

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 504 517**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/76 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2007 E 07703248 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 1984503**

54 Título: **Factor de coagulación VIIa modificado con semivida prolongada**

30 Prioridad:

06.02.2006 EP 06002359

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

08.10.2014

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**WEIMER, THOMAS;
SCHULTE, STEFAN;
KRONTHALER, ULRICH;
LANG, WIEGAND;
LIEBING, UWE y
WORMSBÄCHER, WILFRIED**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 504 517 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

Factor de coagulación VIIa modificado con semivida prolongada

Campo de la invención:

5 La presente invención se refiere al campo de polipéptidos de Factor VII (FVII) y Factor VIIa (FVIIa) enlazados con albúmina. Más específicamente, la invención se refiere a secuencias de ADNc que codifican el Factor VII y el Factor VIIa humanos y derivados, fusionados genéticamente con un ADNc que codifica seroalbúmina humana, en donde al menos uno de tales polipéptidos de Factor VII o Factor VIIa está localizado en el extremo N-terminal de la proteína de fusión y en donde un enlazador peptídico separa el resto del Factor VII o del Factor VIIa en el extremo N-terminal de la proteína de fusión del resto de albúmina, comprendiendo dicho enlazador al menos 25 aminoácidos y unidades de repetición que comprenden glicina y serina, y a procedimientos para la preparación de tales proteínas recombinantes y sus derivados. La invención también incluye un vector de transferencia para uso en terapia génica humana que comprende tales secuencias de ADN modificadas.

Antecedentes de la invención:**Factor VII y Factor VIIa**

15 La hemofilia A es un trastorno hemorrágico hereditario. Es el resultado de una carencia del Factor VIII de la coagulación sanguínea, ligada al cromosoma X y afecta casi exclusivamente a varones con una incidencia de entre uno y dos individuos por cada 10.000. El defecto del cromosoma X es transmitido por mujeres portadoras no siendo ellas mismas hemofílicas. La manifestación clínica de la hemofilia A es un aumento de la tendencia a la hemorragia. Antes de la introducción del tratamiento con concentrados de Factor VIII, la esperanza media de vida de una persona con hemofilia grave era menos de 20 años. El uso de concentrados de Factor VIII procedentes del plasma y posteriormente de formas recombinantes del Factor VIII, ha mejorado considerablemente la situación de los pacientes con hemofilia, incrementando en gran medida la esperanza media de vida, proporcionando a la mayoría de ellos la posibilidad de tener una vida más o menos normal. La hemofilia B que es 5 veces menos prevalente que la hemofilia A está causada por un Factor IX no funcional o ausente y se trata con concentrados de Factor IX procedentes del plasma o una forma recombinante de Factor IX. Tanto en la hemofilia A como en la hemofilia B, el problema médico más grave en el tratamiento de la enfermedad es la generación de aloanticuerpos contra los factores de sustitución. Hasta un 30% de todos los pacientes con hemofilia A desarrollan anticuerpos contra el Factor VIII. Los anticuerpos contra el Factor IX se producen en menor medida pero con consecuencias más graves, ya que son menos susceptibles a una terapia de inducción de tolerancia inmune.

30 El modelo actual de coagulación establece que el agente fisiológico desencadenante de la coagulación es la formación de un complejo entre el Factor tisular (FT) y el Factor VIIa (FVIIa) en la superficie de células que expresan FT, que se encuentran normalmente fuera del sistema vascular. Esto conduce a la activación del Factor IX y el Factor X que generan a la larga cierta cantidad de trombina. En un bucle de retroalimentación positiva, la trombina activa el Factor VIII y el Factor IX, la denominada vía "intrínseca" de la cascada de coagulación de la sangre, amplificando de este modo la generación de Factor Xa, que es necesario para la generación de una ráfaga de trombina completa para lograr la hemostasia completa. Se mostró que mediante la administración de concentraciones supra fisiológicas de Factor VIIa, se consigue una hemostasia evitando la necesidad de Factor VIIIa y Factor IXa. La clonación del ADNc del Factor VII (documento US 4.784.950) hizo posible el desarrollo de Factor VII activado como agente farmacéutico. El Factor VIIa se administró con éxito por primera vez en 1988. Desde entonces el número de indicaciones de Factor VIIa ha crecido de manera constante mostrando que tiene potencial para convertirse en un agente hemostático universal para detener el sangrado (Erhardtsen, 2002). Sin embargo, la corta semivida del Factor VIIa de aproximadamente 2 horas, está limitando su aplicación.

45 FVII es una glicoproteína de cadena única con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, que es secretada por las células hepáticas en el torrente sanguíneo como un zimógeno inactivo de 406 aminoácidos. Contiene 10 residuos de ácido γ -carboxi-glutámico (posiciones 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 y 35) localizados en el dominio Gla N-terminal de la proteína. Los residuos Gla requieren vitamina K para su biosíntesis. Dos dominios de factor de crecimiento epidérmico seguidos por un dominio de proteasa de serina de tipo tripsina, se encuentran en posición C-terminal con respecto al dominio Gla. Otras modificaciones postraduccionales de FVII incluyen la hidroxilación (Asp 63), glicosilación de tipo N (Asn145 y Asn322) así como de tipo O (Ser52 y Ser60).

50 FVII se convierte en su forma activa Factor VIIa mediante proteólisis del enlace peptídico único en Arg152-Ile153 que conduce a la formación de dos cadenas polipeptídicas, una cadena ligera N-terminal (24 kDa) y una cadena pesada C-terminal (28 kDa), que se mantienen unidas por un puente disulfuro. En contraste con otros factores de coagulación dependientes de la vitamina K, no se ha descrito para FVII un péptido de activación, que se escinde durante la activación de estos otros factores de coagulación dependientes de la vitamina K. El sitio de escisión Arg152-Ile153 y algunos aminoácidos aguas abajo muestran homología con el sitio de escisión para la activación de otros polipéptidos dependientes de vitamina K.

Para la consecución de la conformación activa del Factor VIIa, es esencial la formación de un puente salino después de la escisión para activación entre Ile153 y Asp343. La escisión para activación del Factor VII se puede conseguir *in*

vitro con el Factor Xa, Factor XIIIa, Factor IXa, Factor VIIa, proteasa activadora del factor siete (FSAP) y trombina. Mollerup et al. (Biotechnol. Bioeng. (1995) 48: 501-505) informaron que también tiene lugar alguna escisión en la cadena pesada en Arg290 y/o Arg315.

5 El Factor VII está presente en el plasma en una concentración de 500 ng/ml. Un 1%, por ejemplo 5 ng/ml de Factor VII está presente como Factor VIIa. La semivida plasmática del Factor VII se encontró que era de aproximadamente 4 horas y la del Factor VIIa de aproximadamente 2 horas. Aunque la semivida del Factor VIIa de 2 horas es comparativamente larga para un factor de coagulación activado (que para otros factores de coagulación activados es más del orden de minutos, debido a una inhibición irreversible con serpinas como antitrombina III), sin embargo, esto constituye un grave inconveniente para el uso terapéutico del Factor VIIa, puesto que conlleva la necesidad de
10 múltiples inyecciones i.v. o una infusión continua para conseguir la hemostasia. Esto da lugar a un tratamiento muy costoso e incomodidad para el paciente. Hasta ahora no está disponible comercialmente ninguna preparación farmacéutica de un Factor VIIa con una semivida plasmática mejorada, ni se ha publicado ningún dato que muestre variantes de FVII/FVIIa con una semivida prolongada *in vivo*. Como el Factor VII/VIIa tiene el potencial de poder ser utilizado como un agente hemostático universal, todavía existe una gran necesidad médica de desarrollar formas del
15 Factor VIIa que tengan una semivida funcional *in vivo* más larga.

Ballance et al. (documento WO 01/79271) describe polipéptidos de fusión de múltiples proteínas terapéuticas diferentes o variantes y/o fragmentos de dichas proteínas terapéuticas que, cuando se fusionan con seroalbúmina humana o variantes y/o fragmentos de dicha albúmina, tendrán probablemente una semivida funcional incrementada *in vivo* y una vida útil prolongada. Se describen largas listas de potenciales parejas de fusión sin mostrar con datos
20 experimentales para casi la totalidad de estas proteínas que los respectivos polipéptidos fusionados con albúmina, realmente conservan la actividad biológica de la pareja de fusión proteica terapéutica y tienen propiedades mejoradas. Según el documento WO 01/79271, además, cada miembro de la lista de proteínas terapéuticas se puede fusionar con orientaciones muy diferentes con la albúmina, por ejemplo, dos moléculas de la proteína terapéutica fusionada una con el extremo N-terminal y la otra con el extremo C-terminal de la albúmina, o una molécula de la proteína terapéutica fusionada con el extremo N-terminal o C-terminal de la albúmina, o también múltiples regiones de cada proteína fusionadas con múltiples regiones de la otra. Entre las múltiples proteínas terapéuticas enumeradas en el documento WO 01/79271 como potenciales parejas fusionadas con albúmina, están el Factor IX y FVII/FVIIa aunque no se proporcionan evidencias experimentales de principio para ninguna de ambas proteínas. Balance et al. tampoco describen ni hacen alusión al uso de un enlazador que comprende al menos 25 aminoácidos de longitud y
30 unidades de repetición que comprenden glicina y serina.

Sheffield expresó un polipéptido fusionado de albúmina y Factor IX (un factor de protrombina que consistía en 415 aminoácidos) y mostró en experimentos farmacocinéticos que el comportamiento de aclaramiento del polipéptido fusionado de albúmina y Factor IX en conejos se parecía más al del Factor IX que al de la albúmina, mostrando solo un ligero aumento de la semivida terminal (menos de dos veces) (Sheffield WP et al. (2004) Br. J. Haematol. 126:565-573).
35

En vista de los resultados de Sheffield y debido a la alta homología entre los Factores IX y VII (ambos son factores de protrombina dependientes de vitamina K) y su tamaño comparable, un experto en la técnica asumiría que tampoco el Factor VII se beneficiaría de una fusión con albúmina en términos de semivida funcional *in vivo*.

