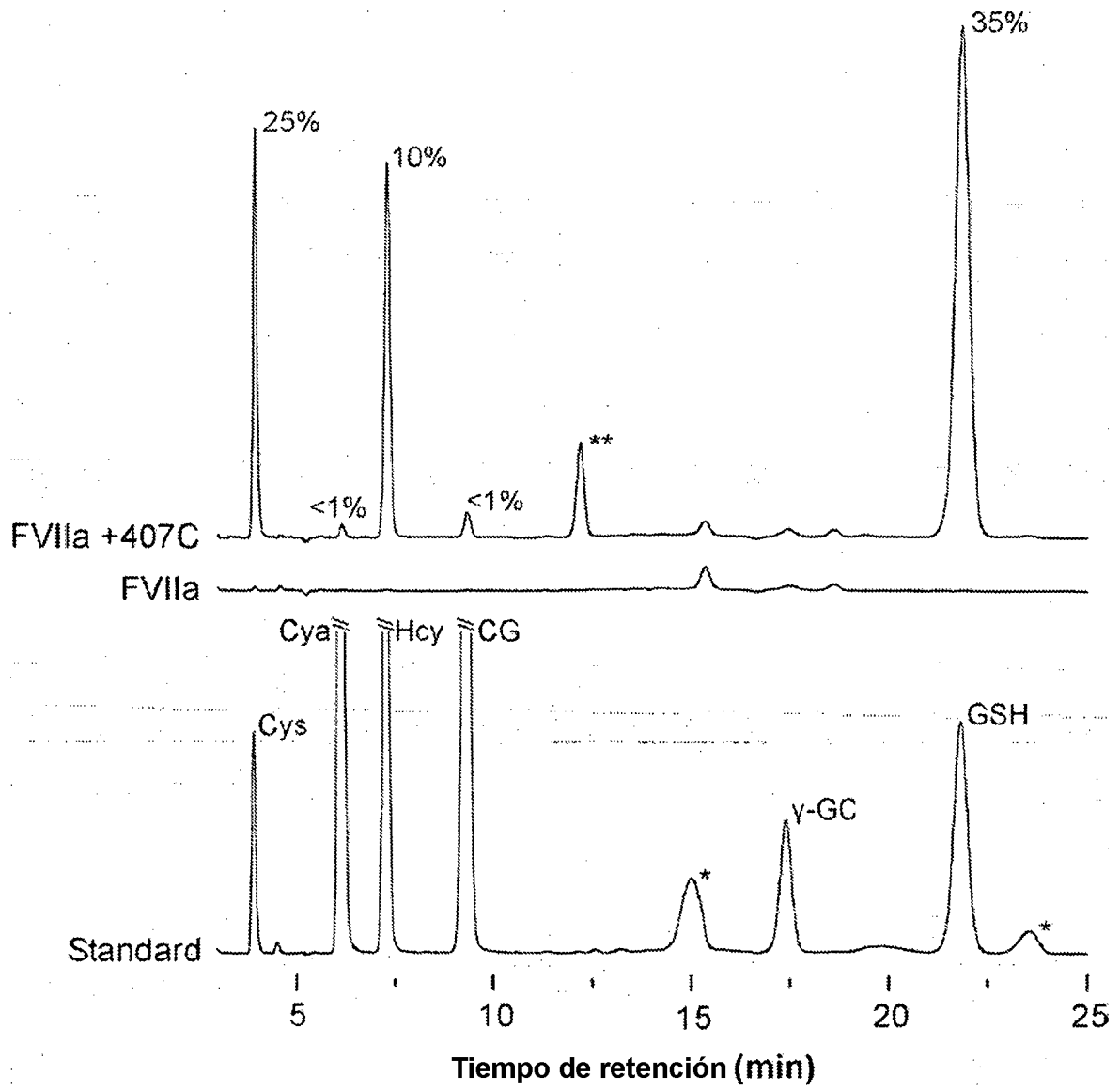


Figura 2

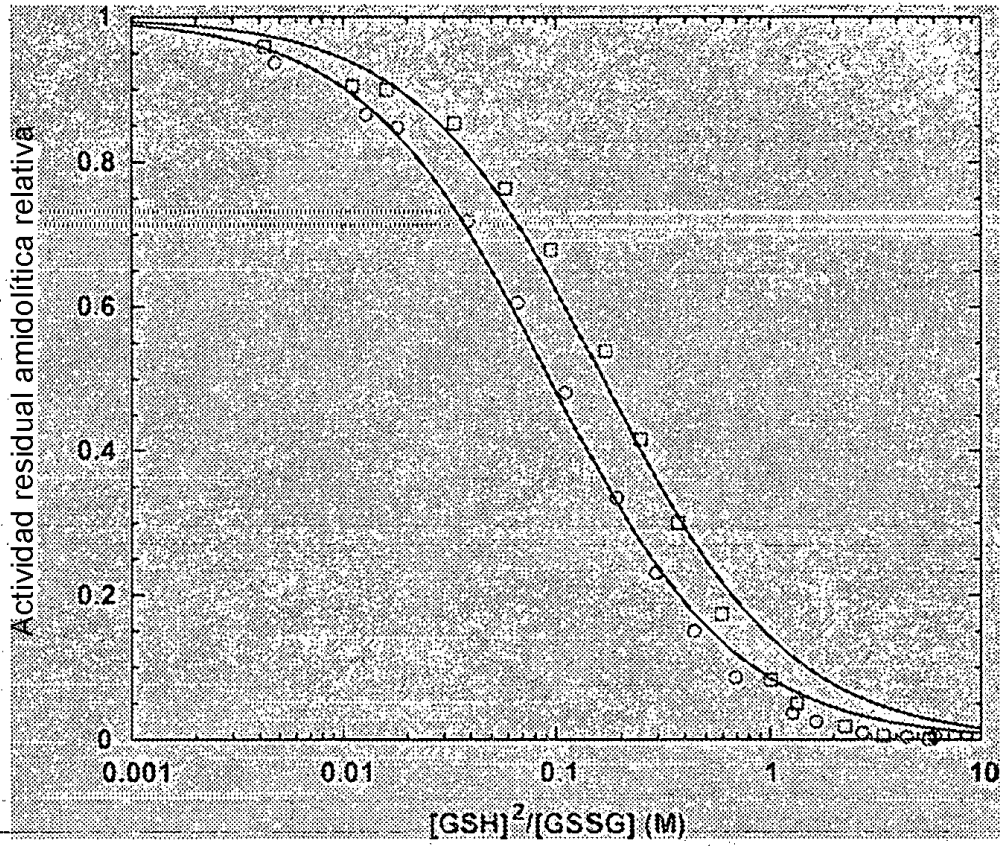


