

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 496 104**

51 Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.1998 E 05026205 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 1676919**

54 Título: **Polipéptidos dependientes de la vitamina K modificados**

30 Prioridad:

23.10.1997 US 955636

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

18.09.2014

73 Titular/es:

**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
(100.0%)
1000 WESTGATE DRIVE, SUITE 160
SAINT PAUL, MN 55114, US**

72 Inventor/es:

NELSESTUEN, GARY L.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 496 104 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos dependientes de la vitamina K modificados

Antecedentes de la invención

5 Las proteínas dependientes de la vitamina K contienen de 9 a 13 residuos de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla) en sus 45 residuos amino-terminales. Los residuos Gla son producidos por enzimas del hígado que emplean la vitamina K para carboxilar las cadenas laterales de los residuos de ácido glutámico, en los precursores proteínicos. Las proteínas dependientes de la vitamina K están implicadas en varios procesos biológicos, entre los cuales el mejor descrito es la coagulación de la sangre (revisados por Furie, B. and Furie, B.C., 1988, *Cell*, 53:505-518). Las proteínas dependientes de la vitamina K incluyen la proteína Z, la proteína S, la protrombina, el Factor X, el Factor IX, la proteína C, el Factor VII y Gas6. La última proteína actúa en la regulación del crecimiento celular. Matsubara et al., 1996, *Dev. Biol.*, 180:499-510. Los residuos Gla son necesarios para la unión adecuada del calcio y para la interacción con membranas por estas proteínas. Se cree que el sitio de contacto con membranas del Factor X se encuentra en los residuos de aminoácidos 1-37. Evans and Nelsestuen, 1996, *Protein Science* 5: suppl. 1, 163 Abs. Aunque las regiones de las proteínas plasmáticas que contienen Gla muestran un alto grado de homología en las secuencias, tienen al menos 1000 veces más afinidad hacia membranas. McDonald, J.F., et al., 1997, *Biochemistry*, 36:5120-5137.

20 El Factor VII actúa en la etapa inicial de la coagulación de la sangre y puede ser un elemento clave para la formación de coágulos de sangre. El precursor inactivo o zimógeno, tiene baja actividad enzimática que se incrementa considerablemente por digestión proteolítica para formar el Factor VIIa. Esta activación puede estar catalizada por el Factor Xa, así como por el Factor tisular VIIa, una proteína integral de la membrana encontrada en varios tipos celulares. Fiore, M.M., et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269:143-149. La activación por el Factor tisular VIIa se denomina autoactivación. Está implicada tanto en la activación (formación del Factor VIIa a partir del Factor VII) como en la actividad posterior del Factor VIIa. La vía más importante para la activación *in vivo* es desconocida. El Factor VIIa puede activar los Factores IX y X de la coagulación de la sangre.

25 El Factor tisular se expresa con altos niveles en la superficie de algunas células tumorales. Es posible que el Factor tisular y el Factor VIIa actúen en el desarrollo de tumores y en la invasión de tejidos. Vrana, J.A., et al., *Cancer Res.*, 56:5063-5070. La expresión celular y la acción del Factor tisular son también un Factor principal en la respuesta tóxica al choque endotóxico. Dackiw, A.A., et al., 1996, *Arch. Surg.*, 131:1273-1278.

30 La proteína C es activada por trombina en presencia de trombomodulina, una proteína integral de la membrana de las células endoteliales. Esmon, N.L., et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257:859-864. La proteína C activada (APC) degrada los Factores Va y VIIIa junto con su cofactor, la proteína S. La resistencia a APC es la forma más común de la enfermedad trombotosis hereditaria. Dahlback, B., 1995, *Blood*, 85:607-614. Los inhibidores de la vitamina K se administran generalmente como una profilaxis para la trombotosis.

35 Las proteínas dependientes de la vitamina K se emplean para tratar ciertos tipos de hemofilia. La hemofilia A se caracteriza por la ausencia del Factor VIII activo, el Factor VIIIa o la presencia de inhibidores del Factor VIII. La hemofilia B se caracteriza por la ausencia del Factor IX activo, el Factor IXa. La carencia de Factor VII, aunque es rara, responde bien a la administración del Factor VII. Bauer, K.A., 1996, *Haemostasis*, 26:155-158, suppl. 1. La terapia de sustitución del Factor VIII está limitada en algunos pacientes debido al desarrollo de títulos elevados de anticuerpos inhibidores del Factor VIII. Alternativamente, el Factor VIIa se puede utilizar en el tratamiento de las hemofilias A y B. El Factor IXa y el Factor VIIIa activan el Factor X. El Factor VIIa elimina la necesidad de los Factores IX y VIII, activando directamente el Factor X y pueden superar los problemas de carencia de los Factores IX y VIII, con pocas consecuencias inmunológicas. Hedner et al., 1993, *Transfus. Med. Rev.*, 7:78-83; Nicolaisen, E.M., et al., 1996, *Thromb. Haemost.*, 76:200-204. Los niveles eficaces de administración del Factor VIIa son frecuentemente altos (45 a 90 µg/kg de peso corporal) y la administración se puede tener que repetir cada pocas horas. Shulmav, S., et al., 1996, *Thromb. Haemost.*, 75:432-436.

50 Se ha encontrado que una forma soluble del Factor tisular (Factor tisular soluble o sTF) que no contiene la región de contacto con las membranas, es eficaz en el tratamiento de la hemofilia cuando se administra junto con el Factor VIIa. Patente de EE.UU. Nº 5.504.064. En perros, se observó que el sTF reduce la cantidad de Factor VIIa, necesario para tratar la hemofilia. La asociación a las membranas por sTF-VIIa, depende totalmente del sitio de contacto con la membrana del Factor VII. Esto está en contraste con el complejo tejido normal-Factor VIIa que se une a las membranas tanto a través del Factor tisular como del VII(a).

Sumario de la invención

55 Se ha descubierto que modificaciones en el dominio del ácido γ-carboxiglutámico (GLA) de los polipéptidos dependientes de la vitamina K, mejoran sus afinidades de unión a las membranas. Los polipéptidos dependientes de la vitamina K, modificados de esta manera, tienen una actividad mejorada y se pueden emplear como anti-coagulantes, pro-coagulantes o para otras funciones que emplean proteínas dependientes de la vitamina K. Por ejemplo, una molécula mejorada del Factor VII puede proporcionar algunos beneficios disminuyendo la dosificación del Factor

VIIa necesaria, la frecuencia relativa de la administración y/o proporcionando cambios cualitativos que permiten un tratamiento más eficaz de los estados de deficiencia.

5 La invención se refiere a un polipéptido del Factor VII o Factor VIIa que comprende un dominio de GLA modificado que mejora la afinidad de unión a las membranas de dicho polipéptido con relación a un polipéptido correspondiente al Factor VII natural o al Factor VIIa, comprendiendo dicho dominio de GLA modificado un residuo de glutamina en la posición 11 y un residuo de ácido glutámico en la posición 33, en donde dichos residuos se numeran según el Factor IX. El dominio de GLA modificado comprende desde aproximadamente el aminoácido 1 hasta aproximadamente el aminoácido 45 e incluye al menos una sustitución de aminoácidos como se indica anteriormente. El aminoácido sustituido puede ser el aminoácido 11, 12, 29, 33 o 34 (numerándose los residuos de acuerdo con el Factor IX). El dominio de GLA modificado puede incluir una secuencia de aminoácidos que, en el estado saturado con calcio, forma una estructura terciaria que tiene un núcleo catiónico con un halo de carga electronegativa.

[0009] El polipéptido dependiente de la vitamina K de la invención es el Factor VII o Factor VIIa. El dominio de GLA modificado del Factor VII o Factor VIIa contiene un residuo de glutamina en el aminoácido 11 y un residuo de ácido glutámico en el aminoácido 33 (SEQ ID NO: 30).

15 [0010] La invención también se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido dependiente de la vitamina K de acuerdo con la reivindicación 3. Como se usa en la presente memoria, el término aislado (purificado) se refiere a una secuencia que corresponde a todo o parte del gen que codifica un polipéptido dependiente de la vitamina K, pero libre de secuencias que normalmente flanquean uno o ambos lados del gen en un genoma de mamífero.

20 [0011] La invención también se refiere a una célula hospedante de mamífero que incluye un vector de ácido nucleico que codifica un polipéptido dependiente de la vitamina K, de acuerdo con la reivindicación 4.

[0012] La invención también se refiere a una composición farmacéutica que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad de un polipéptido dependiente de la vitamina K eficaz para aumentar la formación de coágulos en un mamífero, en el que dicho polipéptido es como se define en la reivindicación 1. La composición farmacéutica puede incluir también el Factor tisular soluble.

25 [0013] La invención también se refiere al uso de un polipéptido dependiente de la vitamina K en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno de la coagulación, de acuerdo con la reivindicación 7.

[0014] Aunque no es parte de la invención reivindicada, se describe también un método para disminuir la formación de coágulos en un mamífero. El método incluye administrar una cantidad de un polipéptido dependiente de la vitamina K eficaz para disminuir la formación de coágulos en el mamífero. El polipéptido dependiente de la vitamina K incluye un dominio de GLA modificado que mejora la afinidad de unión a las membranas del polipéptido con relación a un polipéptido dependiente de la vitamina K natural correspondiente. El dominio de GLA modificado incluye al menos una sustitución de aminoácidos. El polipéptido dependiente de la vitamina K puede ser, por ejemplo, proteína C, proteína C activada o Factor VIIa modificado en su sitio activo. La proteína C o proteína C activada puede incluir un residuo de ácido glutámico en el aminoácido 33 y un residuo de ácido aspártico en el aminoácido 34 (SEQ ID NO: 19). Una glutamina o un ácido glutámico pueden estar sustituidos adicionalmente en la proteína C o proteína C activada (SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 21, respectivamente). Una glicina puede estar adicionalmente sustituida en el aminoácido 12 (SEQ ID NO: 24 o NO: 35).

30 [0015] Un método para aumentar la formación de coágulos en un mamífero incluye administrar una cantidad de un polipéptido dependiente de la vitamina K eficaz para aumentar la formación de coágulos en el mamífero. El polipéptido dependiente de la vitamina K incluye un dominio de GLA modificado que mejora la afinidad de unión a las membranas del polipéptido con relación a un polipéptido dependiente de la vitamina K natural correspondiente. El dominio de GLA modificado incluye al menos una sustitución de aminoácidos. El polipéptido dependiente de la vitamina K puede ser, por ejemplo, el Factor VII, el Factor VIIa, el Factor IX o el Factor IXa. El Factor VII o Factor VIIa puede incluir una sustitución de aminoácido en el aminoácido 11 y en el aminoácido 33. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos puede incluir un residuo de glutamina en el aminoácido 11 y un residuo de ácido glutámico en el aminoácido 33 (SEQ ID NO : 30).

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria pueden usarse para llevar a la práctica la invención, se describen a continuación los métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan en su totalidad como referencia. En caso de conflicto, prevalecerán las definiciones contenidas en la presente memoria descriptiva. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Las secuencias de aminoácidos del dominio de GLA de VIIa de tipo natural y de VIIQ11E33 se encuentran en las SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 30, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos del dominio de GLA del Factor X bovino, la proteína C bovina, la proteína C humana y la proteína C-H11 bovina se encuentran en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 23, respectivamente. La secuencia de aminoácidos del dominio de GLA de la proteína C VQ33E,N34D se encuentra en la SEQ ID NO: 19.
- La Figura 1 representa la unión a las membranas, con desviaciones típicas, de VIIa de tipo natural (círculos blancos), VIIQ11E33 (círculos negros) y el Factor X bovino (triángulos negros).
- 10 La Figura 2 representa la autoactivación de VIIQ11E33. La línea de puntos muestra la actividad en ausencia de fosfolípido.
- La Figura 3 representa la activación del Factor X por el Factor VIIa. Se proporcionan los resultados del Factor VIIa de tipo natural (círculos blancos) y de VIIaQ11E33 (círculos negros) para una concentración de 0,6 nM.
- La Figura 4 representa la coagulación de plasma humano por VIIa y VIIaQ11E33 con el Factor tisular soluble.
- La Figura 5 representa la coagulación de plasma por zimógenos del Factor VII y el Factor tisular normal.
- 15 La Figura 6 representa la inhibición de la formación de coágulos por el Factor VIIaQ11E33 modificado en su sitio activo (DEGR-VIIaQ11E33).
- La Figura 7 representa el tiempo en circulación del Factor VIIQ11E33 en ratas.
- La Figura 8 representa la interacción con las membranas por proteínas normales y modificadas. El panel A muestra la interacción de la proteína C bovina de tipo natural (círculos blancos) y de la proteína C-H11 bovina (círculos negros) con vesículas. El panel B muestra la interacción de la proteína C humana de tipo natural (círculos blancos) y de la proteína C-P11 humana (círculos negros) con membranas. En ambos casos, la línea de puntos indica el resultado si toda la proteína añadida estuviera unida a la membrana.
- 20 La Figura 9 representa la influencia de la proteína C activada sobre los tiempos de coagulación. En el panel A, se muestran la media y la desviación típica para tres determinaciones de los tiempos de coagulación para el plasma bovino, para APC bovina de tipo natural (círculos blancos) y para bAPC-H11 (círculos negros). En el panel B, se muestran la media y la desviación típica de tres duplicados de la coagulación de plasma humano para APC humana de tipo natural (círculos blancos) y APC-P11 humana (círculos negros).
- 25 La Figura 10 representa la inactivación del Factor Va por APC bovina y humana. El panel A representa la inactivación del Factor Va por APC bovina de tipo natural (círculos blancos) y APC-H11 bovina (círculos negros). El panel B representa la inactivación del Factor Va humano en plasma deficiente en proteína S, por APC humana de tipo natural (círculos blancos) y APC-H11 humana (círculos negros).
- 30 La Figura 11 representa la distribución electrostática de la proteína Z. Las líneas verticales indican las regiones electropositivas y las líneas horizontales indican las regiones electronegativas.
- La Figura 12 representa la unión a las membranas y la actividad de diversas proteínas C. El panel A muestra la unión a las membranas por la proteína C de tipo natural (círculos blancos), el mutante P11H de la proteína C (cuadrados negros), el mutante Q33E,N34D (círculos negros) y la protrombina bovina (cuadrados blancos). El panel B muestra la inhibición de la coagulación de la sangre por estos mutantes. El panel C muestra la inactivación del Factor Va.
- 35 La Figura 13 compara la unión a las membranas y la actividad de mutantes de la proteína C humana. El panel A compara la unión a las membranas del tipo natural (círculos blancos), E33 (triángulos blancos) y E33D34 (círculos negros). El panel B compara los tiempos de coagulación empleando el tipo natural (triángulos blancos), E33 (círculos blancos) y E33D34 (círculos negros).
- 40 La Figura 14 compara la unión a las membranas (panel A) y la inhibición de la coagulación (panel B) con el tipo natural (cuadrados blancos), H11 (círculos negros), E33D34 (triángulos blancos) y el triple mutante H11E33D34 (círculos blancos) de la proteína C bovina.
- 45 La Figura 15 representa las propiedades de interacción con las membranas de diferentes proteínas dependientes de la vitamina K. El panel A compara la interacción con las membranas del Factor X humano (círculos negros) y el Factor X bovino (círculos blancos). El panel B muestra la interacción con las membranas por el fragmento 1 de la protrombina bovina normal (círculos blancos), el fragmento 1 modificado con TNBS en ausencia de calcio (círculos negros) y el fragmento 1 modificado con TNBS en presencia de calcio 25 mM (cuadrados negros). El panel C muestra la tasa de unión de la proteína Z a vesículas a pH 9 (círculos negros) y a pH 7,5 (círculos blancos).
- 50

Descripción detallada

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido dependiente de la vitamina K que incluye un dominio de GLA modificado con mejor afinidad de unión a las membranas con relación a un polipéptido dependiente de la vitamina K natural correspondiente, siendo dicho polipéptido como se el definido en la reivindicación 1. Los polipéptidos dependientes de la vitamina K son un grupo de proteínas que utilizan la vitamina K en su vía biosintética para carboxilar las cadenas laterales de residuos de ácido glutámico en precursores de proteínas. El dominio de GLA contiene 9-13 residuos de ácido carboxiglutámico en la región N-terminal del polipéptido, típicamente desde el aminoácido 1 hasta aproximadamente el aminoácido 45. Son ejemplos de polipéptidos dependientes de la vitamina K, la proteína Z, la proteína S, el Factor X, el Factor II (protrombina), el Factor IX, la proteína C, el Factor VII y Gas6. Las posiciones de los aminoácidos de los polipéptidos descritas en la presente memoria se numeran de acuerdo con el Factor IX. La proteína S, la proteína C, el Factor X, el Factor VII y la protrombina humana todos tienen un aminoácido menos (posición 4) y consiguientemente deben ajustarse. Por ejemplo, la posición real 10 de la proteína C bovina es una prolina, pero en la presente memoria está numerada como aminoácido 11 para facilitar su comparación. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" es cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación post-traducciona. Los aminoácidos han sido designados en la presente memoria por las abreviaturas estándares de tres letras y una letra.