40 El problema técnico subyacente de la presente invención era por tanto desarrollar proteínas de fusión funcionales FVIIa-albúmina, que conservaran la actividad biológica y mostraran un aumento de la semivida funcional *in vivo*.

En este sentido, la actividad biológica de un polipéptido de Factor VII/VIIa se refiere a su capacidad para activar los Factores de coagulación IX y X en presencia de factor tisular después de que el mismo haya sido activado.

La semivida plasmática funcional *in vivo* se refiere a la semivida de la actividad biológica del polipéptido de fusión Factor VII/VIIa una vez que se inyecta en el plasma. El plasma es preferiblemente plasma humano.

45 Encontramos que los polipéptidos enlazados con albúmina que comprenden al menos un polipéptido de Factor VII o de Factor VIIa o un fragmento o una variante de los mismos, fusionado con albúmina, o un fragmento o una variante de la misma, en donde al menos una molécula de Factor VII o de Factor VIIa se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína de fusión, están dando lugar a polipéptidos de fusión con un resto de Factor VII/Factor VIIa biológicamente activo.

50 Un aspecto de la invención es, por lo tanto, proteínas de fusión biológicamente activas en las que polipéptidos del Factor VII/VIIa están fusionados con el extremo N-terminal de seroalbúmina humana en donde un enlazador peptídico separa el resto del Factor VII o del Factor VIIa en el extremo N-terminal de la proteína de fusión, del resto de la albúmina, comprendiendo dicho enlazador al menos 25 aminoácidos y unidades de repetición que comprenden glicina y serina. Las proteínas de fusión muestran al menos 25%, preferiblemente más de 40%, incluso más preferiblemente más de 70% y lo más preferiblemente más de 90% de la actividad específica y molar del Factor VII/VIIa de tipo silvestre.
55

Además, sorprendentemente se ha encontrado que en contraste con fusiones del Factor IX con el extremo N-terminal de seroalbúmina humana, según lo publicado por Sheffield, las fusiones de albúmina y Factor VII/VIIa con el

extremo N-terminal de la seroalbúmina humana, condujeron a proteínas de fusión de Factor VII/FVIIa, que no solo conservaban la actividad biológica de Factor VII/FVIIa, sino que también presentaban una prolongación significativa de la semivida plasmática funcional del Factor VII/FVIIa *in vivo*.

5 La expresión de estructuras artificiales fusionadas con albúmina con un resto deseado de FVII/FVIIa en el extremo C-terminal de la albúmina, no dio resultado porque las proteínas fusionadas con albúmina expresadas no se secretaban como moléculas intactas. Después de la transición a través de la membrana celular, se observó una escisión en una molécula madura de FVII/FVIIa, la cual debido a una gama-carboxilación defectuosa, tenía una actividad específica y molar reducida, y un resto de albúmina con el polipéptido FVII fijado a su extremo C-terminal. Por tanto, se observó que, en contraste con la descripción de Ballance et al., solo una fusión del resto FVII/FVIIa con el extremo
10 N-terminal de la seroalbúmina humana da como resultado una proteína de fusión con las propiedades biológicas deseadas, respectivamente la conservación de la actividad biológica de FVII/FVIIa y una semivida plasmática incrementada.

Un aspecto adicional de la invención es por lo tanto proteínas de fusión biológicamente activas en las que los polipéptidos del Factor VII/VIIa están fusionados con el extremo N-terminal de la albúmina, lo que muestra una prolongación significativa de la semivida plasmática funcional, en comparación con el Factor VII/VIIa no fusionado. En realizaciones preferidas, los polipéptidos de fusión FVII/FVIIa y albúmina de la invención que comprenden un polipéptido de FVII/FVIIa, tienen una semivida funcional *in vivo* prolongada o de mayor duración o un aumento de la actividad terapéutica, en comparación con la semivida *in vivo* o la actividad terapéutica de FVII/FVIIa no fusionado.
15

Un aspecto de la invención es por lo tanto FVII/FVIIa fusionados con el extremo N-terminal de la albúmina lo que prolonga la semivida plasmática en comparación con FVII/FVIIa no fusionados, en al menos un 100%, preferentemente más de 200%, incluso más preferiblemente más de 500%, más preferiblemente más de 1000%.
20

En un aspecto adicional sorprendente de la presente invención, encontramos que polipéptidos de fusión FVII/FVIIa y albúmina sin un enlazador, mostraban una actividad biológica significativamente reducida, mientras que polipéptidos de fusión FVII/FVIIa y albúmina en el que los restos de FVII/FVIIa están separados de la albúmina por un enlazador, muestran un aumento de la actividad biológica de FVII/FVIIa que depende de la longitud del enlazador. La porción peptídica del Factor VII o Factor VIIa se acopla con la porción de albúmina a través de un enlazador peptídico, permitiendo de este modo que la molécula de fusión adopte una conformación que permite una actividad específica y molar más alta en comparación con una molécula de fusión sin tal secuencia enlazadora.
25

Por lo tanto un aspecto adicional de la invención son polipéptidos de fusión Factor VII/VIIa y albúmina que comprenden un péptido enlazador entre el resto de Factor VII/VIIa y el extremo N-terminal de la albúmina, los cuales tienen una actividad biológica incrementada de Factor VII/VIIa, por ejemplo, medida como actividad específica y molar, en comparación con proteínas de fusión Factor VII/VIIa sin tales enlazadores, comprendiendo dicho enlazador al menos 25 aminoácidos y unidades de repetición que comprenden glicina y serina. El aumento de la actividad específica y molar de las proteínas de fusión en las que el resto del Factor VII/VIIa está fusionado con el extremo N-terminal de la albúmina a través de un enlazador peptídico, en comparación con proteínas de fusión correspondientes sin un enlazador de este tipo, es de al menos 25%, preferiblemente al menos 50% y más preferiblemente al menos el 100%. Estos polipéptidos de fusión Factor VII/VIIa y albúmina que son portadores de enlazador también presentan una semivida funcional incrementada *in vivo*, en comparación con FVIIa de tipo silvestre. Sin embargo, enlazadores químicos o sistemas de enlazador tales como, sin limitación, avidina-biotina funcionarán de forma similar, siempre y cuando se introduzcan distancias comparables entre el resto del Factor VII/FVIIa y el resto de albúmina. A continuación, la expresión "péptido enlazador" o similares incluirán otros medios enlazadores funcionales de este tipo, en caso adecuado.
30
35
40

La invención incluye polipéptidos terapéuticos de Factor VII/VIIa enlazados con el extremo N-terminal de la albúmina y en los que la proteína de fusión tiene una actividad biológica de Factor VII/VIIa y en los que un enlazador peptídico separa el resto del Factor VII o Factor VIIa en el extremo N-terminal de la proteína de fusión del resto de la albúmina, comprendiendo dicho enlazador al menos 25 aminoácidos y unidades de repetición que comprenden glicina y serina, composiciones, composiciones farmacéuticas, formulaciones y kits. La invención también incluye el uso de dichos polipéptidos terapéuticos enlazados con albúmina en ciertas indicaciones médicas. La invención también incluye moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos enlazados con albúmina de la invención, así como vectores que contienen estos ácidos nucleicos, células hospedadoras transformadas con estos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para preparar los polipéptidos enlazados con albúmina de la invención empleando estos ácidos nucleicos, vectores y/o las células hospedadoras.
45
50

Otro objeto de la invención es proporcionar un método para tratar pacientes con trastornos de la coagulación. El método comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz del polipéptido de FVII/FVIIa enlazado con albúmina fusionado con albúmina, en donde al menos uno de tales polipéptidos del Factor VII o Factor VIIa está localizado en el extremo N-terminal de la proteína de fusión y en donde la proteína de fusión tiene actividad biológica de Factor VII/VIIa y en donde un enlazador peptídico separa el resto del Factor VII o Factor VIIa en el extremo N-terminal de la proteína de fusión del resto de la albúmina, comprendiendo dicho enlazador al menos 25 aminoácidos y unidades de repetición que comprenden glicina y serina.
55

Otro objeto de la invención es proporcionar una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de poli-nucleótidos que codifica un polipéptido de Factor VII/VIIa enlazado con albúmina que comprende un péptido de Factor VII o Factor VIIa en donde al menos uno de tales polipéptidos del Factor VII o Factor VIIa está localizado en el extremo N-terminal de la proteína de fusión y en donde la proteína de fusión tiene una actividad biológica de Factor VII/VIIa y en donde un enlazador peptídico separa el resto del Factor VII o Factor VIIa en el extremo N-terminal de la proteína de fusión, del resto de albúmina, comprendiendo dicho enlazador al menos 25 aminoácidos y unidades de repetición que comprenden glicina y serina, así como un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de este tipo. Dicha secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión se encuentra en el extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico que codifica un propéptido que media en la carboxilación gamma de la parte fusionada del Factor VII/VIIa.

La invención también proporciona un método para la preparación de un polipéptido de Factor VII/FVIIa enlazado con albúmina que comprende un Factor VII o Factor VIIa y albúmina, en donde al menos uno de tales polipéptidos de Factor VII o Factor VIIa está localizado en el extremo N-terminal de la proteína de fusión y en donde la proteína de fusión tiene actividad biológica de Factor VII/VIIa y en donde un enlazador peptídico separa el resto del Factor VII o Factor VIIa en el extremo N-terminal de la proteína de fusión, del resto de albúmina, comprendiendo dicho enlazador al menos 25 aminoácidos y unidades de repetición que comprenden glicina y serina, en donde el método comprende:

- (a) proporcionar un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de Factor VII/VIIa enlazado con albúmina que se puede expresar en una célula de mamífero;
- (b) expresar el ácido nucleico en el organismo para formar un polipéptido de Factor VII/VIIa enlazado con albúmina; y
- (c) purificar el polipéptido de Factor VII/VIIa enlazado con albúmina.