Figura 3

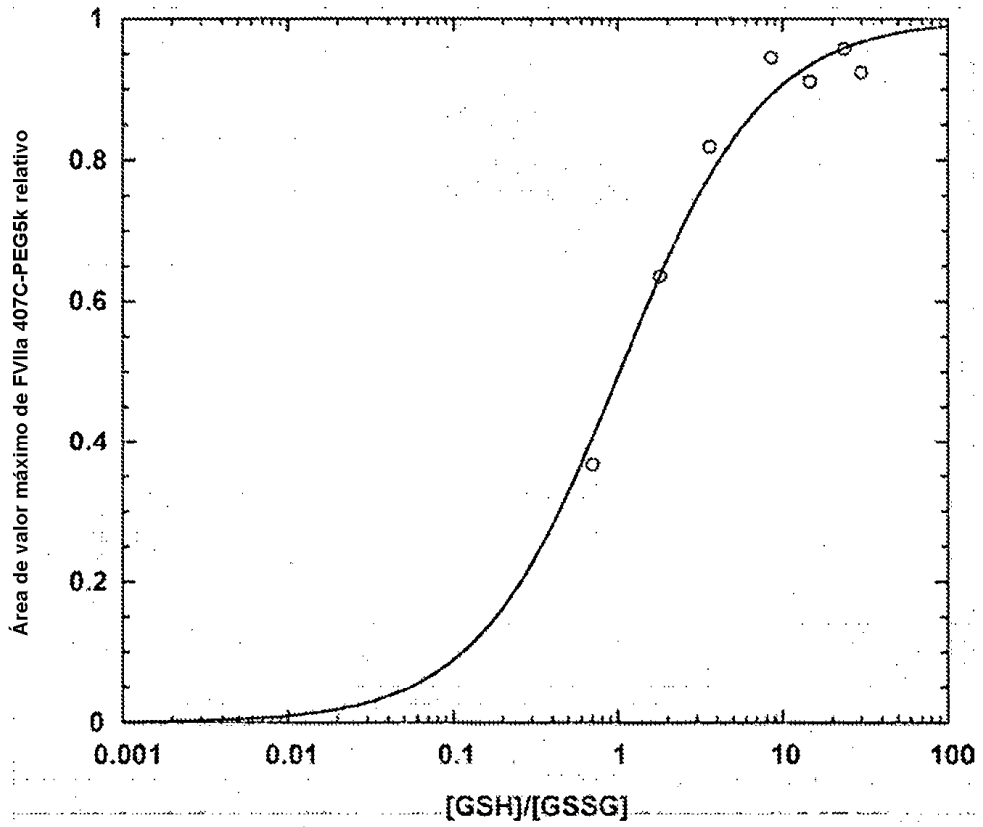


Figura 4