Las modificaciones del dominio de GLA incluyen al menos una sustitución de aminoácidos. Las sustituciones pueden ser conservadoras o no conservadoras. En las sustituciones conservadoras de aminoácidos se sustituye un aminoácido por un aminoácido de la misma clase, mientras que en las sustituciones de aminoácidos no conservadoras se sustituye un aminoácido por un aminoácido de una clase diferente. Las sustituciones no conservadoras pueden dar como resultado un cambio sustancial en la hidrofobicidad del polipéptido o en la voluminosidad de una cadena lateral del residuo. Además, las sustituciones no conservadoras pueden producir un cambio sustancial en la carga del polipéptido, tal como reducir las cargas electropositivas o introducir cargas electronegativas. Ejemplos de sustituciones no conservadoras incluyen la de un aminoácido no polar por un aminoácido básico o la de un aminoácido ácido por un aminoácido polar. La sustitución de aminoácidos puede estar en los aminoácidos 11, 12, 29, 33 o 34. Preferiblemente, la sustitución de aminoácidos está en los aminoácidos 11, 33 o 34. El dominio de GLA modificado puede incluir una secuencia de aminoácidos que en el estado saturado con calcio, contribuya a la formación de una estructura terciaria que tiene un núcleo catiónico con un halo de carga electronegativa. Sin vincularse a una teoría particular, la mejor afinidad para las membranas puede ser el resultado de un patrón electrostático particular que consta de un núcleo electropositivo rodeado completamente por una superficie electronegativa.

Muchos polipéptidos dependientes de la vitamina K son sustratos para enzimas unidas a las membranas. Puesto que los polipéptidos no dependientes de la vitamina K muestran la máxima afinidad potencial de unión a las membranas de un dominio de GLA, todos deben contener aminoácidos cuyo fin sea reducir la afinidad de unión. En consecuencia, muchos polipéptidos dependientes de la vitamina K contienen aminoácidos que no son óptimos desde el punto de vista de la afinidad máxima. Estos residuos rompen eficazmente el sitio de unión para proporcionar un rápido recambio para una reacción enzimática.

Una afinidad reducida para las membranas, puede servir para diferentes fines. La alta afinidad está acompañada por un lento intercambio que puede limitar las velocidades de reacción. Por ejemplo, cuando la enzima protrombinasa se ensambla sobre las membranas con alta afinidad para el sustrato, el intercambio de proteínas desde las membranas es el limitante en lugar de la catálisis enzimática. Lu, Y. and Nelsestuen, G.L., 1996, *Biochemistry*, 35:8201-8209. Alternativamente, el ajuste de la afinidad para las membranas mediante la sustitución de aminoácidos que no sean óptimos puede equilibrar los procesos competitivos de la procoagulación (Factor X, IX, VII y protrombina) y de la anticoagulación (proteína C, S). Aunque las afinidades para las membranas de las proteínas naturales pueden ser óptimas para los estados normales, una mejora de la afinidad para las membranas puede producir proteínas que sean útiles para el estudio *in vitro*, así como mejores agentes terapéuticos para regular *in vivo* la coagulación de la sangre en estados patológicos.

A continuación se describen diversos ejemplos de polipéptidos dependientes de la vitamina K modificados en el dominio de GLA.

Un ejemplo de polipéptido dependiente de la vitamina K es la proteína C o la proteína C activada (APC). Las secuencias de aminoácidos del dominio de GLA de la proteína C de tipo natural humana (hC) y bovina (bC), se muestran en la Tabla 1. X es un residuo Glu o Glu. En general, una proteína con residuos neutros (por ejemplo, Q) o aniónicos (por ejemplo, D, E) en las posiciones 11, 33 y 34, tendrá una afinidad superior para las membranas.

Tabla 1

hC: ANS-FLXXLRH₁₁SSLXRXCIXX₂₁ICDFXXAKXI₃₁FQNVDDTLAF₄₁WSKH (SEQ ID NO:1)

bC: ANS-FLXXLRP₁₁GNVXRXCXX₂₁VCXFXXARXI₃₁FQNTXDTMAF₄₁WSFY (SEQ ID NO:2)

- El dominio de GLA modificado de la proteína C o de APC puede incluir, por ejemplo, un residuo de ácido glutámico en el aminoácido 33 y un residuo de ácido aspártico en el aminoácido 34 (SEQ ID NO: 19). El ácido glutámico en la posición 33 puede ser modificado *in vivo* adicionalmente a ácido γ -carboxiglutámico. Para obtener una actividad óptima, el dominio de GLA modificado puede incluir una sustitución adicional en el aminoácido 11. Por ejemplo, en el aminoácido 11 puede estar sustituido un residuo de glutamina (SEQ ID NO: 20) o alternativamente, puede estar sustituido un residuo de ácido glutámico o de ácido aspártico (SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO:22, respectivamente). En el aminoácido 11 de la proteína C bovina puede estar sustituido un residuo de histidina (SEQ ID NO: 23). Otra modificación puede incluir una sustitución en el aminoácido 12 de un residuo de serina por glicina (SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 35). La sustitución del aminoácido 29 por fenilalanina, el aminoácido encontrado en la protrombina, es otra modificación útil (SEQ ID NO: 25). La proteína C modificada con mejor afinidad de unión para las membranas, se puede emplear en lugar de otros anticoagulantes inyectables, tales como la heparina. La heparina se emplea típicamente en la mayoría de los tipos de cirugía, pero adolece de una baja relación eficacia/toxicidad. Además, la proteína C modificada con una mejor afinidad para las membranas, se puede utilizar en lugar de anticoagulantes orales de la familia de las cumarinas, tal como la warfarina.
- Estas modificaciones también se pueden realizar con APC modificada en el sitio activo. El sitio activo de APC se puede inactivar químicamente, por ejemplo, por N-dansil-glutamyl-glicilarginilclorometilcetona (DEGR) o por mutagénesis dirigida al sitio activo. Sorensen, B.B., et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272:11863-11868. La APC modificada en el sitio activo actúa como un inhibidor del complejo protrombinasa. Una mejor afinidad para las membranas de la APC modificada en el sitio activo, puede dar como resultado un polipéptido terapéuticamente más eficaz.
- El polipéptido dependiente de la vitamina K que puede ser modificado es el Factor VII o la forma activa del Factor VII, el Factor VIIa. El polipéptido Factor VII natural o presente en la naturaleza tiene baja afinidad para las membranas. Las secuencias de aminoácidos del dominio de GLA del Factor VII de tipo natural humano (hVII) y bovino (bVII), se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

hVII: ANA-FLXXLRP₁₁GSLXRCKXX₂₁QCSFXXARXI₃₁FKDAXRTKLF₄₁WISY (SEQ ID NO:3)

bVII: ANG-FLXXLRP₁₁GSLXRRCRXX₂₁LCSFXXAHXI₃₁FRNXXRTRQF₄₁WVSY (SEQ ID NO:4)

- El dominio de GLA del Factor VII o del Factor VIIa incluye un residuo de glutamina en el aminoácido 11 y un residuo de ácido glutámico en el aminoácido 33 (SEQ ID NO: 30). El polipéptido dependiente de la vitamina K modificado de este modo, tiene mucha mayor afinidad para las membranas que el polipéptido natural o de tipo silvestre. También tiene una actividad muy superior en la autoactivación, en la generación del Factor Xa y en algunos ensayos de coagulación de la sangre. La actividad se mejora particularmente en condiciones de coagulación marginales, tales como bajos niveles de Factor tisular y/o fosfolípido. Por ejemplo, el Factor VII modificado es aproximadamente 4 veces más eficaz que el VIIa natural con niveles óptimos de tromboplastina, pero es aproximadamente 20 veces más eficaz a 1% de los niveles óptimos de tromboplastina. Las señales de procoagulación marginales son probablemente más predominantes *in vivo*. Con los ensayos de coagulación disponibles en la actualidad, que emplean niveles óptimos de tromboplastina, no se puede detectar las diferencias en el tiempo de coagulación entre el plasma normal y el plasma de pacientes hemofílicos. Las diferencias en la coagulación entre tales muestras sólo se detectan cuando se emplean en los ensayos de coagulación niveles que no sean óptimos de tromboplastina o tromboplastina diluida.
- Otro ejemplo de un polipéptido dependiente de la vitamina K es el Factor VIIa modificado en el sitio activo. El sitio activo del Factor VIIa puede ser modificado químicamente, por ejemplo, por DEGR o por mutagénesis dirigida al sitio activo. El Factor VII modificado por DEGR es un inhibidor eficaz de la coagulación por varias vías de administración. Arnljots, B., et al., 1997, *J. Vasc. Surg.*, 25:341-346. Las modificaciones del dominio de GLA pueden hacer que el Factor VIIa modificado en el sitio activo sea más eficaz, debido a una mayor afinidad para las membranas. El dominio de GLA modificado del Factor VIIa modificado en el sitio activo puede incluir, por ejemplo, un residuo de glutamina en el aminoácido 11 y un residuo de ácido glutámico en el aminoácido 33 (SEQ ID NO: 30).
- Otro ejemplo de un polipéptido dependiente de la vitamina K puede ser también el Factor IX o la forma activa del Factor IX, el Factor IXa. Del mismo modo que con el Factor VIIa modificado en el sitio activo, el Factor IXa y Xa modificados en el sitio activo pueden ser inhibidores de la coagulación. Las secuencias de aminoácidos del dominio de GLA del Factor IX de tipo natural humano (hIX) y bovino (bIX) se muestran en la Tabla 3. Por ejemplo, un residuo de ácido aspártico o de ácido glutámico pueden sustituir al aminoácido 11 (SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32, respectivamente), un residuo de fenilalanina al aminoácido 29 (SEQ ID NO: 33) o un residuo de ácido aspártico al aminoácido 34 (SEQ ID NO: 34).

Tabla 3

hIX: YNSGKLXXFVQ₁₁GNLXRXCMMX₂₁KCSFXXARXV₃₁FXNTRTTXF₄₁WKQY (SEQ ID NO:5)

bIX: YNSGKLXXFVQ₁₁GNLXRXCMMX₂₁KCSFXXARXV₃₁FXNTXKRTTTF₄₁WKQY (SEQ ID NO:6)

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula hospedante de mamífero que incluye un polipéptido dependiente de la vitamina K que tiene un dominio de GLA modificado que mejora la afinidad de unión a las membranas del polipéptido con relación a un polipéptido dependiente de la vitamina K natural correspondiente, en donde dicho polipéptido es como se define en la reivindicación 1. El dominio de GLA modificado incluye al menos una sustitución de aminoácidos como se ha indicado anteriormente. La célula hospedante de mamífero puede incluir el Factor VII modificado o el Factor VIIa modificado. El dominio de GLA del Factor VII modificado o del Factor VIIa modificado contiene una sustitución de aminoácidos en el aminoácido 11 y en el aminoácido 33, en donde la sustitución de aminoácidos incluye un residuo de glutamina en el aminoácido 11 y un residuo de ácido glutámico en el aminoácido 33 (SEQ ID NO: 30).

Las células hospedantes de mamífero adecuadas son capaces de modificar los residuos de glutamato del polipéptido dependiente de la vitamina K para formar γ -carboxiglutamato. Las células de mamífero obtenidas a partir de riñón y de hígado son especialmente útiles como células hospedantes.

Los polipéptidos dependientes de la vitamina K que incluyen dominios de GLA modificados se pueden formular en composiciones farmacéuticas por mezcla con excipientes o vehículos no tóxicos, farmacéuticamente aceptables. Dichos compuestos y composiciones se pueden preparar para administración parenteral, particularmente en forma de soluciones líquidas o de suspensiones en soluciones tampón fisiológico acuoso; para la administración oral, particularmente en forma de comprimidos o cápsulas; o para la administración intranasal, particularmente en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles. Las composiciones para otras vías de administración se pueden preparar en la forma deseada, empleando métodos estándares.

Las formulaciones para administración parenteral pueden contener como excipientes comunes agua o solución salina estéril, polialquilenglicoles, tal como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. En particular, son ejemplos de excipientes para controlar la liberación de un compuesto de la invención *in vivo* polímeros de lactida, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno biocompatibles y biodegradables. Otros sistemas de administración parenteral adecuados, incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. Las formulaciones para la administración por inhalación pueden contener, si se desea, excipientes, tal como la lactosa. Las formulaciones para inhalación pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril-éter, glicocolato y desoxicolato o pueden ser soluciones oleosas para administrar en forma de gotas nasales. Si se desea, los compuestos se pueden formular como geles para ser aplicados por vía intranasal. Las formulaciones para administración parenteral también pueden incluir glicocolato para administración bucal.

En una realización alternativa, la invención se refiere también a una composición farmacéutica que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad de un polipéptido dependiente de la vitamina K eficaz para aumentar la formación de coágulos en un mamífero, donde el polipéptido dependiente de la vitamina K incluye un dominio de GLA modificado con al menos una sustitución de aminoácidos que mejora la afinidad de unión a las membranas del polipéptido con relación a un polipéptido dependiente de la vitamina K natural correspondiente como se define en la reivindicación 1. Estas composiciones farmacéuticas pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos de la coagulación, tales como la hemofilia A, hemofilia B y enfermedad hepática. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente el Factor tisular soluble. Factor VII es especialmente crítico para la coagulación de la sangre debido a su localización en el inicio de la cascada de coagulación y a su capacidad para activar dos proteínas, los Factores IX y X. La activación directa del Factor X por el Factor VIIa es importante para el posible tratamiento de las formas principales de la hemofilia, los tipos A y B, puesto que se evitan completamente las etapas que implican los Factores IX y VIII. Se ha observado que la administración del Factor VII a pacientes era eficaz para el tratamiento de algunas formas de hemofilia. La mejora de la afinidad a membranas del Factor VII o VIIa por modificación del dominio de GLA proporciona el potencial para hacer más sensible al polipéptido a muchos estados de coagulación, para disminuir las dosificaciones necesarias de VII/VIIa, para ampliar los intervalos en los que se debe administrar el Factor VII/VIIa y para proporcionar cambios cualitativos adicionales que den como resultado un tratamiento más eficaz. En general, la mejora del sitio de contacto con las membranas del Factor VII puede aumentar tanto su tasa de activación como mejorar la actividad del Factor VIIa sobre el Factor X o IX. Estas etapas pueden tener un efector multiplicador sobre las velocidades de coagulación globales de la sangre *in vivo*, dando como resultado un Factor VIIa muy potente para un tratamiento superior de diversas enfermedades de coagulación de la sangre.

Otros polipéptidos dependientes de la vitamina K útiles para aumentar la formación de coágulos incluyen el Factor IX y el Factor IXa.

En otro aspecto, la invención se refiere también a un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 -

9.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplos

5 **Ejemplo 1 – Factor VII con afinidad para membranas y actividad mejoradas:** Se ha observado que la afinidad de la unión a membranas del Factor VII humano de coagulación de la sangre puede ser aumentada por mutagénesis dirigida al sitio. Han sido caracterizadas las propiedades de un mutante P11Q,K33E (denominado en esta memoria Factor VIIQ11E33 o Factor VII mutante (SEQ ID NO: 30)). La afinidad para membranas fue aumentada aproximadamente 20 veces con relación a la de la proteína de tipo natural. La autoactivación por el mutante fue aumentada al
10 menos 100 veces con relación a la del Factor VII de tipo natural. La forma activada de VIIQ11E33 (denominada VIIaQ11E33) mostró una actividad aproximadamente 10 veces superior a la del Factor X. La actividad de coagulación de VIIaQ11E33 con el Factor tisular soluble en plasma normal fue aproximadamente 10 veces superior a la de VIIa de tipo natural. La actividad de coagulación del zimógeno, VIIQ11E33, con el Factor tisular normal (suministrado a una dilución de 1:100 de tromboplastina-HS) fue 20 veces superior a la del Factor VII de tipo natural. El grado en el
15 que se mejoró dicha actividad dependía de los estados, siendo VIIQ11E33 especialmente activo en condiciones de bajos estímulos de coagulación.