En un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos fusionados con albúmina y a métodos para tratar, prevenir o mejorar enfermedades o trastornos. Tal y como se usa en este documento, "polipéptido de fusión Factor VII/VIIa y albúmina" se refiere a un polipéptido formado por la fusión de al menos una molécula de Factor VII/VIIa con el extremo N-terminal de al menos una molécula de albúmina, estando separados ambos restos a través de un enlazador peptídico, comprendiendo dicho enlazador al menos 25 aminoácidos y unidades de repetición que comprenden glicina y serina.

Según el documento WO 01/79271 un polipéptido fusionado con albúmina que comprende FVII/FVIIa se puede utilizar como un agente terapéutico en las indicaciones de "trastornos de sangrado", "hemofilia A y B", "trastornos hepáticos" y "episodios hemorrágicos relacionados con cirugía".

Otro aspecto de la invención es que un polipéptido fusionado con albúmina que comprende FVII/FVIIa se puede emplear también terapéuticamente en otras indicaciones. Las indicaciones más preferidas son "episodios hemorrágicos y cirugía en pacientes con hemofilia heredada o adquirida con inhibidores de Factores de la coagulación (FVIII o FIX)", "reversión de déficits de la hemostasia desarrollados como consecuencia de tratamientos con fármacos tales como fármacos antiplaquetarios o fármacos anticoagulantes", "mejora de la hemostasia secundaria", "déficits de la hemostasia desarrollados durante infecciones o durante enfermedades tales como la carencia de vitamina K o enfermedad hepática grave", "resección hepática", "déficits de la hemostasia desarrollados como consecuencia de mordeduras de serpientes", "hemorragias gastrointestinales", "trauma", "consecuencias de una transfusión masiva (coagulopatía dilucional)", "carencias de factores de coagulación distintos de FVIII y FIX", "VWD", "carencia de FI", "carencia de FV", "carencia de FVII", "carencia de FX", "carencia de FXIII", "SUH", "enfermedades plaquetarias heredadas o adquiridas y trastornos como trombocitopenia, ITP, TTP, síndrome de HELLP, síndrome de Bernard-Soulier, trombostenia de Glanzmann, "HIT", "síndrome de Chediak-Higashi", "síndrome de Hermansky-Pudlak", "síndrome de Rendu-Osler", "púrpura de Henoch-Schonlein" y "curación de heridas".

Descripción detallada de la invención:

Es un objeto de la presente invención proporcionar Factor VII humano y Factor VIIa humano fusionados con el extremo N-terminal de albúmina humana, en donde la proteína de fusión tiene actividad biológica de Factor VII/VIIa y en donde un enlazador peptídico separa el resto del Factor VII o Factor VIIa, en el extremo N-terminal de la proteína de fusión, del resto de la albúmina, comprendiendo dicho enlazador al menos 25 aminoácidos y unidades de repetición que comprenden glicina y serina con una semivida funcional *in vivo* prolongada, en comparación con el Factor VII humano y el Factor VIIa humano. Otro objeto de la invención es proporcionar Factor VII humano y Factor VIIa humano fusionados con el extremo N-terminal de albúmina humana, en donde la proteína de fusión tiene actividad biológica de Factor VII/VIIa y en donde un enlazador peptídico separa el resto del Factor VII o Factor VIIa en el extremo N-terminal de la proteína de fusión, del resto de la albúmina, comprendiendo dicho enlazador al menos 25 aminoácidos y unidades de repetición que comprenden glicina y serina con actividad específica y molar incrementada.

Las expresiones, seroalbúmina humana (SAH) y albúmina humana (AH) se utilizan indistintamente en este documento. Los términos "albúmina" y "seroalbúmina" son más amplios, e incluyen seroalbúmina humana (y fragmentos

y variantes de la misma), así como albúmina de otras especies (y fragmentos y variantes de las mismas). En lugar de la albúmina también se pueden utilizar otras proteínas similares a la albúmina, tales como, sin limitación, alfa-fetoproteína humana (como se describe en el documento WO 2005/024044), así como sus fragmentos funcionales o variantes.

5 Tal como se usa en el presente documento, "albúmina" se refiere en conjunto a un polipéptido o a una secuencia de aminoácidos de albúmina, o a un fragmento o una variante de albúmina, que tiene una o varias actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de la albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a albúmina humana o a fragmentos de la misma, especialmente la forma madura de la albúmina humana, como se muestra en SEQ ID NO: 22 en el presente documento, o a albúmina de otros vertebrados o a fragmentos de la misma, o a análogos o variantes de estas moléculas o fragmentos de las mismas.

10 La porción de albúmina de los polipéptidos enlazados con albúmina puede comprender la secuencia de longitud completa de la AH, tal y como se ha descrito anteriormente, o puede incluir uno o varios fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica. Tales fragmentos pueden tener una longitud de 10 o más aminoácidos o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos procedentes de la secuencia de AH o pueden incluir parte o la totalidad de los dominios de AH.

15 La porción de albúmina de los polipéptidos enlazados con albúmina de la invención puede ser una variante de AH normal. La porción proteica del Factor VII de los polipéptidos enlazados con albúmina de la invención también pueden ser variantes de los polipéptidos del Factor VII, tal y como se describe en el presente documento. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, ya sean conservadoras o no conservadoras, en donde tales cambios no alteran sustancialmente el sitio activo o el dominio activo que proporciona las actividades terapéuticas de los polipéptidos del Factor VII.

20 En particular, los polipéptidos enlazados con albúmina de la invención pueden incluir variantes polimórficas de origen natural de albúmina humana y fragmentos de albúmina humana. La albúmina se puede obtener a partir de cualquier vertebrado, especialmente de cualquier mamífero, por ejemplo, ser humano, vaca, oveja o cerdo. Las albúminas de animales no mamíferos incluyen, pero sin limitación, gallina y salmón. La porción de albúmina del polipéptido enlazado con albúmina puede ser de un animal diferente que la porción de FVII/FVIIa.

25 En términos generales, un fragmento de albúmina o una variante tendrá una longitud de al menos 20, preferiblemente al menos 40, más preferiblemente más de 70 aminoácidos. La variante de albúmina puede consistir preferentemente en, o puede comprender alternativamente, al menos un dominio completo de la albúmina o fragmentos de dichos dominios, por ejemplo, los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 22), 2 (aminoácidos 195-387 de SEQ ID NO: 22), 3 (aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 22), 1 + 2 (1-387 de SEQ ID NO: 22), 2 + 3 (195-585 de SEQ ID NO: 22) o 1 + 3 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 22 + aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 22). Cada dominio se compone de dos subdominios homólogos, a saber, 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones enlazadoras flexibles entre los subdominios que comprende los residuos Lys106 a Glu119, Glu292 a Val315 y Glu492 a Ala511.

35 La porción de albúmina de un polipéptido fusionado con albúmina de la invención puede comprender al menos un subdominio o un dominio de AH o modificaciones conservadoras del mismo.

40 La invención se refiere a un polipéptido de Factor VII o Factor VIIa modificado, que comprende unir el polipéptido del Factor VII o del Factor VIIa con el extremo N-terminal de un polipéptido de albúmina, en donde la proteína de fusión tiene actividad biológica de Factor VII/VIIa y en donde un enlazador peptídico separa el resto de Factor VII o de Factor VIIa en el extremo N-terminal de la proteína de fusión, del resto de albúmina, comprendiendo dicho enlazador 25 aminoácidos y unidades de repetición que comprenden glicina y serina, de tal manera que el polipéptido modificado de Factor VII o de Factor VIIa tiene una semivida funcional incrementada *in vivo*, en comparación con el polipéptido de Factor VII o de Factor VIIa que no está enlazado con albúmina, o de modo que la actividad específica y molar de Factor VII/VIIa fusionado con albúmina con un enlazador peptídico intercalado, es superior que la actividad específica y molar de FVII/FVIIa fusionado con albúmina sin un enlazador peptídico intercalado.

45 El "Factor VII/VIIa" tal como se utiliza en esta solicitud significa un polipéptido terapéutico que consiste ya sea en la forma no activada (Factor VII) o la forma activada (Factor VIIa) o en mezclas de las mismas. "Factor VII/VIIa" bajo la definición anterior, incluye polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos del Factor VII/VIIa humano natural. También incluye polipéptidos con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal o C-terminal modificado que incluye deleciones o adiciones de aminoácidos terminales, siempre que esos polipéptidos conserven sustancialmente la actividad biológica de Factor VIIa. "Factor VII" bajo la definición anterior también incluye variaciones alélicas naturales que pueden existir y ocurrir de un individuo a otro. "Factor VII" bajo la definición anterior incluye además variantes de FVII/FVIIa. Dichas variantes difieren en uno o varios residuos de aminoácidos de la secuencia de tipo silvestre. Ejemplos de tales diferencias pueden incluir el truncamiento del extremo N-terminal y/o C-terminal mediante uno o varios residuos de aminoácido (por ejemplo, de 1 a 10 residuos de aminoácidos), o la adición de uno o varios residuos extra en el extremo N-terminal y/o C-terminal, así como sustituciones conservadoras de aminoácidos, es decir, sustituciones realizadas dentro de grupos de aminoácidos con características similares, por ejemplo (1) aminoácidos pequeños, (2) aminoácidos ácidos, (3) aminoácidos polares, (4)

aminoácidos básicos, (5) aminoácidos hidrófobos y (6) aminoácidos aromáticos. Ejemplos de tales sustituciones conservadoras se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1

(1)	Alanina	Glicina		
(2)	Ácido aspártico	Ácido glutámico		
(3a)	Asparagina	Glutamina		
(3b)	Serina	Treonina		
(4)	Arginina	Histidina	Lisina	
(5)	Isoleucina	Leucina	Metionina	Valina
(6)	Fenilalanina	Tirosina	Triptófano	

5 Las proteínas de fusión muestran al menos 25%, preferiblemente más de 40%, incluso más preferiblemente más de 70% y lo más preferiblemente más de 90% de la actividad específica y molar del Factor VII/VIIa de tipo silvestre no fusionado o del fragmento FVII/FVIIa respectivo o una variante del mismo.