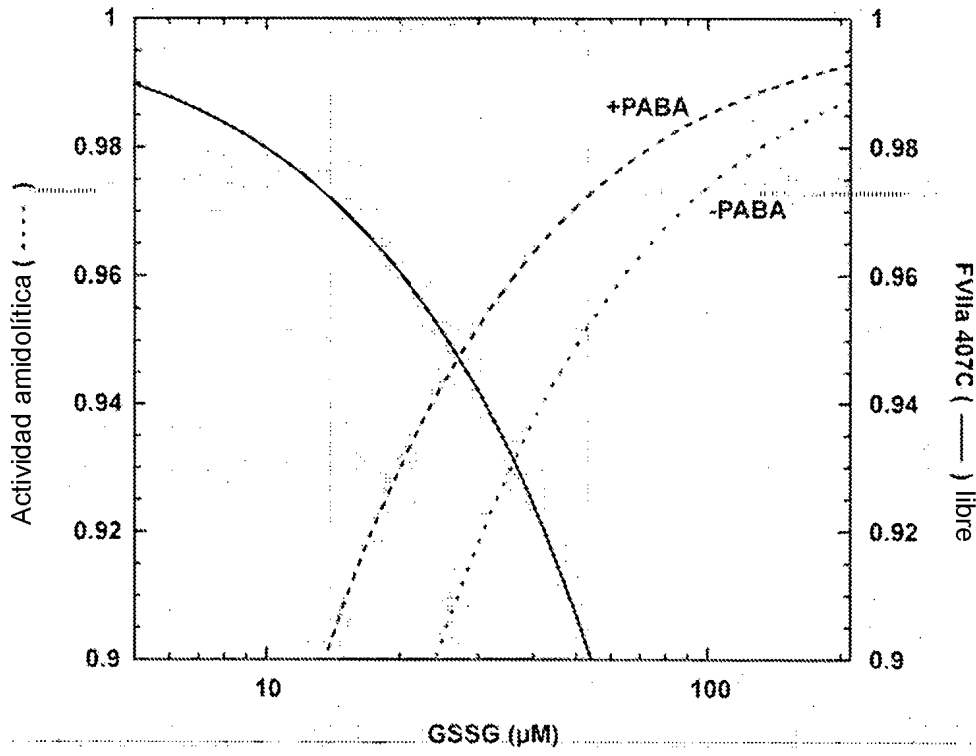


Figura 5

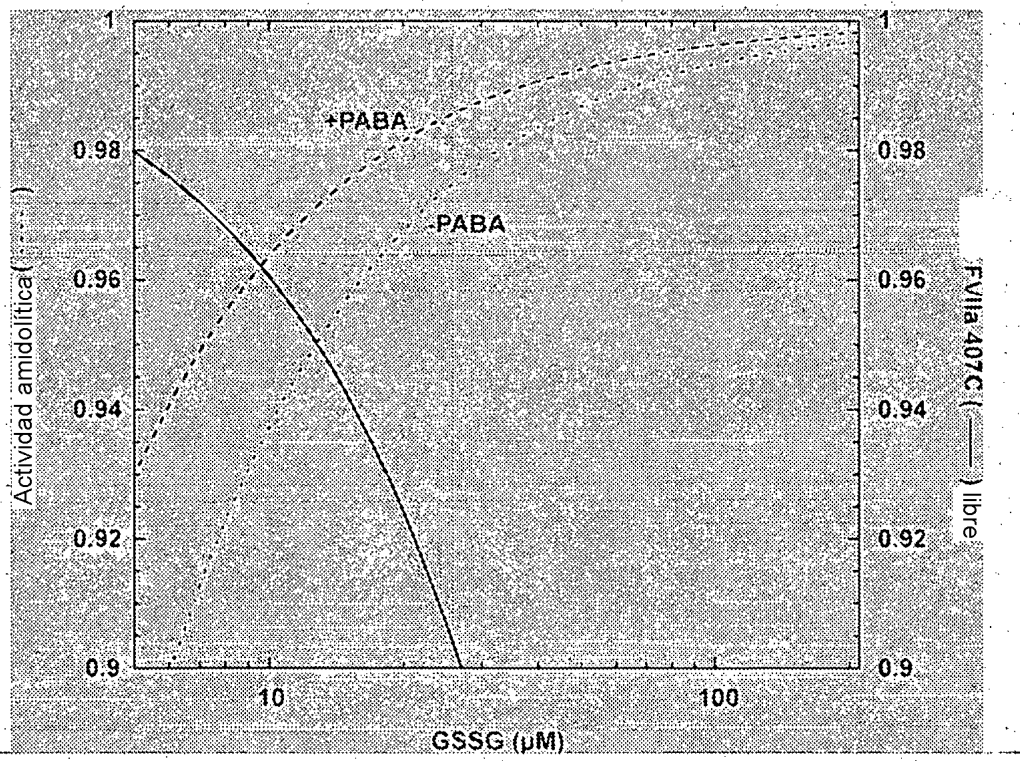