En general, las concentraciones de proteína se determinaron por el ensayo de Bradford, empleando seroalbúmina bovina como patrón. Bradford, M.M., 1976, *Analyt. Biochem.* 248-254. Se obtuvieron concentraciones molares a partir de pesos moleculares de 50.000 para el Factor VII y 55.000 para el Factor X. A no ser que se indique de otro modo, todas las mediciones de la actividad se realizaron en tampón estándar (Tris 0,05 M, pH 7,5, NaCl 100 mM).
20

Producción del Factor VII mutante: El Factor VII mutante se generó a partir del cDNA del Factor VII de tipo natural (número de acceso en GenBank M13232, NID g182799). Petersen, et al., 1990, *Biochemistry* 29:3451-3457. La mutación P11Q (cambio en el aminoácido 11 de un residuo de prolina por un residuo de glutamina) y la mutación K33E (cambio en el aminoácido 33 de un residuo de lisina por un residuo de ácido glutámico) se introdujeron en el cDNA del Factor VII de tipo natural por una estrategia de la reacción en cadena de la polimerasa, esencialmente tal y como se describe en Vallette, et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17:723-733. Durante este proceso, se eliminó un sitio de la enzima de restricción XmaIII para diagnóstico por mutación. Se diseñaron cuatro cebadores de PCR para cebar la síntesis de dos fragmentos mutantes de M13232, uno desde *MluI* hasta *BglII*, las posiciones 221 a 301, y el otro desde *BglII* hasta *SstII*, las posiciones 302 a 787. Estos cebadores se emplearon en condiciones de ciclos de PCR estándares (GENEAMP, Perkin Elmer) para cebar la síntesis de fragmentos empleando como molde 1 ng del cDNA del Factor VII de tipo natural. Los fragmentos resultantes se purificaron en gel y se digirieron con *MluI* y *BglII* o *BglII* y *SstII*. A continuación se ligaron los dos fragmentos purificados en el cDNA del Factor VIII, en el vector de expresión Zem219b, del cual se había eliminado la secuencia de tipo natural correspondiente como un fragmento *MluI-SstII*. Petersen, et al., 1990, citado anteriormente. Los fragmentos mutados se secuenciaron en su totalidad para confirmar las sustituciones P11Q y K33E, así como para eliminar la posibilidad de otros cambios en las secuencias inducidos por la PCR.
25
30
35

Transfección, selección y purificación: Células de riñón de hámster recién nacido (BHK) se dejaron crecer en medio de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado con 10% de suero de ternera fetal y penicilina-estreptomomicina. Las células subconfluentes se transfectaron con el plásmido de expresión del Factor VII, empleando lipofectAMINE (Gibco BRL) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Dos días después de la transfección, las células se tripsinizaron y se diluyeron en medio selectivo que contenía metotrexato 1 μ M (MTX). Las células BHK transfectadas establemente se cultivaron posteriormente en medio de Eagle modificado por Dulbecco exento de suero, suplementado con penicilina-estreptomomicina, 5 μ g/ml de vitamina K₁ y MTX 1 μ M, y se recogió el medio acondicionado. El medio acondicionado se aplicó dos veces a una columna de inmunoafinidad, compuesta por un anticuerpo monoclonal dependiente de calcio (CaFVII22) acoplado a Affi-Gel 10. Nakagaki, et al., 1991, *Biochemistry*, 30:10819-10824. El Factor VIIQ11E33 purificado final corría como una sola banda en la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, sin prueba del Factor VIIa en la preparación. El mutante VII(P11Q,K33E) puro mostró 1400-2800 unidades de Factor VII/mg.
40
45

Activación del Factor VII: El Factor VIIaQ11E33 activado se formó por escisión del Factor Xa bovino de VIIQ11E33 (relación en peso 1:100, incubación durante 1 h a 37°C). Alternativamente, se obtuvo el Factor VIIaQ11E33 por autoactivación (37°C, 20 min) en una mezcla que contenía VIIQ11E33 7 μ M, sTF 0,7 μ M y fosfolípido (fosfatidilserina/fosfatidilcolina (PS/PC), 25/75, 0,1 g/g de proteína).
50

El Factor VIIa de tipo natural era una proteína recombinante homogénea (NOVO Nordisk). Dos preparaciones consistían en un producto liofilizado y un producto no liofilizado comerciales. La última proteína se purificó adicionalmente sobre FPLC mono-Q y mostró una actividad específica de 80.000 unidades/mg, calibrada con un patrón George King NPP.
55

Interacción mejorada con membranas por el Factor VIIQ11E33: La preparación de fosfolípidos, el ensayo y la medición de la unión de la proteína-membrana se realizó por el método descrito por Nelsestuen and Lim, 1977, *Bio-*

chemistry, 30:10819-10824. Se prepararon vesículas unilaminares grandes (LUV) y vesículas unilaminares pequeñas (SUV) por los métodos descritos previamente. Hope, M.J., et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, 812:55-65; Huang, C., 1969, *Biochemistry*, 8:344-352. Se mezclaron en cloroformo fosfatidilserina muy pura (cerebro bovino) y fosfatidilcolina de huevo (Sigma Chemical Col.). El disolvente se retiró por una corriente de nitrógeno gaseoso. Los fosfolípidos secos se pusieron en suspensión en tampón. Las SUV se formaron por tratamiento con ultrasonidos y filtración en gel, mientras que las LUV se formaron por congelación-descongelación y extrusión. Las concentraciones de fosfolípidos se determinaron por un ensayo de fosfato orgánico, suponiendo una relación en peso de fósforo:fosfolípido de 25.

Se prepararon SUV de PS/PC (25/75) o PS/PC (10/90). La proteína se añadió al fosfolípido en las relaciones en peso mostradas en la Figura 1. La unión proteína-membrana se analizó por dispersión de la luz a 90°, por el método de Nelsestuen and Lim, 1977, citado anteriormente. Resumiendo, se midió la intensidad de la dispersión de la luz de las vesículas de fosfolípidos solas (I_1) y después de añadir proteína (I_2) y se corrigió la señal de fondo del tampón y de la proteína no unida. La relación entre el peso molecular del complejo proteína-vesícula (M_2) y el de las vesículas solas (M_1) se puede estimar por la relación de la ecuación 1, en donde $\delta n/\delta c$ es el índice de refracción de las especies respectivas.

$$I_2 / I_1 = (M_2/M_1)^2 (\delta n/\delta c_2/\delta n/\delta c_1)^2 \quad (\text{ecuación 1})$$

Si se conocen las concentraciones de fosfolípidos y proteínas, se puede estimar la concentración de [P*PL] unidas y de proteína libre [P]. Estos valores, junto con la capacidad máxima de unión de las proteínas [P*PL_{máx}] de las vesículas (suponiendo que sea 1,0 g/g para todas las proteínas), se pueden utilizar para obtener la constante de equilibrio para la interacción proteína-membrana, mediante la relación de la ecuación 2, en donde todas las concentraciones se expresan como proteína molar o sitios de unión a las proteínas.

$$K_D = [P] [P*PL_{máx} - P*PL] / [P*PL] \quad (\text{ecuación 2})$$

La unión se determinó en calcio 5 mM y se expresa como la relación M2/M1.

La Figura 1 muestra la unión de VIIa de tipo natural (círculos blancos) y el Factor VIIQ11E33 (círculos negros) a membranas de PS/PC=25/75, 25 µg/mL (Figura 1A) o PS/PC=10/90, 25 µg/mL (Figura 1B). El VIIQ11E33 tenía una afinidad muy superior a la de la proteína de tipo natural. La unión a PS/PC (25/75) era a nivel cuantitativo, de modo que la [Proteína_{libre}] era esencialmente cero. En consecuencia, los valores de Kd no se podían estimar a partir de estos datos. La unión a la membrana del Factor X bovino (triángulos negros) se muestra en la Figura 1 como referencia. El Factor X bovino es una de las proteínas con mayor afinidad en esta familia, proporcionando una Kd para PS/PC (20/80) en calcio 2 mM de 40 nM. McDonald et al., 1997, *Biochemistry*, 36:5120-5127. La Kd para el Factor X bovino, obtenido a partir del resultado con una relación de proteína/fosfolípido de 0,55 (Figura 1), era 0,025 µM.

También se determinó la unión del Factor VII de tipo natural y mutante a membranas de PS/PC (10/90) (Figura 1B). El VIIQ11E33 se unió en menos del nivel cuantitativo, lo que permitió estimar una constante de unión a partir de la relación de la ecuación 3.

$$K_d = [\text{Proteína}_{libre}] [\text{Sitios de unión}_{libres}] / [\text{Proteína}_{unida}] \quad (\text{ecuación 3})$$

Los [sitios de unión_{libres}] se estimaron a partir de la ecuación 4, suponiendo un máximo de M2/M1 de 1,0 (es decir, [Sitios de unión_{totales}] = [Fosfolípido_{conc. en peso}/Proteína_{peso molecular}]). Este es un valor común observado para diversas proteínas de esta familia. Véase McDonald, et al., 1997, citado anteriormente.

$$[\text{Sitios de unión}_{libres}] = [\text{Sitios de unión}_{totales}] - [\text{Proteína}_{unida}] \quad (\text{ecuación 4})$$

Empleando estas suposiciones y los datos de una relación entre proteína y fosfolípido de 0,37, los valores de Kd fueron 0,7 µM para el Factor X bovino, 5,5 µM para el Factor VII de tipo natural y 0,23 µM para VIIQ11E33. Por tanto, estaba claro que el Factor VIIQ11E33 tenía una afinidad de unión a membranas muy mejorada con relación al Factor VII de tipo natural y tenía una de las afinidades de unión a membranas más altas entre las proteínas dependientes de la vitamina K.

Activación mejorada del Factor VIIQ11E33: La primera etapa en la coagulación implica la activación del Factor VII. La autoactivación de VII se realizó en una solución que contenía sTF 100 nM (producto recombinante altamente purificado procedente del Dr. Walter Kisiel, Fiore, et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269:143-149), VIIQ11E33 36 nM y PS/PC (25/75, 22 µg/mL). La actividad de VIIaQ11E33 se estimó en varios intervalos de tiempo por adición de un sustrato S-2288 (Kabi) 0,15 mM y determinación de la velocidad de liberación del producto p-nitrofenilfosfato mediante cambio de la absorbancia a 405 nm. La actividad inicial de la preparación de VIIQ11E33 era menor del 4% de VIIaQ11E33 totalmente activo.

Se encontró que el VIIQ11E33 era un sustrato mucho mejor para la activación que el Factor VII de tipo natural. La Figura 2 muestra la autoactivación del Factor VIIQ11E33. Los datos fueron analizados por la relación de la ecuación 5 (ecuación 7 de Fiore, et al., 1994, citado anteriormente).

$$\ln[VIIa]_t = \ln[VIIa]_0 + kcat \cdot y \cdot t \quad (\text{ecuación 5})$$

$\ln[VIIa]_t$ es la concentración del Factor VIIa en el tiempo t , $kcat$ es la constante de velocidad catalítica para el Factor VIIa que actúa sobre VII e y es la saturación fraccional de los sitios de VIIa. Para el Factor VIIa de tipo natural, esta relación y sTF 1 μM proporcionaron una $kcat$ de 0,0045/s y una relación $kcat/Km$ de $7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Véase, Fiore, et al., 1994, citado anteriormente. Para la enzima VIIQ11E33 la autoactivación fue rápida (Figura 2) y sólo fue posible estimar un límite inferior para $kcat$. Este se obtuvo a partir del tiempo de duplicación de VIIa de aproximadamente 25 segundos ($kcat = (\ln 2)/t_{1/2}$). El valor resultante ($kcat_{\min} = 0,03/\text{s}$) junto con la concentración de sustrato de esta reacción ($3,6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) y la suposición de que $y = 1,0$, proporcionó un valor para $kcat/[S] = 8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este debía estar lejos del valor $kcat/Km$ verdadero para el VIIaQ11E33, pero fue aproximadamente 100 veces mayor que el valor de $kcat/Km$ para el Factor VIIa/sTF de tipo natural estimado por Fiore, et al., 1994, citado anteriormente. Por tanto, la combinación de la enzima VIIaQ11E33 y el sustrato del Factor VIIQ11E33 fue superior a las proteínas de tipo natural en la etapa de activación de la coagulación. Esto sugirió que VIIQ11E33 era superior a la enzima de tipo natural cuando eran mínimas las condiciones de la coagulación.

Actividad mejorada de VIIaQ11E33: Una vez generado, el Factor VIIa activa el Factor X o el Factor IX. La activación del Factor X bovino (0,1 μM) por el Factor VIIa fue realizada en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 que contenía NaCl 100 mM, calcio 5 mM, varias cantidades de fosfolípidos (PS/PC, 25/75) y 1 mg/mL de seroalbúmina bovina a 22,5°C. En el tiempo cero se añadió el Factor VIIa (0,06 nM de VIIaQ11E33 o 0,6 nM de VIIa de tipo natural) y se determinó la actividad de Xa en los puntos de tiempo 1, 3 y 5 minutos. Se mezclaron partes alícuotas de la mezcla de reacción (0,2 mL) con tampón (0,2 mL) que contenía EDTA 10 mM y S-2222 0,4 mM (Kabi), un sustrato cromógeno para el Factor Xa. El cambio en la absorbancia a 405 nm se determinó en un espectrofotómetro DU8 de Beckman. La cantidad de Factor Xa generado se calculó a partir del coeficiente de extinción ($1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) del producto de la reacción de p-nitrofenilfosfato y una velocidad de 33/s para la hidrólisis del sustrato por Xa bovino purificado en las condiciones de este ensayo.

La Figura 3 compara la capacidad del Factor VIIa de tipo natural (círculos blancos) y VIIaQ11E33 (círculos negros) para activar el Factor X en un sistema purificado. De nuevo, VIIaQ11E33 fue muy superior al Factor VIIa de tipo natural en esta reacción. La diferencia era máxima a concentraciones bajas de fosfolípido y disminuía hasta 2 veces a 200 μg de fosfolípido por mL. Esto era esperado debido a que altas concentraciones en membranas hacen que se una a la membrana una porción mayor de Factor VIIa de tipo natural. De nuevo, la función aumentada de VIIaQ11E33 fue la mayor en condiciones de baja exposición a fosfolípidos.

Coagulación superior de VIIaQ11E33: Los ensayos de coagulación de la sangre se realizaron a 37°C empleando el método manual basculante para detectar la formación de coágulos. El plasma humano (0,1 mL) se dejó equilibrar a 37°C durante 1 minuto. Se añadieron varios reactivos en un volumen de 0,1 mL de tampón estándar. Se añadieron al plasma el Factor tisular soluble (50 nM) y el fosfolípido (PS/PC, 10/90, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$), junto con la concentración del Factor VIIa mostrada en la Figura 4 (0,1 – 32 nM). Finalmente, se añadieron 0,1 mL de CaCl_2 25 mM para iniciar la reacción. Se midió el tiempo para formar un coágulo. En la mayoría de los casos se describió la media y la desviación típica de las muestras replicadas.

La Figura 4 muestra los tiempos de coagulación de VIIa de tipo natural frente a VIIaQ11E33 en plasma humano normal. La coagulación fue mantenida por sTF y vesículas de fosfolípido añadidas. El Factor VII endógeno de tipo natural tiene una concentración de aproximadamente 10 nM y virtualmente no tiene impacto sobre los tiempos de coagulación. La coagulación de fondo fue 120 segundos con o sin sTF. El Factor VIIaQ11E33 mostró aproximadamente una actividad 8 veces mayor que la del VIIa de tipo natural en estas condiciones del ensayo. Se obtuvieron resultados similares con plasma deficiente en Factor VIII, lo que sugiere que la vía principal para la coagulación de la sangre en este sistema implicó la activación directa del Factor X por el Factor VIIa. En general, la actividad procoagulante sostenida por las vesículas de membranas y el Factor tisular soluble del Factor VIIaQ11E33 era superior a la del VIIa de tipo natural. El zimógeno de tipo natural no tenía virtualmente actividad en estas condiciones, tal y como se indicaba con los tiempos de coagulación de fondo similares de 2 minutos, tanto si se añadía o no sTF.

Actividad procoagulante con Factor tisular normal: Se midió en plasma humano normal la actividad de VIIa y/o VIIQ11E33 con sTF. En este ensayo el Factor VII endógeno parecía no tener impacto sobre el tiempo de coagulación; el tiempo de coagulación de fondo fue 2 minutos para el plasma, tanto con Factor tisular soluble como sin él. El Factor tisular soluble (concentración final 50 nM) y VIIa se añadieron al plasma antes de la solución de calcio. Se determinó el tiempo de coagulación para las muestras que contenían varios niveles de VIIa o VIIaQ11E33. Se sometieron a ensayo dos preparaciones de plasma humano, normal y deficiente en Factor VIII.

La coagulación mantenida por el Factor tisular normal se sometió a ensayo con tromboplastina-HS de cerebro de conejo estándar (HS = alta sensibilidad) que contenía calcio (Sigma Chemical Co.). Esta mezcla contiene tanto fosfolípidos como Factor tisular unido a membranas. La tromboplastina-HS de cerebro de conejo se diluyó 1:100 en tampón y se empleó en el ensayo de VII (añadido en forma de plasma humano normal, que contenía Factor VII 10 nM) y VIIQ11E33 (añadido en forma de proteína pura). La tromboplastina (0,2 mL) se añadió al plasma (0,1 mL) para iniciar la reacción y se midió el tiempo requerido para formar un coágulo de sangre. Los ensayos se realizaron también con tromboplastina sin diluir, tal y como la descrita por el fabricante.

A niveles óptimos de tromboplastina humana, el Factor VII de tipo natural mostró un nivel normal de actividad, aproximadamente 1500 unidades por mg. Esto es aproximadamente 25 veces menos que la actividad del Factor VIIa de tipo natural (80.000 unidades por mg). VIIQ11E33 proporcionó aproximadamente 1500-3000 unidades por mg en condiciones de ensayo estándares, sólo dos veces superior a las del Factor VII de tipo natural.

5 La diferencia entre VII de tipo natural y VIIQ11E33 era mucho mayor cuando las condiciones de la coagulación eran sub-óptimas. La Figura 5 muestra los tiempos de coagulación y las concentraciones de zimógeno en los ensayos que contenían 0,01 vez el nivel normal de tromboplastina. En estas condiciones, VIIQ11E33 fue aproximadamente 20 veces más activo que el Factor VII de tipo natural. Por tanto, fue especialmente evidente una eficacia mayor del mutante VIIQ11E33 cuando estaban limitadas las condiciones de coagulación, lo que es importante para muchas situaciones *in vivo*.