10 El polipéptido FVII/VIIa de la invención unido a través de un enlazador peptídico intercalado, con el extremo N-terminal de la albúmina, tiene una actividad específica y molar incrementada en comparación con la actividad específica y molar de una fusión homóloga de Factor VII/VIIa y albúmina sin un enlazador peptídico intercalado. El aumento de la actividad específica y molar del polipéptido Factor VII/VIIa enlazado con albúmina de la invención, en comparación con la actividad específica y molar de una fusión de Factor VII/VIIa y albúmina sin un enlazador peptídico intercalado, es de al menos 25%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 100% y más preferiblemente al menos 200%. La actividad del Factor VII/VIIa es la capacidad para convertir el sustrato Factor X en Factor Xa activo. La actividad de FVIIa de un polipéptido Factor VII/VIIa enlazado con albúmina, se puede medir preferentemente utilizando STACLOT®. La actividad específica y molar, tal y como se usa en esta invención significa: Actividad tal y como se mide en un ensayo STACLOT® después de la activación de la proteína de fusión FVII enlazado con albúmina en Unidades Internacionales (UI) por 100 UI de antígeno de Factor VII/VIIa, medido con ELISA.

20 Los polipéptidos de FVII/FVIIa enlazados con albúmina de la invención tienen una actividad específica y molar al menos 25% superior en comparación con la fusión Factor VII/VIIa y albúmina sin enlazador peptídico intercalado y muestran una semivida funcional *in vivo* incrementada en comparación con la forma no ligada del polipéptido Factor VII o Factor VIIa. La semivida funcional *in vivo* se puede determinar tal y como se muestra en Lindley et al. (Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant Factor VIIa, Clin. Pharmacol Ther. (1994) 55:638-648)

25 Los polipéptidos FVII/FVIIa enlazados con albúmina de la invención tienen una actividad específica y molar al menos 25% superior en comparación con las proteínas de fusión Factor VII/VIIa y albúmina sin enlazador peptídico intercalado y su semivida funcional *in vivo* generalmente se incrementa al menos 100%, preferiblemente al menos 200%, aún más preferiblemente al menos 500%, en comparación con la forma no ligada del polipéptido de Factor VII o Factor VIIa.

30 La semivida funcional *in vivo* de la forma de tipo silvestre del Factor VII humano es de aproximadamente 4 horas. La semivida funcional de los polipéptidos de Factor VII enlazados con albúmina de la invención es por lo general de al menos aproximadamente 8 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 12 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 24 horas.

35 La semivida funcional *in vivo* de la forma de tipo silvestre del Factor VIIa humano es de aproximadamente 2 horas en los seres humanos. La semivida funcional de los polipéptidos de Factor VIIa enlazados con albúmina de la invención es por lo general de al menos aproximadamente 4 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 6 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 12 horas.

40 De acuerdo con la invención, el resto del Factor VII/VIIa se acopla con el resto de albúmina a través de un enlazador peptídico. El enlazador es preferiblemente flexible y no inmunógeno y genera una distancia entre la albúmina humana y FVII/FVIIa que minimiza la potencial interferencia entre los dos miembros de la fusión, dando como resultado una actividad FVII/FVIIa incrementada de la proteína de fusión. Enlazadores ejemplares incluyen (GGGS)_N o (GGGS)_N o (GGS)_N, en donde N es un número entero mayor que o igual que 1 y en donde G representa glicina y S representa serina. Estos aminoácidos pertenecen al grupo de los aminoácidos naturales y se escogieron como ejemplos para todos los posibles aminoácidos naturales.

45 La invención incluye además mutaciones adicionales dentro de la secuencia del polipéptido de Factor VII/VIIa, que mejoran la actividad catalítica, prolongan la semivida plasmática o modifican la interacción con el Factor Tisular. Se describen mutaciones particularmente útiles del Factor VII en Shah et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4229-4234, en las que se citan mejoras en la función de las proteínas. Otras mutaciones útiles del Factor VII/VIIa se expo-

nen en la descripción de la técnica anterior del documento de solicitud de patente Europea 04019485.4.

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión Factor VII/VIII y albúmina, tal como se describe en esta solicitud. El término "polinucleótido(s)" se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. El polinucleótido puede ser de ADN monocatenario o bicatenario, ARN monocatenario o bicatenario. Tal y como se emplea en esta memoria, el término "polinucleótido(s)" incluye también ADN's o ARN's que comprenden una o varias bases modificadas y/o bases inusuales, tales como inosina. Se apreciará que se puede realizar una variedad de modificaciones en el ADN y el ARN que sirven para muchos fines útiles, conocidos por los expertos en la técnica. El término "polinucleótido(s)", tal y como se emplea en este documento, incluye tales formas de polinucleótidos modificadas química, enzimática o metabólicamente, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo, por ejemplo, células simples y complejas. El experto entenderá que, debido a la degeneración del código genético, un polipéptido dado puede estar codificado por diferentes polinucleótidos. Estas "variantes" están incluidas en esta invención.

Preferiblemente, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido aislado. El término polinucleótido "aislado" se refiere a un polinucleótido que está sustancialmente exento de otras secuencias de ácido nucleico, tales como y sin limitación, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico. Los polinucleótidos aislados se pueden purificar a partir de una célula hospedadora. Los métodos convencionales de purificación de ácido nucleico, conocidos por los expertos en la técnica, se pueden utilizar para obtener polinucleótidos aislados. El término también incluye polinucleótidos recombinantes y polinucleótidos sintetizados químicamente.

Aún otro aspecto de la invención es un plásmido o un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el plásmido o el vector es un vector de expresión. En una realización particular, el vector es un vector de transferencia para uso en terapia génica humana.

Todavía otro aspecto de la invención es una célula hospedadora que comprende un polinucleótido de la invención o un plásmido o un vector de la invención.

Las células hospedadoras de la invención se pueden emplear en un método para producir un polipéptido de fusión FVII/VIII y albúmina, el cual forma parte de esta invención. El método comprende:

- cultivar células hospedadoras de la invención en condiciones tales que se expresa el polipéptido de fusión FVII/VIII y albúmina; y
- opcionalmente recuperar el polipéptido de fusión FVII/VIII y albúmina a partir del medio de cultivo.

Expresión de las variantes propuestas:

La producción de proteínas recombinantes a niveles elevados en células hospedadoras adecuadas requiere el ensamblaje de los ADNc modificados mencionados anteriormente, en unidades de transcripción eficaces junto con elementos reguladores adecuados en un vector de expresión recombinante, que se puede propagar en diferentes sistemas de expresión, de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los elementos reguladores eficaces de la transcripción se podrían obtener a partir de virus que tienen como hospedadores naturales células animales o a partir del ADN cromosómico de células animales. Preferiblemente, se pueden utilizar combinaciones de promotor-potenciador obtenidas a partir del Virus de Simio 40, adenovirus, virus de polioma BK, citomegalovirus humano, o la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, o combinaciones de promotor-potenciador que incluyen genes transcritos de forma constitutiva y potente en células animales, tales como beta-actina o GRP78. Con el fin de lograr niveles elevados y estables de ARNm transcrito a partir de los ADNc, la unidad de transcripción debe contener en su parte 3' proximal una región de ADN que codifica una secuencia de terminación de la transcripción-poliadenilación. Preferiblemente, esta secuencia se obtiene a partir de la región de transcripción temprana del Virus de Simio 40, del gen de beta-globina de conejo o del gen activador de plasminógeno tisular humano.

Los ADNc se integran a continuación en el genoma de una línea celular hospedadora adecuada para la expresión de los polipéptidos de fusión Factor VII/VIII enlazados con albúmina. Preferiblemente, esta línea celular debería ser una línea celular animal de origen vertebrado a fin de asegurar un plegamiento correcto, la γ -carboxilación de los residuos de ácido glutámico dentro del dominio Gla, la formación de enlaces disulfuro, la glicosilación ligada a asparagina, la glicosilación ligada a O y otras modificaciones postraduccionales, así como la secreción en el medio de cultivo. Ejemplos de otras modificaciones postraduccionales son la O-sulfatación de tirosina, la hidroxilación, el procesamiento proteolítico de la cadena de polipéptido naciente y la escisión de la región del propéptido. Ejemplos de líneas celulares que se pueden utilizar son células COS de mono, células L de ratón, células C127 de ratón, células BHK-21 de hámster, células embrionarias de riñón humano 293 y preferiblemente células CHO de hámster.

El vector de expresión recombinante que codifica los ADNc correspondientes se puede introducir en una línea celular animal de varias maneras diferentes. Por ejemplo, los vectores de expresión recombinantes se pueden crear a partir de vectores basados en virus animales diferentes. Ejemplos de éstos son vectores basados en baculovirus, virus vaccinia, adenovirus y preferentemente virus del papiloma bovino.

Las unidades de transcripción que codifican los ADNc correspondientes también se pueden introducir en células animales junto con otro gen recombinante que puede actuar como un marcador seleccionable dominante en estas células, con el fin de facilitar el aislamiento de clones de células específicas que han integrado el ADN recombinante en su genoma. Ejemplos de este tipo de genes marcadores seleccionables dominantes son fosfotransferasa de amino glicosido Tn5, que confiere resistencia a la geneticina (G418), fosfotransferasa de higromicina, que confiere resistencia a la higromicina, y acetil transferasa de puomicina, que confiere resistencia a la puomicina. El vector de expresión recombinante que codifica un marcador seleccionable de este tipo, puede estar en el mismo vector que el que codifica el ADNc de la proteína deseada, o puede estar codificado en un vector separado que se introduce y se integra simultáneamente en el genoma de la célula hospedadora, dando como resultado con frecuencia una unión física fuerte entre las diferentes unidades de transcripción.