Figura 6

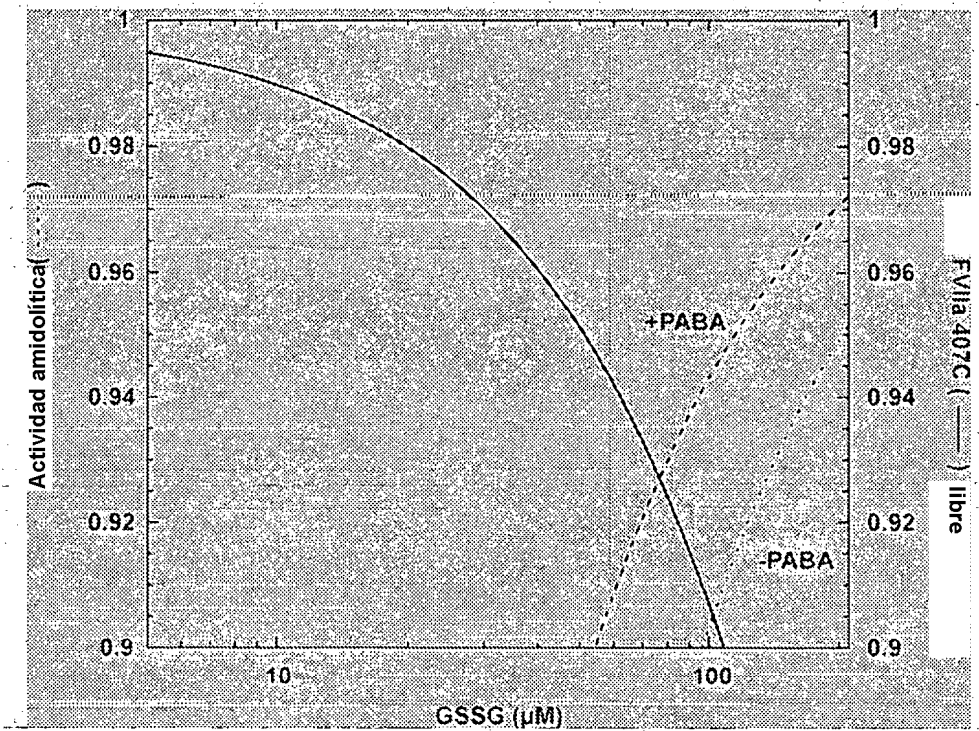


Figura 7