10 **Actividades anticoagulantes de DEGR-VIIaQ11E33:** Se realizaron ensayos de coagulación estándares con suero humano normal y tromboplastina humana que se había diluido 1:10 con tampón. El sitio activo del Factor VIIaQ11E33 fue modificado por DEGR, tal y como describen Sorenson, B.B., et al., 1997, citado anteriormente. La Figura 6 muestra el tiempo de coagulación de DEGR-VIIaQ11E33 (0-4 nm) incubado con tromboplastina, en tampón con calcio, durante 15 segundos antes de la adición del plasma. El tiempo para formar un coágulo se determinó por el método manual basculante. El tiempo de coagulación fue aproximadamente 45 segundos con aproximadamente 1 nm de DEGR-VIIaQ11E33.

15 **Ejemplo 2 – Tiempo en circulación del Factor VIIQ11E33 en ratas:** A dos ratas (325-350 g) Sprague Dawley anestesiadas (nembutil sódico) se les inyectaron 36 µg de Factor VIIQ11E33 en el tiempo cero. La inyección se hizo a través de la vena yugular, en la que se había introducido una cánula. En los tiempos indicados en la Figura 7, se extrajo sangre de la arteria carótida en la que se había insertado una cánula mediante cirugía. La cantidad de Factor VIIQ11E33 en la circulación se estimó a partir del tiempo de coagulación del plasma humano deficiente en el Factor VII, al que se había añadido 1 µL de una dilución 1:10 de plasma de rata. Se empleó una dilución 1:100 de tromboplastina-HS de cerebro de conejo (Sigma Chemical Co.). La coagulación se determinó por el método manual de tubo basculante, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1. La cantidad de actividad del Factor VII en el plasma antes de la inyección de VIIQ11E33, se determinó y restó como un blanco. La concentración del Factor VIIQ11E33 en la circulación se da como log nM. Se realizó un experimento de simulación en el que a un tercer animal se le realizaba la operación y la canulación, pero sin Factor VIIQ11E33. La cantidad de actividad del Factor VII en este animal no cambió durante el tiempo del experimento (100 minutos). Al final del experimento, los animales fueron sacrificados por exceso de nembutil sódico.

20 Las ratas parecían normales durante el experimento, sin pruebas de coagulación. Por tanto, el Factor VIIQ11E33 no causó una coagulación indiscriminada, incluso en la rata después de la operación. El tiempo de vida en la circulación del VIIQ11E33 fue normal (Figura 7), siendo eliminada aproximadamente el 40% de la proteína en alrededor de 60 minutos e incluso con una desaparición más lenta de la proteína restante. Esto era similar a la velocidad de eliminación de la protrombina bovina de la rata. Nelsestuen and Suttie, 1971, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45:198-203. Esto es superior al Factor VIIa recombinante de tipo natural que proporcionó una semivida en la circulación para los ensayos funcionales de 20-45 minutos. Thomsen, M.K., et al., 1993, *Thromb. Haemost.*, 70:458-464. Esto indicaba que el Factor VIIQ11E33 no fue reconocido como una proteína anormal y que no fue destruido rápidamente por la actividad de coagulación. Parecía una proteína normal y debía tener una semivida estándar en la circulación en el animal.

25 **Ejemplo 3 – Mejora del sitio de la membrana y de la actividad de la proteína C:** La proteína C bovina y humana muestran un alto grado de homología en los aminoácidos de sus dominios de GLA (44 residuos amino-terminales), a pesar de tener la proteína humana aproximadamente una afinidad para membranas 10 veces superior. La proteína C bovina contiene una prolina en la posición 11 frente a una histidina en la posición 11 de la proteína C humana. Se examinó el impacto de la sustitución de la prolina en 11 en la proteína C bovina por una histidina y el cambio inverso en la proteína C humana. En ambos casos, la proteína que contenía la prolina en 11 mostró menor afinidad para membranas, aproximadamente 10 veces para la proteína C bovina y 5 veces para la proteína C humana. La proteína C humana activada (hAPC) que contiene prolina en la posición 11, mostró una actividad de 2,4 a 3,5 veces menor que la de la hAPC de tipo natural, dependiendo del ensayo empleado. La APC bovina que contiene histidina en 11, mostró una actividad que era hasta 15 veces superior a la de la bAPC de tipo natural. Esto demostró la capacidad para mejorar por mutación tanto el contacto con las membranas como la actividad.

30 **Mutagénesis de la proteína C:** Un clon de cDNA de la proteína C humana de longitud completa fue proporcionado por el Dr. Johan Stenflo (Dpto. de Química Clínica, Hospital Universitario, Malmö, Suecia). El clon de cDNA de la proteína C bovina fue proporcionado por el Dr. Donald Foster (ZymoGenetics, Inc., EE.UU.). El número de acceso en GenBank para la secuencia de nucleótidos de la proteína C bovina es KO2435, NID g163486 y para la secuencia de nucleótidos de la proteína C humana es K02059, NID g190322.

35 La mutagénesis dirigida al sitio se realizó según un método de PCR. Para la mutagénesis de la proteína C humana de histidina en 11 a prolina, se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos: **A**, 5'-AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCC AAG CTT-3' (SEQ ID NO: 7) (que se corresponde con los nucleótidos 860-895 en el vector pRc/CMV) para crear un sitio *Hind* III entre pRc/CMV y la proteína C. **B**, 5'-GCA CTC CCG CTC CAG GCT GCT

60

GGG ACG GAG CTC CTC CAG GAA-3' (SEQ ID NO: 8) (que se corresponde con los residuos de aminoácidos 4-17 en la proteína C humana, el 8º residuo en esta secuencia había mutado desde el de la proteína C humana al de la proteína C bovina, tal y como se indica por el subrayado).

5 Para la mutagénesis de la proteína C bovina de la prolina en 11 a histidina, se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos: **A**, (tal y como se ha descrito anteriormente); **C**, 5'-ACG CTC CAC GTT GCC GTG CCG CAG CTC CTC TAG GAA-3' (SEQ ID NO: 9) (que se corresponde con los residuos de aminoácidos 4-15 en la proteína C bovina, el 6º aminoácido había mutado desde el de la proteína C bovina al de la proteína C humana, tal y como se indica por el subrayado); **D**, 5'-TTC CTA GAG GAG CTG CGG CAC GGC AAC GTG GAG CGT-3' (SEQ ID NO: 10) (que se corresponde con los residuos de aminoácidos 4-15 de la proteína C bovina, el 7º aminoácido había mutado desde el de la proteína C bovina al de la proteína C humana; los nucleótidos mutados están subrayados); **E**, 5'-GCA TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA GGG CCC TCT AGA-3' (SEQ ID NO: 11) (que se corresponde con los nucleótidos 984-1019 en el vector pRc/CMV), creando un sitio *Xba* I entre pRc/CMV y la proteína C.

15 Tanto el cDNA de la proteína C humana como el de la bovina fueron clonados en los sitios *Hind* III y *Xba* I del vector de expresión pRc/CMV. El cDNA de la proteína C humana que contiene el extremo 5' hasta el aminoácido 17 fue amplificado por PCR con cDNA de la proteína C humana intacta y los cebadores A y B. El volumen para la PCR fue 100 µL y contenía 0,25 µg de DNA molde, 200 µM de cada uno de los cuatro desoxirribonucleósidos-trifosfatos, 0,5 mM de cada cebador y 2,5 U de Pwo-DNA-polimerasa (Boehringer Mannheim) en tampón Tris-HCl (Tris 10 mM, KCl 25 mM, (NH₄)₂SO₄ 5 mM y MgSO₄ 2 mM, pH 8,85). Las muestras se sometieron a 30 ciclos de PCR que consistían en un periodo de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, un periodo de reasociación de 2 minutos a 55°C y un periodo de prolongación de 2 minutos a 72°C. Después de la amplificación, el DNA se sometió a electroforesis a través de un gel de agarosa al 0,8% en tampón Tris-acetato 40 mM que contenía EDTA 1 mM. Los productos de la PCR se purificaron con un kit JET Plasmid Miniprep (Saveen Biotech AB, Suecia). El cDNA de la proteína C humana que contenía las mutaciones respectivas fue escindido por *Hind* III y *Bsr* BI y a continuación clonado en el vector pRc/CMV que había sido escindido por *Hind* III/*Xba* I y que contenía un fragmento de la proteína C humana desde *Bsr* BI hasta el extremo 3', para producir con la mutación un cDNA de longitud completa de la proteína C humana.

25 El cDNA de la proteína C bovina que contenía el extremo 5'-terminal hasta el aminoácido 11 se amplificó con PCR con el cDNA de la proteína C humana intacta y los cebadores A y C. El cDNA de la proteína C bovina desde el aminoácido 11 hasta el extremo 3'-terminal se amplificó con cDNA de la proteína C humana intacta y los cebadores D y E. Estos dos fragmentos de cDNA se emplearon como moldes para amplificar el cDNA de la proteína C bovina de longitud completa, que contenía los aminoácidos mutados, con los cebadores A y E. Las condiciones de la PCR eran idénticas a las empleadas para hAPC. El cDNA de la proteína C bovina que contenía las mutaciones respectivas fue escindido por *Hind* III y *Bsu* 36I y el fragmento *Hind* III/*Bsu* 36I se clonó en el vector pRc/CMV que contenía fragmentos de la proteína C bovina intacta, desde *Bsu* 36I hasta el extremo 3'-terminal, para producir cDNA de la proteína C bovina de longitud completa, que contenía la mutación. Todas las mutaciones se confirmaron por secuenciación del DNA antes de la transfección.

30 **Cultivo celular y expresión:** La línea celular 293 de riñón humano transfectada con adenovirus se dejó crecer en medio DMEM suplementado con suero de ternera fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomycin y 10 µg/mL de vitamina K₁. La transfección se realizó empleando el método de la lipofectina. Felgner, P.L., et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7413-7417. Se diluyeron 2 µg de DNA en 0,1 mL con DMEM que contenía medio de L-glutamina 2 mM. Se añadieron 10 µL de lipofectina (1 mg/mL) a 100 µL de DMEM que contenía medio de L-glutamina 2 mM. El DNA y la lipofectina se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Las monocapas celulares (25-50% de confluencia en placas Petri de 5 cm) se lavaron dos veces en DMEM con medio de L-glutamina 2 mM. La mezcla de DNA/lípidos se diluyó hasta 1,8 mL en DMEM que contenía medio de L-glutamina 2 mM, se añadió a las células y se incubó durante 16 horas. Las células se alimentaron con 2 mL de medio completo que contenía suero de ternera fetal al 10%, se dejaron recuperar durante otras 48-72 horas y a continuación se tripsinizaron y se sembraron en placas de 10 cm con medio de selección (DMEM que contenía 10% de suero y 400 µg/mL de geneticina) a 1:5. Yan, S.C.B., et al., 1990, *Bio/Technology* 655-661. Después de 3-5 semanas de selección se obtuvieron colonias resistentes a geneticina. Se tomaron 24 colonias de cada transfección de DNA, se dejaron crecer hasta confluencia y se escrutaron los medios para la expresión de la proteína C con un ensayo de transferencia de puntos, empleando el anticuerpo monoclonal HPC4 (para la proteína C humana) y el anticuerpo monoclonal BPC5 (para la proteína C bovina). Los clones que produjeron grandes cantidades de proteína se aislaron y se dejaron crecer hasta confluencia en presencia de 10 µg/mL de vitamina K₁.

45 La purificación de la proteína C recombinante bovina y su mutante se basaron en el método descrito previamente con algunas modificaciones. Rezair, A.R., and Esmon, C.T., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267:26104-26109. El medio acondicionado exento de suero procedente de las células transfectadas establemente se centrífugo a 5000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El material sobrenadante se filtró por membranas de nitrato de celulosa de 0,45 µm (Micro Filtration Systems, Japón). Se añadió EDTA (concentración final 5 mM) y PPACK (concentración final 0,2 µM) al medio acondicionado de la línea celular 293, a continuación se hizo pasar a través de una columna de intercambio aniónico de Pharmacia FFQ, a temperatura ambiente, empleando Millipore Con Sep LC100 (Millipore, EE.UU.). La proteína se eluyó con un gradiente de CaCl₂ (solución de partida, Tris-HCl 20 mM/NaCl 150 mM, pH 7,4; solución limitante, Tris-HCl 20 mM/NaCl 150 mM/CaCl₂ 30 mM, pH 7,4). Después de retirar el CaCl₂ por diálisis y tratamiento con Che-

lex 100, la proteína fue reabsorbida en una segunda columna FFQ, a continuación se eluyó con un gradiente de NaCl (solución de partida, Tris-HCl 20 mM/NaCl 150 mM, pH 7,4; solución limitante, Tris-HCl 20 mM/NaCl 500 mM, pH 7,4). En este momento de la purificación, las proteínas C bovinas de tipo natural y recombinante mutante eran homogéneas tal y como se determinó por SDS-PAGE.

- 5 La primera columna empleada para la purificación de la proteína C humana recombinante de tipo natural y mutante era la misma que la descrita para la proteína C bovina. El método cromatográfico descrito por Rezair and Esmon se empleó con algunas modificaciones descritas para el método de purificación de la proteína S. Rezair, A.R. and Esmon, C.T., 1992, citado anteriormente; He, Z., et al., 1995, *Eur. J. Biochem.*, 227:433-440. Las fracciones que contenían la proteína C procedentes de la cromatografía de intercambio aniónico se identificaron por transferencia de puntos. Las fracciones positivas se reunieron y se aplicaron a una columna de afinidad que contenía el anticuerpo HPC-4 dependiente de Ca^{2+} . La columna se equilibró con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, que contenía benzamidina-HCl 5 mM y CaCl_2 2 mM. Después de la aplicación, la columna se lavó con el mismo tampón que contenía NaCl 1 M. La proteína C se eluyó a continuación con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM, pH 7,4, que contenía benzamidina-HCl 5 mM. Después de la purificación, se estimó la pureza de todas las preparaciones de proteína C recombinante bovina y humana por SDS-PAGE, seguido por tinción con plata. Las proteínas se concentraron empleando filtros YM 10 (Amicon), a continuación se dializaron frente a tampón (Tris-HCl 50 mM y NaCl 150 mM, pH 7,4) durante 12 horas y se conservaron a -70°C . Las concentraciones de las proteínas se midieron por absorbancia a 280 nm.

- 20 **Asociación de moléculas de proteína C normales y mutantes con membranas:** Se prepararon LUV y SUV según los métodos descritos en el Ejemplo 1. Se empleó dispersión de luz a 90° con la luz incidente para cuantificar la unión proteína-membrana, tal y como se ha descrito anteriormente para el Factor VII (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PS/PC, (25/75) en calcio 5 mM (tampón Tris 0,05 M – NaCl 0,1 M, pH 7,5).

- 25 La proteína C bovina que contenía histidina en la posición 11 interactuó con membranas aproximadamente con una afinidad 10 veces superior a la de la proteína de tipo natural. Cuando se ajustó a la ecuación 2, los datos proporcionaron valores de K_D de 930 ± 80 nM para la proteína C-H11 y 9200 ± 950 nM para la proteína C de tipo natural (Figura 8A). La diferencia en la afinidad correspondía a aproximadamente 1,4 kcal/mol a 25°C . De hecho, la afinidad para membranas de la proteína C-H11 bovina era casi idéntica a la observada en la proteína C humana natural (660 nM, Figura 8B). Esto sugirió que la prolina 11 formaba una base principal para las diferencias entre el sitio de unión a membranas de las proteínas humana y bovina.

- 30 La sustitución inversa, el reemplazo de His-11 de la proteína C humana por prolina, disminuyó la afinidad para membranas (Figura 8B). Cuando se ajustaron a la ecuación 2, estos datos proporcionaron valores de K_D de 660 ± 90 nM para la proteína C humana de tipo natural y 3350 ± 110 nM para la proteína C-P11 humana. El impacto de la introducción de prolina fue sólo ligeramente menor que el de la prolina en las proteínas bovinas.

- 35 **Efecto de la prolina en 11 sobre la actividad de la proteína C activada:** La proteína C activada se generó por la escisión con trombina, empleando condiciones idénticas tanto para la proteína de tipo natural como para la mutante. Aproximadamente 150 μg de las diversas preparaciones de proteína C (1 mg/mL) se mezclaron con trombina bovina (3 μg) y se incubaron a 37°C durante 5 horas. El producto de la reacción se diluyó hasta obtener un tampón Tris 0,025 M – NaCl 0,05 M y se aplicó a una columna de 1 mL de SP-Sephadex C-50. La columna se lavó con 1 mL del mismo tampón y se reunió el flujo pasante como proteína C activada. Se recuperó aproximadamente 65-80% de la proteína aplicada a la columna. La actividad de APC se determinó por proteólisis de S2366 (0,1 mM) a 25°C . Las preparaciones se compararon con preparaciones patrones obtenidas a gran escala. La APC humana patrón fue proporcionada por el Dr. Walter Kiesel. Para las proteínas bovinas, el patrón fue una preparación a gran escala de APC activada por trombina. La actividad de la APC bovina era coherente para todas las preparaciones de proteínas normales y mutantes ($\pm 5\%$). Se emplearon dos preparaciones de APC bovina para las comparaciones. La APC humana generada a partir de trombina tenía una actividad que era 55 a 60% la del patrón. Las concentraciones descritas en este estudio estaban basadas en la actividad frente a S2366, en relación con la del patrón.