Otros tipos de genes marcadores seleccionables, que se pueden utilizar junto con el ADNc de la proteína deseada, se basan en diversas unidades de transcripción que codifican la reductasa de dihidrofolato (dhfr). Después de la introducción de este tipo de genes en células que carecen de actividad dhfr endógena, preferentemente células CHO (DUKX-B11, DG-44) esto permitirá que éstas crezcan en medios que carecen de nucleósidos. Un ejemplo de un medio de este tipo es F12 de Ham sin hipoxantina, timidina ni glicina. Estos genes dhfr se pueden introducir junto con las unidades transcripcionales de ADNc del Factor de coagulación, en células CHO del tipo anterior, ya sea ligados en el mismo vector o en diferentes vectores, creando de este modo líneas celulares positivas para dhfr que producen la proteína recombinante.

Si las líneas celulares anteriores se cultivan en presencia del inhibidor citotóxico de dhfr, metotrexato, aparecerán nuevas líneas de células resistentes al metotrexato. Estas líneas celulares pueden producir proteína recombinante con una tasa incrementada debido al número amplificado de dhfr unida y a las unidades transcripcionales de la proteína deseada. Cuando estas líneas celulares se propagan con concentraciones crecientes de metotrexato (1-10000 nM), se pueden obtener nuevas líneas celulares que producen la proteína deseada con una tasa muy elevada.

Las líneas celulares anteriores que producen la proteína deseada se pueden cultivar a gran escala, ya sea mediante cultivo en suspensión o sobre diversos soportes sólidos. Ejemplos de estos soportes son microvehículos basados en matrices de dextrano o de colágeno, o soportes sólidos en forma de fibras huecas o diversos materiales cerámicos. Cuando se cultiva en un cultivo en suspensión celular o sobre microvehículos, el cultivo de las líneas celulares anteriores se puede realizar como un cultivo discontinuo o como un cultivo por perfusión con una producción continua de medio condicionado durante periodos de tiempo prolongados. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, las líneas celulares anteriores son muy adecuadas para el desarrollo de un procedimiento industrial para la producción de las proteínas recombinantes deseadas.

La proteína recombinante, que se acumula en el medio de células secretoras de los tipos anteriores, se puede concentrar y purificar mediante una variedad de métodos bioquímicos y cromatográficos, incluyendo métodos que utilizan diferencias de tamaño, carga, hidrofobicidad, solubilidad, afinidad específica, etc. entre la proteína deseada y otras sustancias en el medio de cultivo celular.

Un ejemplo de una purificación de este tipo es la adsorción de la proteína recombinante a un anticuerpo monoclonal que está inmovilizado sobre un soporte sólido. Después de la desorción, la proteína se puede purificar adicionalmente mediante una variedad de técnicas cromatográficas basadas en las propiedades anteriores.

Se prefiere purificar el polipéptido de Factor VII/VIIa enlazado con albúmina de la presente invención con una pureza de hasta $\geq 80\%$, más preferiblemente $\geq 95\%$, y se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente puro, que tiene una pureza superior al 99,9% con respecto a macromoléculas contaminantes, en particular otras proteínas y ácidos nucleicos, y está exento de agentes infecciosos y pirógenos. Preferiblemente, un polipéptido de Factor VII/VIIa enlazado con albúmina aislado o purificado de la invención está sustancialmente exento de otros polipéptidos.

Los polipéptidos de Factor VII/VIIa enlazados con albúmina descritos en esta invención se pueden formular como preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. Las proteínas purificadas se pueden disolver en soluciones tampón acuosas, fisiológicamente compatibles, convencionales a las que se puede añadir, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas.

Tales vehículos y excipientes farmacéuticos así como formulaciones farmacéuticas adecuadas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)). En particular, la composición farmacéutica que comprende la variante del polipéptido de la invención se puede formular en forma liofilizada o soluble estable. La variante del polipéptido se puede liofilizar a través de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes del uso mediante la adición de uno o varios diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica, estéril.

Las formulaciones de la composición se suministran al individuo por cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen varios sistemas de administración y se pueden usar para administrar la composición

a través de cualquier vía conveniente. Preferentemente, las composiciones de la invención se administran sistémicamente. Para uso sistémico, las variantes de Factor VII/VIIa enlazado con albúmina de la invención se formulan para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmica) o enteral (por ejemplo, oral, vaginal o rectal) según métodos convencionales.

5 La ruta de administración más preferida es la administración intravenosa. Las formulaciones se pueden administrar continuamente por infusión o por inyección en bolo. Algunas formulaciones incluyen sistemas de liberación lenta.

10 Los polipéptidos de Factor VII/VIIa enlazados con albúmina, biológicamente activos, modificados de la presente invención se administran a pacientes en una dosis terapéuticamente eficaz, lo que significa una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados, prevenir o disminuir la gravedad o la transmisión del estado o la indicación tratada, sin llegar a una dosis que produce efectos secundarios adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores como, por ejemplo, la indicación, la formulación y el modo de administración y se tiene que determinar en ensayos preclínicos y clínicos para cada indicación respectiva.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar sola o junto con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden incorporar como parte del mismo agente farmacéutico.

15 Los diversos productos de la invención son útiles como medicamentos. Por consiguiente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de FVII/VIIa enlazado con albúmina, tal y como se describe en el presente documento, un polinucleótido de la invención o un plásmido o un vector de la invención.

Los ADNs modificados de esta invención también se pueden integrar en un vector de transferencia para uso en la terapia génica humana.

20 Otro aspecto de la invención es el uso de un polipéptido de FVII/VIIa enlazado con albúmina tal y como se describe en el presente documento, de un polinucleótido de la invención, de un plásmido o un vector de la invención, o de una célula hospedadora de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de trastornos hemorrágicos. Los trastornos hemorrágicos incluyen pero no se limitan a la hemofilia A. En otra realización de la invención, el tratamiento comprende terapia génica humana.

25 La invención también se refiere a un método para tratar a un individuo en una o varias de las siguientes indicaciones: "episodios hemorrágicos y cirugía en pacientes con hemofilia heredada o adquirida con inhibidores de Factores de la coagulación (FVIII o FIX)", "reversión de déficits de la hemostasia desarrollados como consecuencia de tratamientos con fármacos como fármacos antiplaquetarios o fármacos anticoagulantes", "mejora de la hemostasia secundaria", "déficits de la hemostasia desarrollados durante infecciones o durante enfermedades tales como la carencia de vitamina K o enfermedad hepática grave", "resección hepática", "déficits de la hemostasia desarrollados como consecuencia de mordeduras de serpientes", "hemorragias gastrointestinales". Otras indicaciones preferidas son "trauma", "consecuencias de una transfusión masiva (coagulopatía dilucional)", "carencias de factores de coagulación distintos de FVIII y FIX", "VWD", "carencia de FI", "carencia de FV", "carencia de FVII", "carencia de FX", "carencia de FXIII", "SUH", "enfermedades plaquetarias heredadas o adquiridas y trastornos como trombocitopenia, ITP, TTP, síndrome de HELLP, síndrome de Bernard-Soulier, trombostenia de Glanzmann, HIT", "síndrome de Chediak-Higashi", "síndrome de Hermansky-Pudlak", "síndrome de Rendu-Osler", "púrpura de Henoch-Schonlein" y "curación de heridas". El método comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del polipéptido de FVII/VIIa enlazado con albúmina tal como se describe en el presente documento. En otra realización, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del polinucleótido de la invención o de un plásmido o un vector de la invención. Alternativamente, el método puede comprender administrar al individuo una cantidad eficaz de las células hospedadoras de la invención descritas en el presente documento.

Descripción de las tablas y los dibujos:

Figura 1:

45 El sitio de restricción XhoI introducido en el sitio del codón de detención natural de FVII mediante la sustitución de TAG por TCG, está subrayado. El sitio NotI utilizado para una construcción adicional está subrayado dos veces. La secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal del Factor VII se proporciona en código de tres letras (encontrada).

Figura 2:

50 Esquema de las secuencias del enlazador insertado entre el extremo C-terminal del Factor VII y el extremo N-terminal de la albúmina en las diversas estructuras artificiales de pFVII. El sitio de escisión de trombina en pFVII-834 está subrayado. Las asparaginas de los sitios de N-glicosilación se subrayan dos veces.

Figura 3:

55 Las proteínas de fusión FVII y albúmina se activaron por la actividad de FXa y la actividad de FVIIa se midió en un ensayo STACLOT[®]. El gráfico muestra la actividad de proteínas con un enlazador de mayor longitud con respecto a la proteína sin enlazador (obtenida a partir del plásmido pFVII-974).

Figura 4:

Resultados de experimentos de PK con Factor VII de tipo silvestre (pFVII-659), proteínas de fusión FVII y albúmina, FVII obtenido a partir del plasma (pdFVII) y rFVIIa (NovoSeven[®]) según se mide con ELISA.

Ejemplos:

5 Ejemplo 1: Generación de ADNc que codifican polipéptidos de fusión FVII - albúmina

Una secuencia que codifica el Factor VII se amplificó con PCR a partir de una genoteca de ADNc de hígado humano (ProQuest, Invitrogen) usando los cebadores We1303 y We1304 (SEQ ID NO 1 y 2). Después de una segunda ronda de PCR usando los cebadores We1286 y We1287 (SEQ ID NO 3 y 4), el fragmento resultante se clonó en pCR4TOPO (Invitrogen). A partir de éste, el ADNc de FVII se transfirió como un fragmento EcoRI en el sitio EcoRI de pRESpuo3 (BD Biosciences) en el que se había delecionado previamente un sitio XhoI interno. El plásmido resultante se denominó pFVII-659.

Posteriormente se introdujo un sitio de restricción XhoI en pFVII-659 en el sitio del codón de detención natural de FVII (figura 1) mediante mutagénesis dirigida al sitio de acuerdo con protocolos convencionales (QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) usando los oligonucleótidos We1643 y We1644 (SEQ ID NO 5 y 6). El plásmido resultante se denominó pFVII-700.

Los oligonucleótidos We1731 y We1732 (SEQ ID NO 7 y 8) se reasociaron en concentraciones equimolares (10 pmol) en condiciones estándar de PCR, se rellenaron y se amplificaron usando un protocolo de PCR de 2 min de desnaturalización inicial a 94°C, seguida por 7 ciclos de 15 s de desnaturalización a 94°C, 15 s de reasociación a 55°C y 15 s de elongación a 72°C, y finalizó con una etapa de extensión de 5 min a 72°C. El fragmento resultante se digirió con las endonucleasas de restricción XhoI y NotI y se ligó en pFVII-700 digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se denominó pFVII-733, que contenía la secuencia que codificaba FVII y una extensión C-terminal de un enlazador de glicina/serina escindible con trombina.