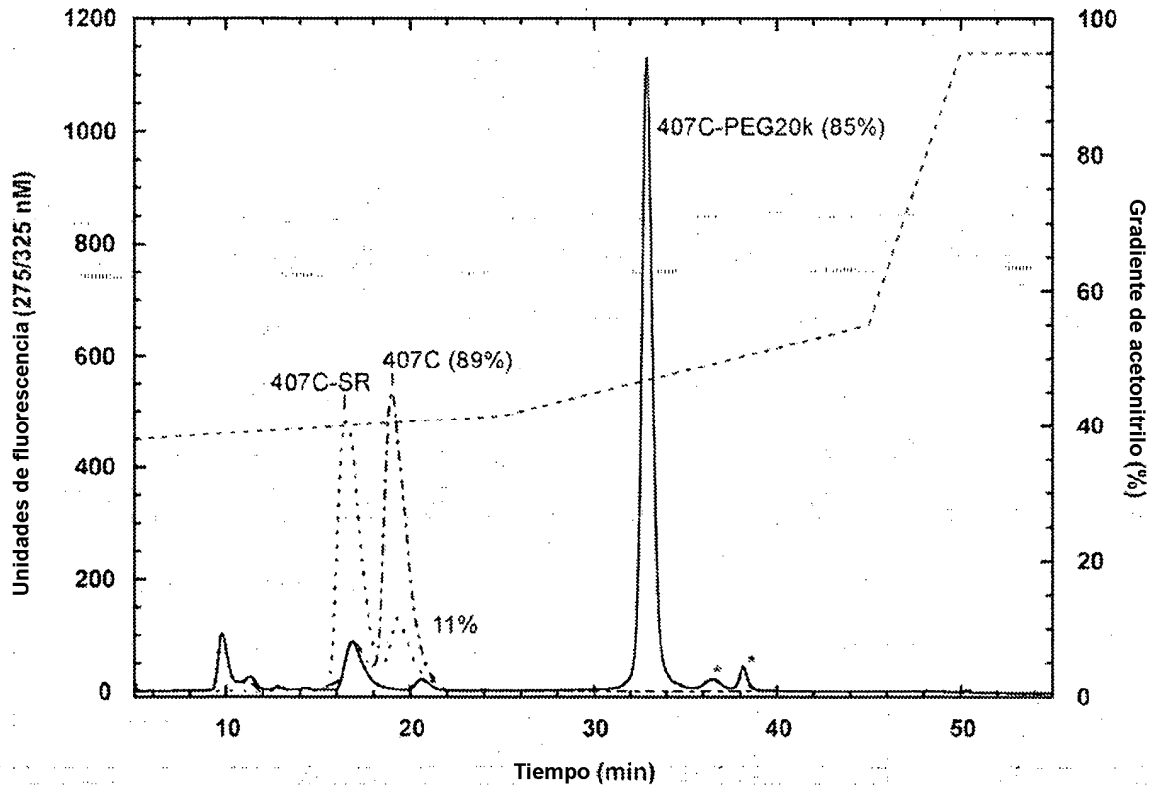


Figura 8

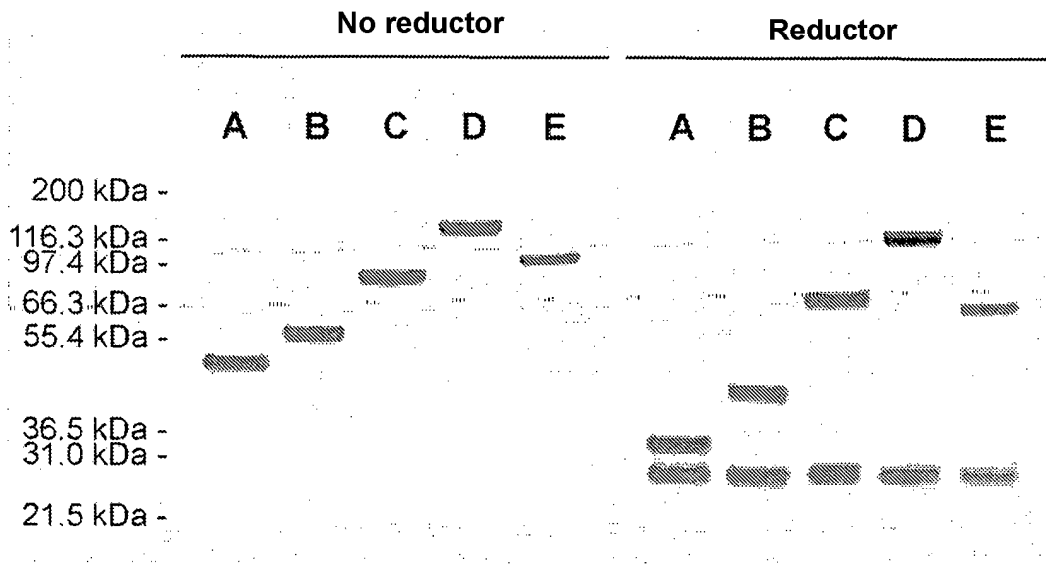