- 50 El ensayo APTT estándar usó plasma bovino o humano y reactivo APTT estándar (Sigma Chemical Co.), según las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los fosfolípidos se proporcionaron en forma de vesículas formadas a partir de fosfolípidos altamente purificados. En este ensayo, el plasma bovino (0,1 mL) se incubó con caolín (0,1 mL de 5 mg/mL en tampón Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5) o ácido elágico (0,1 mM en tampón) durante 5 minutos a 35°C . La coagulación se inició añadiendo 0,1 mL de tampón que contenía fosfolípido y las cantidades de APC mostradas, seguido por 0,1 mL de cloruro cálcico 25 mM. Todos los reactivos estaban en tampón estándar que contenía tampón Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5. Por término medio, se necesitaba una concentración 14 veces superior de bAPC de tipo natural, para duplicar el impacto del mutante H11. El tiempo de coagulación con bAPC-H11 10 nM fue superior a 120 minutos. El reactivo APTT estándar (Sigma Chemical Co.) proporcionó un tiempo de coagulación de aproximadamente 61 segundos a 35°C con este plasma. El tiempo necesario para formar un coágulo se registró por técnicas manuales. La cantidad de fosfolípido se diseñó para que fuera el componente limitante en el ensayo y proporcionara los tiempos de coagulación mostrados. Los fosfolípidos empleados fueron SUV (45 $\mu\text{g}/0,4$ mL en el ensayo final, PS/PC, 10/90) o LUV (120 $\mu\text{g}/0,4$ mL en el ensayo final, PS/PC, 25/75).

- 60 La actividad anticoagulante de la proteína C activada se analizó en diversos ensayos. La Figura 9 muestra el impac-

to sobre el ensayo APTT, realizado con fosfolípidos limitantes. En las condiciones de este ensayo, los tiempos de coagulación disminuyeron en una relación inversa, casi lineal, con la concentración de fosfolípidos. Se necesitaron aproximadamente 14 veces la cantidad de APC bovina de tipo natural para igualar el efecto de la APC-H11 bovina.

5 Partes del estudio de la Figura 9 se repitieron para membranas de PS/PC (25/75, LUV). De nuevo, la actividad estaba limitada por los fosfolípidos y su concentración se ajustó para proporcionar un tiempo de coagulación de control de 360 segundos (120 µg de PS al 25% en el ensayo de 0,4 mL). Se necesitaron aproximadamente 15 veces más enzima de tipo natural para igualar el impacto del mutante H11. Finalmente, se utilizó el reactivo APTT estándar (Sigma Chemical Co., tiempo de coagulación estándar 50±2 segundos). Se necesitaron aproximadamente 10,0±0,7 nM de enzima de tipo natural para duplicar el tiempo de coagulación a 102±5 segundos. El mismo impacto fue producido por APC-H11 bovina 2,2±0,1 nM. Los fosfolípidos no fueron limitantes de la velocidad en el ensayo estándar, por lo que se puede esperar un menor impacto sobre la afinidad para las membranas.

10 Los resultados para las proteínas humanas se muestran en la Figura 8B. Se requirieron aproximadamente 2,5 veces la cantidad de APC humana que contenía prolina en 11 para prolongar la coagulación hasta el grado de la APC de tipo natural. Un impacto menor por la introducción de prolina en 11 puede reflejar las diferencias menores en la afinidad para las membranas de las proteínas humanas (Figura 9B).

15 **Inactivación del Factor Va:** La inactivación del Factor Va se analizó por el método de Nicolaes, et al., 1996, *Thrombosis and Haemostasis*, 76:404-410. Resumiendo, para las proteínas bovinas se diluyó 1000 veces plasma bovino con Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M, 1 mg/mL de seroalbúmina bovina y calcio 5 mM a pH 7,5. Al Factor V activado se añadieron vesículas de fosfolípidos (5 µg/0,24 mL de líquido de análisis) y 5 µL de trombina 190 nM. Después de incubación durante 10 minutos a 37°C se añadió APC y la incubación continuó durante 6 minutos. Se añadieron protrombina bovina (hasta una concentración final de 10 µM) y Factor Xa (concentración final 0,3 nM) y la mezcla de reacción se incubó durante un minuto a 37°C. Una muestra de 20 µL de esta mezcla de reacción de activación se añadió a 0,38 mL de tampón (Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 7,5) que contenía sustrato S2288 (60 µM). La cantidad de trombina se determinó por el cambio en la absorbancia a 405 nM ($\epsilon = 1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, k_{cat} para trombina = 100/s). Para las proteínas humanas, el plasma deficiente en proteína S humana (Biopool Canada, Inc.) se diluyó 100 veces, el Factor Va se activó por trombina humana y el Factor Va producido se analizó con los reactivos empleados para las proteínas bovinas.

20 La APC-H11 bovina fue 9,2 veces más activa que la de tipo natural (Figura 10A) para inactivar el Factor Va. Del mismo modo que para la unión a membranas (antes citada), el impacto de la prolina en 11 fue menor con las proteínas humanas, con una media de 2,4 veces la diferencia entre las curvas trazadas para el tipo natural y para el mutante P-11 (Figura 10B). Se obtuvieron resultados similares con el plasma humano normal.

25 **Ejemplo 4 – Identificación de una afinidad arquetípica para membranas para el sitio de contacto con las membranas de las proteínas dependientes de la vitamina K:** La comparación de diversos mutantes de la proteína C humana y bovina y de otros polipéptidos dependientes de la vitamina K condujo a la proposición de un arquetipo de sitio de contacto con las membranas. El arquetipo electrostático consiste en un núcleo electropositivo sobre una superficie de la proteína, creado por iones de calcio unidos, rodeado por un halo de carga electronegativa de los aminoácidos de la proteína. Cuanto más se acerque un miembro de esta familia de proteínas a este patrón electrostático, mayor es su afinidad para las membranas.

30 Las vesículas de fosfolípidos, la proteína C bovina de tipo natural, los estudios de la interacción proteína-membrana, la activación y la cuantificación de la proteína C y el análisis de la actividad fueron tal y como se han descrito en el Ejemplo 3.

35 La proteína C mutante y recombinante se generó por los siguientes procedimientos. La mutagénesis dirigida al sitio se realizó por un método de PCR. Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos: **A**, como se ha descrito en el Ejemplo 3; **F**, 5'-GCA TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA GGG CCC TCT AGA-3' (SEQ ID NO: 11) (que se corresponde con los nucleótidos 984-1019 en el vector pRc/CMV), creando un sitio *Xba* I entre pRc/CMV y la proteína C; **G**, 5'-GAA GGC CAT TGT GTC TTC CGT GTC TTC GAA AAT CTC CCG AGC-3' (SEQ ID NO: 12) (que se corresponde con los residuos de aminoácidos 40-27 en la proteína C bovina, los aminoácidos 8° y 9° habían mutado desde QN a ED, como se indica con el subrayado); **H**, 5'-CAG TGT GTC ATC CAC ATC TTC GAA AAT TTC CTT GGC-3' (SEQ ID NO: 13) (que se corresponde con los residuos de aminoácidos 38-27 en la proteína C humana, los aminoácidos 6° y 7° de esta secuencia habían mutado desde QN a ED, como se indica con el subrayado); **I**, 5'-GCC AAG GAA ATT TTC GAA GAT GTG GAT GAC ACA CTG-3' (SEQ ID NO: 14) (que se corresponde con los residuos de aminoácidos 27-38 de la proteína C humana, los aminoácidos 6° y 7° de esta secuencia habían mutado desde QN a ED, como se indica con el subrayado); **J**, 5'-CAG TGT GTC ATC CAC ATT TTC GAA AAT TTC CTT GGC-3' (SEQ ID NO: 15) (que se corresponde con los residuos de aminoácidos 38-27 de la proteína C humana, el 7° aminoácido de esta secuencia había mutado desde Q a E, como se indica con el subrayado); **K**, 5'-GCC AAG GAA ATT TTC GAA AAT GTG GAT GAC ACA CTG-3' (SEQ ID NO: 16) (que se corresponde con los residuos de aminoácidos 27-38 de la proteína C humana, el 6° aminoácido de esta secuencia había mutado desde Q a E, como se indica con el subrayado).

Se clonaron tanto el cDNA de longitud completa de la proteína C humana como bovina en el sitio *Hind* III y *Xba* I del

vector pRc/CMV. Para obtener el mutante E33D34 de la proteína C bovina, se realizó una amplificación por PCR del DNA diana del modo siguiente. El cDNA de la proteína C bovina que contenía el extremo 5' para el aminoácido en la posición 40, se amplificó con cDNA de la proteína C bovina intacta y los cebadores A y C. Las condiciones para la PCR fueron como se han descrito en el Ejemplo 3. La muestra se sometió a 30 ciclos de PCR que consistían en un periodo de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, un periodo de reasociación de 2 minutos a 55°C y un periodo de prolongación de 2 minutos a 72°C. Después de la amplificación, el DNA se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en tampón Tris-acetato 40 mM que contenía EDTA 1 mM. Los productos de la PCR se purificaron con el kit The GeneClean III (BIO 101, Inc. EE.UU.) y el fragmento de la PCR del cDNA de la proteína C bovina que contenía las mutaciones respectivas fue escindido por *Hind* III y *Bbs* I. El fragmento *Hind* III/*Bbs* I y el fragmento de la proteína C humana (*Bbs* I-extremo 3') fueron clonados en los sitios *Hind* III y *Xba* I del vector pRc/CMV, para producir un cDNA de la proteína C bovina de longitud completa con las mutaciones. El mutante H11 E33 D34 de la proteína C bovina se creó del mismo modo, pero se empleó el mutante H11 de la proteína C bovina como molde en la PCR.

El cDNA de la proteína C humana que contenía desde el extremo 5' hasta el aminoácido 38 fue amplificado por PCR con cDNA de la proteína C humana intacta y los cebadores A y D. El cDNA de la proteína C humana desde el aminoácido 27 hasta el extremo 3' fue amplificado con cDNA de la proteína C humana intacta y los cebadores B y E. Estos dos fragmentos de cDNA se emplearon como moldes para amplificar el cDNA de la proteína C bovina de longitud completa que contenía los aminoácidos mutados (E33 D34) con los cebadores A y B. El mutante E33 de la proteína C humana se obtuvo por las siguientes etapas: el cDNA de la proteína C humana que contenía el extremo 5' hasta el aminoácido 38 fue amplificado con cDNA de la proteína C humana intacta y los cebadores A y F. El cDNA de la proteína C humana desde el aminoácido 27 hasta el extremo 3' fue amplificado con el cDNA de la proteína C humana intacta y los cebadores B y G. Estos dos fragmentos de cDNA se emplearon como moldes para amplificar el cDNA de la proteína C bovina de longitud completa que contenía aminoácidos mutados (E33) con los cebadores A y B. La mezcla de PCR y el programa se han descrito anteriormente. Los productos de PCR de la proteína C humana que contenían las mutaciones respectivas fueron escindidos por *Hind* III y *Sal* I y a continuación el fragmento (*Hind* III – *Sal* I) junto con el fragmento de la proteína C humana intacta (*Sal* I – extremo 3') fueron clonados en los sitios *Hind* III y *Xba* I del vector pRc/CMV para producir el cDNA de la proteína C humana de longitud completa con las mutaciones respectivas. Todas las mutaciones se confirmaron por la secuenciación del DNA antes de la transfección.

La línea celular 293 de riñón humano transfectada con adenovirus se cultivó y se transfectó como se describe en el Ejemplo 3. La proteína C recombinante humana y bovina y los mutantes se purificaron como se describe en el Ejemplo 3.

Las proteínas dependientes de la vitamina K se clasificaron en cuatro grupos basándose en sus afinidades para una membrana típica (Tabla 4). Las secuencias de los residuos aminoterminales de algunas proteínas relevantes que incluyen la proteína C humana (hC), la proteína C bovina (bC), la protrombina bovina (bPT), el Factor X bovino (bX) y el Factor VII humano (hVII) se dan para referencia, en donde X es Gla (ácido γ-carboxiglutámico) o Glu.

bPT: ANKGFLXXVRK₁₁GNLXRXCLXX₂₁PCSRXXAFXA₃₁LXSLSATDAF₄₁WAKY (SEQ ID NO:17)
bX: ANS-FLXXVKQ₁₁GNLXRXCLXX₂₁ACSLXXARXV₃₁FXDAXQTDXF₄₁WSKY (SEQ ID NO:18)
hC: ANS-FLXXLRH₁₁SSLXRXCIXX₂₁ICDFXXAKXI₃₁FQNVDDTLAF₄₁WSKH (SEQ ID NO:1)
bC: ANS-FLXXLRP₁₁GNVXRXCSXX₂₁VCXFXXARXI₃₁FQNTXDTMAF₄₁WSFY (SEQ ID NO:2)
hVII: ANA-FLXXLRP₁₁GSLXRXCKXX₂₁QCSFXXARXI₃₁FKDAXRTKLF₄₁WISY (SEQ ID NO:3)

TABLA 4
Cargas y Afinidad

	Residuo						K _D (nM)
	11 + 29 + 33 + 34 = Suma					Total	
Clase I							
bZ	-2	+	-2	-1	-4	-6	0,2 ^a -32
hZ	-2	+	-2		-3	-5	2,0 ^a -170
Clase II							

	Residuo						Total	K _D (nM)
	11 + 29 + 33 + 34 = Suma							
bPT-TNBS			-2		-2		-1	<10
hVII-Q11E33		+	-2	-1	-2		-2	10
hS		+	-2	-1	-2		-2	40
bX		+	-2	-1	-2		-3	40
bC-E33D34	P	+	-2	-1	-2		-4	125
hX	+	+	-2	-1	-1		-2	160
bPT	+		-2		-1		0	100
hPT	+		-2		-1		-1	-
bS	+	+	-2		0		0	120
Clase III								
bIX		+	-2		-1		-1	1000
hIX		+	-2		-1		-1	1000
hC		+			+1		-2	660
bC-H11		+			+1		-1	930
Clase IV								
hC	P	+			+1		-2	3300
hVII	P	+	+	-1	+1		+1	4000
bC	P	+			+1		-1	9200
bVII	P	+	+		+1		0	15000

^a El valor de la afinidad superior es igual a $k_{\text{disociación}}/1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; el denominador es una $k_{\text{asociación}}$ típica para otras proteínas.

En la Tabla 4, los mutantes del polipéptido dependiente de la vitamina K aparecen en negrita. La carga total (residuos 1-34) incluye 7 iones de calcio (+14) y el extremo amino (+1).

- 5 La proteína Z fue asignada a la clase I, basándose en su constante de velocidad de disociación que era 100 a 1000 veces más lenta que la de otras proteínas. Si la proteína Z mostrara una constante de velocidad de asociación normal (aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) la K_D podría ser aproximadamente 10^{-10} M . Wei, G.J., et al., 1982, *Biochemistry*, 21:1949-1959. La última afinidad puede ser la máxima posible para las proteínas de la vitamina K. Las proteínas de la clase IV diferían de las de la clase III por la presencia de prolina en 11 que puede alterar la afinidad por medios no electrostáticos.
- 10

Aunque había una correlación relativamente débil entre la afinidad para membranas y la carga negativa neta en los residuos 1-34, se observó una excelente correlación cuando sólo se consideraron los residuos 5, 11, 29, 33 y 34 (Tabla 4). Los últimos aminoácidos están localizados en la superficie de la proteína. Se diseñó una variedad de proteínas por sustitución de aminoácidos en la estructura de la protrombina y se estimaron sus potenciales electrostáticos por el programa DelPhi. En la Figura 11 se muestra un boceto sistematizado del potencial electrostático de la proteína Z bovina. Los sitios electronegativos en 7, 8, 26, 30, 33, 34 y 11 producen un halo de carga electronegativa rodeando un núcleo catiónico producido por el poro revestido con calcio (Figura 11). Cuanto más se aproxime una estructura proteica a esta estructura mayor será su afinidad para la membrana. Esta correlación es evidente en las proteínas de tipo natural, los mutantes y las proteínas químicamente modificadas.

15

El modelo para otras estructuras se puede extrapolar a partir del examen de los grupos con carga que están ausentes en otras proteínas. Por ejemplo, Lys-11 y Arg-10 de la protrombina bovina generan regiones altamente electropositivas en su proximidad; la carencia de Gla-33 en la proteína C y en el Factor VII, crea menos electronegatividad en esas regiones proteicas. En todos los casos, la mayor afinidad se corresponde con una estructura con un núcleo electropositivo que estaba completamente rodeado por una superficie proteica electronegativa, como se muestra para la proteína Z. Las excepciones a este modelo son las proteínas con Pro-11 que pueden tener menor afinidad mediante un impacto estructural y Ser-12 (proteína C humana) que es un residuo sin carga único.

Para estudiar más a fondo la hipótesis de un arquetipo de la distribución electrostática, se empleó la mutagénesis dirigida al sitio para sustituir Gln33Asn34 de la proteína C bovina y humana por Glu33Asp34 (SEQ ID NO: 19). Glu33 debe ser modificado adicionalmente a Gla durante el procesamiento de la proteína. Estos cambios alteraron el potencial electrostático de la proteína C bovina al del Factor X bovino. La afinidad para membranas de la proteína mutante se esperaba que fuera menor que el del Factor X, debido a la presencia de prolina en 11. Realmente, el mutante de la proteína C bovina proporcionó una afinidad para membranas similar a la de la protrombina bovina (Figura 12A) y ligeramente menor que la del Factor X bovino (Tabla 4).