Basándose en pFVII-733, se insertaron otros enlazadores sin sitio de corte para trombina y sitios de N-glicosilación adicionales. Para ello, las parejas de cebadores We2148 y We2149 (SEQ ID NO 9 y 10), We2148 y We2150 (SEQ ID NO 9 y 11), We2148 y We2151 (SEQ ID NO 9 y 12), We2152 y We2153 (SEQ ID NO 13 y 14), We2152 y We2154 (SEQ ID NO 13 y 15), We2152 y We2155 (SEQ ID NO 13 y 16) y We2156 y We2157 (SEQ ID NO 17 y 18), respectivamente, se reasociaron y se amplificaron tal y como se ha descrito anteriormente. Los fragmentos respectivos de PCR se digirieron con endonucleasas de restricción XhoI y BamHI y se insertaron en pFVII-733 digerido con las mismas enzimas. En el sitio BamHI de los plásmidos resultantes, así como en el de pFVII-733, se insertó un fragmento BamHI que contenía el ADNc de albúmina humana madura. Este fragmento se había generado con PCR sobre una secuencia de ADNc de albúmina usando los cebadores We1862 y We1902 (SEQ ID NO 19 y 20) en condiciones convencionales. Los plásmidos finales se denominaron pFVII-935, pFVII-936, pFVII-937, pFVII-938, pFVII-939, pFVII-940, pFVII-941 y pFVII-834, respectivamente. Sus secuencias enlazadoras y la secuencia C-terminal de FVII y N-terminal de la albúmina se describen en la figura 2.

Basándose en pFVII-938, se generaron las secuencias de enlazador más cortas mediante mutagénesis por delección. Para ello, se emplearon los cebadores de mutagénesis We2247 y We2248 (SEQ ID NO 23 y 24), We2249 y We2250 (SEQ ID NO 25 y 26), We2251 y We2252 (SEQ ID NO 27 y 28) y We2253 y We2254 (SEQ ID NO 29 y 30) en protocolos de mutagénesis convencionales (QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) para generar los plásmidos pFVII-1014, pFVII-1015, pFVII-1016 y pFVII-1370, respectivamente.

Con el fin de generar una proteína de fusión FVII y albúmina sin enlazador, se aplicó mutagénesis por delección tal y como se ha indicado anteriormente, al plásmido pFVII-935 usando los cebadores We2181 y We2182 (SEQ ID NO 31 y 32). El plásmido resultante se denominó pFVII-974.

Basándose en el plásmido pFVII-974, se aplicó mutagénesis por inserción para generar 1 a 3 enlazadores de aminoácidos. Para ello, se emplearon los cebadores de mutagénesis We2432 y We2433 (SEQ ID NO 33 y 34), We2434 y We2435 (SEQ ID NO 35 y 36) y We2436 y We2437 (SEQ ID NO 37 y 38) en protocolos de mutagénesis convencionales (QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) para generar los plásmidos pFVII-1158, pFVII-1159 y pFVII-1160, respectivamente.

Otras estructuras artificiales se generaron con procedimientos similares, aplicando en protocolos de mutagénesis convencionales, los cebadores de mutagénesis We2713 y We2714 (SEQ ID NO 39 y 40) sobre el plásmido pFVII-1370, We2715 y We2716 (SEQ ID NO 41 y 42) sobre el plásmido pFVII-1370, We2717 y We2718 (SEQ ID NO 43 y 44) sobre el plásmido pFVII-1016 y We2756 y We2757 (SEQ ID NO 45 y 46) sobre el plásmido pFVII-935 para generar los plásmidos pFVII-1361, pFVII-1362, pFVII-1363 y pFVII-1382, respectivamente

Las secuencias de los enlazadores y las secuencias del extremo C-terminal de FVII y N-terminal de albúmina de los plásmidos descritos anteriormente, se resumen en la figura 2.

55 Ejemplo 2: Transfección y expresión de polipéptidos de fusión Factor VII - albúmina

Los plásmidos se cultivaron en *E. coli* TOP10 (Invitrogen) y se purificaron utilizando protocolos convencionales (Qia-gen). Las células HEK-293 se transfectaron usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se dejaron crecer en medio exento de suero (Invitrogen 293 Express) en presencia de 50 ng/ml de vitamina K y 4 µg/ml de puromicina. Las poblaciones de células transfectadas se propagaron a través de matraces T en frascos rotatorios a partir de los cuales se recogió el material sobrenadante para purificación.

Ejemplo 3: Purificación de FVII y polipéptidos de fusión FVII - albúmina

La recogida de cultivos celulares que contenían FVII o proteína de fusión FVII y albúmina se aplicó sobre una columna FF de 2,06 ml de Q-Sefarosa equilibrada previamente con tampón HEPES 20 mM pH 7,4. Posteriormente, la columna se lavó con 10 volúmenes del mencionado tampón HEPES. La elución de las moléculas de FVII unidas se consiguió ejecutando un gradiente lineal de NaCl desde 0 a 1,0 M en tampón HEPES 20 mM dentro de 20 volúmenes de columna. El eluato contenía aproximadamente 85-90% del antígeno de FVII aplicado con concentraciones de proteína entre 0,5 y 1 g/L.

Alternativamente, FVII se purificó mediante cromatografía usando factor tisular inmovilizado tal como se ha descrito en el documento EP 0770625B1.

El antígeno de FVII y la actividad se determinaron tal y como se describe en el ejemplo 4.

Ejemplo 4: Determinación de la actividad de FVII y del antígeno.

La actividad de FVII se determinó usando un kit para ensayo cromogénico, disponible comercialmente (Chromogenix Coaset FVII empleando plasma humano estándar) basándose en el método descrito por Seligsohn et al. Blood (1978) 52:978-988.

La actividad de FVIIa se determinó usando un kit para ensayo, disponible comercialmente (STACLOT[®]VIIa-rTF, Diagnostica Stago) basándose en el método descrito por Morissey et al. (1993) Blood 81:734-744.

El antígeno de FVII se determinó mediante un ELISA cuya ejecución es conocida por los expertos en la técnica. Brevemente, las microplacas se incubaron con 120 µL por pocillo de anticuerpo de captura (IgG de oveja anti FVII humano, Cedarlane CL20030AP, diluida 1:1000 en tampón A [Sigma C3041]) durante una noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con tampón B (Sigma P3563), cada pocillo se incubó con 200 µl de tampón C (Sigma P3688) durante una hora a temperatura ambiente. Después de otras tres etapas de lavado con tampón B, diluciones en serie de la muestra del ensayo en tampón B, así como diluciones en serie de plasma humano estándar (Dade Behring; 50 - 0,5 mU/ml [1 mU equivale a 0,5 ng]) en tampón B (volúmenes por pocillo: 100 µL), se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, 100 µL de una dilución 1:5000 en tampón B del anticuerpo de detección (IgG de oveja anti FVII humano, Cedarlane CL20030K, marcado con peroxidasa) se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante otras dos horas a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado con tampón B, se añadieron 100 µl de solución de sustrato (TMB, Dade Behring, OUVF) por pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La adición de 100 µl de solución de parada sin diluir (Dade Behring, OSFA) preparó las muestras para su lectura en un lector de microplacas adecuado a 450 nm de longitud de onda. Las concentraciones de las muestras del ensayo se calcularon después usando la curva patrón con plasma humano estándar como referencia.

Ejemplo 5: Activación de FVII y de polipéptidos de fusión FVII-albúmina con el Factor Xa

Polipéptidos de FVII purificados tal y como se ha descrito en el ejemplo 3, se dializaron frente a un tampón que consistía en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, Na-citrato 1 mM, 1 g/l de Na-caprilato a pH 8,5. Dentro de este entorno de tampón, FVII fue activado a FVIIa mediante incubación con FXa (preparación disponible comercialmente, 100 UI/ml, ERL), fosfolípidos (Phospholipon 25P, 1 g/l, Rhone Poulenc-Nattermann, Colonia) y Ca⁺⁺ (solución de CaCl₂ en agua destilada, 1 M) durante diversos intervalos de tiempo a 37°C. Las concentraciones finales fueron ~30 a 65 UI/ml de FVII, medidas por el ensayo cromogénico; 0,5% de FXa en relación con FVII, es decir, 1 UI de FXa y 200 UI de FVII, 0,02 g/L de fosfolípidos y CaCl₂ 5 mM.

La activación finalizó con la adición de 10% (v/v) de un tampón que consistía en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, Na-citrato 200 mM, 1 g/l de Na-caprilato a pH 5,0.

Para controlar la escisión de las moléculas, en paralelo se aplicó a SDS-PAGE una muestra de la mezcla de activación y una muestra no activada correspondiente, se tiñeron con azul de Coomassie y se analizó la densidad de las bandas.

Brevemente, las muestras se redujeron, se aplicaron a SDS-PAGE (gradiente de 8-16% de poli(acrilamida), geles de Tris-glicina de Novex[®], Invitrogen; de acuerdo con las instrucciones del fabricante) y se tiñeron con azul de Coomassie G-250. Las bandas resultantes se analizaron (Versa DOC[®], Bio-Rad) y se calcularon las concentraciones relativas de proteína utilizando el programa informático Image Quant (V 4.20, Amersham).