Figura 9

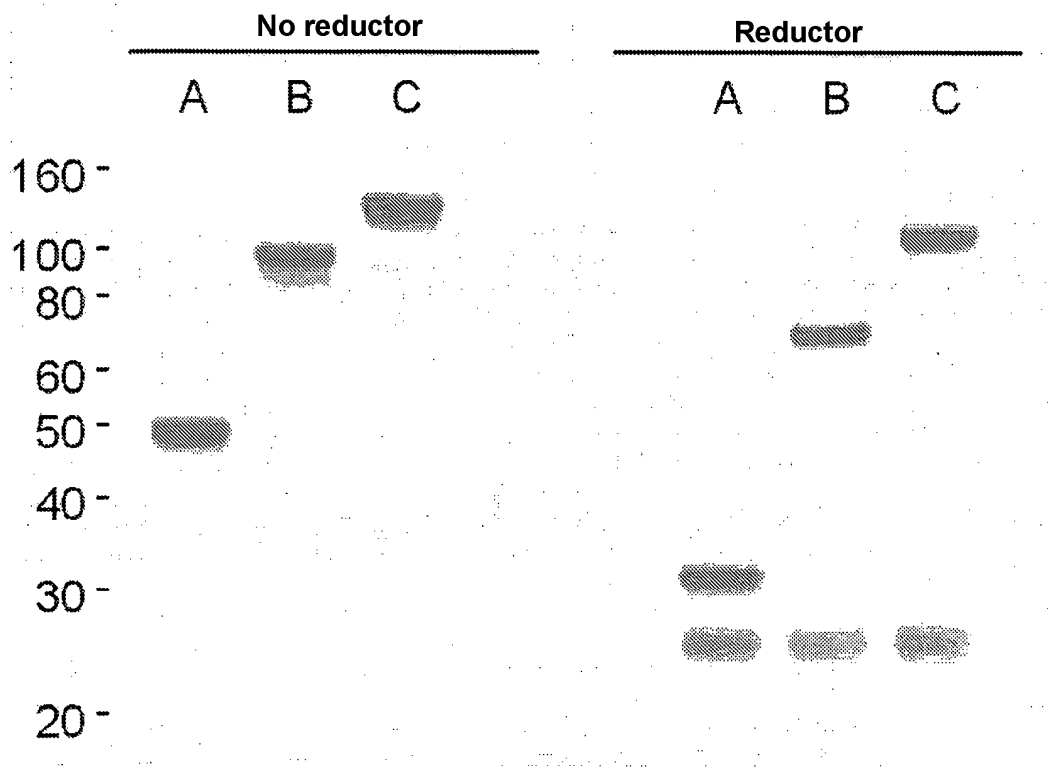


Figura 10