Más interesante fue que la inhibición de la coagulación por APC era superior para el mutante que para la enzima de tipo natural (Figura 12B, C). La inclusión de resultados para el mutante P11H de la proteína C bovina del Ejemplo 3 mostró que se podía producir una familia de proteínas, cada una con una afinidad para membranas y una actividad diferentes, variando las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 11, 33 y 34.

Los mutantes de la proteína C humana que contenían E33 y E33D34 dieron como resultado un pequeño aumento de la afinidad de la unión a membranas (Figura 13a). La actividad de estos mutantes fue ligeramente menor que la de la enzima de tipo natural (Figura 13b). Los resultados con mutantes de la proteína C bovina sugieren que el fallo de la mutación E33D34 en la proteína humana puede proceder de H11 y/o de otros aminoácidos únicos de la proteína. La Figura 14A muestra que el mutante H11 de la proteína C bovina se unió a la membrana con aproximadamente 10 veces más afinidad que la proteína de tipo natural, el mutante E33D34 se unió con aproximadamente 70 veces más afinidad, pero el mutante triple, H11E33D34, era sólo ligeramente mejor que el mutante H11. Esta relación se reflejaba en la actividad de la APC formada a partir de estos mutantes (Figura 14B). Este resultado sugirió que la presencia de H11 redujo el impacto de E33D34 sobre la afinidad de unión a membranas.

Estos resultados indicaban que la introducción de E33D34 puede no ser óptima para todas las proteínas. En consecuencia, pueden ser deseables otras mutaciones para crear proteína C humana que emplearan E33D34 y tuvieran una afinidad para membranas aumentada al máximo. El resultado con la proteína bovina sugirió que la histidina en 11 puede ser la causa principal de este fenómeno. En consecuencia, H11 se puede alterar a glutamina o a otro aminoácido en la proteína C humana, junto con la mutación E33D34. Otro aminoácido que puede tener impacto sobre la afinidad es la serina en la posición 12, un aminoácido que es totalmente exclusivo de la proteína C humana. Estos cambios adicionales producirían proteínas con una mejor afinidad para membranas.

El arquetipo electrostático se analizó también comparando el Factor X humano y el bovino. La presencia de lisina en 11 en el Factor X humano, sugiere que debe haber menos afinidad que en el Factor X bovino. Esta predicción fue confirmada por el resultado mostrado en la Figura 15.

Estudios previos han mostrado que la modificación con ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) del fragmento 1 de la protrombina bovina y humana tuvo relativamente poco impacto (de 0 a 5 veces) sobre la afinidad para membranas. Weber, D.J., et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267:4564-4569; Welsch, D.J., et al., 1988, *Biochemistry*, 27:4933-4938.

Las condiciones empleadas para la reacción dieron como resultado la derivatización del extremo amino, un cambio que está ligado a una menor afinidad para membranas. Welsch, D.J. and Nelsestuen, G.L., 1988, *Biochemistry*, 27:4939-4945. La modificación de la proteína en presencia de calcio, que protege el extremo amino dio como resultado la proteína modificada con TNBS, con una afinidad muy superior para la membrana que el fragmento 1 natural.

La sugerencia de que la proteína Z constituye el arquetipo se basó en su constante de velocidad de disociación y en que una velocidad de asociación normal generaría una $K_D = 10^{-10}$ M. Que este valor pueda alcanzarse no es seguro. Es posible, que la velocidad de asociación lenta de la proteína Z esté causada por un plegamiento inadecuado de la proteína, dando como resultado una menor concentración de la conformación de unión a membranas. Si se pudiera alterar las condiciones para mejorar el plegamiento de la proteína, deberían mejorar las velocidades de asociación de la proteína Z. Realmente, la constante de velocidad de asociación para la proteína Z fue mejorada alterando el pH. La base para esta observación puede estar relacionada con una característica inusual de la estructura de la protrombina que es la posición cercana del extremo amino (+1 a pH 7,5) a los iones de calcio 2 y 3. La carga +1 en el extremo amino es responsable de la región ligeramente electropositiva justo encima de Ca-1 en la Figura 11. La repulsión de cargas entre Ca y el extremo amino puede desestabilizar el plegamiento de la proteína y podría ser un problema importante para una proteína que tuviera una baja estabilidad de plegamiento.

La Tabla 5 proporciona un soporte adicional para el modelo del arquetipo. Dicha tabla muestra la relación entre la distancia de los grupos iónicos de los iones estroncio 1 y 8 (que se corresponden a calcio 1 y a un ión metálico divalente extra, encontrado en la estructura cristalina de Sr con rayos X de la protrombina). El modelo sugiere que cuan-

to más próximo esté el grupo iónico a estos iones metálicos mayor será su impacto sobre la afinidad para membranas. La excepción es Arg-16, que contribuye a la carga del núcleo electropositivo. Una afinidad superior se correlaciona con una carga electronegativa en todos los demás sitios. Esta correlación también se aplica a los residuos de GLA.

5

TABLA 5
Distancia a Sr-1, 8 e importancia de los iones

Posición	Átomo ^a	Distancia (Å) a: impacto/ión		
		Sr-1	Sr-8	en K _D (K _M)
(A.A-Proteína)				
3 (K-PT)	ε-N	22,1	21,7	Baja o desconocida
5 (K-IX)	para-C (F)	20,1	20,8	"
19 (K/R-VII)	C5 (L)	20,2	17,8	"
22 (K-IX)	C4 (P)	17,0	18,5	"
10 (R)	C6 (R)	16,8	12,9	"
25 (R-PT)	C6 (R)	11,2	13,8	"
24 (X/D-PC)	O (S)	8,1	12,0	"
11(K-PT, hX, bS; Gla-PZ)	ε-C (K)	14,7	7,4	3-10 veces ^b
	γ-C (E)	11,6	7,5	"
33 (Gla)	γ-C (E)	11,6	7,5	"
34 (D)	O (S)	15,3	12,1	"
29 (R)	para-C (F)	7,5	8,4	"
16 (R)	C6 (R)	14,2	10,6	" ^c
Residuo Gla ^d				
Poca importancia:				
7		12,8	13,3	+2 (<2)
15		20	16	<2 (<2)
20		19,4	17,8	<2 (<2)
21		17,2	15	4 (3)
33		11,6	7,5	? ^e (<2)
Mucha importancia:				
8		8,7	10,9	? ^e (20)
26		3,6	9,5	? ^e (50)
17		11,1	9,1	>200 (100)
27		8,4	10,6	>200 (85)
30		3,4	4,2	>200 (25)

^a Las distancias son desde este átomo de protrombina bovina (el residuo de protrombina empleado en la medición se da entre paréntesis) hasta el estroncio 1 y 8 de la estructura del fragmento 1 de la Sr-protrombina. Seshadri, et al., 1994, *Biochemistry*, 33:1087-1092.

^b Para todos excepto 16-R, los cationes disminuyen la afinidad y los aniones aumentan la afinidad.

^c Thariath, et al., 1997, *Biochem. J.*, 322:309-315.

^d Impacto de las mutaciones Glu a Asp, las distancias son valores medios para los gamma-carboxil-carbonos. Los datos de K_D (K_M) proceden de Ratcliffe, et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268:24339-45.

^e La unión tenía una capacidad inferior o causaba agregación, haciendo las comparaciones menos precisas.

- 5 Los resultados en la Figura 15C muestran que la velocidad de asociación para la proteína Z fue mejorada sustancialmente a pH 9, en donde un amino terminal debe estar sin carga. La constante de velocidad obtenida de estos datos fue aproximadamente 12 veces superior a pH 9 que a pH 7,5 (Figura 15C).

Otras realizaciones

- 10 Se debe entender que aunque la invención se ha descrito junto con la memoria descriptiva detallada de la misma, la memoria descriptiva anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones anexas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Regents of the University of Minnesota
- <120> Polipéptidos modificados dependientes de la vitamina K
- <130> 09531/002WO1
- 5 <150> 08/955,636
<151> 23-10-1997
- <160> 35
- <170> FastSEQ for Windows Versión 3.0
- 10 <210> 1
<211> 44
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- <220>
<221> MOD_RES
- 15 <222> (0)...(0)
<223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico
- <400> 1
Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg His Ser Ser Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Cys Ile Xaa Xaa Ile Cys Asp Phe Xaa Xaa Ala Lys Xaa Ile Phe Gln
20 25 30
Asn Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His
35 40
- 20 <210> 2
<211> 44
<212> PRT
<213> Bos taurus
- <220>
<221> MOD_RES
- 25 <222> (0) ... (0)
<223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico
- <400> 2
Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Pro Gly Asn Val Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Cys Ser Xaa Xaa Val Cys Xaa Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Gln
20 25 30
Asn Thr Xaa Asp Thr Met Ala Phe Trp Ser Phe Tyr
35 40
- 30 <210> 3
<211> 44
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- <220>
<221> MOD_RES
- 35 <222> (0)...(0)
<223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

ES 2 496 104 T3

<400> 3

Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Pro Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Lys
 20 25 30
 Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr
 35 40

<210> 4

<211> 44

5 <212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (0)...(0)

<223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

<400> 4

Ala Asn Gly Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Pro Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Cys Arg Xaa Xaa Leu Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala His Xaa Ile Phe Arg
 20 25 30
 Asn Xaa Xaa Arg Thr Arg Gln Phe Trp Val Ser Tyr
 35 40

15

<210> 5

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (0)...(0)

<223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

25

<400> 5

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Xaa Xaa Phe Val Gln Gly Asn Leu Xaa Arg
 1 5 10 15
 Xaa Cys Met Xaa Xaa Lys Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe
 20 25 30
 Xaa Asn Thr Xaa Arg Thr Thr Xaa Phe Trp Lys Gln Tyr
 35 40 45

<210> 6

<211> 46

30 <212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> MOD_RES

<222> (0)...(0)

35 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

ES 2 496 104 T3

<400> 6
 Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Xaa Xaa Phe Val Gln Gly Asn Leu Xaa Arg
 1 5 10 15
 Xaa Cys Met Xaa Xaa Lys Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe
 20 25 30
 Xaa Asn Thr Xaa Lys Arg Thr Thr Xaa Phe Trp Lys Gln Tyr
 35 40 45

- 5 <210> 7
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido mutagénico de la proteína C

- 10 <400> 7
 aaattaatac gactcactat agggagacc aagctt 36
 <210> 8
 <211> 42
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido mutagénico de la proteína C

- 20 <400> 8
 gactcccgc tccaggctgc tgggacggag ctctccagg aa 42
 <210> 9
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
 <223> Oligonucleótido mutagénico de la proteína C

- 30 <400> 9
 acgctccacg ttgccgtgcc gcagctcctc taggaa 36
 <210> 10
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
 <223> Oligonucleótido mutagénico de la proteína C

- 40 <400> 10
 ttctagagg agctgaggca cggcaacgtg gagcgt 36
 <210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
 <223> Oligonucleótido mutagénico de la proteína C

ES 2 496 104 T3

	<400> 11 gcatttagt gacactatag aatagggccc tctaga	36
5	<210> 12 <211> 42 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido mutagénico de la proteína C	
10	<400> 12 gaaggccatt gtgtcttccg tgtcttcgaa aatctcccga gc	42
15	<210> 13 <211> 36 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido mutagénico de la proteína C	
20	<400> 13 cagtgtgtca tccacatctt cgaaaatttc cttggc	36
25	<210> 14 <211> 36 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido mutagénico de la proteína C	
30	<400> 14 gccaaggaaa tttcgaaga tgtggatgac aactg	36
35	<210> 15 <211> 36 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido mutagénico de la proteína C	
40	<400> 15 cagtgtgtca tccacattt cgaaaatttc cttggc	36
45	<210> 16 <211> 36 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido mutagénico de la proteína C	
	<400> 16 gccaaggaaa tttcgaaaa tgtggatgac aactg	36

<210> 17
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0) ... (0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

10 <400> 17
Ala Asn Lys Gly Phe Leu Xaa Xaa Val Arg Lys Gly Asn Leu Xaa Arg
1 5 10 15
Xaa Cys Leu Xaa Xaa Pro Cys Ser Arg Xaa Xaa Ala Phe Xaa Ala Leu
20 25 30
Xaa Ser Leu Ser Ala Thr Asp Ala Phe Trp Ala Lys Tyr
35 40 45

<210> 18
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

20 <400> 18
Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Val Lys Gln Gly Asn Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Cys Leu Xaa Xaa Ala Cys Ser Leu Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe Xaa
20 25 30
Asp Ala Xaa Gln Thr Asp Xaa Phe Trp Ser Lys Tyr
35 40

25 <210> 19
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

35 <400> 19
Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg His Ser Ser Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Cys Ile Xaa Xaa Ile Cys Asp Phe Xaa Xaa Ala Lys Xaa Ile Phe Glu
20 25 30
Asp Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His
35 40

<210> 20
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

5

<400> 20
Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Gln Ser Ser Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Cys Ile Xaa Xaa Ile Cys Asp Phe Xaa Xaa Ala Lys Xaa Ile Phe Glu
20 25 30
Asp Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His
35 40

<210> 21
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

15

<400> 21
Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Glu Ser Ser Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Cys Ile Xaa Xaa Ile Cys Asp Phe Xaa Xaa Ala Lys Xaa Ile Phe Glu
20 25 30
Asp Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His
35 40

<210> 22
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

25

<400> 22
Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Asp Ser Ser Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Cys Ile Xaa Xaa Ile Cys Asp Phe Xaa Xaa Ala Lys Xaa Ile Phe Glu
20 25 30
Asp Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His
35 40

<210> 23
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0) ... (0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

35

<400> 23

Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg His Gly Asn Val Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Cys Ser Xaa Xaa Val Cys Xaa Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Gln
 20 25 30
 Asn Thr Xaa Asp Thr Met Ala Phe Trp Ser Phe Tyr
 35 40

<210> 24

<211> 44

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (0) ... (0)

10 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

<400> 24

Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Gln Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Cys Ile Xaa Xaa Ile Cys Asp Phe Xaa Xaa Ala Lys Xaa Ile Phe Glu
 20 25 30
 Asp Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His
 35 40

<210> 25

15 <211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (0) ... (0)

<223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

<400> 25

Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg His Ser Ser Leu Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Cys Ile Xaa Xaa Ile Cys Asp Phe Xaa Xaa Ala Phe Xaa Ile Phe Glu
 20 25 30
 Asp Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His
 35 40

25

<210> 26

<211> 44

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (0)...(0)

<223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

35

<400> 26

Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Glu Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Lys
 20 25 30
 Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr
 35 40

<210> 27
 <211> 44
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

10

<400> 27
Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Asp Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr
35 40

<210> 28
 <211> 44
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0)...(0)
 20 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

20

<400> 28
Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Pro Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Phe Xaa Ile Phe Lys
20 25 30
Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr
35 40

<210> 29
 <211> 44
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

30

<400> 29
Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Pro Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Asp
20 25 30
Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr
35 40

<210> 30
 <211> 44
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

5

<400> 30
Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Gln Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Glu
20 25 30
Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr
35 40

<210> 31
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

15

<400> 31
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Xaa Xaa Phe Val Asp Gly Asn Leu Xaa Arg
1 5 10 15
Xaa Cys Met Xaa Xaa Lys Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe
20 25 30
Xaa Asn Thr Xaa Arg Thr Thr Xaa Phe Trp Lys Gln Tyr
35 40 45

<210> 32
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

25

<400> 32
Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Xaa Xaa Phe Val Glu Gly Asn Leu Xaa Arg
1 5 10 15
Xaa Cys Met Xaa Xaa Lys Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe
20 25 30
Xaa Asn Thr Xaa Arg Thr Thr Xaa Phe Trp Lys Gln Tyr
35 40 45

<210> 33
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

35

<400> 33

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Xaa Xaa Phe Val Gln Gly Asn Leu Xaa Arg
 1 5 10 15
 Xaa Cys Met Xaa Xaa Lys Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Phe Xaa Val Phe
 20 25 30
 Xaa Asn Thr Xaa Arg Thr Thr Xaa Phe Trp Lys Gln Tyr
 35 40 45

<210> 34

<211> 45

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (0)...(0)

10 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

<400> 34

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Xaa Xaa Phe Val Gln Gly Asn Leu Xaa Arg
 1 5 10 15
 Xaa Cys Met Xaa Xaa Lys Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe
 20 25 30
 Xaa Asp Thr Xaa Arg Thr Thr Xaa Phe Trp Lys Gln Tyr
 35 40 45

<210> 35

<211> 44

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (0)... (0)

20 <223> Xaa=ácido gamma carboxiglutámico o ácido glutámico

<400> 35

Ala Asn Ser Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Glu Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Cys Ile Xaa Xaa Ile Cys Asp Phe Xaa Xaa Ala Lys Xaa Ile Phe Glu
 20 25 30
 Asp Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His
 35 40

25

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido del Factor VII o Factor VIIa que comprende un dominio de GLA modificado que mejora la afinidad de unión a membranas de dicho polipéptido con relación a un polipéptido del Factor VII o Factor VIIa natural correspondiente, comprendiendo dicho dominio de GLA modificado un residuo de glutamina en la posición 11 y un residuo de ácido glutámico en la posición 33, en donde dichos residuos están numerados de acuerdo con el Factor IX.
5
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido es el Factor VIIa.
3. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido del Factor VII o Factor VIIa, en donde dicho polipéptido comprende un dominio de GLA modificado que mejora la afinidad de unión a membranas de dicho polipéptido con relación a un polipéptido del Factor VII o Factor VIIa natural correspondiente, comprendiendo dicho dominio de GLA modificado un residuo de glutamina en la posición 11 y un residuo de ácido glutámico en la posición 33, en donde dichos residuos están numerados según el Factor IX.
10
4. Una célula hospedante de mamífero que comprende un vector de ácido nucleico, codificando dicho vector un polipéptido del Factor VII o Factor VIIa, comprendiendo dicho polipéptido un dominio de GLA modificado que mejora la afinidad de unión a membranas de dicho polipéptido con relación a un polipéptido del Factor VII o Factor VIIa natural correspondiente, comprendiendo dicho dominio de GLA modificado un residuo de glutamina en la posición 11 y un residuo de ácido glutámico en la posición 33, en donde dichos residuos están numerados de acuerdo con el Factor IX.
15
5. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad de un polipéptido del Factor VII o Factor VIIa eficaz para aumentar la formación de coágulos en un mamífero, en donde dicho polipéptido es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
20
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde dicho polipéptido es el Factor VIIa.
7. Uso de un polipéptido del Factor VII o Factor VIIa como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno de la coagulación, aumentando la formación de coágulos.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el trastorno de la coagulación es la hemofilia A, la hemofilia B o una enfermedad hepática.
25
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde dicho polipéptido es el Factor VIIa.
10. Un polipéptido del Factor VII o Factor VIIa como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para uso en un método para el tratamiento de un trastorno de la coagulación aumentando la formación de coágulos en un mamífero.
30
11. El polipéptido para uso en el método para el tratamiento de un trastorno de la coagulación de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho polipéptido es el Factor VIIa.

Fig. 1A

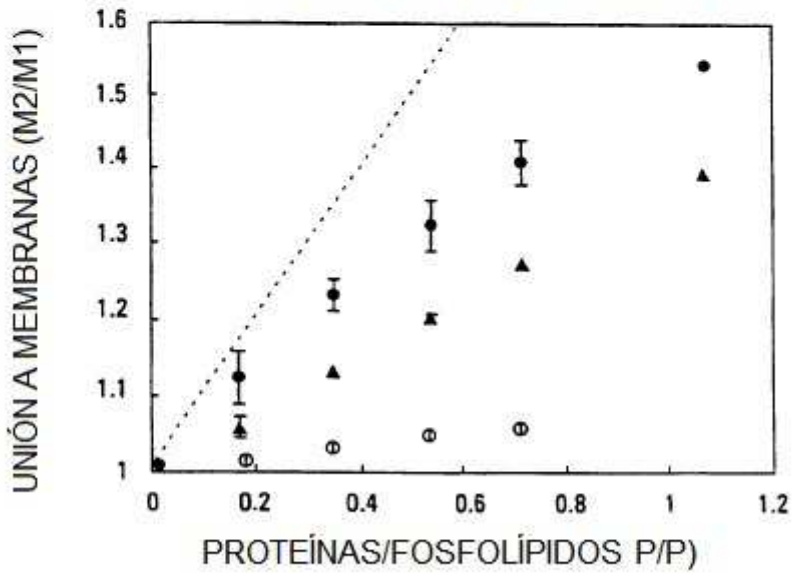
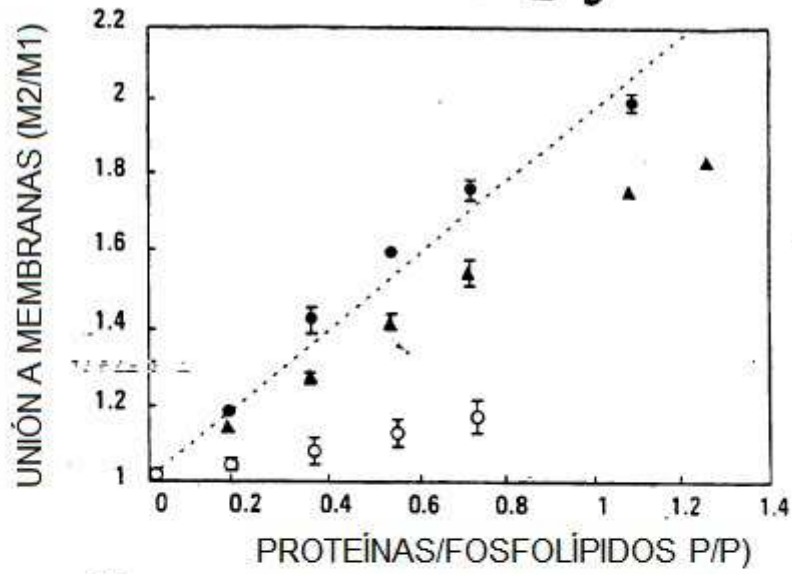


Fig. 1B

Fig. 2

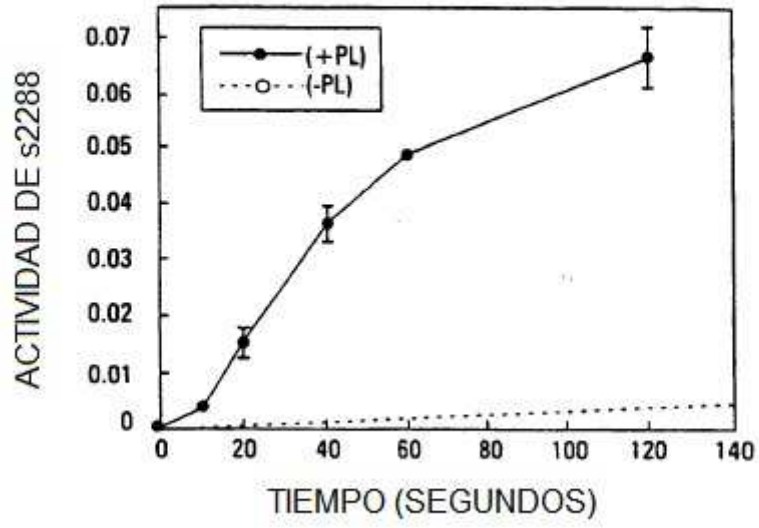


Fig. 3

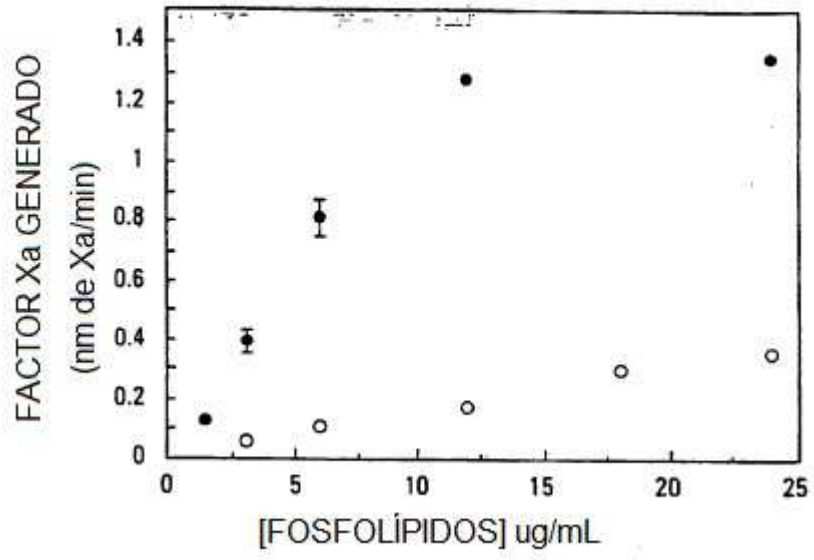


Fig. 4

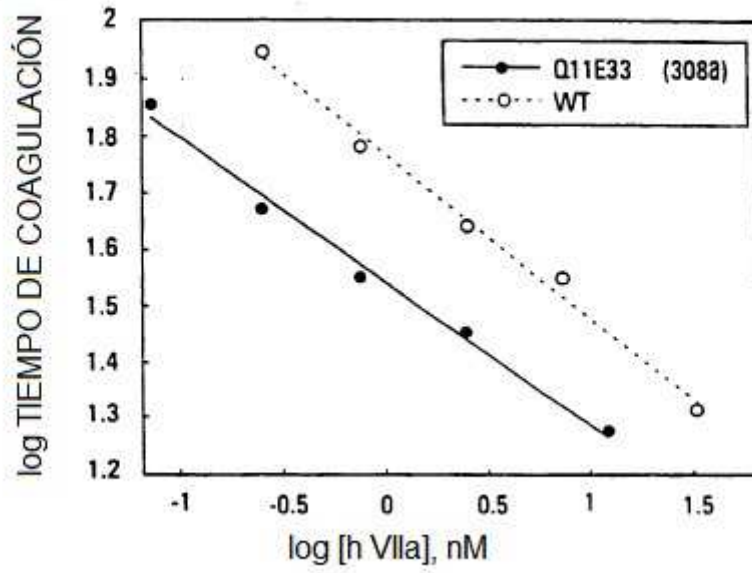


Fig. 5

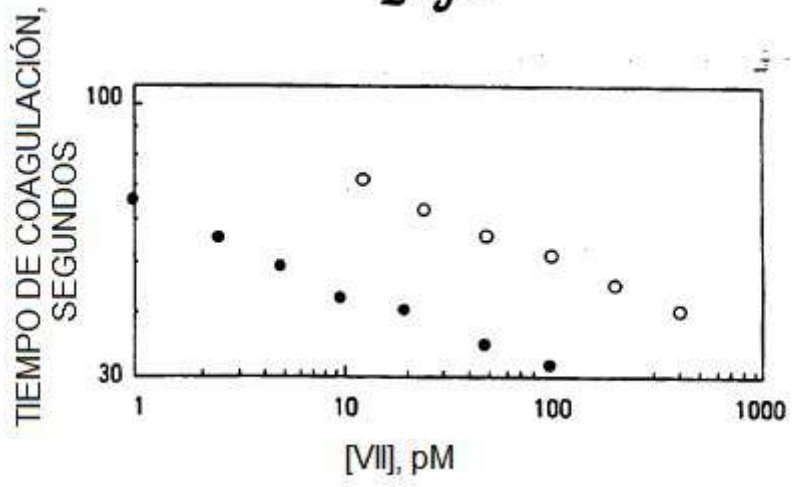


Fig. 6

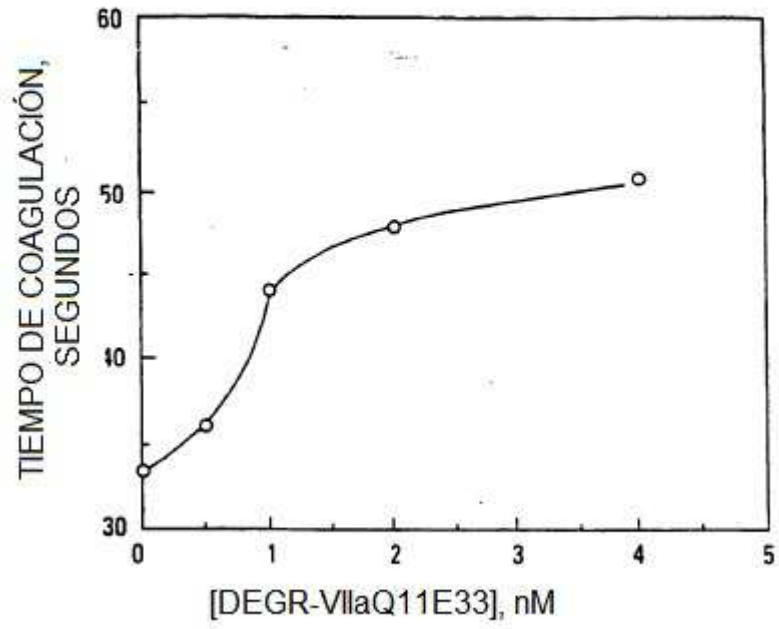


Fig. 7

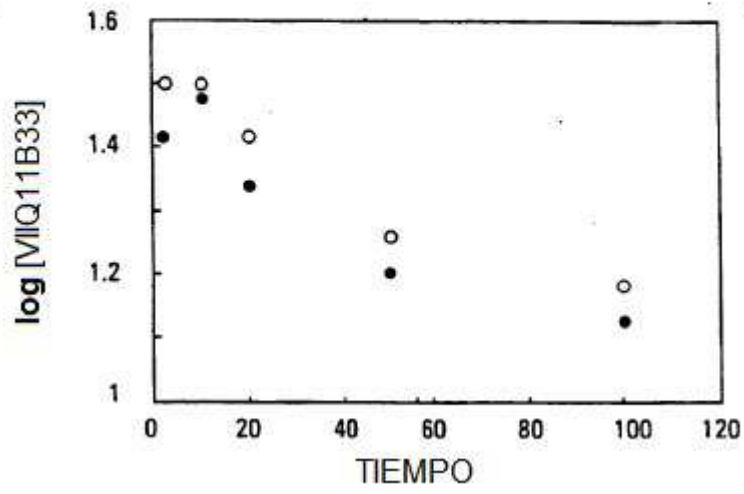


Fig. 8 A

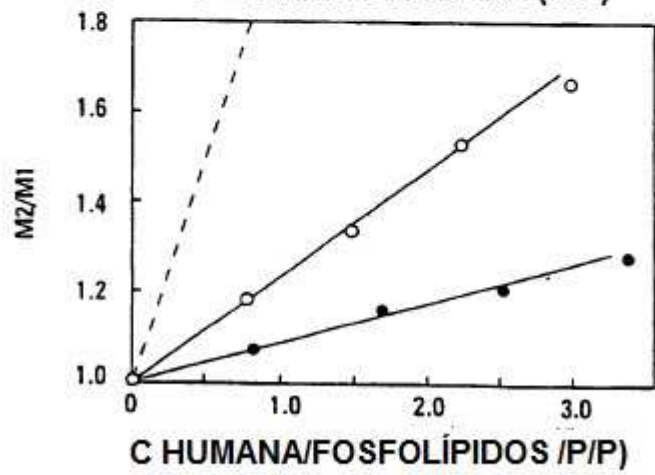
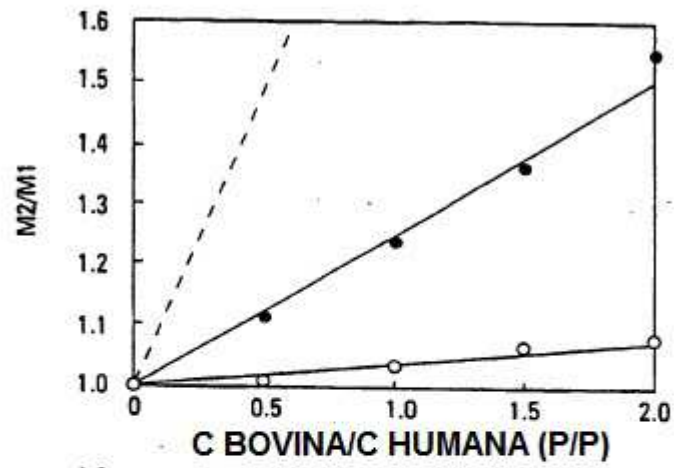


Fig. 8 B

Fig. 9 A

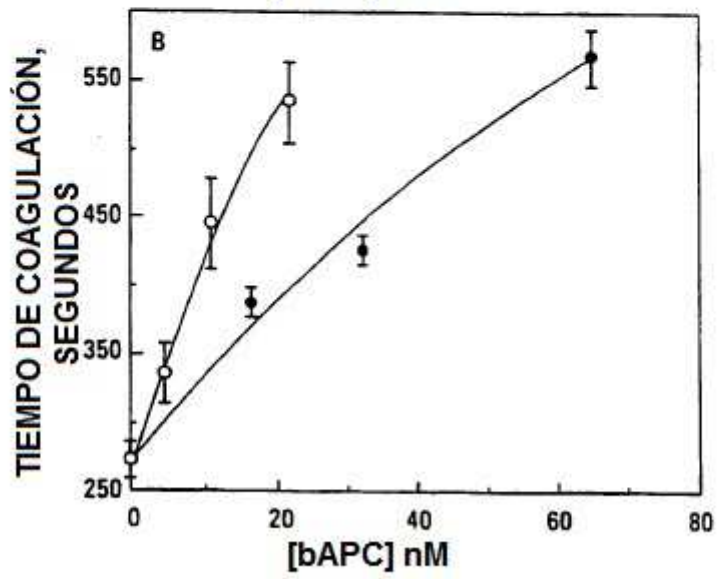
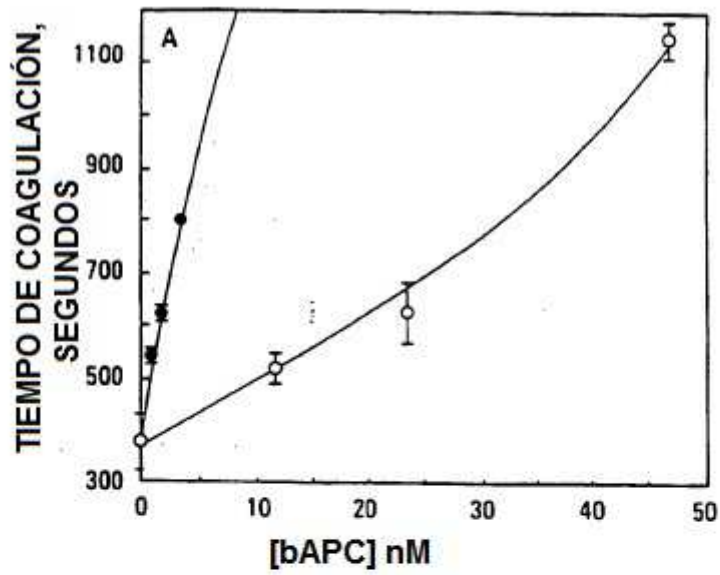


Fig. 9 B

Fig. 10 A

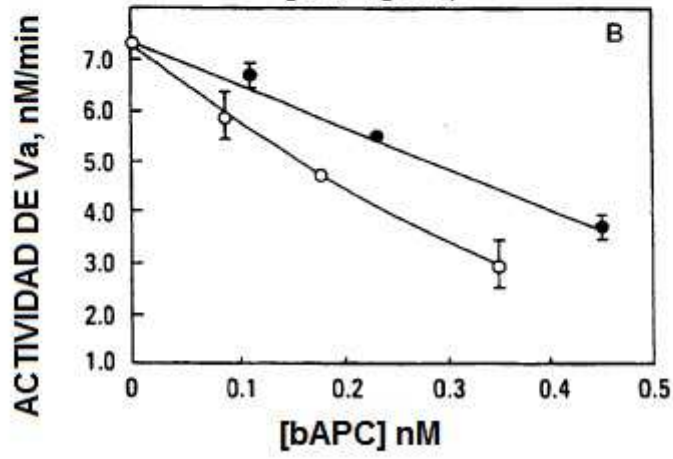
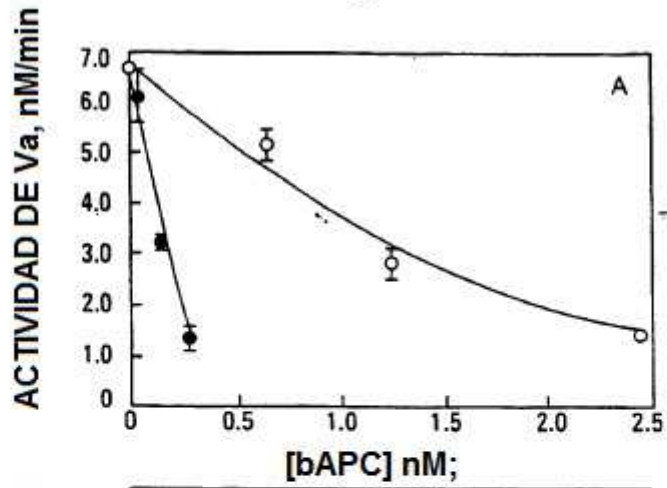
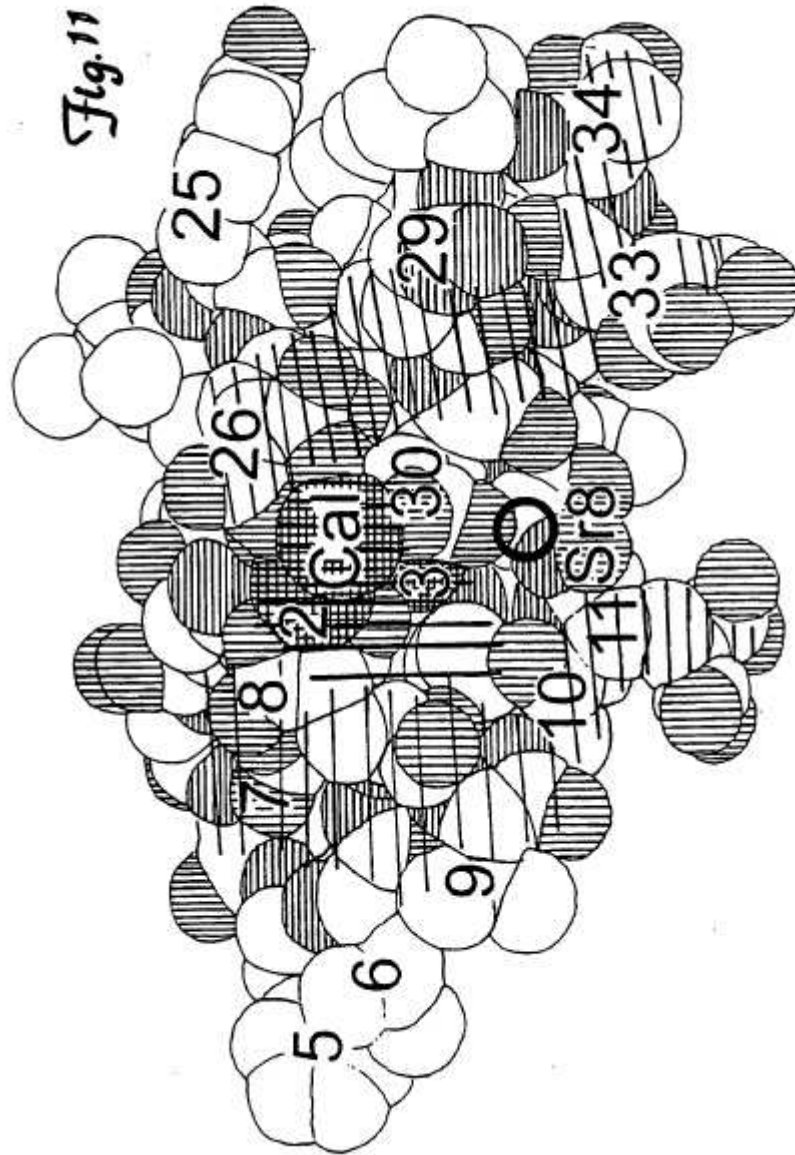


Fig. 10 B



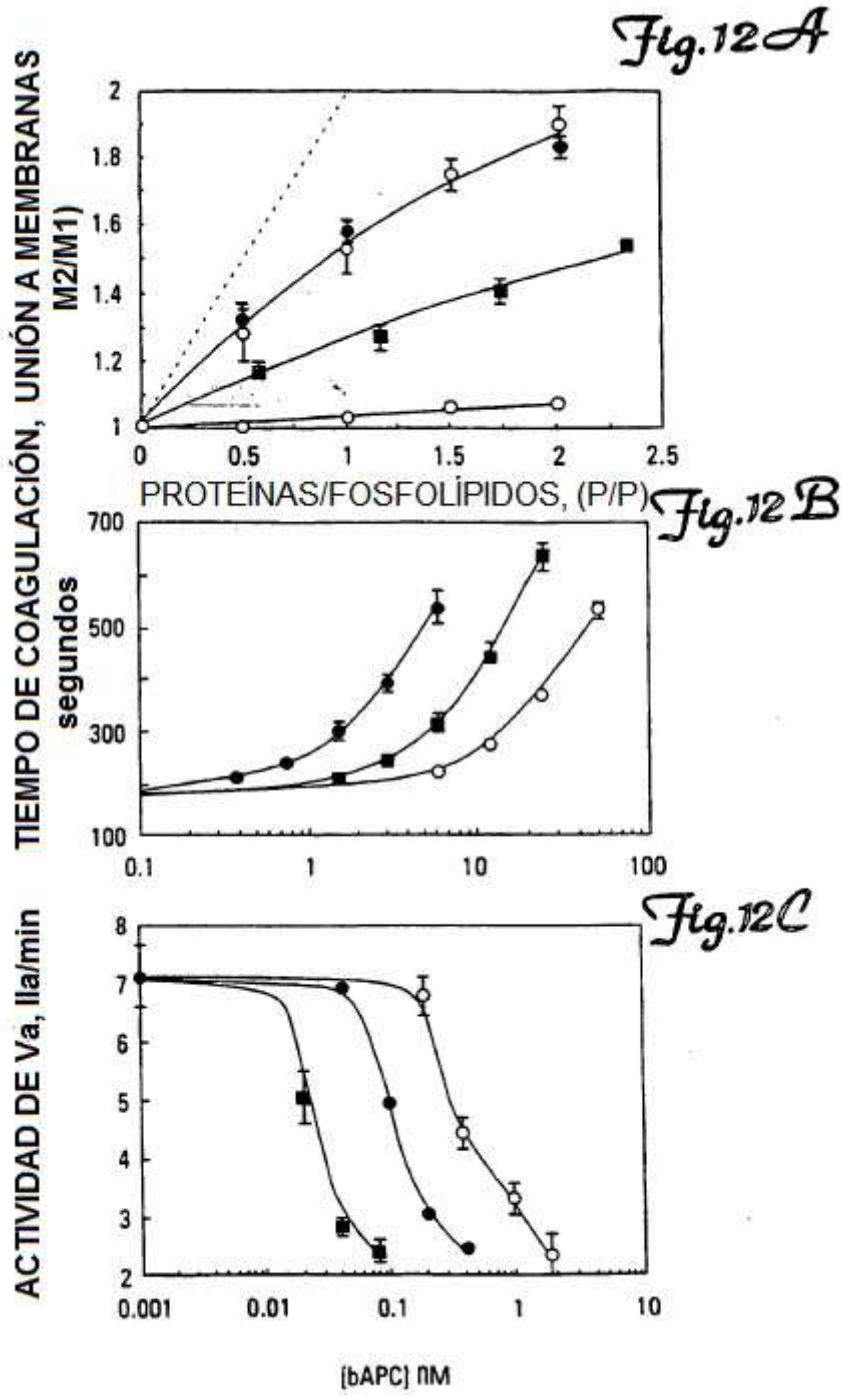
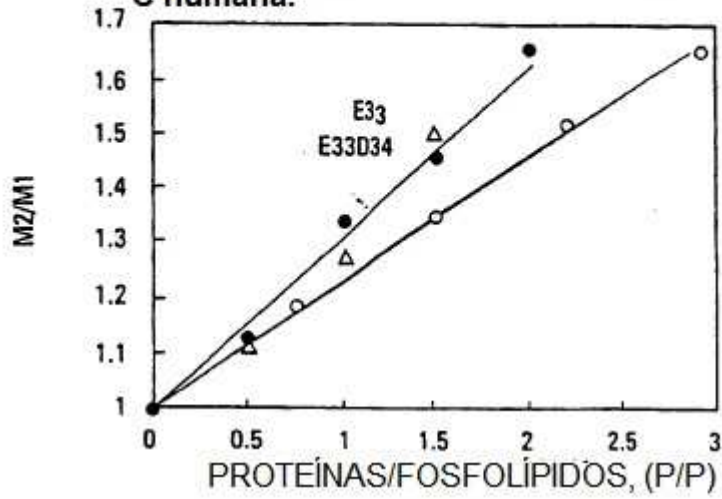


Fig.13 A

Comparación de unión a membranas de mutantes de proteína C humana - proteína C humana.



TIEMPOS DE COAGULACIÓN - APC HUMANA

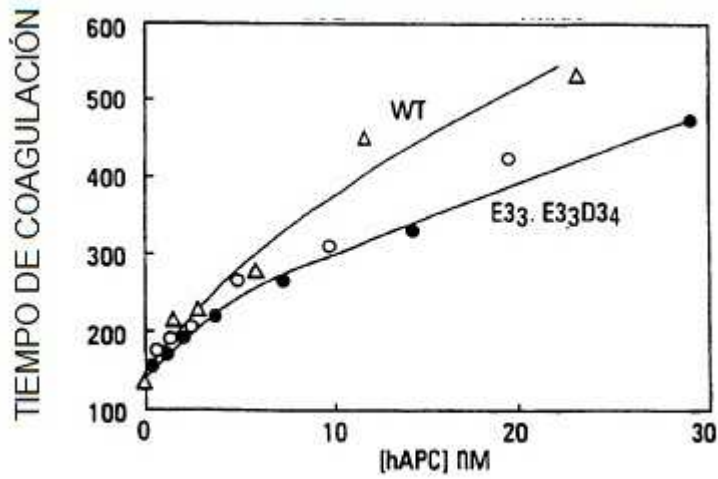
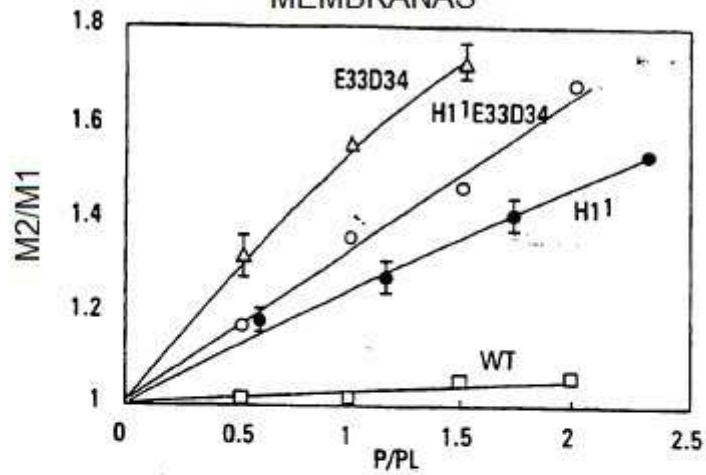


Fig.13 B

Fig. 14 A

COMPARACIÓN DE MUTANTE TRIPLE
DE PROTEÍNA C BOVINA - UNIÓN A
MEMBRANAS



INHIBICIÓN DE LA COAGULACIÓN

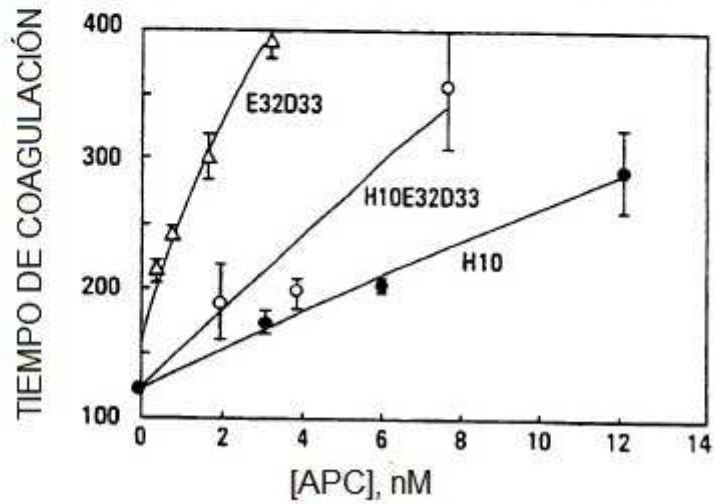


Fig. 14 B

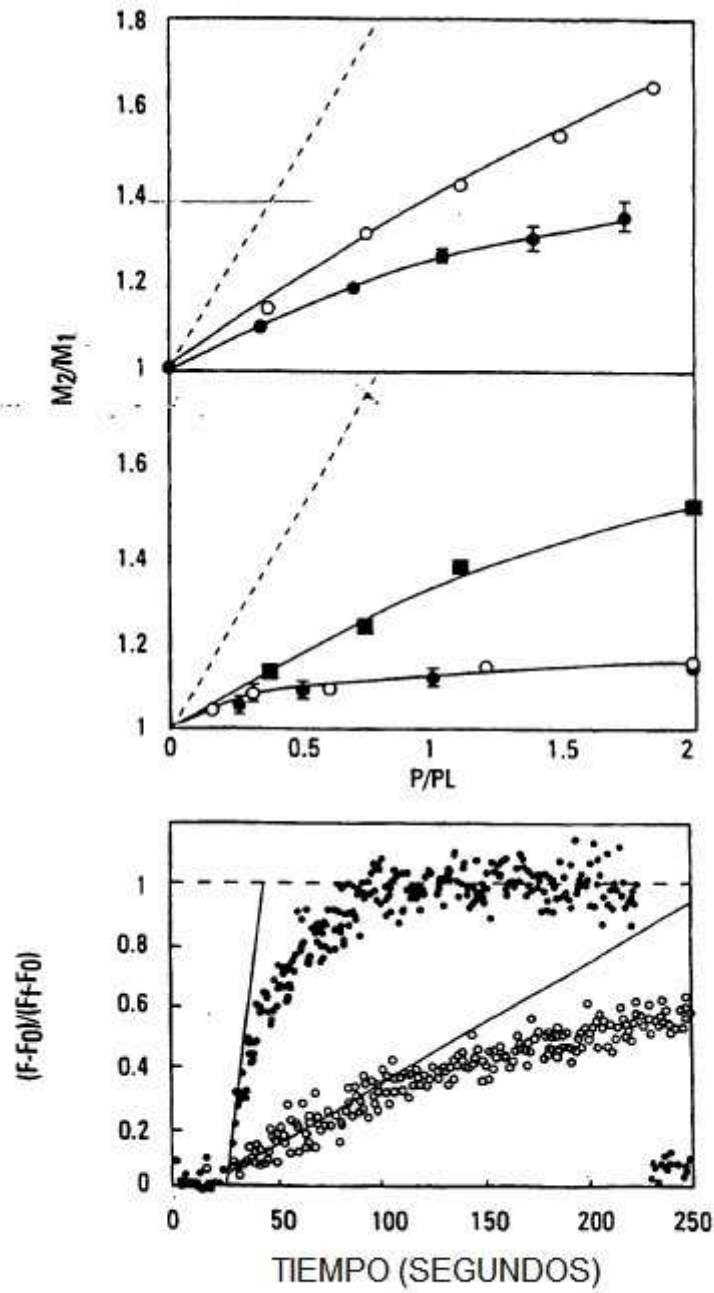


Fig. 15