Ejemplo 6: La actividad de las proteínas de fusión FVII-albúmina depende de la longitud del enlazador

- 5 Proteínas de fusión FVII-albúmina con longitud del enlazador entre 0 y 31 aminoácidos se activaron tal y como se ha descrito anteriormente y se determinó la actividad de FVIIa en un ensayo STACLOT[®]. Aunque los polipéptidos de fusión independientes de la longitud del enlazador mostraban un grado comparable de escisión con FXa, las actividades de FVIIa de las proteínas de fusión de albúmina medidas a través del ensayo de la actividad, mostraban un resultado sorprendente: cuanto mayor era longitud del enlazador entre el resto de FVII y de albúmina, mayor era la actividad específica y molar de FVIIa medida (figura 3 y tabla 3) y la estructura artificial sin enlazador (974) mostraba menos de la mitad de actividad de FVIIa, en comparación con las estructuras artificiales con péptidos enlazadores de 19 o más aminoácidos de longitud. Incluso un aminoácido como enlazador (pFVII-1158) incrementaba la actividad específica y molar de la proteína de fusión en un 31%, en comparación con una proteína de fusión sin enlazador (pFVII-974). Esto sugería firmemente que la fusión directa de las secuencias de FVII y albúmina podía conducir a una situación conformacional en la que el resto de albúmina interfiere con la conformación de su parte FVIIa o su interacción con su sustrato. Esta interferencia parece que se reduce significativamente en las estructuras artificiales que tienen un enlazador peptídico intercalado entre el Factor VII/VIIa y la albúmina.
- 10
- 15 La proteína de fusión con albúmina sin enlazador (974) mostraba aproximadamente un 25% de actividad específica y molar cuando se comparaba con NovoSeven[®] (tabla 4).

Tabla 3:

Proteína de fusión con albúmina obtenida a partir de pFVII	Longitud del enlazador [aminoácidos]	Nº de sitios de N-glicosilación dentro del enlazador	% de incremento de la actividad Staclot en comparación con una proteína de fusión sin enlazador
974	0	0	0
1158	1	0	31,3
1159	2	0	75,6
1160	3	0	104,0
1370	4	0	81,6
1361	5	0	107,0
1362	6	0	98,5
1363	7	0	178,1
1015	10	1	155,7
1014	13	2	201,5
1382	16	0	149,8
935	19	0	194,5
936	25	0	255,7
937	31	0	249,8

- 20 Tabla 4: Comparación de la actividad específica y molar (expresada en unidades de FVIIa medida por el ensayo Staclot por 100 unidades de antígeno de FVII determinado por Elisa) entre la proteína de fusión FVII y albúmina sin enlazador (974) y NovoSeven[®]

ES 2 504 517 T3

Proteína	Actividad Staclot específica [UI/100 UI de antígeno de FVII]	% de actividad específica
974	489	27,8
NovoSeven®	1759	100,0

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CSL Behring GmbH CSL Behring GmbH

<120> Factor de coagulación VIIa modificado con semivida prolongada

5 <130> 2006/M001-A107

<150> EP 06002359.5

<151> 06-02-2006

<160> 55

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 1

ggcaggggca gcactgcag 19

<210> 2

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 2

25 cacagggcag ggctgctgg 19

<210> 3

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Cebador

<400> 3

gcggttagca tggctccca ggcctc 27

<210> 4

35 <211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

40 <400> 4

gcggcgccg cctagggaaa tgggctcgc 30

<210> 5

<211> 33

ES 2 504 517 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 5 <400> 5
 gagccccatt tcctcgagg gccgccgcaa ggg 33

 <210> 6
 <211> 33
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 6
 ccctgcggc ggccctcgag ggaaatgggg ctc 33

 15 <210> 7
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Cebador

 <400> 7
gtgggtgctcg agcgtgcccc gcgccgtggg cggctccggc ggctccggcg gctccggatc 60
c 61

 <210> 8
 <211> 62
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 8
caccacgagg ccgcttatca ggatccggag ccgccggagc cgccggagcc gccacggcg 60
cg 62

 <210> 9
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> Cebador

 <400> 9
 ctcgagcggg ggatctggcg ggtctggagg ctctggaggg tcggaggct ct 52

 <210> 10
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 45 <400> 10
 ggatccagag cctcccgacc ctccagagcc tccagac 37

 <210> 11
 <211> 46

ES 2 504 517 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 5 <400> 11
 ggatccagat cccccagagc ctccagagcc tcccgaccct ccagag 46

 <210> 12
 <211> 59
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 12
 ggatcccgac cctccagacc cgccagatcc cccagagcct ccagagcctc ccgaccctc 59

 15 <210> 13
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Cebador

 <400> 13
 ctcgagcaac ggatctggcg ggtctggagg ctctggaggg tcgggaggc 49

 <210> 14
 <211> 40
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 14
 30 ggatccattg cctcccagacc ctccagagcc tccagaccgg 40

 <210> 15
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> Cebador

 <400> 15
 ggatccggtt cccccagagc ctccagagcc tcccgaccct ccagagcc 48

 <210> 16
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 45 <400> 16
ggatccggtc cctccagacc cgccagatcc cccagagcct ccagagcctc ccgaccctcc 60
agag 64

 <210> 17
 <211> 56
 <212> ADN

ES 2 504 517 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 17
 5 ctcgagcaat ggatctggcg ggtctggagg ctctggaggg tcgaatggct ctggag 56
 <210> 18
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 18
ggatccgttc cctccagacc cgccagatcc cccagagcct ccagagccat tcgaccctcc 60
agag 64
 <210> 19
 15 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 19
 gtgggatccg atgcacacaa gagtgaggtt g 31
 <210> 20
 <211> 35
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 20
 cacggatccc tataagccta aggcagcttg acttg 35
 30 <210> 21
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 21
 35 **Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu**

ES 2 504 517 T3

1 5 10 15
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20 25 30
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35 40 45
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50 55 60
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65 70 75 80
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85 90
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100 105 110
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115 120 125
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130 135 140
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145 150 155 160
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165 170 175
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180 185 190
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195 200 205
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210 215 220
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225 230 235 240
 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245 250 255
 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260 265 270
 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu

ES 2 504 517 T3

275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

<210> 22
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 22

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110

ES 2 504 517 T3

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380

ES 2 504 517 T3

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585

<210> 23
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cebador

<400> 23
 gagcaacgga tctggagggt cgggag 26

10

<210> 24
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Cebador

<400> 24
 ctcccgacct tccagatccg ttgctc 26

<210> 25
 <211> 26

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 5 <400> 25
 ctggcgggtc tggatccgat gcacac 26

 <210> 26
 <211> 26
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 26
 ggtgcatcg gatccagacc cgccag 26

 15 <210> 27
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Cebador

 <400> 27
 cgagcaacgg atctggatcc gatgcacac 29

 <210> 28
 <211> 29
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 28
 30 ggtgcatcg gatccagatc cgttgctcg 29

 <210> 29
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> Cebador

 <400> 29
 cattccctc gagcggatcc gatgcacac 29

 <210> 30
 40 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 30
 45 ggtgcatcg gatccgctcg agggaaatg 29

 <210> 31
 <211> 27
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

ES 2 504 517 T3

<220>
 <223> Cebador

 <400> 31
 cccatttcc c gatgcacac aagagtg 27

 5 <210> 32
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 10 <400> 32
 cactcttg tgcatcgga aatggg 27

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

 <220>
 <223> Cebador

 20 <400> 33
 gcccatttc cgggatgc acacaagat gag 33

 <210> 34
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 34
 ctactcttg tgtgatccc cgggaaatgg ggc 33

 <210> 35
 30 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 35 <400> 35
 gcccatttc cgggtccga tgcacacaag agtgag 36

 <210> 36
 <211> 36
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 36
 ctactcttg tgtgatcgg acccgggaaa tggggc 36

 45 <210> 37
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> Cebador

ES 2 504 517 T3

<400> 37
 gccccatttc ccgggggctc cgatgcacac aagagtgag 39

 <210> 38
 <211> 39
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 38
 10 ctcactcttg tgtgcatcgg agcccccggg aaatggggc 39

 <210> 39
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador

 <400> 39
 cctcgagcgg aggtccgat gcacacaag 29

 <210> 40
 20 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 25 <400> 40
 cttgtgtgca tcggaccctc cgctcgagg 29

 <210> 41
 <211> 32
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 41
 cccatttccc tcggggggga gcggatccga tg 32

 35 <210> 42
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> Cebador

 <400> 42
 catcggatcc gctcccccc gagggaaatg gg 32

 <210> 43
 <211> 35
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 43
 50 cccatttccc tcgagcggcg gatctggatc cgatg 35

<210> 44
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 44
 catcgatcc agatccgccg ctcgagggaa atggg 35

10 <210> 45
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

15 <400> 45
 ggtcgggagg cgatgcacac aagagtg 27

<210> 46
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 46
 cactcttggtg tgcacgcct cccgacc 27

25 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

30 <400> 47
 Glu Pro Gln Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Glu
 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

40 <400> 48
 Gly Gly Val Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ile
 1 5 10

<210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Enlazador

<400> 49
 Pro Ala Arg Gly Gly Gly Gly Gly Lys Ala Arg
 1 5 10

<210> 50
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Enlazador

<400> 50
Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Gly Gly
1 5 10

10 <210> 51
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

15 <400> 51
Thr Ser Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Pro Pro
1 5 10

<210> 52
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Enlazador

<400> 52
Met Tyr Gly Ala Lys Lys Pro Leu Asn Thr Glu Gly Val Met Lys Ser
1 5 10 15

Arg Ser

25 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

30 <400> 53
Arg Gly Glu Val Lys Tyr Pro Leu Cys Thr Arg Lys Glu Ser Lys
1 5 10 15

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Enlazador

<400> 54
Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser
1 5

40 <210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>

<223> Enlazador

<400> 55

Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido fusionado con albúmina que comprende al menos un polipéptido de Factor VII o Factor VIIa fusionado con albúmina, en el que al menos uno de estos polipéptidos de Factor VII o Factor VIIa está localizado en el extremo N-terminal de la proteína de fusión y en el que la proteína de fusión tiene actividad biológica de Factor VII/VIIa y en el que un enlazador peptídico separa el resto del Factor VII o del Factor VIIa en el extremo N-terminal de la proteína de fusión, del resto de albúmina, comprendiendo dicho enlazador al menos 25 aminoácidos y unidades de repetición que comprenden glicina y serina.
- 10 2. Un polipéptido fusionado con albúmina según la reivindicación 1, en el que la proteína de fusión tiene al menos 25% de actividad biológica específica y molar de Factor VII/VIIa en comparación con el Factor VII o el Factor VIIa de tipo silvestre no fusionado respectivo.
3. Un polipéptido fusionado con albúmina que comprende un polipéptido de Factor VII o Factor VIIa según la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína de fusión tiene una semivida plasmática funcional incrementada *in vivo* en comparación con un Factor VII o un Factor VIIa no fusionado.
- 15 4. Un polipéptido fusionado con albúmina que comprende un polipéptido de Factor VII o Factor VIIa según la reivindicación 3, en el que la proteína de fusión tiene una semivida funcional *in vivo* que se incrementa al menos 100% en comparación con un Factor VII o un Factor VIIa no fusionado.
5. El polipéptido fusionado con albúmina según las reivindicaciones 1 a 4, en el que el enlazador contiene un sitio de escisión para proteasa.
- 20 6. El polipéptido fusionado con albúmina según la reivindicación 5, en el que el sitio de escisión se puede escindir con una proteasa de la coagulación seleccionada a partir del grupo que consiste en Factor IIa, Factor IXa, Factor Xa, Factor XIa, Factor XIIa, proteína C activada, elastasa o calicreína.
- 25 7. El polipéptido fusionado con albúmina según las reivindicaciones 1 a 6, en el que el enlazador se modifica mediante la inserción de sitios para modificaciones postraduccionales y en el que la modificación postraducciona comprende uno o varios sitios de N-glicosilación de la estructura Asn - X - Ser/Thr, en donde X designa cualquier aminoácido excepto prolina.
8. El polipéptido fusionado con albúmina según la reivindicación 1 a 7, en el que dicho polipéptido fusionado con albúmina se modifica de modo que la modificación comprende añadir mediante inserción al menos parte del péptido de activación de un polipéptido diferente dependiente de vitamina K, o añadir mediante inserción un análogo de dicho péptido de activación del polipéptido diferente dependiente de vitamina K.
- 30 9. Los polipéptidos fusionados con albúmina según las reivindicaciones 1 a 8, en los que el resto del polipéptido del Factor VII o del Factor VIIa tiene actividad procoagulante.
10. El polipéptido fusionado con albúmina según las reivindicaciones 1 a 9, para uso como medicamento.
- 35 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del polipéptido fusionado con albúmina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, junto con un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 11, para uso en el tratamiento o la prevención de trastornos hemorrágicos, en donde el trastorno hemorrágico es preferentemente hemofilia A.
- 40 13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 12, en la que el polipéptido fusionado con albúmina se administra por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmica.
- 45 14. Una molécula de ácido nucleico en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido fusionado con albúmina según las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha secuencia de polinucleótidos se encuentra en el extremo 3' de una secuencia de nucleótidos que codifica un propéptido que media en la carboxilación gamma de la parte fusionada del Factor VII/VIIa.
- 50 15. Un plásmido o un vector en donde dicho plásmido o vector comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 14.
16. Un plásmido o un vector según la reivindicación 15, en donde dicho plásmido o vector es i) un vector de expresión o ii) un vector de transferencia para uso en terapia génica.
17. Una célula hospedadora en donde dicha célula hospedadora comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 14 a 16.
18. Un método para preparar un polipéptido fusionado con albúmina según la reivindicación 1 a 9, en donde di-

cho método comprende:

a. proporcionar un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido fusionado con albúmina que se puede expresar en un organismo;

b. expresar el ácido nucleico en el organismo para formar un polipéptido fusionado con albúmina; y

5 purificar el polipéptido fusionado con albúmina.

Figura 1:

XhoI NotI
.. CTGCGAGCCCCATTTCCCTCGAGGGCCGCCGCAAGGGCGAATTCGGATCCGCGGCCGCA
.. L R A P F P

Figura 2:

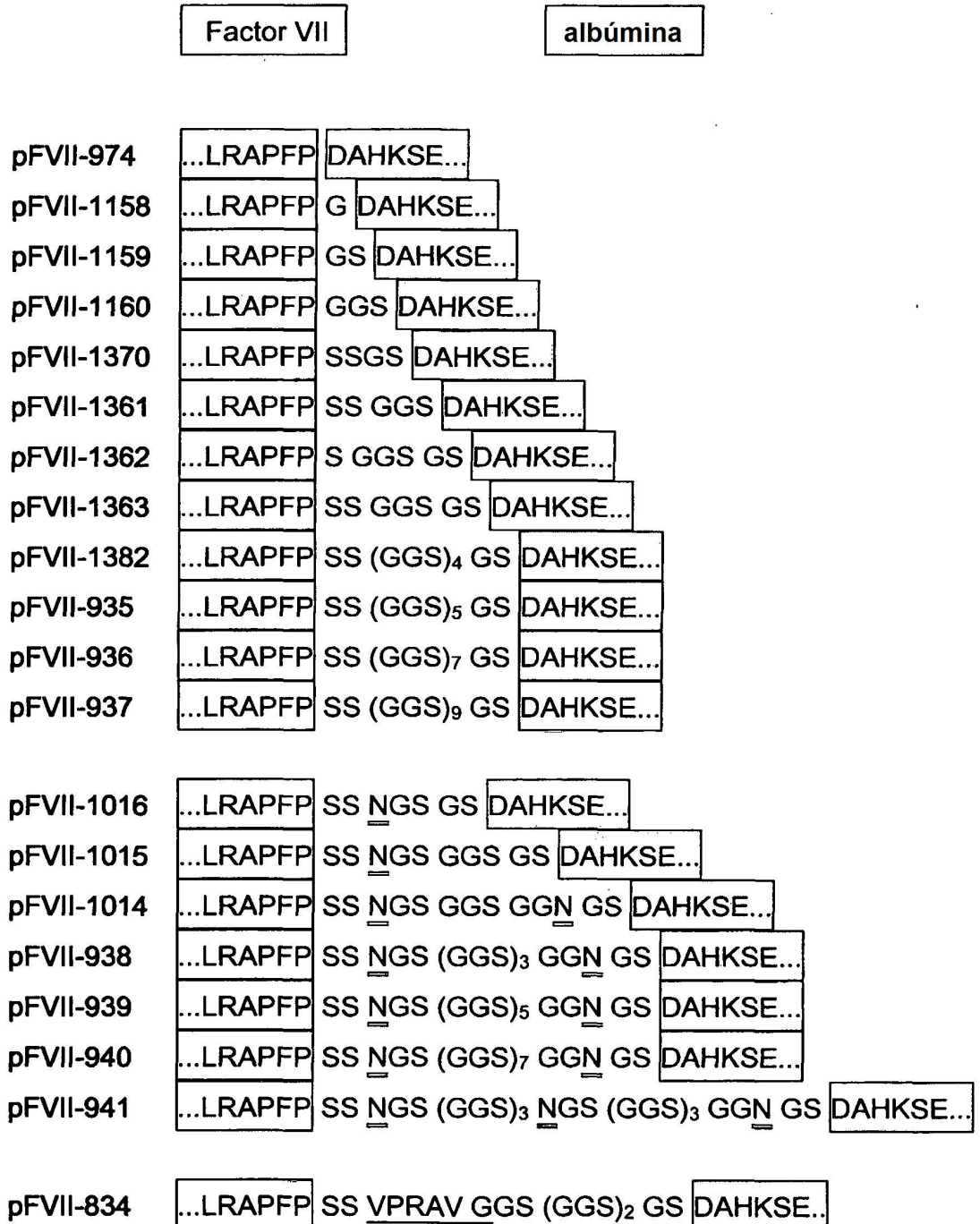


Figura 3:

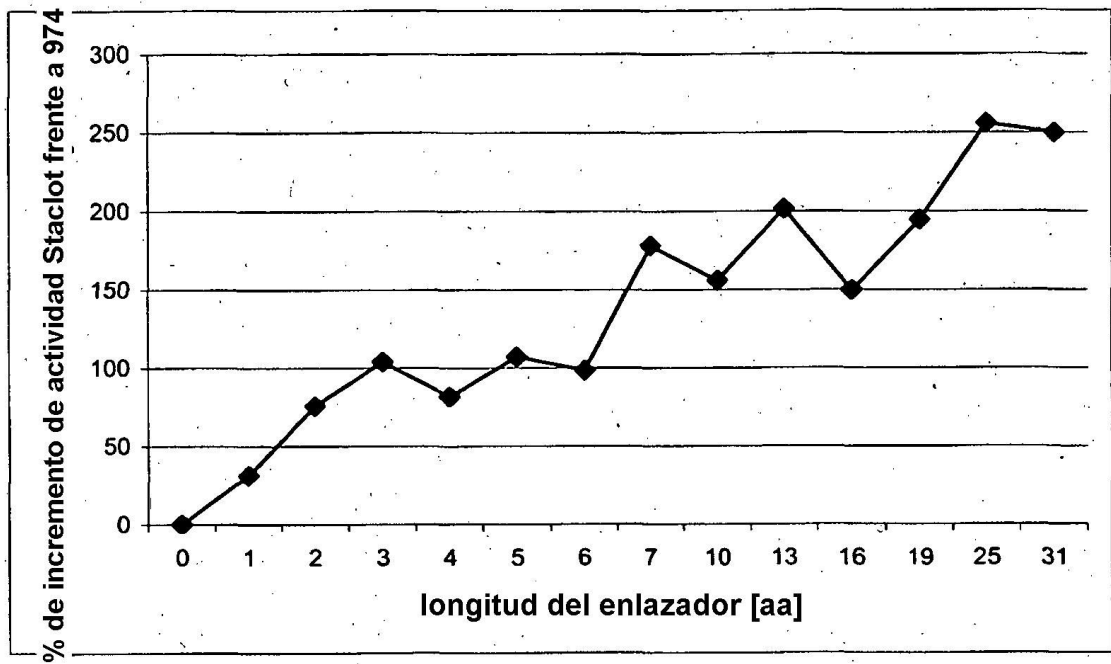


Figura 4:

