

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 974**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010** **E 10792705 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014** **EP 2445513**

54 Título: **Moléculas del Factor VII quimérico**

30 Prioridad:

25.06.2009 US 220278 P

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

16.12.2014

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 Bynum Hall Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**STAFFORD, DARREL W. y
FENG, DENGMIN.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 524 974 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

Moléculas del Factor VII quimérico

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con polipéptidos del Factor VII de coagulación humano quimérico (FVII) que tienen mayor actividad coagulante y menos complicaciones trombóticas que los actualmente disponibles polipéptidos del Factor VII, así como constructos de polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, vectores y células huésped que comprenden y que expresan los polinucleótidos, composiciones farmacéuticas, usos y métodos de tratamiento.

Antecedentes de la invención

15 La coagulación de la sangre es un proceso que consiste en una interacción compleja de varios componentes de la sangre (o factores) que eventualmente dan lugar a un coágulo de fibrina. Generalmente, los componentes de la sangre, que participan en lo que se ha referido como la "cascada," de coagulación, son proteínas enzimáticamente inactivas (proenzimas o zimógenos) que se convierten en enzimas proteolíticas por la acción de un activador (que en sí es un factor de coagulación activado). Los factores de coagulación que han experimentado una conversión de ese tipo se denominan generalmente como "factores activos", y se designan por la adición de la letra "a" al nombre del factor de la coagulación (*por ejemplo.*, el Factor VII activada se designa como Factor VIIa o FVIIa).

Normalmente, la iniciación del proceso hemostático se media por la formación de un complejo entre el factor tisular y el Factor VIIa. Este complejo convierte después los Factores IX (FIX) y X (FX) a sus formas activas. El Factor Xa (FXa) convierte cantidades limitadas de protrombina a trombina en la célula que contiene el factor tisular. La trombina activa las plaquetas y los Factores V (FV) y VIII (FVIII) en Factores Va (FVa) y VIIIa (FVIIIa), ambos cofactores en el proceso adicional conduciendo al torrente completo de trombina. Este proceso incluye la generación del Factor Xa por el Factor IXa (FIXa) (en complejo con el Factor VIIIa) y ocurre en la superficie de las plaquetas activadas. La trombina finalmente convierte el fibrinógeno en fibrina resultando en la formación de un coágulo de fibrina. En los últimos años se ha encontrado que el Factor VII y el factor tisular son los principales iniciadores de coagulación de la sangre.

30 El Factor VII es una glicoproteína de plasma que circula en la sangre como un zimógeno de cadena sencilla. El zimógeno tiene actividad catalítica marginal. El Factor VII de cadena sencilla se puede convertir en Factor VIIa de dos cadenas por el Factor Xa, Factor XIIa, Factor IXa, Factor VIIa o trombina *in vitro*. El Factor Xa se cree que es el principal activador fisiológico del Factor VII. Similar a otras muchas proteínas plasmáticas implicadas en la hemostasia, el Factor VII depende de la Vitamina K para su actividad, que se requiere para la gamma-carboxilación de residuos múltiples de ácido glutámico que se agrupan cerca del terminal amino de la proteína. Estos ácidos glutámicos carboxilados en gamma se requieren para la interacción inducida por iones metálicos del Factor VII con fosfolípidos. La conversión del zimógeno Factor VII en la molécula de cadena doble activada ocurre por escisión de un enlace peptídico interno Arg₁₅₂-Ile₁₅₃. Además, se conoce bien que altas concentraciones de Factor VII conducen a la autoactivación *in vitro*. En presencia de factor tisular, fosfolípidos e iones de calcio, el Factor VIIa de doble cadena activa rápidamente el Factor X o Factor IX por proteólisis limitada.

45 El gen que codifica al FVII humano (hFVII) se ha mapeado con el cromosoma 13 en q34-qter 9 (de Grouchy y otros, Hum Genet 1984; 66:230-233). Contiene nueve exones y se extiende por 12.8 Kb (O'Hara y otros, Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:5158-5162). La organización génica y la estructura de la proteína de FVII son similares a las de otras proteínas procoagulantes dependientes de vitamina K, con exones 1a y 1b que codifican para la secuencia señal; exón 2 el propéptido y el dominio GLA; exón 3 una región hidrofóbica corta; exones 4 y 5 dominios tipo factor de crecimiento epidérmico; y exón 6 hasta el 8 el dominio catalítico de la serina proteasa. (Yoshitake y otros, Biochemistry 1985; 24: 3736-3750).

50 El Factor IX (factor Christmas) es el zimógeno de una serina proteasa activa en la hemostasia normal y la actividad enzimática requiere la carboxilación de residuos específicos de ácido glutámico. Los Factores IX, X, VII y la proteína C son parálogos estrechamente relacionados de la misma familia de serina proteasas, con un alto grado de identidad de secuencia de aminoácidos y arreglo intrón-exón de los genes que codifican estas proteínas. Estas proteínas estrechamente relacionadas tienen una estructura similar de dominios funcionales a partir del terminal amino al carboxilo para incluir un dominio ácido γ-carboxiglutámico (GLA), dos dominios tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), un péptido de activación y el dominio catalítico. La proteína S es una proteína de 666 aminoácidos, dependiente de vitamina K con un dominio GLA, 4 dominios tipo EGF, una región sensible a trombina y 2 dominios de laminina.

Las proteínas plasmáticas de la coagulación dependientes de vitamina K contienen un dominio GLA que funciona como el

sitio de unión de proteínas a las membranas y el dominio GLA está muy conservado entre las diversas proteínas de la coagulación. A pesar de su similitud, los dominios GLA exhiben una amplia variedad de afinidades por el fosfolípido, con el dominio GLA de la Proteína S que tiene la mayor afinidad por los fosfolípidos. (Ellison y otros, *Biochemistry*, 1998; 37:7997-8003), (McDonald y otros, *Biochemistry* 1997; 36:5120-27).

Es frecuentemente deseable estimular o mejorar la cascada de coagulación en un sujeto. El Factor VIIa se ha usado para controlar los trastornos de sangrados que tienen varias causas tales como deficiencias de factores de coagulación (por ejemplo, hemofilia A y B o deficiencia de Factores de coagulación XI o VII) o inhibidores de factores de coagulación. El Factor VIIa se ha usado además para controlar el sangrado excesivo que ocurre en sujetos con una cascada de coagulación de la sangre que funciona normalmente (sin deficiencias de factores o inhibidores de coagulación contra cualquiera de los factores de coagulación). Tal sangrado puede, por ejemplo, ser causado por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand.

El sangrado es además un problema importante con respecto a la cirugía y otras formas de trauma. Por ejemplo, el Factor VII se ha usado ampliamente para tratar soldados heridos en Irak y Afganistán. (Perkins JG, y otros *The Journal of Trauma*. 2007; 62: 1095-9; discusión 9-101). Su uso se ha acreditado con salvar muchas vidas, pero como con la mayoría de los tratamientos médicos, existen efectos secundarios, tales como accidente cerebrovascular u otros eventos trombóticos después del tratamiento. La impresión general de los médicos que usan FVIIa, sin embargo, es que su uso ha salvado muchas más vidas que las que se han perdido. Quizás la mejor indicación de esto es que en guerras anteriores aproximadamente el 30 por ciento de los heridos murieron de sus lesiones, mientras que en la actual guerra del Golfo el número se ha reducido a aproximadamente 10 por ciento. (Gawande A, y otros, *N Engl J Med*. 2004; 351: 2471-5).

Estudios de ratones transgénicos con hemofilia B que expresan Factor VIIa han demostrado que la expresión continua de Factor VIIa en niveles bajos (por debajo de 1.5 µg/ml) restaura la actividad de coagulación en ratones con hemofilia B. Los niveles de factor VIIa en ratones silvestres o con hemofilia B anteriormente 2 µg/ml, sin embargo, condujeron a trombosis en el corazón y los pulmones; tanto el corazón como los pulmones son sitios de alta expresión de factor tisular. Esto sugiere que los altos niveles de factor VIIa en la circulación inducen trombosis cuando contactan con el factor tisular expuesto en la lesión de los vasos en el corazón y los pulmones. (Margaritas y otros, *J. Clin. Invest.* 2004; 113:1025-31). Además, los estudios han demostrado que la transferencia génica mediada por vector del Factor VIIa canino en perros hemofílicos es tanto segura como eficaz a corto y mediano plazo. (Margaritas y otros, *Gene Therapy* 2009; 113:3682-3689).

Advertencias relacionadas con el tratamiento con factor VII se proponen actualmente para los productos que buscan la aprobación regulatoria. Por ejemplo, la Agencia Europea de Medicamentos, Unidad de Evaluación de Medicamentos Humanos recomienda que las terapias actuales con Factor VII lleven una advertencia del riesgo de trombosis y coagulación intravascular diseminada, particularmente en situaciones donde el Factor VII debe ser administrado a pacientes con antecedentes de enfermedad coronaria del corazón o enfermedad hepática, pacientes post-operatorios, recién nacidos y las personas con riesgo de trombosis y coagulación intravascular diseminada. *Ver, por ejemplo*, Core SPC for Human Plasma Derived Coagulation Factor VII Products (CPMP/BPWG/2048/01), julio 2004.

Anteriormente, se ha demostrado que el dominio EGF-1 del Factor VIIa juega un papel crítico en la afinidad del Factor VIIa por el factor tisular. Usando tanto un sustrato sintético como el Factor X, tanto en presencia como ausencia de factor tisular, polipéptidos del Factor VIIa con un dominio EGF-1 del Factor IX tuvieron actividad catalítica inferior que el Factor VIIa silvestre. (Jin y otros, *Biochemistry*, 1999, 28:1185-92). A primera vista, esto parecería obviar el uso de constructos quiméricos para tratar el sangrado; sin embargo, Monroe (*British Journal of Haematology* 1997; 99:542-549) ha propuesto que el mecanismo de FVIIa en el tratamiento de hemofilia y sangrado es independiente del factor tisular. La opinión en la técnica, sin embargo, está dividida en cuanto a si el Factor VIIa no es activo independiente del factor tisular.

Las preparaciones comerciales de factor VIIa recombinante humano se venden como NovoSeven® y NovoSeven® RT. NovoSeven® y NovoSeven® RT se indican para el tratamiento de episodios de sangrado en pacientes con hemofilia A o B, y son el único rFVIIa para el tratamiento de episodios de sangrado disponibles en el mercado. Recientemente, se ha demostrado que puede NovoSeven® unirse a las plaquetas liofilizadas rehidratadas, que se pueden administrar en conjunto para localizar el Factor VII en un sitio de la lesión. (Fischer y otros, *Platelets*, 2008; 19:182-91). Además, se ha demostrado que la PEGilación selectiva del Factor VII puede aumentar la vida media plasmática, (Stennicke y otros, *Thromb. Haemost.*, 2008; 100:920-28), y que un Factor VII recombinante humano, con 3 sustituciones de aminoácidos tiene una actividad aumentada en la superficie de las plaquetas. (Moss y otros, *J. Thromb. Haemost.*, 2009; 7:299-305). La PEGilación de las moléculas del Factor VIIa quimérico de la presente invención se espera que trabaje de manera similar para aumentar la vida media plasmática. Asimismo, otras modificaciones de las proteínas conocidas en la técnica, tales como la unión covalente de porciones no polipeptídicas para formar conjugados, por ejemplo, glicosilación, se esperan que funcionen de manera

similar en las moléculas de Factor VIIa quimérico de la presente invención, es decir, las propiedades impartidas a una proteína por la unión covalente de una porción no polipéptidica se esperan que se impartan a las moléculas de Factor VIIa.

- 5 Existe una necesidad de variantes de Factor VIIa que tienen alta actividad coagulante que se pueden administrar a dosis relativamente bajas, y variantes que producen menos efectos secundarios indeseables tales como complicaciones trombóticas, asociadas con las terapias disponibles.

Resumen de la invención

- 10 Esta solicitud describe moléculas de FVIIa quimérico, particularmente moléculas de hFVIIa quimérico que comprenden dominios de hFVIIa y dominios de una o más proteínas del sistema de coagulación, proporcionando uno o más beneficios deseados. Las moléculas de FVIIa quimérico de la presente invención, por lo tanto, tienen una o más propiedades mejoradas en comparación con el rFVIIa disponible en el comercio, incluyendo que tienen actividad coagulante superior y/o siendo capaces de ser administradas en dosis relativamente bajas y/o que producen menos complicaciones trombóticas.
- 15 Por consiguiente, el tratamiento médico con una quimera de la invención ofrece ventajas sobre el compuesto rFVIIa actualmente disponible, tales como potencialmente dosis inferiores y/o menos efectos secundarios indeseables.

- 20 De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un polipéptido del Factor VIIa quimérico, en donde el polipéptido del Factor VIIa quimérico comprende el dominio EGF-2 y los dominios catalíticos del Factor VII; un dominio GLA seleccionado del grupo que consiste en el dominio GLA del Factor IX y el dominio GLA de la proteína S; y un dominio EGF-1 seleccionado del grupo que consiste en el dominio EGF-1 del Factor IX y el dominio EGF-1 de proteína S, para usar en el tratamiento de un trastorno de sangrado en un sujeto que tiene un trastorno de sangrado.

- 25 En algunas modalidades, el dominio GLA es un dominio GLA del Factor IX y el dominio EGF-1 es un dominio EGF-1 del Factor IX. En otras modalidades el dominio GLA es un dominio GLA de la proteína S y el dominio EGF-1 es un dominio EGF-1 del Factor IX.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una proteína de coagulación quimérica que comprende:

- 30 un dominio GLA de proteína S;
un dominio EGF-1 seleccionado del dominio EGF-1 de proteína S; y, el dominio EGF-1 del Factor IX; y
el dominio EGF-2 y dominio catalítico del Factor VII.

- 35 Se describen además polipéptidos FVIIa que incluyen un FVIIa quimérico que comprende los dominios EGF-2 y catalítico de FVII y el dominio GLA de una proteína de coagulación dependiente de la vitamina K y el dominio EGF-1 de una proteína de coagulación dependiente de la vitamina K. En modalidades particulares de la invención los polipéptidos FVIIa quiméricos de la invención incluyen 1) un FVIIa quimérico que comprende los dominios GLA y EGF-1 de FIX y los dominios EGF-2 y catalíticos de FVII; 2) un FVIIa quimérico que comprende el dominio EGF-1 de FIX y el GLA, dominios EGF-2 y catalíticos de FVII; 3) un FVIIa quimérico que comprende el dominio GLA de la proteína S, el dominio EGF-1 de FIX y los dominios EGF-2 y catalíticos de FVII; 4) un FVIIa quimérico que comprende los dominios GLA y EGF-1 de la Proteína S y los dominios EGF-2 y catalíticos de FVII; 5) un FVIIa quimérico que comprende el dominio EGF-1 de la Proteína S y los dominios GLA, EGF-2 y catalíticos de FVII; y 6) un FVIIa quimérico que comprende el dominio EGF-1 de la Proteína S, el dominio GLA de FIX y los dominios EGF-2 y catalíticos de FVII. Los polipéptidos FVIIa quiméricos representativos pueden incluir además FVIIa silvestre o cualquiera de los polipéptidos de FVIIa quimérico anteriormente descritos, que tienen sustituciones de aminoácidos en el dominio EGF-1 o el dominio GLA. Las sustituciones pueden ser sustituciones conservativas o sustituciones no conservativas. Tales sustituciones pueden incluir la sustitución de la isoleucina en el residuo 69 por alanina y/o una sustitución de la arginina en el residuo 79 por alanina del dominio EGF-1. Las sustituciones adicionales pueden incluir la sustitución de la lisina en el residuo 5 por arginina, que causa que tenga una afinidad de unión superior el dominio GLA por el colágeno de tipo IV, pero no parece afectar la unión de plaquetas (Gui y otros, J. Thromb Haemost. 2009; 7:1843-1851); la sustitución de la metionina en el residuo 306 por otro aminoácido, preferentemente una sustitución de aminoácido conservativa, con mayor preferencia alanina, que reduce adicionalmente la afinidad por el factor tisular; y, la sustitución de la valina en el residuo 158 por aspartato, la sustitución del glutamato en 296 por valina y/o la sustitución de la metionina en el residuo 298 por glutamina, que resulta en un Factor VIIa con actividad específica superior .

- 55 Se proporcionan además los métodos de tratamiento de un trastorno de sangrado en un sujeto que tiene un trastorno de sangrado mediante la administración de uno o más de los polipéptidos de FVIIa quimérico descritos en la presente. El método de tratamiento del trastorno de sangrado puede incluir un método para administrar al sujeto una molécula de ácido

nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del Factor VIIa quimérico de esta invención.

Se describe además un método de tratamiento de un trastorno de sangrado en un sujeto que tiene el trastorno de sangrado mediante la administración de una proteína que comprende un dominio GLA, en donde la proteína se dirige a y/o se concentra cerca del sitio de un coágulo en relación con la concentración de la proteína en la circulación en el plasma del sujeto. Esto puede incluir el uso de dominios que se unen con mayor afinidad a las plaquetas, que se encuentran en o cerca del sitio de formación del coágulo, que los polipéptidos del Factor VII actualmente disponibles. Los ejemplos de tales dominios son los dominios GLA de varias proteínas de la coagulación que unen las capas de fosfolípidos cargados negativamente situados en la superficie de las plaquetas. Ejemplos no limitantes de tales dominios GLA incluyen el dominio GLA de FIX, que se une a las plaquetas y fosfolípidos mucho más fuerte que el dominio GLA de FVIIa (Melton y otros, "Location of the platelet binding site in zymogen coagulation factor IX" Blood Coagul Fibrinolysis 12:237-243 (2001)) y el dominio GLA de la proteína S, que une fosfolípidos más fuerte que cualquier otro dominio GLA conocido (McDonald y otros, "Comparison of naturally occurring vitamin K-dependent proteins: correlation of amino acid sequences and membrane binding properties suggests a membrane contact site" Biochemistry:36:5120-5127 (1997)). Los ejemplos no limitantes de una proteína que comprende un dominio GLA incluyen una proteína recombinante que comprende un dominio GLA de FIX o Proteína S, una proteína quimérica que comprende un dominio GLA de FIX o Proteína S y/o un polipéptido FVIIa quimérico de esta invención que comprende un dominio GLA de FIX o Proteína S.

Se describe además un método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno de sangrado mediante la administración de un polipéptido del Factor VIIa quimérico de la invención que comprende un dominio catalítico derivado de un polipéptido del Factor VII y un dominio, o dominios dirigidos a plaquetas. Tales dominios dirigidos a plaquetas incluyen dominios de proteínas que interactúan o se unen a la superficie de una plaqueta. Tal interacción o unión a la superficie de una plaqueta se puede mediar a través de los fosfolípidos de membrana de la plaqueta, o a través de proteínas y/o receptores de la superficie celular de la plaqueta. Los ejemplos no limitantes de tales dominios incluyen el dominio A1 del Factor von Willebrand, que es el sitio de unión principal de la glicoproteína Ib de plaqueta (Emsley y otros, JBC, 273:10396-10401 (1998)) y el fragmento Fab (dominio) de los anticuerpos que se une a las proteínas de membrana y/o receptores de la plaqueta, tales como un anticuerpo que se une a los fosfolípidos de membrana de la plaqueta (Out y otros, Blood, 77:2655-2659 (1991)).

Tal focalización de las proteínas de coagulación al sitio de un coágulo usando un dominio que se une a las plaquetas y que ha reducido la afinidad por el factor tisular tiene el beneficio adicional, pero inesperado de disminuir el riesgo de complicaciones asociadas con las actuales terapias del Factor VII, tal como la trombogenicidad. Este enfoque se puede usar además para dirigir otros polipéptidos terapéuticamente útiles u otras moléculas a las plaquetas, o al sitio de un coágulo. Tales moléculas terapéuticamente útiles pueden incluir anti-coagulantes y similares.

Se describe además un método de tratamiento de un trastorno de sangrado en un sujeto que tiene un trastorno de sangrado mediante la administración al sujeto de un polipéptido con trombogenicidad reducida en relación con la trombogenicidad del Factor VII (por ejemplo, reducida al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, etc. con relación a la trombogenicidad del Factor VII nativo). La "trombogenicidad reducida" se puede determinar de diversos modos de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, que incluyen pero sin limitarse a una determinación de un número reducido de coágulos, coágulos más pequeños, más tiempo requerido para que ocurra el coágulo (*in vivo* o en un ensayo *in vitro*, menos muertes de sujetos debido a la formación de trombos y/o tiempo de supervivencia prolongado, en comparación con el control. Un polipéptido con trombogenicidad reducida en comparación con el Factor VII puede ser, por ejemplo, un polipéptido del Factor VII quimérico de esta invención o fragmento activo de este. Los ejemplos no limitantes de tales polipéptidos incluyen un FVIIa quimérico que comprende los dominios GLA y EGF-1 de FIX y los dominios EGF-2 y catalíticos de FVII y un FVIIa quimérico que comprende el dominio GLA de la proteína S, el dominio EGF-1 de FIX y los dominios EGF-2 y catalíticos de FVII.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una representación esquemática de moléculas de FVIIa quimérico útiles en la presente invención. FVII: Factor VII; FIX: Factor IX

La Figura 2 muestra la generación de trombina (nM) en condiciones normales y en condiciones hemofílicas (eliminación del Factor IX y Factor VIII) en un sistema de hemofilia modelo basado en células para concentraciones diversas de Factor VIIa silvestre.

La Figura 3 muestra la generación de trombina (nM) en condiciones normales y en condiciones hemofílicas (eliminación de Factor IX y Factor VIII) en un sistema de hemofilia modelo basado en células con la administración de 50 nM de Factor VIIa silvestre, o 10 nM de Factor VIIa quimérico.

La Figura 4 muestra el pico de la trombina, en relación con el valor de control, producido en un sistema de hemofilia modelo basado en células a continuación de la administración de 50 nM de Factor VIIa silvestre, o 10 nM de Factor VIIa quimérico.

La Figura 5 muestra la alteración del tiempo de hemostasia en un ensayo de coagulación de un ratón con hemofilia B sin ningún tratamiento, un ratón con hemofilia B administrado con 2 mg/kg de NovoSeven®, un ratón con hemofilia B administrado con 2 mg/kg de una molécula de FVIIa quimérico y un ratón silvestre sin ningún tratamiento.

La Figura 6 muestra la secuencia de un Factor VII quimérico ilustrativo de la presente invención, que comprende la señal, pro péptido, dominios GLA y EGF1 del Factor IX (subrayados) (sec. con núm. de ident.: 1).

La Figura 7 muestra la secuencia de un Factor VII quimérico ilustrativo de la presente invención, que comprende la señal, pro péptido, y dominios EGF1 de Factor IX (subrayados), y el dominio GLA de la Proteína S (negrita) (sec. con núm. de ident.:2).

Descripción de la invención

La presente invención se describirá ahora más completamente de aquí en adelante. Esta invención puede, sin embargo, realizarse en formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las modalidades expuestas en la presente. Más bien, estas modalidades se proporcionan para que ésta descripción sea exhaustiva y completa, refleje completamente el alcance de la invención a aquellos con experiencia en la materia.

La terminología que se usa en la descripción de la invención en la presente es con el propósito de describir modalidades particulares y no se pretende que sean limitativas de la invención. Tal como se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "la" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se defina de cualquier otra forma, los términos (que incluyen los términos técnicos y científicos) que se usan en la presente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por alguien con experiencia en la técnica a la que pertenece esta invención. Se entenderá además que los términos, tales como los definidos en los diccionarios usados comúnmente, deben interpretarse como que tienen un significado que es consistente con su significado en el contexto de la presente solicitud y técnica relevante y no deben interpretarse en un sentido idealizado o excesivamente formal a menos que expresamente así se defina en la presente. La terminología que se usa en la descripción de la invención en la presente es con el propósito de describir modalidades particulares y no se pretende que sean limitativas de la invención.

Además como se usa en la presente, "y/o" se refiere a y abarca cualquiera y todas las posibles combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

A menos que el contexto se indique de cualquier otra forma, se pretende específicamente que las diversas características de la invención descritas en la presente se puedan usar en cualquier combinación.

Además, la presente invención también contempla que en algunas modalidades de la invención, cualquier característica o combinación de las características que se exponen en la presente se pueden excluir u omitir. Para ilustrar, si la especificación declara que un complejo comprende los componentes A, B y C, se pretende específicamente que cualquiera de A, B o C, o una combinación de estos, se puede omitir y rechazar singularmente o en cualquier combinación.

Como se usa en la presente, la frase de transición " que consiste prácticamente en" (y variantes gramaticales), se debe interpretar como que abarca los materiales o etapas citados "y aquellos que no afectan materialmente la (s) característica (s) básica(s) y novedosa (s)" de la invención reivindicada. Ver, In re Herz, 537 F.2d 549, 551-52, 190 U.S.P.Q. 461, 463 (CCPA 1976) (énfasis en el original); ver además MPEP § 2111.03. Así, el término "que consiste prácticamente en" como se usa en la presente no debe interpretarse como equivalente a "que comprende".

El término "aproximadamente," como se usa en la presente cuando hace referencia a un valor medible tal como una cantidad o concentración y similares, significa abarcar variaciones de 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0.5 %, o aún 0.1 % de la cantidad especificada.

El término "actividad" como se usa en la presente significa la capacidad de un polipéptido del Factor VII para convertir su sustrato Factor X al Factor Xa activo.

- 5 El término "actividad inherente" incluye además la capacidad para generar trombina en la superficie de las plaquetas activadas en ausencia del factor tisular.

10 El término "dominio GLA N-terminal" incluye la secuencia de aminoácidos de aproximadamente el residuo de aminoácido 61 a aproximadamente el residuo de aminoácidos 105 de la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:18), la secuencia de aminoácidos de aproximadamente el residuo de aminoácido 47 a aproximadamente el residuo de aminoácidos 92 de la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:19, cualquier modificaciones post-traduccionales a las secuencias de aminoácidos identificadas, cualquier sustituciones de aminoácidos conservativas en las secuencias de aminoácidos identificadas, adición de residuos de aminoácidos a las secuencias de aminoácidos identificadas, deleciones de residuos de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos identificadas, o cualquier otra secuencia de aminoácidos de una proteína de la cascada de coagulación que se une a membranas de fosfolípidos.

15 El término "EGF-1" describe una región de 30-40 aminoácidos que contiene seis cisteínas encontradas originalmente en EGF (factor de crecimiento epidérmico) y en una variedad además de proteínas implicadas en la señalización celular y en las proteínas de coagulación, con casi todos los dominios tipo EGF conocidos que contienen enlaces disulfuro 1-3, 2-4 y 5-6. 20 El dominio EGF-1 del Factor VII es de aproximadamente el residuo de aminoácidos 106 a aproximadamente el residuo de aminoácidos 142 de la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18. El dominio EGF-1 del Factor IX es de aproximadamente el residuo de aminoácidos 93 a aproximadamente el residuo de aminoácidos 129 de la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:19. El dominio EGF-1 de la Proteína S es de aproximadamente el residuo de aminoácidos 117 a aproximadamente el residuo de aminoácidos 155 de la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de 25 ident.:20. Estas secuencias de aminoácidos pueden incluir cualquier modificaciones post-traduccionales a las secuencias de aminoácidos identificadas, cualquier sustituciones de aminoácidos conservativas en las secuencias de aminoácidos identificadas, cualquier adición de residuos de aminoácidos a las secuencias de aminoácidos identificadas y/o cualquier deleciones de residuos de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos identificadas.

30 El término "EGF-2" significa el segundo dominio tipo EGF en una serie (de dos o más dominios tipo EGF). El dominio EGF-2 del Factor VII es de aproximadamente el residuo de aminoácidos 147 a aproximadamente el residuo de aminoácidos 188 en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:18. El dominio EGF-2 del Factor IX es de aproximadamente el residuo de aminoácidos 130 a aproximadamente el residuo de aminoácidos 171 en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:19. El dominio EGF-2 de la Proteína S es de aproximadamente el residuo de aminoácidos 157 a 35 aproximadamente el residuo de aminoácidos 200 en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:20. Estas secuencias de aminoácidos pueden incluir cualquier modificaciones post-traduccionales a las secuencias de aminoácidos identificadas, cualquier sustituciones de aminoácidos conservativas en las secuencias de aminoácidos identificadas, cualquier adición de residuos de aminoácidos a las secuencias de aminoácidos identificadas y/o cualquier deleciones de residuos de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos identificadas.

40 El término "dominio catalítico", como se usa en la presente significa un dominio en una proteína que media la escisión de enlaces peptídicos. El dominio catalítico del Factor VII es de aproximadamente el residuo de aminoácidos 213 a aproximadamente el residuo de aminoácidos 452 en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:18. El dominio catalítico del Factor IX es de aproximadamente el residuo de aminoácidos 227 a aproximadamente el residuo de 45 aminoácidos 459 en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:19. Estas secuencias de aminoácidos pueden incluir cualquier modificaciones post-traduccionales a las secuencias de aminoácidos identificadas, cualquier sustituciones de aminoácidos conservativos en las secuencias de aminoácidos identificadas, cualquier adición de residuos de aminoácidos a las secuencias de aminoácidos identificadas y/o cualquier deleciones de residuos de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos identificadas.

50 La indicación de las tres letras "GLA" significa ácido 4-carboxiglutámico (γ -carboxiglutamato).

El término "dominio de proteasa" significa un dominio en una proteína que media la escisión de enlaces peptídicos, generalmente considerados que son de aproximadamente el residuo de aminoácido 213 al residuo de aminoácido carboxi 55 terminal de sec. con núm. de ident.:18. (la cadena pesada del Factor VIIa) El término "polipéptido del Factor VII", como se usa en la presente significa cualquier proteína que comprende la secuencia de aminoácidos 61-466 del Factor VII humano nativo (sec. con núm. de ident.: 18) o variantes o fragmentos de esta. Esto incluye pero sin limitarse al Factor VII humano, Factor VIIa humano y variantes de estos. El término "Factor VII" como se usa en la presente pretende comprender la

molécula del Factor VII zimógeno de una cadena inactivo, así como la molécula de Factor VII de doble cadena activada (Factor VIIa). Esto incluye proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos 61-466 (sec. con núm. de ident.: 18) del Factor VII o Factor VIIa nativo humano. Un experto en la técnica reconoce que cambios menores de secuencia se podrían esperar para realizar de manera similar y que los dominios, polipéptidos y Factor VII implicados podrían ser ligeramente acortados o alargados o contener sustituciones sin apartarse de la invención. Por lo tanto, la definición abarca además las proteínas y péptidos con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal modificado incluyendo deleciones o adiciones de aminoácidos N-terminal tal que en algunas modalidades las proteínas retienen sustancialmente la actividad de Factor VIIa (por ejemplo, retienen aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, etc., de la actividad del Factor VIIa nativo). El término "Factor VIIa," o "FVIIa" como se usa en la presente significa un producto que consiste en la forma activada (Factor VIIa). "Factor VII" o "Factor VIIa" dentro de la definición anterior incluye además las variaciones alélicas naturales que pueden existir y ocurrir de un individuo a otro. Además, el grado y lugar de la glicosilación u otras modificaciones post-traduccionales pueden variar dependiendo de las células huésped elegidas, tejido o especie animal de expresión y de la naturaleza del huésped celular, o el medio ambiente del tejido.

El término "dominio" como se usa en la presente pretende abarcar una parte de una secuencia de proteína y la estructura que puede evolucionar, funcionar y existir independientemente del resto de la cadena de proteína. Un dominio es capaz de formar una estructura tridimensional compacta y frecuentemente puede ser independientemente estable y plegada. Un dominio puede aparecer en una variedad de proteínas relacionadas evolutivamente. Los dominios varían en longitud de entre aproximadamente 25 aminoácidos hasta aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. Un "dominio" puede abarcar además un dominio de una proteína silvestre que ha tenido un residuo de aminoácido o residuos, sustituidos por sustitución conservativa. Debido a que son auto-estable en un medio de proteína, los dominios pueden ser "intercambiados" por ingeniería genética entre una proteína y otra para hacer proteínas quiméricas.

El término "variante" o "variantes", como se usa en la presente, pretende designar el Factor VII que tiene la secuencia de aminoácidos 61-466 (sec. con núm. de ident.:18) del Factor VII o Factor VIIa humano nativo, en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han sustituido por otro aminoácido y/o en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han suprimido y/o en donde uno o más aminoácidos se han insertado en la proteína y/o en donde uno o más aminoácidos se han añadido a la proteína parental y/o en donde el dominio GLA se ha sustituido con dominio GLA de una proteína diferente (por ejemplo, dominio GLA que se une a membranas plaquetarias o membranas de fosfolípido) y/o en donde el dominio GLA se ha sustituido con un dominio de unión de plaquetas de una proteína diferente (por ejemplo, el dominio A1 del Factor von Willebrand, que es el sitio de unión principal para la glicoproteína plaquetaria Ib (Emsley y otros, JBC, 273:10396-10401 (1998)) y el fragmento Fab (dominio) de los anticuerpos que se une a las proteínas de membrana de plaquetas y/o receptores, tales como un anticuerpo que se une a los fosfolípidos de membrana de plaquetas (Out y otros, Blood, 77:2655-2659 (1991)) y/o en donde el dominio EGF-1 del Factor VII se ha sustituido con un dominio EGF-1 de una proteína diferente (por ejemplo, un dominio EGF-1 que se une con menor afinidad al factor tisular, tal como el dominio EGF-1 del Factor IX). Tal adición puede tener lugar ya sea en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la proteína parental o ambos, así como internamente. Por lo tanto, en algunas modalidades la "variante" o "variantes" de esta invención todavía pueden tener actividad de coagulación de FVII en su forma activada. En algunas modalidades, la variante o variantes de esta invención pueden no tener actividad de coagulación.

Por lo tanto, en algunas modalidades, una variante es al menos, 40 %, 50 %, 60 % o 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 61-466 (sec. con núm. de ident.:18) del Factor VII o Factor VIIa humano nativo. Por ejemplo, el dominio EGF-1 de FVII tiene 65.7 % de identidad con el dominio EGF-1 de FIX y el dominio GLA de FVII tiene 58.6 % de identidad con el dominio GLA de FIX y 51 % de identidad con el dominio GLA de la proteína S. En una modalidad una variante es al menos 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 61-466 (sec. con núm. de ident.:18) del Factor VII o Factor VIIa humano nativo. En otra modalidad una variante es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 61-466 (sec. con núm. de ident.:18) del Factor VII o Factor VIIa humano nativo. En una modalidad adicional una variante es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 61-466 (sec. con núm. de ident.:18) del Factor VII o Factor VIIa humano nativo.

El término "cualquier otro aminoácido" como se usa en la presente significa un aminoácido que es diferente de ese ácido presente de forma natural en esa posición. Esto incluye pero sin limitarse a los aminoácidos que se pueden codificar por un polinucleótido. Preferentemente el aminoácido diferente está en la forma L natural y se puede codificar por un polinucleótido. Un ejemplo específico es L-cisteína (Cys).

Como se usa en la presente, el término "operablemente enlazado" se refiere a la unión covalente de dos o más secuencias de nucleótidos, por medio de ligación enzimática o de cualquier otra forma, en una configuración respecto a otra tal que se puede realizar la función normal de las secuencias. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica una presecuencia o líder secretor se enlaza operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido si se expresa

como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido: un promotor o potenciador se enlaza operablemente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia de interés; un sitio de unión a ribosoma se enlaza operablemente a una secuencia codificante si se sitúa para facilitar la traducción a la proteína o péptido de interés. Generalmente, "operablemente enlazado" significa que las secuencias de nucleótidos que se unen son contiguas y en el caso de un líder secretor, contiguo y en fase de lectura. El enlace se logra más fácilmente mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se usan después los adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o enlazadores, junto con métodos estándar de ADN recombinante.

El término "vector," como se usa en la presente, significa cualquier entidad de ácido nucleico capaz de la amplificación en una célula huésped. Por lo tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el cromosoma (s) en que ha sido integrado. La elección del vector dependerá frecuentemente de la célula huésped en la que se introducirá. Los vectores incluyen, pero sin limitarse a vectores plasmídicos, vectores de fagos, virus o vectores cósmidos. Los vectores normalmente contienen un origen de replicación y al menos un gen seleccionable, es decir, un gen que codifica un producto que es fácilmente detectable o cuya presencia es esencial para el crecimiento celular.

El término "célula huésped", como se usa en la presente, representa cualquier célula, que incluyen células híbridas, en las que se puede expresar el ADN heterólogo. Las células huésped típicas incluyen, pero sin limitarse a células de insecto, células de levadura, células de mamífero, que incluyen células humanas, tales como la BHK, CHO, HEK, y células COS. En la práctica de la presente invención, las células huésped que se cultivan son preferentemente células de mamífero, con mayor preferencia una línea celular de mamífero establecida, que incluyen, sin limitarse a, líneas celulares CHO (por ejemplo, ATCC CCL 61), COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), riñón de hámster bebé (BHK) y HEK293 (por ejemplo, ATCC CRL 1573; Graham y otros, J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Una línea celular BHK adecuada es la línea celular BHK tk^{ts13} (Waechter y Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982), de aquí en adelante referida como células BHK 570. La línea celular BHK 570 está disponible en la Colección Americana de Cultivo Tipo, 10801 Universidad, Boulevard, Manassas, Virginia. 20110, bajo el número de acceso a la ATCC CRL 10314. Una línea celular tk- ts13 BHK está disponible además en la ATCC con el número de acceso CRL 1632. Otras líneas de células adecuadas se incluyen, sin limitarse a, células Rat Hep I (Hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (Hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), Pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) y DUKX (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 77:4216-4220, 1980). Además son útiles las células 3T3, células de Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células.

Como se usa en la presente el término "medio de crecimiento adecuado" significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células y la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido del Factor VII de la invención. .

El término "conjugado" (o indistintamente "polipéptido conjugado") pretende indicar una molécula heterogénea (en el sentido de compuesta o quimérica) formada por la unión covalente de uno o más polipéptido (s) a una o más porciones no polipeptídicas tales como moléculas poliméricas, compuestos lipofílicos, porciones de azúcar o agentes de derivación orgánicos. Preferentemente, el conjugado es soluble a concentraciones y condiciones relevantes, es decir, soluble en fluidos fisiológicos tales como la sangre. Los ejemplos de polipéptidos conjugados de la invención incluyen polipéptidos glicosilados y/o PEGilados.

El término "unión covalente" significa que la porción de polipéptido y no-polipéptido se unen ya sea covalentemente directamente uno con otro, o bien se unen covalentemente indirectamente uno con otro a través de una porción o porciones de intervención, tales como un puente, separador, o porción o porciones de enlace. El término "polipéptido no-conjugado" puede usarse para referirse a la parte de polipéptido del conjugado.

Cuando se usa en la presente descripción, el término "porción no-polipéptido" se refiere a una molécula que es capaz de conjugarse a un grupo de unión del polipéptido de la invención. Ejemplos adecuados de tales moléculas incluyen moléculas de polímeros, porciones de azúcar, compuestos lipofílicos, o agentes de derivación orgánica. Cuando se usa en el contexto de un conjugado de la invención se entenderá que la porción no-polipéptido se enlaza a la parte de polipéptido del conjugado a través de un grupo de unión del polipéptido. Como explicado anteriormente, la porción no-polipéptido se puede unir covalentemente directamente al grupo de unión, o se puede unir covalentemente indirectamente al grupo de unión a través de una porción o porciones de intervención, tales como un puente, separador, o porción o porciones de enlace.

La "molécula de polímero" es una molécula formada por el enlace covalente de dos o más monómeros, en donde ninguno de los monómeros es un residuo de aminoácido, excepto donde el polímero es albúmina humana u otra proteína plasmática abundante. El término "polímero" puede usarse de forma intercambiable con el término "molécula de polímero." El término

Una molécula de carbohidrato unida por glicosilación *in vivo*, tales como N- o O-glicosilación (como se describe adicionalmente más abajo) se refiere en la presente descripción como una "porción de azúcar." Excepto cuando el número de porciones no-polipéptido, tales como molécula(s) de polímero(s) o porciones de azúcar en el conjugado se indiquen especialmente en cada referencia con "una porción no-polipéptido" contenida en un conjugado o de cualquier otra forma usada en la presente invención será una referencia con una o más porciones no-polipéptido, tales como molécula(s) de polímero(s) o porciones de azúcar.

El término "grupo de unión" pretende indicar un grupo funcional del polipéptido, particularmente de un residuo de aminoácido del mismo o una porción de carbohidrato, capaz de unir una porción no-polipéptido tales como a molécula de polímero, una molécula lipofílica, una porción de azúcar o un agente de derivación orgánica.

En la N-glicosilación *in vivo*, el término "grupo de unión" se usa en un sentido no convencional para indicar los residuos de aminoácidos que constituyen un sitio de N-glicosilación (con la secuencia N-X-S/T/C, en donde X es cualquier residuo de aminoácido excepto prolina, N es asparagina y S/T/C es ya sea serina, treonina o cisteína, preferentemente serina o treonina, y con la máxima preferencia treonina). Aunque el residuo de asparagina del sitio de N-glicosilación es aquel al cual se une el resto de azúcar durante la glicosilación, tal unión no puede lograrse a menos que estén presentes los otros residuos de aminoácidos del sitio de N-glicosilación.

Como consecuencia, cuando la porción no-polipéptido es una porción de azúcar y la conjugación se debe lograr por N-glicosilación, el término "residuo de aminoácido que comprende un grupo de unión para la porción no polipéptido" cuando se usa en relación con las alteraciones de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés se debe entender que significa que uno o más residuos de aminoácidos que constituyen un sitio de N-glicosilación se deben modificar tal que sea un sitio de N-glicosilación funcional que se introduzca en la secuencia de aminoácidos o se elimine de dicha secuencia.

En el presente contexto, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a incluir tanto el control y/o prevención de un sangrado esperado, tal como en la cirugía, y la regulación de un sangrado que está ocurriendo, tales como en un trauma o en el tratamiento de demanda para pacientes con hemofilia, con el propósito de inhibir o minimizar el sangrado. La administración profiláctica del polipéptido Factor VIIa de acuerdo con la invención se incluye de ese modo en el término "tratamiento."

El término "episodio de sangrado" incluye el sangrado incontrolable y excesivo. Los episodios de sangrado pueden ser un problema importante tanto en relación con la cirugía y otras formas de daño tisular. El sangrado incontrolable y excesivo puede ocurrir en personas que tienen un sistema de coagulación normal y sujetos que tienen trastornos de coagulación o de sangrado.

Como se usa en la presente el término "trastorno de sangrado" refleja todos los defectos, congénitos, adquiridos o inducidos, de origen celular, fisiológico, o molecular que se manifiesta en sangrados. Los ejemplos son las deficiencias del factor de coagulación (*por ejemplo*, hemofilia A y B o deficiencia de los Factores XI o VII de coagulación), inhibidores del factor de coagulación, función defectuosa de las plaquetas, trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand, o sangrado inducido por cirugía o trauma.

Sangrados excesivos ocurren además en sujetos con una cascada de coagulación de la sangre que funciona normalmente (sin deficiencias del factor de la coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de la coagulación) y pueden causarse por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. En tales casos, los sangrados pueden compararse con los sangrados causados por hemofilia porque el sistema hemostático, como en la hemofilia, carece o tiene "compuestos" esenciales de la coagulación anormales (tales como plaquetas o proteína del factor de von Willebrand), causando grandes sangrados. En sujetos que experimentan daño tisular extenso en asociación con la cirugía o trauma, el mecanismo hemostático normal se puede abrumar por la demanda de la hemostasia inmediata y puede desarrollar el sangrado a pesar de un mecanismo hemostático normal. El alcance de la hemostasia satisfactoria también es un problema cuando los sangrados ocurren en órganos tales como el cerebro, la región del oído interno y los ojos, con posibilidad limitada para la hemostasia quirúrgica. El mismo problema puede surgir en el proceso de toma de biopsias de

varios órganos (hígado, pulmón, tejido tumoral, tracto gastrointestinal) así como en la cirugía laparoscópica. Común para todas estas situaciones es la dificultad de proporcionar la hemostasia por técnicas quirúrgicas (sutura, clips, etc.), que también es el caso cuando el sangrado es difuso (gastritis hemorrágica y sangrado uterino profuso). Los sangrados agudos y profusos pueden ocurrir además en sujetos de tratamiento anticoagulante en los cuales se indujo una hemostasia defectuosa por la terapia dada. Tales sujetos pueden necesitar intervenciones quirúrgicas en caso de que el efecto anticoagulante tenga que ser rápidamente contrarrestado. La prostatectomía radical retropúbica es un procedimiento comúnmente realizado para los sujetos con cáncer de próstata localizado. La operación se complica con frecuencia por la pérdida de sangre significativa y, a veces masiva. La pérdida de sangre considerable durante la prostatectomía se relaciona principalmente con la situación anatómica complicada, con varios sitios densamente vascularizados que no son de fácil acceso para la hemostasia quirúrgica, y que pueden resultar en el sangrado difuso en un área grande. Además, la hemorragia intracerebral es la forma menos tratable de la apoplejía y se asocia con una alta mortalidad y crecimiento de hematoma las primeras horas siguientes a la hemorragia intracerebral. El tratamiento con rFVIIa pueden limitar el crecimiento del hematoma, reducir la mortalidad y mejorar los resultados funcionales en 90 días. Con los rFVIIa disponibles actualmente, sin embargo, existe el riesgo de eventos adversos de tromboembolismo. Las moléculas del Factor VII quimérico de la presente invención, con menor trombogenicidad, pueden superar este problema en la terapia de la apoplejía. Otra situación que puede causar problemas en el caso de la hemostasia insatisfactoria es cuando los sujetos con un mecanismo hemostático normal, se les da el tratamiento anticoagulante para prevenir la enfermedad tromboembólica. Tal terapia puede incluir heparina, otras formas de proteoglicanos, warfarina u otras formas de antagonistas de la vitamina K así como aspirina y otros inhibidores de la agregación plaquetaria.

En una modalidad de la invención, el sangrado se asocia con la hemofilia. En otra modalidad, el sangrado se asocia con la hemofilia con inhibidores adquiridos. En otra modalidad, el sangrado se asocia con trombocitopenia. En otra modalidad, el sangrado se asocia con la enfermedad de von Willebrand. En otra modalidad, el sangrado se asocia con daño tisular severo. En otra modalidad, el sangrado se asocia con trauma severo. En otra modalidad, el sangrado se asocia con cirugía. En otra modalidad, el sangrado se asocia con cirugía laparoscópica. En otra modalidad, el sangrado se asocia con gastritis hemorrágica. En otra modalidad, el sangrado es sangrado uterino profuso. En otra modalidad, el sangrado está ocurriendo en órganos con una posibilidad limitada para la hemostasia mecánica. En otra modalidad, el sangrado está ocurriendo en el cerebro, región del oído interno o los ojos. En otra modalidad, el sangrado se asocia con el proceso de toma de biopsias. En otra modalidad, el sangrado se asocia con terapia anticoagulante.

El término "sujeto" como se utiliza en la presente se pretende que signifique cualquier animal, particularmente mamíferos, tales como humanos, y puede, cuando sea adecuado, usarse de forma intercambiable con el término "paciente."

El término "mejoría del sistema hemostático normal" significa una mejoría de la capacidad para generar trombina o de generar un coágulo funcional.

El término "terapia génica" se refiere a un método para cambiar la expresión de un gen endógeno mediante la administración exógena de un gen. Como se utiliza en la presente, "terapia génica" se refiere a la sustitución del gen defectuoso que codifica una proteína defectuosa, o sustitución de un gen ausente, mediante la introducción de un gen funcional correspondiente al gen defectuoso o ausente en las células somáticas o madre de un individuo que lo necesita. La terapia génica se puede lograr mediante métodos *ex vivo*, en los cuales las células madre somáticas o diferenciadas se eliminan del cuerpo del individuo, seguido de la introducción de una copia normal del gen defectuoso en las células explantadas usando un vector viral como el vehículo de suministro de genes. Adicionalmente, las tecnologías de transferencia génica directa *in vivo* permiten la transferencia génica en las células en el individuo *in situ* usando un amplio intervalo de vectores virales, liposomas, complejos de proteína ADN o ADN desnudo para lograr un resultado terapéutico. El término "terapia génica" se refiere además a la sustitución de un gen defectuoso que codifica una proteína defectuosa mediante la introducción de un polinucleótido que funciona sustancialmente similar al gen o proteína defectuosos que deben funcionar si no fueran defectuosos en las células somáticas o madre de un individuo que lo necesita.

En la presente invención, la terapia génica se emplea en el contexto de administrar a un sujeto una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un FVII quimérico de esta invención. Por lo tanto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de FVII quimérico de esta invención. Una molécula de ácido nucleico de este tipo se puede presentar en un constructo de ácido nucleico (por ejemplo, un vector o plásmido). Un constructo de ácido nucleico de este tipo puede presentarse en una célula. En la presente descripción se proporciona además un método para suministrar una proteína de FVII quimérico de esta invención a una célula, que comprende introducir en la célula una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de FVII quimérico bajo condiciones en las que se expresa

la secuencia de nucleótidos para producir la proteína de FVII quimérico en la célula. La célula puede ser una célula que se introduce en un sujeto y/o la célula puede ser una célula ya presente en el sujeto.

Preparación del Factor VII quimérico

Los polipéptidos del factor VII quimérico descritos en la presente se pueden producir por medio de técnicas de ácido nucleico recombinante. Generalmente, una secuencia de ácido nucleico del factor VII silvestre clonado se modifica para codificar la proteína deseada. Esta secuencia modificada se inserta después en un vector de expresión, que es a su vez transformado o transfectado en las células huésped. Las células eucariotas superiores, particularmente las células de mamífero cultivadas, son adecuadas como células huésped. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos completa para el Factor VII humano son conocidas (ver patente de los EE.UU. núm. 4,784,950, donde se describe la clonación y expresión del Factor VII recombinante humano, y núms. de acceso de GenBank® J02933 y AAA51983 y núm. de acceso de SwissProt P08709-1) y la secuencia de aminoácidos se proporciona en la presente como sec. con núm. de ident.:18. La secuencia del Factor VII bovino se describe en Takeya y otros, J. Biol. Chem. 263:14868-14872 (1988)). Las secuencias completas de nucleótidos y aminoácidos para el Factor IX se conocen (ver Davie y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1982; 79:6461-6464; Jaye y otros, Nucleic Acids Res. 1983; 11:2325-2335; y, McGraw y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1985; 82:2847-2851 y GenBank® Núms. de acceso J00136 y AAA98726 y SwissProt núm. de acceso P00740) y la secuencia de aminoácidos se proporciona en la presente descripción como la sec. con núm. de ident.:19; ya que son secuencias completas de nucleótidos y aminoácidos para la Proteína S (ver Hoskins y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987; 84:349-353 y GenBank® Núms. de acceso M15036 y AAA36479 y SwissProt núm. de acceso P07225) y las secuencias de aminoácidos se proporciona en la presente descripción como la sec. con núm. de ident.:20. Las secuencias completas de nucleótidos y aminoácidos para otras proteínas de coagulación se pueden conocer y ver además usando SwissProt o en la página web de NCBI.

Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos pueden llevarse a cabo mediante una variedad de técnicas. La modificación de la secuencia de ácido nucleico puede ser por sitio específico, mutagénesis. Las técnicas para la mutagénesis sitio-específica son bien conocidas en la técnica y se describen en, por ejemplo, Zoller y Smith (DNA 3:479-488, 1984) o "Splicing by extension overlap", Horton y otros, Gene 77, 1989, págs. 61-68. Por lo tanto, usando las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del Factor VII, se puede introducir la alteración(es) de elección. Del mismo modo, los procedimientos para preparar un constructo de ADN usando la reacción en cadena de la polimerasa usando iniciadores específicos son bien conocidos por las personas expertas en la técnica (ver, PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, Calif., Estados Unidos). Además, los polipéptidos del factor VII quimérico de la presente invención se pueden preparar mediante la introducción de sitios de restricción únicos en las secuencias de nucleótidos que codifican varios polipéptidos, que se pueden usar para aislar fragmentos de secuencias de nucleótidos que codifican los dominios enteros de varios polipéptidos. Posteriormente, estas varias secuencias de nucleótidos se pueden recombinar para producir los varios polipéptidos de Factor VII quimérico de la presente invención.

Por ejemplo, los sitios de restricción únicos se pueden introducir en las secuencias de nucleótidos que codifican varias proteínas de la coagulación tal que los dominios GLA, EGF-1, EGF-2 y catalíticos pueden intercambiarse libremente entre las varias proteínas de la coagulación. El dominio EGF-1 puede rotar libremente alrededor del dominio EGF-2, (Pike y otros Proc Natl. Acad. Sci. 1999; 96:8925-8930) mientras que, los dominios GLA y EGF-1 no pueden rotar libremente alrededor uno del otro cuando el calcio está presente (Sunnerhagen y otros Nature Structural Biology 1995; 2:504-509). En esta modalidad, los dominios GLA y EGF-1 pueden ser de la misma proteína de la coagulación, pero de una proteína diferente a la de los dominios EGF-2 y catalíticas. Los polipéptidos del Factor VIIa quimérico de la presente invención, pueden comprender por lo tanto los dominios de cualquiera de las proteínas de la coagulación, proporcionando al menos que 50 % de un dominio sea un dominio Factor VII. Más aun, los polipéptidos del Factor VIIa quimérico de la presente invención pueden incluir dominios GLA y EGF-1 a partir de la misma proteína, o de diferentes proteínas.

El constructo de ácido nucleico que codifica los polipéptidos del Factor VII quimérico de la invención puede ser adecuadamente de origen genómico o ADNc, por ejemplo obtenido mediante la preparación de una genoteca genómica o de ADNc y la detección de secuencias de ADN que codifican para todo o parte de varios polipéptidos mediante hibridación usando sondas de oligonucleótidos sintéticas de acuerdo con técnicas estándar (ver, Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

El constructo de ácido nucleico que codifica los polipéptidos del Factor VII quimérico se puede preparar también sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859-1869, o el método descrito por Matthes y otros, EMBO Journal 3 (1984), 801-805. De acuerdo con el método de fosfoamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, purifican, hibridan, ligan y clonan en vectores adecuados.

Además, el constructo de ácido nucleico puede ser mixto de origen sintético y genómico, mixto de origen sintético y ADNc o mixto genómico y ADNc preparados mediante la ligación de fragmentos de origen sintético, genómico o ADNc (según sea apropiado), los fragmentos correspondientes a varias partes del constructo de ácido nucleico íntegro, de acuerdo con técnicas estándar.

Secuencias de ADN para uso en la producción de los polipéptidos del Factor VII quimérico de acuerdo con la presente invención típicamente codificarán un pre-pro polipéptido en el amino-terminal del factor VII para lograr el procesamiento postraduccional adecuado (por ejemplo, gamma-carboxilación de los residuos de ácido glutámico) y secreción de la célula huésped. El pre-pro polipéptido puede ser el del factor VII u otra proteína de plasma dependiente de la vitamina K, tales como Factor IX, Factor X, protrombina, proteína C o proteína S. Como se apreciará por los expertos en la técnica, pueden hacerse modificaciones adicionales en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos del Factor VII quimérico donde las modificaciones no dañarán significativamente la capacidad de la proteína para actuar como coagulante.

Los vectores de expresión para uso en la expresión de las variantes del Factor VIIa comprenderán un promotor capaz de dirigir la transcripción de un gen clonado o ADNc. Los promotores adecuados para uso en células de mamífero cultivadas incluyen promotores virales y promotores celulares. Los promotores virales incluyen el promotor SV40 (Subramani y otros, Mol. Cell. Biol. 1:854-864, 1981) y el promotor CMV (Boshart y otros, Cell 41:521-530, 1985). Un promotor viral particularmente adecuado es el principal promotor tardío de adenovirus 2 (Kaufman y Sharp, Mol. Cell. Biol. 2:1304-1319, 1982). Otro promotor particularmente preferible es el promotor del factor de elongación 1-alfa de hámster chino (CHEF1). Los promotores celulares incluyen el promotor del gen kappa de ratón (Bergman y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7041-7045, 1983) y el promotor de ratón V_H (Loh y otros, Cell 33:85-93, 1983). Un promotor celular particularmente adecuado es el promotor de la metalotioneína-I de ratón (Palmiter y otros, Science 222:809-814, 1983). Los vectores de expresión pueden contener además un conjunto de sitios de empalme de ARN situado corriente abajo del promotor y corriente arriba del sitio de inserción para la secuencia del Factor VII quimérico en sí. Los sitios de empalme de ARN adecuados se pueden obtener a partir de genes de adenovirus y/o inmunoglobulina. Además contenidos en los vectores de expresión está una señal de poliadenilación situada corriente abajo del sitio de inserción. Particularmente las señales de poliadenilación adecuadas incluyen la señal de poliadenilación temprana o tardía de SV40 (Kaufman y Sharp), la señal de poliadenilación de la región de adenovirus 5 Elb, el terminador del gen de la hormona de crecimiento humana (DeNoto y otros Nucl. Acids Res. 9:3719-3730, 1981) o la señal de poliadenilación del gen del factor VII humano o el gen del Factor VII bovino. Los vectores de expresión puede incluir además una secuencia viral líder no codificante, tal como el líder tripartito de adenovirus 2, situada entre el promotor y los sitios de empalme de ARN; y las secuencias potenciadoras, tal como el potenciador de SV40.

Secuencias de ADN clonadas se introducen en células de mamífero cultivadas mediante, por ejemplo, transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler y otros, Cell 14:725-732, 1978; Corsaro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603-616, 1981; Graham y Van der Eb, Virology 52d:456-467, 1973) o electroporación (Neumann y otros, EMBO J. 1:841-845, 1982). Para identificar y seleccionar células que expresen el ADN exógeno, un gen que confiere un fenotipo seleccionable (un marcador seleccionable) se introduce generalmente en las células junto con el gen o ADNc de interés. Los marcadores seleccionables adecuados incluyen genes que confieren resistencia a fármacos tales como neomicina, higromicina, y metotrexato. El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. El marcador seleccionable amplificable adecuado es una secuencia de dihidrofolato reductasa (DHFR). Otro marcador seleccionable adecuado es histidinol. Los marcadores seleccionables se revisan en Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass.) La persona experta en la técnica será capaz de elegir fácilmente los marcadores seleccionables adecuados.

Los marcadores seleccionables pueden introducirse en la célula en un plásmido separado al mismo tiempo que el gen de interés, o pueden introducirse en el mismo plásmido. Si en el mismo plásmido, el marcador seleccionable y el gen de interés pueden estar bajo el control de diferentes promotores o el mismo promotor, el último arreglo produce un mensaje dicistrónico. Las construcciones de este tipo son conocidas en la técnica (por ejemplo, Levinson y Simonsen, patente de los EE.UU. núm. 4,713,339). Puede ser ventajoso además añadir ADN adicional, conocido como "ADN portador," a la mezcla que se introduce en las células.

Después que las células tomaron el ADN, se cultivan en un medio de crecimiento adecuado, típicamente durante 1-2 días, para empezar a expresar el gen de interés. El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el cultivo de las células huésped, tales como medios mínimos o complejos que contienen suplementos adecuados. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar de acuerdo con las recetas publicadas (por ejemplo, en catálogos de la Colección Americana de Cultivo Tipo). Los medios se preparan usando procedimientos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, las referencias para bacteria y levadura; Bennett, J. W. y LaSure,

L., editores, *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991). El medio de crecimiento generalmente incluye una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, azúcares esenciales, vitaminas, sales, fosfolípidos, proteínas y factores de crecimiento. Para la producción de polipéptidos del Factor VII quimérico gamma-carboxilados, el medio contendrá vitamina K, preferentemente a una concentración de aproximadamente 0.1 ng/ml a aproximadamente 20 µg/ml. La selección del fármaco se aplica después de seleccionar durante el crecimiento de las células aquellas que expresan el marcador seleccionable de una manera estable. Para las células que se transfectaron con un marcador seleccionable amplificable la concentración del fármaco puede aumentarse para seleccionar un mayor número de copias de las secuencias clonadas, incrementando de ese modo los niveles de expresión. Los clones de células establemente transfectadas se tamizan después para la expresión del polipéptido del Factor VII quimérico deseado.

Las líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen las líneas celulares CHO (ATCC CCL 61), COS-1 (ATCC CRL 1650), riñón de hámster bebé (BHK) y 293 (ATCC CRL 1573; Graham y otros, *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977). Una línea celular BHK adecuada es la línea celular BHK tk.sup.-ts13 (Waechter y Baserga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1106-1110, 1982), de aquí en adelante referida como células BHK 570. La línea celular BHK 570 está disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Dr., Manassas, Va. 20852, bajo el número de acceso a la ATCC CRL 10314. Una línea celular BHK tk^{-ts13} está disponible además bajo el número de acceso a la ATCC CRL 1632. Además, se puede usar un número de otras líneas celulares, incluyendo células Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) y DUKX (Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 77:4216-4220, 1980).

Los polipéptidos del factor VII quimérico de la invención se pueden conjugar para prolongar la vida media del polipéptido *in vivo*. Tal conjugación puede disminuir el aclaramiento renal y aumentar la cantidad de Factor VII presente *in vivo*, mientras que disminuye la frecuencia de la administración de los polipéptidos del Factor VII quimérico. Los conjugados y métodos de preparación de polipéptidos del Factor VII conjugados adecuados se describen en la patente de los EE.UU. núm. 7,442,524.

Animales Transgénicos

La tecnología de animales transgénicos se puede emplear para producir los polipéptidos del Factor VII quimérico de la invención. Se prefiere producir, las proteínas dentro de las glándulas mamarias de un mamífero hembra huésped. La expresión en la glándula mamaria y secreción posterior de la proteína de interés en la leche supera muchas dificultades encontradas en el aislamiento de proteínas de otras fuentes. La leche se recoge fácilmente, está disponible en grandes cantidades, y bioquímicamente bien caracterizada. Además, las principales proteínas de la leche están presentes en la leche a altas concentraciones (típicamente aproximadamente de 1 a 15 g/l). Los polipéptidos del factor VII quimérico de la presente invención se pueden producir además en la orina de un animal huésped, que tiene la ventaja sobre la producción en la leche de que tanto machos como hembras producen orina y que hay menos proteínas en la orina que en la leche para fines de aislamiento.

Desde un punto de vista comercial cuando se considera el uso de la leche como fuente de polipéptidos del factor VII quimérico de la presente invención, es claramente preferible usar como huésped una especie que tenga una gran producción de leche. Mientras que los animales más pequeños tales como ratones y ratas pueden usarse (y se prefieren en la prueba de la etapa del principio), se prefiere el uso de mamíferos de ganado incluyendo, pero sin limitarse a, cerdos, cabras, ovejas y ganado vacuno. Las ovejas son particularmente adecuadas debido a factores tales como la historia previa a la transgénesis en estas especies, producción de leche, costo y disponibilidad de equipo para la recogida de la leche de oveja (ver, por ejemplo, Publicación PCT núm. WO 88/00239 para una comparación de los factores que influyen en la elección de las especies huésped). En general, es deseable seleccionar una raza de animal huésped que se ha criado para uso diario, tal como oveja de Frisia Oriental, o para introducir materia prima diaria en la cría de la línea transgénica en una fecha posterior. En cualquier caso, se deben usar animales de estado de salud conocido, bueno.

Para obtener la expresión en la glándula mamaria, se utiliza un promotor de la transcripción de un gen de proteína de leche. Los genes de la proteína de la leche incluyen los genes que codifican las caseínas (ver patente de los EE.UU. núm. 5,304,489), beta-lactoglobulina, a-lactoalbúmina, y proteína ácida del suero de la leche. El promotor de beta-lactoglobulina (BLG) es adecuado. En el caso del gen de la beta-lactoglobulina ovina, se usará generalmente una región de al menos el proximal de 406 pb de la secuencia de flanco 5' del gen, aunque porciones más grandes de la secuencia de flanco 5', hasta aproximadamente 5 kpb, son adecuadas, tal como segmento de ADN de aproximadamente 4,25 kpb que abarca el promotor de flanco 5' y la porción no codificante del gen de la beta-lactoglobulina (ver Whitelaw y otros, *Biochem. J.* 286: 31-39 (1992)). Los fragmentos similares de ADN promotor de otras especies también son adecuados.

Para obtener la expresión en orina, se usa un promotor específico del urotelio. Por ejemplo, se puede usar un promotor que conduce la expresión de genes relacionados con la uroplaquina. (Ver, por ejemplo, patente de los EE.UU. núm. 6,001,646).

5 Otras regiones del gen de la beta-lactoglobulina se pueden incorporar además en las construcciones, como pueden regiones genómicas del gen que se expresa. Se acepta generalmente en la técnica que las construcciones que carecen de intrones, por ejemplo, expresan pobremente en comparación con las que contienen tales secuencias de ADN (ver Brinster y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 836-840 (1988); Palmiter y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 478-482 (1991); Whitelaw y otros, Transgenic Res. 1: 3-13 (1991); publicación PCT núm. WO 89/01343; y publicación PCT núm. WO 10 91/02318). En este sentido, generalmente se prefiere, siempre que sea posible, usar secuencias genómicas que contienen adicional de al menos algunos intrones de, *por ejemplo*, el gen de la beta-lactoglobulina, se prefiere. Una de región de este tipo es un segmento de ADN que proporciona para el empalme de intrón y poliadenilación del ARN de la región no codificante 3' del gen de la beta-lactoglobulina ovina. Cuando se sustituye en las secuencias no codificantes 3' naturales de 15 un gen, este segmento de beta-lactoglobulina ovina puede tanto mejorar como estabilizar los niveles de expresión de la proteína o polipéptido de interés. En otras modalidades, la región que rodea la iniciación ATG de la secuencia del Factor VII quimérico se sustituye con secuencias correspondientes de un gen de proteína específica de la leche. La sustitución de este tipo proporciona un medio ambiente de iniciación potencial tejido-específica para mejorar la expresión. Es conveniente sustituir el Factor VII quimérico íntegro pre-pro y las secuencias no-codificantes 5' con las de, *por ejemplo*, el gen BLG, 20 aunque las regiones más pequeñas se pueden sustituir.

Para la expresión de los polipéptidos del FVIIa quimérico en animales transgénicos, un segmento de ADN que codifica el Factor VIIa quimérico se enlaza operablemente a los segmentos de ADN adicionales requeridos para su expresión para 25 producir unidades de expresión. Segmentos adicionales de este tipo incluyen el promotor mencionado anteriormente, así como las secuencias que proporcionan para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. Las unidades de expresión incluirán además un segmento de ADN que codifica una secuencia señal secretora enlazada operablemente al segmento que codifica el Factor VIIa quimérico. La secuencia señal secretora puede ser una secuencia de señal secretora del factor VII nativo o puede ser de otra proteína, tal como una proteína de leche (ver, *por ejemplo*, von Heijne, Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986); y Meade y otros, patente de los EE.UU. núm. 4,873,316.) 30

La construcción de las unidades de expresión para su uso en animales transgénicos se lleva cabo convenientemente mediante la inserción de una secuencia del Factor VII quimérico en un vector de plásmido o fago que contiene los segmentos de ADN adicionales, aunque la unidad de expresión se puede construir esencialmente por cualquier secuencia de ligaduras. Es particularmente conveniente proporcionar un vector que contiene un segmento de ADN que codifica una 35 proteína de la leche y sustituir la secuencia codificante para la proteína de la leche con la de un polipéptido del Factor VII quimérico; creando por lo tanto una fusión génica que incluye las secuencias de control de la expresión del gen de la proteína de la leche. En cualquier caso, la clonación de las unidades de expresión en plásmidos u otros vectores facilita la amplificación de la secuencia del Factor VII quimérico. La amplificación se lleva a cabo convenientemente en células huésped bacterianas (*por ejemplo*, *E. coli*), por lo que los vectores incluirán típicamente un origen de replicación y un marcador seleccionable funcional en células huésped bacterianas. La unidad de expresión se introduce después en huevos fertilizados (incluyendo embriones de etapa temprana) de las especies huésped elegidas. La introducción de ADN heterólogo se puede lograr por una de varias rutas, incluyendo la microinyección (*por ejemplo*, patente de los EE.UU. núm. 4,873,191), infección retroviral (Jaenisch, Science 240: 1468-1474 (1988)) o integración de sitio dirigida con células madre embrionarias (ES) (revisado por Bradley y otros, Bio/Technology 10: 534-539 (1992)). Los huevos se implantan entonces en 40 los oviductos o úteros de hembras pseudoembarazadas y se les permite desarrollar a término. Las crías que llevan el ADN introducido en su línea germinal pueden transmitir el ADN a su progenie de la manera normal, mendeliana, lo que permite el desarrollo de los rebaños transgénicos. Los procedimientos generales para producir animales transgénicos son conocidos en la técnica (ver, *por ejemplo*, Hogan y otros, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simons y otros, Bio/Technology 6: 179-183 (1988); Wall y otros, Biol. Reprod. 32: 645-651 (1985); Buhler y otros, Bio/Technology 8: 140-143 (1990); Ebert y otros, Bio/Technology 9: 835-838 (1991); Krimpenfort y otros, Bio/Technology 9: 844-847 (1991); Wall y otros, J. Cell. Biochem. 49: 113-120 (1992); patente de los EE.UU. núm. 4,873,191; patente de los EE.UU. núm. 4,873,316; Publicación PCT núm. WO 88/00239, Publicación PCT núm. WO 50 90/05188, Publicación PCT núm. WO 92/11757; y Publicación de Gran Bretaña núm. GB 87/00458). Las técnicas para introducir secuencias de ADN extraño en los mamíferos y sus células germinales fueron desarrolladas originalmente en el ratón (ver, *por ejemplo*, Gordon y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384 (1980); Gordon y Ruddle, Science 214: 1244-1246 (1981); Palmiter y Brinster, Cell 41: 343-345 (1985); Brinster y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442 (1985); y Hogan y otros). Estas técnicas se adaptaron posteriormente para su uso con animales más grandes, incluyendo especies de ganado (ver, *por ejemplo*, Publicaciones PCT núms. WO 88/00239, WO 90/05188, y WO 92/11757; y Simons y 55

otros, Bio/Technology 6: 179-183 (1988)). En resumen, en la ruta más eficiente usada hasta la fecha en la generación de ratones o ganado transgénico, varios cientos de moléculas lineales de ADN de interés se inyectan en uno de los pro-núcleos de un huevo fertilizado de acuerdo con las técnicas establecidas. La inyección del ADN en el citoplasma de un cigoto se puede emplear también.

La producción en plantas transgénicas se puede emplear también. La expresión puede ser generalizada o dirigida a un órgano particular, tal como un tubérculo (ver, Hiatt, Nature 344:469-479 (1990); Edelbaum y otros, J. Interferon Res. 12:449-453 (1992); Sijmons y otros, Bio/Technology 8:217-221 (1990); y EP 0 255 378).

La producción de los polipéptidos del Factor VII quimérico de la presente invención se pueden lograr además mediante la traducción *in vitro* tales como por ejemplo por lisado de reticulocitos de conejo, extracto de germen de trigo y sistemas libre de células *E. coli*. La traducción *in vitro* se puede enlazar o acoplar además. La traducción enlazada *in vitro* se basa en la transcripción con una polimerasa del bacteriófago seguido por la traducción en los sistemas de lisado de reticulocitos de conejo o lisado de germen de trigo. La traducción *acoplada in vitro* se basa en el sistema libre de células *E. coli*.

Recuperación y activación

Los polipéptidos del factor VII quimérico de la invención se recuperan del medio de cultivo celular o leche. Los polipéptidos del factor VII quimérico de la presente invención se pueden purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromato enfoque, y exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectro enfoque preparativo (IEF), solubilidad diferencial (*por ejemplo*, precipitación con sulfato de amonio), o extracción (ver, *por ejemplo*, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989). La purificación adicional se puede lograr con instrumentos de purificación química convencionales, tal como la cromatografía líquida de alta resolución. Otros métodos de purificación, que incluyen precipitación con citrato bórico, se conocen en la técnica, y pueden aplicarse a la purificación de los nuevos polipéptidos del Factor VII quiméricos descritos en la presente descripción (ver, *por ejemplo*, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982).

Para fines terapéuticos se prefiere que los polipéptidos del Factor VII quimérico de la invención sean sustancialmente puros. Por lo tanto, en una modalidad de la invención las variantes del Factor VII de la invención se purifican hasta al menos aproximadamente 90 a 95 % de pureza, preferentemente hasta al menos aproximadamente 98 % de pureza. La pureza puede evaluarse mediante *por ejemplo*, electroforesis en gel, secuenciación de aminoácidos amino-terminal y HPLC en fase inversa.

El polipéptido Factor VII quimérico se escinde en su sitio de activación para convertirlo en su forma de dos cadenas. La activación puede llevarse a cabo de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos por Osterud, y otros, Biochemistry 11:2853-2857 (1972); Thomas, patente de los EE.UU. núm. 4,456,591; Hedner y Kisiel, J. Clin. Invest. 71:1836-1841 (1983); o Kisiel y Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73:29-42 (1983). Alternativamente, el polipéptido quimérico Factor VII puede activarse mediante la concentración del polipéptido quimérico Factor VII y en contacto con una superficie o resina cargada positivamente, *por ejemplo*, como se describe por Bjoern y otros. (Descripción de la investigación, 269 Septiembre 1986, págs. 564-565), Factor VII se puede activar pasándolo a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico, tal como Mono Q® (Pharmacia fine Chemicals) o similares. El polipéptido del Factor VII quimérico se puede activar además en solución mediante la obtención una solución que comprende una preparación sustancialmente purificada del polipéptido del Factor VII quimérico; adición a la solución un compuesto de amina, Ca^{2+} a una concentración final de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM (tales como de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM), y ajuste el pH final de la solución de aproximadamente 7.2 a 8.6 (tales como aproximadamente 7.6 a aproximadamente 8.2); incubación de la mezcla de activación resultante entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 25 °C durante una cantidad de tiempo suficiente para convertir al menos el 90 % del polipéptido del FVII quimérico en un polipéptido del FVIIa quimérico; y, opcionalmente, aislamiento del FVIIa de la mezcla de activación. El polipéptido Factor VII activado quimérico resultante puede formularse después y administrarse como se describe más abajo.

Terapia génica

Los polipéptidos del Factor VII quimérico de la invención pueden usarse en los métodos para tratar los trastornos del sangrado por vía de la terapia génica. En esta modalidad de la invención, los polipéptidos del Factor VII quimérico de la invención se codifican por moléculas de ácido nucleico que se pueden introducir en las células del sujeto por transferencia *ex vivo* o por transferencia *in vivo*.

Cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles en la técnica se puede utilizar según la presente invención. Los métodos ilustrativos se describen más abajo. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, ver Goldspiel y otros, *Clinical Pharmacy* 1993, 12:488-505; Wu y Wu, *Biotherapy* 1991, 3:87-95; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1993, 32:573-596; Mulligan, *Science* 1993, 260:926-932; y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 1993, 62:191-217; Mayo, *TIBTECH* 1993, 11:155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel y otros, (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; y en Capítulos 12 y 13, Dracopoli y otros, (eds.), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY; Colosimo y otros, *Biotechniques* 2000;29(2):314-8, 320-2, 324.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos del Factor VII quimérico se pueden insertar en un vector de clonación apropiado. Los vectores adecuados para terapia génica incluyen virus, tales como adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), vaccinia, herpesvirus, baculovirus y retrovirus, parvovirus, lentivirus, bacteriófagos, cósmidos, plásmidos, vectores fúngicos y otros vehículos de recombinación típicamente usados en la técnica que se han descrito para la expresión en una variedad de huéspedes eucariotas y procariotas, y pueden usarse para la terapia génica, así como para la expresión de proteínas simples.

En una modalidad, el vector es un vector viral. Los vectores virales, especialmente vectores adenovirales pueden ser un complejo con un anfífilo catiónico, tal como un lípido catiónico, poli-L-lisina (PLL), y dietilaminoetil-dextrano (DELAE-dextrano), que proporcionan eficacia de la infección viral de las células objetivo (Ver, por ejemplo, Publicación PCT núm. PCT/US97/21496 presentada el 20 de noviembre de 1997). Los vectores virales adecuados para uso en la presente invención incluyen vectores derivados de vaccinia, herpesvirus, AAV y retrovirus. Para un análisis de los vectores virales en la terapia génica, ver Mah y otros, *Clin. Pharmacokinet.* 2002; 41(12):901-11; Scott y otros, *Neuromuscul. Disord.* 2002;12 Suppl 1:S23-9.

En una modalidad, se usa un vector en el que las secuencias codificantes y cualesquiera otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de este modo la expresión del constructo de una molécula de ácido nucleico que se ha integrado en el genoma (Koller and Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86:8932-8935; Zijlstra y otros, *Nature* 1989, 342:435-438; patente de los EE.UU. núm. 6,244,113 de Zarlín y otros; y patente de los EE.UU. núm. 6,200,812 de Pati y otros.).

La entrega del vector en un paciente puede ser directa, en cuyo caso el paciente se expone directamente al vector o un complejo de entrega, o indirecta, en cuyo caso, las células se transforman primero con el vector *in vitro*, y después se trasplanta en el paciente. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* y *ex vivo*.

En una modalidad, el vector se administra directamente *in vivo*, donde entra en las células del sujeto y media en la expresión del gen. Esto se puede lograr por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica y discutidos anteriormente, *por ejemplo*, construyéndolo como parte de un vector de expresión apropiado y administrándolo de modo que se convierta en intracelular, *por ejemplo*, por infección usando un retroviral defectuoso o atenuado u otro vector viral (ver, patente de los EE.UU. núm. 4,980,286), o por inyección directa de ADN de desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (*por ejemplo*, una pistola de genes; Biolistic, Dupont); o revestimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en biopolímeros (por ejemplo, poli- β -1-64-N-acetilglucosamina polisacárido; ver la patente de los EE.UU. núm. 5,635,493), encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas; mediante la administración del mismo en unión a un péptido u otro ligando conocido para entrar en el núcleo; o mediante la administración del mismo en unión a un ligando sujeto a la endocitosis mediada por receptor (ver, *por ejemplo*, Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 1987, 262:4429-4432), etc. En otra modalidad, se puede formar un complejo ligando-ácido nucleico en el que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para interrumpir endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal, o péptidos 12-mer catiónicos, *por ejemplo*, derivados de antenapedia, que se puede usar para transferir ADN terapéutico a las células (Mi y otros, *Mol. Therapy* 2000, 2:339-47). En aún otra modalidad, el ácido nucleico puede ser dirigido *in vivo* para la absorción y expresión específica de la célula, dirigiendo un receptor específico (ver, *por ejemplo*, Publicaciones PCT núms. WO 92/06180, WO 92/22635, WO 92/20316 y WO 93/14188). Además, una técnica conocida como Magnetofection puede ser utilizado para entregar vectores de mamíferos. Esta técnica asocia los vectores con nanopartículas superparamagnéticas para la entrega bajo la influencia de campos magnéticos. Esta aplicación reduce el tiempo de administración y mejora la eficacia del vector (Scherer y otros, *Gene Therapy* 2002; 9:102-9).

En una modalidad, el ácido nucleico puede administrarse usando un portador lipídico. Los portadores lipídicos se pueden asociar con ácidos nucleicos desnudos (por ejemplo, ADN de plásmido) para facilitar el paso a través de membranas

celulares. Los lípidos catiónicos, aniónicos, o neutrales pueden usarse para este propósito. Sin embargo, lípidos catiónicos son adecuados porque se han demostrado asociarse mejor con el ADN que, generalmente, tiene una carga negativa. Los lípidos catiónicos han mostrado además mediar la entrega intracelular de ADN plásmido (Felgner y Ringold, *Nature* 1989; 337:387). La inyección intravenosa de complejos lípido catiónico-plásmido en ratones demostró resultar en la expresión del ADN en el pulmón (Brigham y otros, *Am. J. Med. Sci.* 1989; 298:278). Ver además, Osaka y otros, *J. Pharm. Sci.* 1996; 85(6):612-618; San y otros, *Human Gene Therapy* 1993; 4:781-788; Senior y otros, *Biochemica et Biophysica Acta* 1991; 1070:173-179; Kabanov y Kabanov, *Bioconjugate Chem.* 1995; 6:7-20; Liu y otros, *Pharmaceut. Res.* 1996; 13; Remy y otros, *Bioconjugate Chem.* 1994; 5:647-654; Behr, J-P., *Bioconjugate Chem* 1994; 5:382-389; Wyman y otros, *Biochem.* 1997; 36:3008-3017; la patente de los EE.UU. núm. 5,939,401 de Marshall y otros; patente de los EE.UU. núm. 6,331,524 de Scheule y otros

Los lípidos catiónicos incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. núm. 5,283,185; y por ejemplo, la patente de los EE.UU. núm. 5,767,099.) En una modalidad, el lípido catiónico es N_4 -spermina colestiril carbamato (GL-67) descrito en la patente de los Estados Unidos. núm. 5,767,099. Los lípidos adecuados adicionales incluyen N_4 -spermidina colestiril carbamato (GL-53) y 1-(N_4 -spermina)-2,3-dilaurylglicerol carbamato (GL-89).

Para la administración *in vivo* de vectores virales, un tratamiento inmunosupresor adecuado puede emplearse junto con el vector viral, *por ejemplo*, vector de adenovirus, para evitar inmuno-desactivación del vector viral y las células transfectadas. Por ejemplo, citocinas inmunosupresivas, tales como interleucina-12 (IL-12), interferón-gamma. (IFN-gamma.), o anticuerpo anti-CD4, pueden administrarse para bloquear las respuestas inmunes humorales o celulares a los vectores virales. En este sentido es ventajoso emplear un vector viral que se modifica para expresar un número mínimo de antígenos.

Las células somáticas pueden ser diseñados *ex vivo* con un constructo que codifica un polipéptido del Factor VII quimérico de la invención usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente, y re-implantado en un individuo. Este método se describe generalmente en la publicación PCT núm. WO 93/09222 de Selden y otros. Además, esta tecnología se usa en la tecnología ImPACT patentada de entrega basada en células, descrita en Payumo y otros, *Clin. Orthopaed, y Res. relacionadas*, 2002; 403S: S228-S242. En un sistema como la terapia génica, las células somáticas (por ejemplo, fibroblastos, hepatocitos, o células endoteliales) se eliminan del paciente, se cultivan *in vitro*, se transfectan con los genes de interés terapéutico caracterizados, y se reintroducen en el paciente. Tanto las células primarias (derivadas de un individuo o de tejidos y modificadas antes de los pases), y células secundarias (pases *in vitro* antes de la introducción *in vivo*) pueden usarse, así como también las líneas celulares inmortalizadas conocidos en la técnica. Las células somáticas útiles para los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a las células somáticas, tales como fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales, células endoteliales, hepatocitos, elementos formados de la sangre, células musculares, otras células somáticas que pueden ser cultivadas, y precursores de células somáticas. En una modalidad, las células son hepatocitos.

Los constructos que incluyen el polinucleótido que codifica los polipéptidos FVIIa quiméricos de la invención y, opcionalmente, los ácidos nucleicos que codifican un marcador seleccionable, junto con secuencias adicionales necesarias para la expresión del FVIIa quimérico en células primaria o secundarias del receptor, se usan para transfectar células primarias o secundarias en las que el producto codificado se va a producir. Dichos constructos incluyen pero sin limitarse a vectores infecciosos, tales como retrovirales, herpes, adenovirus, virus adeno-asociados, vectores de poliovirus y de paperas, se puede usar para este propósito.

La administración transdérmica es especialmente adecuada para la transferencia indirecta usando tipos de células de la epidermis incluyendo queratinocitos, melanocitos y células dendríticas (Pfutzner y otros, *Expert Opin. Investig. Drugs* 2000; 9:2069-83).

En una modalidad, el vector para la terapia génica es un virus adeno-asociado auto-complementario monocatenario. Adicionalmente, el virus adeno-asociado auto-complementario puede contener el potenciador del promotor de transtiretina pequeño, intrones del virus diminuto del ratón y la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino. El vector puede contener además la secuencia RKRRKR descrita por Margaritis y otros que provoca que el Factor VII se segregue en la forma activa, *por ejemplo*, Factor VIIa. (Margaritis y otros, *J. Clin. Invest.*, 2004; 113:1025-31).

Administración y composiciones farmacéuticas

Los polipéptidos del Factor VII quimérico de acuerdo con la presente invención puede usarse para controlar los trastornos de sangrado que tienen varias causas, tales como deficiencias del factor de coagulación (por ejemplo, hemofilia A y B o deficiencia de los factores de coagulación XI o VII) o inhibidores del factor de coagulación, o pueden usarse para controlar el

sangrado excesivo que ocurre en sujetos con una cascada de coagulación de la sangre que funciona normalmente (sin deficiencias de factor de coagulación o inhibidores contra cualquiera de los factores de coagulación). Los sangrados pueden ser causados por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. También pueden observarse en sujetos en los que se induce un aumento de la actividad fibrinolítica por diversos estímulos.

En los sujetos que experimentan daño tisular extenso en asociación con la cirugía o trauma, el mecanismo hemostático puede ser abrumado por la demanda de la hemostasia inmediata y estos pueden desarrollar sangrados a pesar de un mecanismo hemostático normal. El logro de la hemostasia satisfactoria también es un problema cuando se producen sangrados en órganos tales como el cerebro, la región del oído interno y los ojos y puede ser también un problema en los casos de sangrados difusos (gastritis hemorrágica y sangrado uterino profuso) cuando es difícil identificar la fuente. El mismo problema puede surgir en el proceso de tomar biopsias de varios órganos (hígado, pulmón, tejido tumoral, tracto gastrointestinal) así como en cirugía laparoscópica. Estas situaciones comparten la dificultad de proporcionar la hemostasis por técnicas quirúrgicas (suturas, grapas, etc.). Sangrados agudos y profusos también pueden ocurrir en sujetos con terapia anticoagulante en los cuales se induce una hemostasis defectuosa por la terapia dada. Tales sujetos pueden necesitar intervenciones quirúrgicas en caso de que el efecto anticoagulante tenga que ser contraatacado rápidamente. Otra situación que puede causar problemas en el caso de la hemostasis insatisfactoria es cuando los sujetos con un mecanismo hemostático normal, se les da terapia anticoagulante para prevenir la enfermedad tromboembólica. Dicha terapia puede incluir heparina, otras formas de proteoglicanos, warfarina u otras formas de antagonistas de vitamina K así como también aspirina y otros inhibidores de la agregación plaquetaria.

Para el tratamiento en relación con intervenciones deliberadas, los polipéptidos del Factor VII quiméricos de la invención se administrarán típicamente dentro de aproximadamente 24 horas antes de realizar la intervención, y tanto como 7 días o más después de esta. La administración de un coagulante puede ser por una variedad de vías como las descritas en la presente.

La dosis de los polipéptidos del Factor VII quiméricos están en el intervalo de aproximadamente 0.05 mg/día a aproximadamente 500 mg/día, preferentemente de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 200 mg/día, y con mayor preferencia de aproximadamente 10 mg/día a aproximadamente 175 mg/día para un sujeto de 70 kg como dosis de carga y mantenimiento, dependiendo del peso del sujeto y la gravedad de la afección. Un experto en la técnica sería capaz de determinar la dosificación óptima para un sujeto dado y una afección dada.

Las composiciones farmacéuticas tienen como principal objetivo la administración para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, es decir, intravenosa, subcutánea, o intramuscular, o pueden administrarse por infusión continua o pulsátil. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden formularse para la administración en varias formas, que incluyen, pero sin limitarse a, por vía oral, subcutánea, intravenosa, intracerebral, intranasal, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal, intraocular, o de cualquier otra manera aceptable.

Las composiciones para la administración parenteral comprenden el polipéptido del Factor VII quimérico de la invención en combinación con, preferentemente disuelto en, un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente un portador acuoso. Una variedad de portadores acuosos pueden usarse, tal como agua, agua tamponada, 0.4 % solución salina, 0.3 % glicina y similares. Los polipéptidos del Factor VII quiméricos de la invención pueden formularse además con composiciones que prolonguen la estabilidad y el almacenamiento, tal como metionina y sacarosa. Los polipéptidos del Factor VII quiméricos de la invención también se pueden formular en preparaciones de liposomas para la entrega o la orientación a los sitios de la lesión. Las preparaciones de liposomas se describen generalmente en, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núms. 4,837,028, 4,501,728, y 4,975,282. Las composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales y muy conocidas. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse bajo condiciones asépticas y liofilizadas, la preparación liofilizada se combina con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes amortiguadores y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc. Las composiciones pueden también contener conservantes, isotonicadores, surfactantes no iónicos o detergentes, antioxidantes y/u otros aditivos diversos.

La concentración del polipéptido del Factor VII quimérico en estas formulaciones puede variar considerablemente, es decir, de menos de aproximadamente 0.5 % en peso, usualmente a o al menos aproximadamente 1 % en peso hasta tanto como aproximadamente 15 o 20 % en peso y se seleccionará principalmente por los volúmenes de los fluidos, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Así, una composición farmacéutica típica para infusión intravenosa puede prepararse para que contenga hasta 250 ml de solución de Ringer estéril y 10 mg del polipéptido del

Factor VII quimérico. Los métodos presentes para preparar composiciones administrables parenteralmente se conocerán o serán aparentes para aquellos con experiencia en la técnica y se describen en más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18va ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1990).

5 Las composiciones que contienen el polipéptido del Factor VII quimérico de la presente invención pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un sujeto que ya sufre de una enfermedad, como se describió anteriormente, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "cantidad terapéuticamente eficaz". Como se entenderá por la persona experta en la técnica las cantidades eficaces para este propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o daño así como del peso y estado general del sujeto. En general, sin embargo, la cantidad eficaz estará en el intervalo de aproximadamente 0.05 mg hasta aproximadamente 500 mg del polipéptido del Factor VII quimérico por día para un sujeto de 70 kg, siendo lo más comúnmente usado una dosificación de aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 200 mg del polipéptido del Factor VII quimérico por día.

15 Hay que tener en cuenta que los materiales de la presente invención se pueden emplear generalmente en estados de enfermedades o lesiones graves, es decir, potencialmente mortal o situaciones potencialmente peligrosas para la vida. En tales casos, en vista de la reducción de sustancias extrañas y la falta general de inmunogenicidad del Factor VII humano en los seres humanos, es posible y puede ser deseable por el médico tratante administrar un exceso sustancial de estas composiciones de polipéptidos del Factor VII quiméricos.

20 En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen el polipéptido del Factor VII quimérico de la invención se administran a un sujeto susceptible de o de otra manera en riesgo de un estado de enfermedad o lesión para mejorar la capacidad coagulante propia del sujeto. Tal cantidad se define como una "dosis profilácticamente eficaz". En las aplicaciones profilácticas, las cantidades precisas dependen una vez más del estado de salud y peso del sujeto, pero la dosis generalmente se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0.05 mg a aproximadamente 500 mg por día para un sujeto de 70 kilogramos, más comúnmente de aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 200 mg día para un sujeto de 70 kilogramos.

30 Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones pueden llevarse a cabo con patrones y niveles de dosis que se seleccionan por el médico del tratamiento. Para los sujetos ambulatorios que requieren niveles de mantenimiento diarios, los polipéptidos del Factor VII quiméricos pueden administrarse por infusión continua usando *por ejemplo*, un sistema de bomba portátil.

35 El polipéptido del Factor VII quiméricos de la presente invención puede formularse además en formulaciones de liberación sostenida o prolongada. Los métodos de formular composiciones de liberación sostenida o prolongada se conocen en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, matrices semipermeables de partículas hidrófobas sólidas que contiene el polipéptido.

40 La administración local de los polipéptidos del Factor VIIa quiméricos de la presente invención, tales como, por ejemplo, la aplicación tópica puede llevarse a cabo, por ejemplo, por medio de una pulverización, perfusión, catéteres de doble balón, endoprótesis, incorporados en injertos vasculares o endoprótesis, hidrogeles usados para recubrir catéteres de balón, u otros métodos bien establecidos. En cualquier caso, las composiciones farmacéuticas deben proporcionar una cantidad de la variante del Factor VII suficiente para tratar de manera eficaz al sujeto.

45 Los siguientes ejemplos se han incluido para ilustrar la invención. Ciertos aspectos de los siguientes ejemplos se describen en términos de técnicas y procedimientos encontrados o contemplados por los presentes co-inventores para explotar bien la invención en la práctica. A la luz de la presente descripción y el nivel general de experiencia en la técnica, aquellos con experiencia apreciarán que los siguientes ejemplos pretenden ser solamente ilustrativos y que se pueden emplear numerosos cambios, modificaciones, y alteraciones sin apartarse del alcance de la invención.

50 Ejemplos

Ejemplo I - Construcción y expresión de los polipéptidos del Factor VIIa quiméricos

55 El ADNc del Factor VII humano y el Factor IX humano se obtuvieron y se introdujeron los siguientes sitios de restricción únicos para facilitar el intercambio de dominio:

Sitio BstEII en el extremo 5' del dominio EGF-1 (residuos 47-49 del Factor VII; residuos 48-50 del Factor IX);

Sitio SacI en la unión de los dominios EGF-1 y EGF-2 (residuos 82-83 del Factor VII; residuos 83-84 del Factor IX);
Sitio NotI está en el extremo 3' del dominio EGF-2 (residuos 135-137 del Factor VII; residuos 132-134 del Factor IX).

Se construyeron varias quimeras usando estos sitios de restricción para el intercambio de dominios entre el Factor VII y Factor IX y se representan en la FIG. 1. Los mismos sitios de restricción o similares se pueden usar para intercambiar dominios entre Factor VII y Proteína S.

La secuencia de aminoácidos de las quimeras resultantes se exponen en la sec. con núm. de ident.:1 (dominios señal del Factor IX, propéptido, GLA y EGF1, con dominios catalíticos y EGF2 del Factor VII) y sec. con núm. de ident.:2 (dominios señal del Factor IX y propéptido, dominio GLA de la Proteína S, dominio EGF1 del Factor IX, con dominios catalíticos y EGF2 del Factor VII). Una selección de estos ADN recombinantes se subclonaron en el vector de expresión pCMV5 para la transfección a células de mamífero.

Los constructos recombinantes resultantes fueron co-transfectadas con pSV2neo y pCMVhGC en la línea celular 293 de riñón humano (ATCC CRL 1573). Se seleccionó un clon que expresa un alto nivel de cada constructo y se tamiza como se describió anteriormente (Toomey y otros, 1991, J. Biol. Chem., 266:19198-19202). Cada clon proyectado se amplió para botellas de rodillos de 900 cm² para la producción a gran escala y las proteínas recombinantes se purificaron por un método de cromatografía de pseudo-afinidad usando Fast Flow Q-Sepharose y elución con un gradiente de calcio, seguido por un gradiente de NaCl.

Ejemplo II - Generación de trombina de los polipéptidos del Factor VIIa

La generación de trombina del Factor VIIa se determinó usando un modelo de hemofilia *in vitro*. Los monocitos se usaron como una fuente del factor tisular y se combinan con las plaquetas no activadas y plasma sintético que contiene las concentraciones plasmáticas de los Factores V, VII, IX, VIII, y XI, y las concentraciones en plasma de antitrombina y TFPI. Las condiciones hemofílicas se crearon omitiendo los factores VIII y IX.

Los monocitos se prepararon mediante la extracción de 4 ml de sangre de un individuo sano y colocándolas en un tubo de citrato de sodio. La sangre se depositó cuidadosamente en la parte superior de 3 ml del medio de separación de linfocitos Accu-Prep™ (Accurate Chemicals, NY, USA) en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugó a 1500 rpm por 30 minutos. La capa mononuclear se retiró a continuación y se añadió a un volumen igual de Versene (Cultivo tisular Lineberger) a 4 °C y se centrifugó a 800 rpm durante 10 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en 5 ml de Versene en 4 °C y se centrifugó a 800 rpm por 10 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en 4 ml de medio SFM macrófago (Life Technologies, CA, USA), suplementado con 500 ng/ml de lipopolisacáridos (LPS) (Sigma-Aldrich, MO, USA) y las células se colocaron en placas de 200 µl/pocillo de una placa de 96-pocillos. La placa se incubó a 37 °C, 5 % CO₂ por dos horas y después se lavó tres veces con medio SFM macrófago y después se incubó toda a noche.

Las plaquetas se prepararon mediante la extracción de 4 ml de sangre de un individuo sano y colocándolas en un tubo de citrato de sodio. La sangre se depositó cuidadosamente en la parte superior de 5 ml del medio de separación de linfocitos Accu-Prep™ (Accurate Chemicals, NY, USA) en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugó a 1500 rpm por 30 minutos. La capa de plaquetas se retiró después y se añadió a un volumen igual de citrato-glucosa-solución salina con 10 µg/ml de prostaglandina E₁ (PGE1) (Sigma-Aldrich, MO, USA) y se centrifugó a 800 rpm por 10 minutos. El sedimento resultante se desechó y las plaquetas se aislaron de las proteínas plasmáticas por filtración en gel de Sefarosa en amortiguador Tyrodes libre de calcio suplementado con 1 mg/ml ovalbúmina. Las plaquetas recuperadas se almacenaron a 37 °C.

El plasma sintético para el ensayo *in vitro* que imita la hemofilia se generó usando el inhibidor del Factor XI C-1-esterasa a una concentración de 5 µg/ml con la adición después de 1 hora de incubación con los monocitos previamente preparados de 200 µg/ml antitrombina, 0.07 µg/ml de TFPI, 100 mg/ml de protrombina, 8 µg/ml del Factor X y 0.5 µg/ml del Factor VII. Después de una incubación toda la noche, se añadió el Factor V a una concentración de 7 µg/ml. Para condiciones normales, el Factor IX se añadió después de 1 hora de incubación a una concentración de 4 µg/ml y tras la incubación durante la noche, el Factor VIII se añadió a 1 U/ml.

260 µl de plaquetas se añadieron al plasma sintético anterior y la suspensión resultante se añadió a los monocitos para comenzar la reacción. A intervalos de tiempo se extrajeron muestras de 10 µl y se añadieron a 90 µl del amortiguador de ensayo de trombina que contiene 1 mM EDTA y 0.5 mM Gly-Pro-Arg-pNA (Centerchem Inc., CT, USA). 100 µl de ácido acético al 50 % se añadieron para detener la escisión del sustrato sintético y el OD se midió a 405 nm. La concentración de trombina se determinó usando la siguiente fórmula:

$$[\text{trombina}] = \text{dilución} \times ((A_{405} - \text{fondo}) / (\text{terminación} - \text{inicio})) / (\text{factor de conversión})$$

en donde el factor de conversión es 1 nM trombina da una velocidad de 0.0117 OD/min a 405 nm.

La generación de trombina en condiciones normales (Factores VIII y IX incluidos) muestra una producción máxima de trombina con una fase de latencia corta (FIG. 2). Concentraciones crecientes de Factor VIIa silvestre mejoraron la producción de trombina en la condición hemofílica. (Fig. 2).

Ejemplo III - Generación de trombina de polipéptidos del Factor VIIa quiméricos

La generación de trombina de las proteínas quiméricas producidas en el Ejemplo I se determinó a través de un modelo de hemofilia *in vitro* descrito en el Ejemplo II. La adición de 10 nM de un Factor VIIa quimérico que contiene los dominios catalíticos y EGF-2 del Factor VII y los dominios GLA y EGF-1 del Factor IX, o un Factor VIIa quimérico que contiene los dominios catalíticos, GLA y EGF-2 del Factor VII y el dominio EGF-1 del Factor IX tuvieron actividad similar a 50 nM del Factor VIIa silvestre. (Fig. 3).

En cuanto a la producción del máximo de trombina en relación con el control, ni el Factor VIIa silvestre, ni los polipéptidos del Factor VIIa quiméricos probaron restablecer la producción máxima de trombina al nivel del control. Sin embargo, 10 nM de un Factor VIIa quimérico que contiene los dominios catalíticos y EGF-2 del Factor VII y los dominios GLA y EGF-1 del Factor IX, o un Factor VIIa quimérico que contiene los dominios catalíticos, GLA y EGF-2 del Factor VII y el dominio EGF-1 del Factor IX restablecieron la producción máxima de trombina a un nivel similar al producido por 50 nM del Factor VIIa silvestre. (Fig. 4).

Ejemplo IV -Ensayo de coagulación de los polipéptidos del Factor VIIa quiméricos

La actividad coagulación de los polipéptidos del Factor VIIa quiméricos se evaluó *in vivo*, en un ensayo de coagulación, como se describe por Buyue, Y., y otros, 2008, Blood, 112:3234-3241. En resumen, el Factor VII se administró a un ratón con hemofilia B (2 mg/kg de NovoSeven®, 2 mg/kg de un Factor VIIa quimérico que contiene los dominios GLA y EGF-1 del Factor IX y los dominios catalíticos y EGF-2 del Factor VIIa, o 1.4 mg/kg de un Factor VIIa quimérico que contiene el dominio GLA de la proteína S, el dominio EGF-1 del Factor IX y los dominios catalíticos y EGF-2 del Factor VIIa), a través de un catéter insertado en una vena en la pierna. Un ratón silvestre se utilizó como control. Los ratones se anestesiaron y la vena safena de la otra pierna se seccionó empujando una aguja de pequeño calibre a través de ella. La porción distal se corta después mediante la inserción de la punta de un par de tijeras en la vena y cortando con tijeras para crear una pequeña taza. Se forma un coágulo y se registra el tiempo hasta que se detiene el sangrado. El coágulo se elimina después usando una aguja calibre 30 y se registra nuevamente el tiempo hasta que se detiene el sangrado. Este proceso se repitió por 30 minutos. El número de los coágulos se registró como el número de interrupciones. Los tiempos registrados se promediaron y registraron como un tiempo promedio. El experimento se realizó en un ratón para el ratón silvestre y el Factor VIIa quimérico que contiene el dominio GLA de la proteína S, el dominio EGF-1 del Factor IX y los dominios catalíticos y EGF-2 del Factor VIIa. Para el Factor VIIa quimérico que contiene los dominios GLA y EGF-1 del Factor IX y los dominios catalíticos y EGF-2 del Factor VIIa el experimento se llevó a cabo en dos ratones con hemofilia B con los mismos resultados. Para el ratón con hemofilia B que no se le administró ningún Factor VII, las 0.25 interrupciones registradas en la Tabla 1 más abajo indican que sólo uno de los cuatro ratones no sangró con la lesión inicial.

Tabla 1

	Hemofilia B	NovoSeven®	C1 (1063)	C2	Ratón silvestre
Disrupciones	0.25	20	29	13	25
Tiempo promedio (seg)	1712	71	51	125	54

El experimento se repitió con un ratón con hemofilia B sin ningún tratamiento, un ratón de hemofilia B administrado con 2 mg/kg de NovoSeven®, un ratón con hemofilia B administrado con 2 mg/kg de un Factor VIIa quimérico que contiene los dominios GLA y EGF-1 del Factor IX y los dominios catalíticos y EGF-2 del Factor VIIa y un ratón silvestre sin tratamiento. El ratón con hemofilia B administrado con 2 mg/kg del Factor VIIa quimérico que contiene los dominios GLA y EGF-1 del Factor

IX y los dominios catalíticos y EGF-2 del Factor VIIa tuvo un tiempo promedio más corto al cese del sangrado que el ratón con hemofilia B administrado con 2 mg/kg de NovoSeven® y el ratón silvestre. (Fig. 5).

Ejemplo V - Trombogenicidad de los polipéptidos del Factor VIIa quiméricos

La trombogenicidad de los polipéptidos del Factor VIIa quiméricos de la invención puede probarse en un modelo de ratón que expresa altos niveles de esas proteínas. Recientemente, se ha demostrado que el 50 % de los ratones que expresan más de 2 µg/ml del factor VIIa de ratón silvestre recombinante mueren de trombosis dentro de 16 meses. Los ratones hemofílicos B que expresan niveles similares de factor VIIa tuvieron las mismas tasas de mortalidad y cuando los ratones se volvieron a cruzar en la cepa de ratón C57BL, la trombosis ocurrió mucho antes (<4 meses). (Aljamali MN, y otros J Clin Invest. 2008;118:1825-1834).

Un ratón hemofílico B (cepa C57BL/6J) que expresa 2-10 µg o más de los polipéptidos quiméricos puede ser producido y si la expresión de los polipéptidos del Factor VII quiméricos causa trombosis, entonces estos ratones deberían desarrollarla desde el principio (<4 meses).

La cepa de ratón puede desarrollarse usando un nuevo vector adeno asociado auto-complementario (AAV) desarrollado por el Dr. Paul Monahan del Centro de Terapia Génica en la UNC. (Wu Z, y otros Mol Ther. 2008;16:280-289). Este vector contiene el potenciador del promotor de transtiretina pequeño (promotor TTR), intrones del virus diminuto del ratón, el MVM y la señal de la hormona de crecimiento bovina pA. Se ha demostrado que la inyección de genomas de vectores 1×10^{11} , basado en este vector, en la vena portal resultó en la expresión sostenida del Factor IX de 7 g por ml dentro de las 8 semanas de la infección. (Wu Z, y otros Mol Ther. 2008; 16:280-289).

El ADNc de ratón y el Factor VIIa humano, así como los polipéptidos del Factor VII quiméricos de la invención pueden usarse para evaluar la trombogenicidad. Pueden usarse además la secuencia RKRRKR (sec. con núm. de ident.:21) descrita por Margaritis y otros que provoca que el Factor VII se segregue en la forma activa, *por ejemplo*, el Factor VIIa. (Margaritis y otros, J. Clin. Invest., 2004; 113:1025-31).

Para probar esta hipótesis, se pueden generar polipéptidos de ratón de Factor VII quimérico y silvestre. Se informó que el factor tisular de ratón no reacciona con el Factor VII humano, por lo que los polipéptidos de ratón se usan para demostrar que el factor tisular es irrelevante a la acción del Factor VIIa administrado en trauma pero está relacionado con la trombosis. Los polipéptidos de ratón que se pueden usar para probar esta hipótesis incluyen de un Factor VII de ratón silvestre (sec. con núm. de ident.:3), un Factor VII de ratón silvestre con una secuencia RKRRKR para provocar que el polipéptido se secrete en la forma activa (FVIIa) de dos cadenas (sec. con núm. de ident.:4), una señal del Factor IX de ratón, propéptido, dominios GLA y EGF1, con dominios catalíticos y EGF2 del Factor VII y una secuencia RKRRKR (sec. con núm. de ident.:5) y una señal del Factor IV de ratón y dominios de propéptidos, dominio GLA de la Proteína S, dominio EGF1 del Factor IX, con los dominios catalíticos y EGF2 del Factor VII y una secuencia RKRRKR (sec. con núm. de ident.:6). Los polipéptidos del Factor VII de ratón quiméricos (sec. con núms. de ident.: 5 y 6) tendrán una afinidad reducida por el factor tisular (tal vez hasta en 100 veces menor en comparación con la molécula de FVII silvestre) y esto debe ser suficiente para evitar la trombosis no deseada.

Los polipéptidos del Factor VII quiméricos pueden también adicionalmente modificarse para reducir aún más la afinidad por el factor tisular. Un ejemplo de tal mutación es cambiar la metionina en el residuo 306 a alanina. Pueden incluirse otras modificaciones de los polipéptidos del Factor VII quiméricos que resultan en una actividad específica más alta del Factor VIIa. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen los siguientes equivalentes a los residuos 158, 296 y 298 de la secuencia humana: V158D, E296V y M298Q.

Los polipéptidos del Factor VII de ratón quiméricos y silvestres descritos anteriormente pueden construirse usando ADNc del Factor VII como un molde y usando iniciadores de oligonucleótidos para amplificar los distintos dominios y después insertar los constructos en un vector pSC-TTR-mvm, la construcción de estos se describe en Wu y otros, Molecular Therapy, 2008; 16:280-289. Específicamente, el Factor VII de ratón de silvestre puede ser amplificado a partir de ADNc del Factor VII de ratón usando los siguientes iniciadores: 5'-TGAGGATCCCCACCATGGTTCCACAGGCGCATGGGCT -3' (sec. con núm. de ident.:7) y 5'-TTCCCCAGCATGCCTACAGTAGTGGGAGTCGGAAC-3' (sec. con núm. de ident.:8). El fragmento amplificado puede ser digerido con BamHI/SphI e insertado en el vector pSC-TTR-mvm entre los sitios BglII/SphI. Subsecuentemente, la secuencia de poliadenilación BGH puede insertarse en el vector resultante en el sitio SphI.

El constructo del Factor VII de ratón de silvestre con la secuencia RKRRKR puede construirse de forma similar.

Específicamente, el Factor VII de ratón silvestre con la secuencia RKRRKR puede amplificarse a partir de ADNc del Factor VII de ratón usando los siguientes iniciadores:

5'- TGAGGATCCCCACCATGGTTCCACAGGCGCATGGGCT -3' (sec. con núm. de ident.:7) y 5'-
5 5 ACAATGCGTTTTGCGCGCTTACGGCGGCCTTGGCGGCTGCTGGAGT-3' (sec. con núm. de ident.:9), para generar un
primer fragmento; y,
5'-TTCCCCAGCATGCCTACAGTAGTGGGAGTCGGAAAAAC-3' (sec. con núm. de ident.:8) y 5'-
10 GCCGCCGTAAGCGGCGAAAAACGCATTGTGGGAGGCAACGTGTGCCC-3' (sec. con núm. de ident.:10) para generar un
segundo fragmento. Una PCR de solapamiento se lleva a cabo después usando estos dos fragmentos como molde y los
siguientes iniciadores:

5'- TGAGGATCCCCACCATGGTTCCACAGGCGCATGGGCT -3' (sec. con núm. de ident.:7) y 5'-
15 TTCCCCAGCATGCCTACAGTAGTGGGAGTCGGAAAAAC-3' (sec. con núm. de ident.:8). El fragmento amplificado resultante
puede ser digerido con BamHI/SphI e insertado en el vector pSC-TTR-mvm entre los sitios BglII/SphI. Subsecuentemente, la
secuencia de poliadenilación BGH puede insertarse en el vector resultante en el sitio SphI.

El constructo que contiene la señal del Factor IX de ratón, propéptido, dominios GLA y EGF1, con dominios catalíticos y
EGF2 del Factor VII y una secuencia RKRRKR (sec. con núm. de ident.:5) se construye de manera similar. Específicamente,
un primer fragmento se genera a través del ADNc del Factor IX de ratón como un molde y los siguientes iniciadores:

5'- AGGCCTGAAGATCTCCACCATGAAGCACCTGAACACCGTC-3' (sec. con núm. de ident.:11) y
20 5'-GATCAGCTGCTCATTCTTGCTTTTTTACAGTTCCTTCTTCAAATC-3' (sec. con núm. de ident.:12). Un segundo
fragmento se generó usando Factor VII de ratón como molde y los siguientes iniciadores:

25 5'-GATTTGAAGGAAGGAAGTGTGAAAAAGCAAGAATGAGCAGCTGATC-3' (sec. con núm. de ident.:13)
y 5'-ACAATGCGTTTTGCGCGCTTACGGCGGCCTTGGCGGCTGCTGGAGT-3' (sec. con núm. de ident.:9).

Un tercer fragmento puede generarse usando Factor VII de ratón como molde y los siguientes iniciadores: 5'-
30 TTCCCCAGCATGCCTACAGTAGTGGGAGTCGGAAAAAC-3' (sec. con núm. de ident.:8) y
5'- GCCGCCGTAAGCGGCGAAAAACGCATTGTGGGAGGCAACGTGTGCCC-3' (sec. con núm. de ident.:10). Una
superposición de PCR puede entonces llevarse a cabo utilizando estos tres fragmentos como molde y los iniciadores
5'- AGGCCTGAAGATCTCCACCATGAAGCACCTGAACACCGTC-3' (sec. con núm. de ident.:11) y 5'-
TTCCCCAGCATGCCTACAGTAGTGGGAGTCGGAAAAAC-3' (sec. con núm. de ident.:8). El fragmento amplificado resultante
es digerido después con BamHI/SphI e insertado en el vector pSC-TTR-mvm entre los sitios BglII/SphI. Subsecuentemente,
35 la secuencia de poliadenilación BGH se inserta en el vector resultante en el sitio SphI.

Un proceso similar puede ser usado para generar el constructo que contiene los dominio de la señal del Factor IX de ratón y
propéptido, dominio GLA de la Proteína S, dominio EGF1 del Factor IX, con dominios catalíticos y EGF2 del Factor VII y una
secuencia RKRRKR (sec. con núm. de ident.: 6). Específicamente, se puede generar un primer fragmento usando ADNc de
40 Factor IX de ratón y los siguientes iniciadores: 5'- AGGCCTGAAGATCTCCACCATGAAGCACCTGAACACCGTC-3' (sec.
con núm. de ident.:11) y
5'-GTTTCTTCGAACAAGGTATTTGCTCTCTTGGACGGGTAAGAATTTTG-3' (sec. con núm. de ident.:14). Un segundo
fragmento puede ser generado usando la proteína S de ratón como molde y los siguientes iniciadores:

45 5'-CAAAATTCTTACCCGTCCAAAGAGAGCAAATACCTTGTTCTGAAGAAAC-3' (sec. con núm. de ident.:15)
y 5'-GATCTCCATCAACATACTGCTTATAAAAAATAATCCGTCTCGGGATT-3' (sec. con núm. de ident.:16). Un tercer
fragmento se puede generar utilizando el vector con la señal del Factor IV de ratón, propéptido, dominios GLA y EGF1, con
dominios catalíticos y EGF2 del Factor VII y una secuencia RKRRKR como un molde y los siguientes iniciadores:

50 5'-AATCCCGAGACGGATTATTTTATAAGCAGTATGTTGATGGAGATC-3' (sec. con núm. de ident.:17) y 5'-
TTCCCCAGCATGCCTACAGTAGTGGGAGTCGGAAAAAC-3' (sec. con núm. de ident.:8). Una superposición de PCR puede
entonces llevarse a cabo utilizando estos tres fragmentos como molde y los iniciadores:

55 5'- AGGCCTGAAGATCTCCACCATGAAGCACCTGAACACCGTC-3' (sec. con núm. de ident.:11) y 5'-
TTCCCCAGCATGCCTACAGTAGTGGGAGTCGGAAAAAC-3' (sec. con núm. de ident.:8). El fragmento amplificado resultante
es digerido después con BamHI/SphI e insertado en el vector pSC-TTR-mvm entre los sitios BglII/SphI. Subsecuentemente,
la secuencia de poliadenilación BGH puede insertarse en el vector resultante en el sitio SphI.

Los constructos del vector del Factor VII de ratón de silvestre (sec. con núm. de ident.:3) y el Factor VII de ratón de silvestre con la secuencia RKRRKR (sec. con núm. de ident.:4) se inyectaron en dos ratones macho con hemofilia B de igual edad (5×10^{11} genomas del vector por ratón). Los constructos del vector señal del Factor IX de ratón, propéptido, dominios GLA y EGF1, con dominios catalíticos y EGF2 del Factor VII y una secuencia RKRRKR (sec. con núm. de ident.:5) y dominios de propéptido y señal del Factor IX de ratón, dominio GLA de la Proteína S, dominio EGF1 del Factor IX, con dominios catalíticos y EGF2 del Factor VII y una secuencia RKRRKR (sec. con núm. de ident.:6) se inyectaron en tres ratones macho con hemofilia B de igual edad (5×10^{11} genomas del vector por ratón). Aproximadamente tres semanas después de la inyección, todos los ratones inyectados con el Factor VII de ratón de silvestre (sec. con núm. de ident.:3) o Factor VII de ratón de silvestre con la secuencia RKRRKR (sec. con núm. de ident.:4) murieron. Los ratones inyectados con la señal del Factor IV de ratón, propéptido, dominios GLA y EGF1, con dominios catalíticos y EGF2 del Factor VII y una secuencia RKRRKR (sec. con núm. de ident.:5), o dominios de señal del Factor IV de ratón y propéptido, dominio GLA de la Proteína S, dominio EGF1 del Factor IX, con dominios catalíticos y EGF2 del Factor VII y una secuencia RKRRKR (sec. con núm. de ident.:6) estaban vivos y no mostraron síntomas adversos aproximadamente cinco semanas después de la inyección. La sangre se recoge una vez a la semana de los ratones y después de seis a ocho semanas después de la inyección se puede medir el nivel de polipéptido del Factor VII de ratón. Además, los niveles de antígeno de los polipéptidos del Factor VII de ratón se pueden determinar indirectamente por la medición de la actividad de coagulación *in vitro* a partir de muestras de sangre de los ratones inyectados (Margaritas y otros, Gene Therapy 2009; 113:3682-3689).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> University of North Carolina at Chapel Hill
Stafford, Darrel
Jin, DaYun

<120> MOLÉCULAS QUIMÉRICAS DEL FACTOR VII
<130> 5470-494WO
<150> US 61/220,278
<151> 2009-06-25

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 453
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas del Factor VII quiméricas

<400> 1

5 Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
20 25 30

10 Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
35 40 45

15 Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
50 55 60

20 Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
85 90 95

25 Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
100 105 110

30 Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
115 120 125

Glu Leu His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly
130 135 140

35 Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg
145 150 155 160

40

45

50

55

Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro
 165 170 175
 Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn
 180 185 190
 Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys
 195 200 205
 Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu
 210 215 220
 Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His
 225 230 235 240
 Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly
 245 250 255
 Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val
 260 265 270
 Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His
 275 280 285
 Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His
 290 295 300
 Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu
 305 310 315 320
 Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp
 325 330 335
 Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu
 340 345 350
 Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro
 355 360 365
 Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys
 370 375 380
 Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg
 385 390 395 400
 Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala
 405 410 415

5 Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu
 420 425 430

Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu
435 440 445

Arg Ala Pro Phe Pro
450

15

20 <210> 2
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas del Factor VII quiméricas

25
<400> 2

30

35

40

45

50

55

ES 2 524 974 T3

5 Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
 1 5 10 15
 10 Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
 20 25 30
 15 Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Ala Asn
 35 40 45
 20 Ser Leu Leu Glu Glu Thr Lys Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Ile
 50 55 60
 25 Glu Glu Leu Cys Asn Lys Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Asp
 65 70 75 80
 30 Pro Glu Thr Asp Tyr Phe Tyr Pro Lys Tyr Leu Val Asp Gly Asp Gln
 85 90 95
 35 Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
 100 105 110
 40 Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
 115 120 125
 45 Glu Leu His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly
 130 135 140
 50 Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg
 145 150 155 160
 55 Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro
 165 170 175

	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn
				180					185					190		
5	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys
			195					200					205			
10	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu
		210					215					220				
15	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His
	225					230					235					240
20	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly
				245						250					255	
25	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val
				260					265					270		
30	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His
			275					280					285			
35	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His
		290					295					300				
40	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu
	305					310					315					320
45	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp
					325					330					335	
50	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu
				340					345					350		
55	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro
			355					360					365			
60	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys
		370					375					380				
65	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg
	385					390					395					400
70	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala
					405					410					415	
75	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu
				420					425					430		

ES 2 524 974 T3

Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu
 435 440 445

5

Arg Ala Pro Phe Pro
 450

10 <210> 3
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <400> 3

20

25

30

35

40

45

50

55

ES 2 524 974 T3

	Met	Val	Pro	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Phe	Leu	Leu	Gln
	1				5					10					15	
5	Leu	Gln	Gly	Pro	Leu	Gly	Thr	Ala	Val	Phe	Ile	Thr	Gln	Glu	Glu	Ala
				20					25					30		
	His	Gly	Val	Leu	His	Arg	Gln	Arg	Arg	Ala	Asn	Ser	Leu	Leu	Glu	Glu
10			35					40					45			
	Leu	Trp	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Asn	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser
		50					55					60				
15	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Ser	Pro	Glu	Arg	Thr	Lys	Gln
	65					70					75					80
	Phe	Trp	Ile	Val	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser	Asn	Pro	Cys
20					85					90					95	
	Gln	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Gln	Asp	His	Leu	Lys	Ser	Tyr	Val	Cys	Phe
				100					105					110		
25	Cys	Leu	Leu	Asp	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Lys	Ser	Lys	Asn	Glu
			115					120					125			
30	Gln	Leu	Ile	Cys	Ala	Asn	Glu	Asn	Gly	Asp	Cys	Asp	Gln	Tyr	Cys	Arg
		130					135					140				
	Asp	His	Val	Gly	Thr	Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	Cys	His	Glu	Asp	Tyr	Thr
35						150					155					160
	Leu	Gln	Pro	Asp	Glu	Val	Ser	Cys	Lys	Pro	Lys	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys
					165					170					175	
40	Gly	Arg	Ile	Pro	Val	Val	Glu	Lys	Arg	Asn	Ser	Ser	Ser	Arg	Gln	Gly
				180					185					190		
	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Asn	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln

ES 2 524 974 T3

	195	200	205
5	Ala Val Leu Lys Ile Asn Gly Leu Leu Leu Cys Gly Ala Val Leu Leu 210 215 220		
10	Asp Ala Arg Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Phe Asp Asn Ile Arg 225 230 235 240		
15	Tyr Trp Gly Asn Ile Thr Val Val Met Gly Glu His Asp Phe Ser Glu 245 250 255		
20	Lys Asp Gly Asp Glu Gln Val Arg Arg Val Thr Gln Val Ile Met Pro 260 265 270		
25	Asp Lys Tyr Ile Arg Gly Lys Ile Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg 275 280 285		
30	Leu His Arg Pro Val Thr Phe Thr Asp Tyr Val Val Pro Leu Cys Leu 290 295 300		
35	Pro Glu Lys Ser Phe Ser Glu Asn Thr Leu Ala Arg Ile Arg Phe Ser 305 310 315 320		
40	Arg Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu 325 330 335		
45	Glu Leu Met Ser Ile Glu Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu 340 345 350		
50	Glu His Ala Lys His Ser Ser Asn Thr Pro Lys Ile Thr Glu Asn Met 355 360 365		
55	Phe Cys Ala Gly Tyr Met Asp Gly Thr Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp 370 375 380		
	Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr His Gly Thr Trp Tyr Leu Thr 385 390 395 400		
	Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Ala Ile Gly His Ile Gly 405 410 415		
	Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Asp Trp Leu Val Arg His Met 420 425 430		
	Asp Ser Lys Leu Gln Val Gly Val Phe Arg Leu Pro Leu Leu 435 440 445		

<210> 4
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial

5
<220>
<223> Factor VII de ratón silvestre con la secuencia señal de secreción RKRRKR
<400> 4

10 Met Val Pro Gln Ala His Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Leu Leu Gln
1 5 10 15

15 Leu Gln Gly Pro Leu Gly Thr Ala Val Phe Ile Thr Gln Glu Glu Ala
20 25 30

20 His Gly Val Leu His Arg Gln Arg Arg Ala Asn Ser Leu Leu Glu Glu
35 40 45

25 Leu Trp Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Asn Glu Glu Gln Cys Ser
50 55 60

30 Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Ser Pro Glu Arg Thr Lys Gln
65 70 75 80

35 Phe Trp Ile Val Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Asn Pro Cys
85 90 95

40 Gln Asn Gly Gly Thr Cys Gln Asp His Leu Lys Ser Tyr Val Cys Phe
100 105 110

45 Cys Leu Leu Asp Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Lys Ser Lys Asn Glu
115 120 125

50 Gln Leu Ile Cys Ala Asn Glu Asn Gly Asp Cys Asp Gln Tyr Cys Arg
130 135 140

55 Asp His Val Gly Thr Lys Arg Thr Cys Ser Cys His Glu Asp Tyr Thr
145 150 155 160

Leu Gln Pro Asp Glu Val Ser Cys Lys Pro Lys Val Glu Tyr Pro Cys
165 170 175

Gly Arg Ile Pro Val Val Glu Lys Arg Asn Ser Ser Ser Arg Gln Gly
180 185 190

Arg Arg Lys Arg Arg Lys Arg Ile Val Gly Gly Asn Val Cys Pro Lys
195 200 205

Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Val Leu Lys Ile Asn Gly Leu Leu Leu
210 215 220

Cys Gly Ala Val Leu Leu Asp Ala Arg Trp Ile Val Thr Ala Ala His

ES 2 524 974 T3

	225					230						235				240
5	Cys	Phe	Asp	Asn	Ile	Arg	Tyr	Trp	Gly	Asn	Ile	Thr	Val	Val	Met	Gly
					245					250					255	
10	Glu	His	Asp	Phe	Ser	Glu	Lys	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Val	Arg	Arg	Val
				260					265					270		
15	Thr	Gln	Val	Ile	Met	Pro	Asp	Lys	Tyr	Ile	Arg	Gly	Lys	Ile	Asn	His
			275					280					285			
20	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Arg	Pro	Val	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
		290					295					300				
25	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Lys	Ser	Phe	Ser	Glu	Asn	Thr	Leu
	305					310					315					320
30	Ala	Arg	Ile	Arg	Phe	Ser	Arg	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp
					325					330					335	
35	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Ser	Ile	Glu	Val	Pro	Arg	Leu
			340						345					350		
40	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Glu	His	Ala	Lys	His	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro
			355					360					365			
45	Lys	Ile	Thr	Glu	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Lys
		370					375					380				
50	Asp	Ala	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	His
	385					390					395					400
55	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Val	Val	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	Ala
					405					410					415	
60	Ala	Ile	Gly	His	Ile	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Asp
				420					425					430		
65	Trp	Leu	Val	Arg	His	Met	Asp	Ser	Lys	Leu	Gln	Val	Gly	Val	Phe	Arg
		435						440					445			
70	Leu	Pro	Leu	Leu												
		450														

5 <210> 5
<211> 458
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de proteínas del Factor VII quiméricas

15

20

25

30

35

40

45

50

55

ES 2 524 974 T3

Met Lys His Leu Asn Thr Val Met Ala Glu Ser Pro Ala Leu Ile Thr
 1 5 10 15
 Ile Phe Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Thr Glu Cys Ala Val Phe Leu
 20 25 30
 5 Asp Arg Glu Asn Ala Thr Lys Ile Leu Thr Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
 35 40 45
 10 Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Arg Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
 50 55 60
 Ile Glu Glu Arg Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
 65 70 75 80
 15 Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
 85 90 95
 20 Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ile Cys Lys Asp Asp Ile
 100 105 110
 Ser Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Gln Val Gly Phe Glu Gly Arg Asn Cys
 115 120 125
 25 Glu Phe Ser Lys Asn Glu Gln Leu Ile Cys Ala Asn Glu Asn Gly Asp
 130 135 140
 30 Cys Asp Gln Tyr Cys Arg Asp His Val Gly Thr Lys Arg Thr Cys Ser
 145 150 155 160
 35 Cys His Glu Asp Tyr Thr Leu Gln Pro Asp Glu Val Ser Cys Lys Pro
 165 170 175
 Lys Val Glu Tyr Pro Cys Gly Arg Ile Pro Val Val Glu Lys Arg Asn
 180 185 190
 40 Ser Ser Ser Arg Gln Gly Arg Arg Lys Arg Arg Lys Arg Ile Val Gly
 195 200 205
 45 Gly Asn Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Val Leu Lys
 210 215 220
 50 Ile Asn Gly Leu Leu Leu Cys Gly Ala Val Leu Leu Asp Ala Arg Trp
 225 230 235 240
 Ile Val Thr Ala Ala His Cys Phe Asp Asn Ile Arg Tyr Trp Gly Asn
 55

	245	250	255
	Ile Thr Val Val Met Gly Glu His Asp Phe Ser Glu Lys Asp Gly Asp		
	260	265	270
5	Glu Gln Val Arg Arg Val Thr Gln Val Ile Met Pro Asp Lys Tyr Ile		
	275	280	285
10	Arg Gly Lys Ile Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Arg Pro		
	290	295	300
15	Val Thr Phe Thr Asp Tyr Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Lys Ser		
	305	310	315
	Phe Ser Glu Asn Thr Leu Ala Arg Ile Arg Phe Ser Arg Val Ser Gly		
	325	330	335
20	Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Ser		
	340	345	350
25	Ile Glu Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Glu His Ala Lys		
	355	360	365
	His Ser Ser Asn Thr Pro Lys Ile Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly		
	370	375	380
30	Tyr Met Asp Gly Thr Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro		
	385	390	395
35	His Ala Thr His Tyr His Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Val Val Ser		
	405	410	415
40	Trp Gly Glu Gly Cys Ala Ala Ile Gly His Ile Gly Val Tyr Thr Arg		
	420	425	430
	Val Ser Gln Tyr Ile Asp Trp Leu Val Arg His Met Asp Ser Lys Leu		
	435	440	445
45	Gln Val Gly Val Phe Arg Leu Pro Leu Leu		
	450	455	

<210> 6

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas del Factor VII quiméricas

<400> 6

5	Met	Lys	His	Leu	Asn	Thr	Val	Met	Ala	Glu	Ser	Pro	Ala	Leu	Ile	Thr
	1				5					10					15	
	Ile	Phe	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Leu	Ser	Thr	Glu	Cys	Ala	Val	Phe	Leu
			20						25					30		
10	Asp	Arg	Glu	Asn	Ala	Thr	Lys	Ile	Leu	Thr	Arg	Pro	Lys	Arg	Ala	Asn
			35					40					45			
	Thr	Leu	Phe	Glu	Glu	Thr	Met	Lys	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Ile
15		50					55					60				
	Glu	Glu	Leu	Cys	Asn	Lys	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Asn	Asn
	65					70					75				80	
20	Pro	Glu	Thr	Asp	Tyr	Phe	Tyr	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys
				85						90					95	
	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ile	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile	Ser
25				100					105					110		
	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Gln	Val	Gly	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu
			115					120					125			
30	Phe	Ser	Lys	Asn	Glu	Gln	Leu	Ile	Cys	Ala	Asn	Glu	Asn	Gly	Asp	Cys
	130						135					140				
	Asp	Gln	Tyr	Cys	Arg	Asp	His	Val	Gly	Thr	Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	Cys
35	145					150					155					160
	His	Glu	Asp	Tyr	Thr	Leu	Gln	Pro	Asp	Glu	Val	Ser	Cys	Lys	Pro	Lys
					165					170					175	
40	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Arg	Ile	Pro	Val	Val	Glu	Lys	Arg	Asn	Ser
				180					185						190	
	Ser	Ser	Arg	Gln	Gly	Arg	Arg	Lys	Arg	Arg	Lys	Arg	Ile	Val	Gly	Gly
			195					200					205			
45	Asn	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Ala	Val	Leu	Lys	Ile
	210						215					220				
50	Asn	Gly	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Val	Leu	Leu	Asp	Ala	Arg	Trp	Ile
	225					230					235					240
	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Asn	Ile	Arg	Tyr	Trp	Gly	Asn	Ile
					245					250					255	
55	Thr	Val	Val	Met	Gly	Glu	His	Asp	Phe	Ser	Glu	Lys	Asp	Gly	Asp	Glu

ES 2 524 974 T3

	260	265	270	
5	Gln Val Arg Arg Val Thr Gln Val Ile Met Pro Asp Lys Tyr Ile Arg	275	280	285
10	Gly Lys Ile Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Arg Pro Val	290	295	300
15	Thr Phe Thr Asp Tyr Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Lys Ser Phe	305	310	315
20	Ser Glu Asn Thr Leu Ala Arg Ile Arg Phe Ser Arg Val Ser Gly Trp	325	330	335
25	Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Ser Ile	340	345	350
30	Glu Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Glu His Ala Lys His	355	360	365
35	Ser Ser Asn Thr Pro Lys Ile Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr	370	375	380
40	Met Asp Gly Thr Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His	385	390	395
45	Ala Thr His Tyr His Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Val Val Ser Trp	405	410	415
50	Gly Glu Gly Cys Ala Ala Ile Gly His Ile Gly Val Tyr Thr Arg Val	420	425	430
55	Ser Gln Tyr Ile Asp Trp Leu Val Arg His Met Asp Ser Lys Leu Gln	435	440	445
	Val Gly Val Phe Arg Leu Pro Leu Leu	450	455	
50	<210> 7			
	<211> 37			
	<212> ADN.			
	<213> Artificial			
55	<220>			
	<223> Iniciador de PCR			

<400> 7
 tgaggatccc caccatgggt ccacaggcgc atgggct 37

 5 <210> 8
 <211> 37
 <212> ADN.
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> Iniciador de PCR

 <400> 8
 ttcccagca tgcctacagt agtgggagtc ggaaaac 37

 15 <210> 9
 <211> 46
 <212> ADN.
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Iniciador de PCR

 <400> 9
 acaatgcgtt ttcgccgtt acggcggcct tggcggctgc tggagt 46
 25
 <210> 10
 <211> 46
 <212> ADN.
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Iniciador de PCR

 <400> 10
 gccgccgtaa gcggcgaaaa cgcattgtgg gaggcaacgt gtgccc 46
 35
 <210> 11
 <211> 40
 <212> ADN.
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Iniciador de PCR

 45 <400> 11
 aggcctgaag atctccacca tgaagcacct gaacaccgtc 40

 <210> 12
 <211> 47
 50 <212> ADN.
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Iniciador de PCR
 55
 <400> 12
 gatcagctgc tcattctgc tttttcaca gttccttct tcaaatc 47

5 <210> 13
 <211> 47
 <212> ADN.
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de PCR
 10 <400> 13
 gatttgaagg aaggaactgt gaaaaaagca agaagtagca gctgatc 47
 <210> 14
 <211> 48
 <212> ADN.
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de PCR
 20 <400> 14
 gtttctcga acaaggattt tgctctctt ggacgggtaa gaatttg 48
 <210> 15
 <211> 48
 25 <212> ADN.
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de PCR
 30 <400> 15
 caaaattctt acccggtcaa agagagcaaa tacctgttc gaagaaac 48
 <210> 16
 <211> 46
 35 <212> ADN.
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de PCR
 40 <400> 16
 gatctccatc aacatactgc ttataaaaat aatccgtctc gggatt 46
 <210> 17
 <211> 46
 45 <212> ADN.
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de PCR
 50 <400> 17
 aatcccgaga cggattattt ttataagcag tatgttgatg gagatc 46
 55

ES 2 524 974 T3

```

<210> 18
<211> 466
<212> PRT
5  <213> Homo sapiens
<400> 18
      Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
10      1          5          10          15
      Gly Cys Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Ala Ser Gly Gly Glu Thr
15
20
25
30
35
40
45
50
55

```

ES 2 524 974 T3

20

25

30

Arg Asp Met Pro Trp Lys Pro Gly Pro His Arg Val Phe Val Thr Gln
35 40 45

5

Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe
50 55 60

10

Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu
65 70 75 80

Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
85 90 95

15

Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser
100 105 110

20

Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr
115 120 125

Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His
130 135 140

25

Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln
145 150 155 160

30

Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu
165 170 175

Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu
180 185 190

35

Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
195 200 205

40

Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys
210 215 220

Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly
225 230 235 240

45

Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp
245 250 255

50

Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp
260 265 270

Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val
275 280 285

55

ES 2 524 974 T3

	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala
	290						295					300				
	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro
	305					310					315					320
5	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val
					325					330					335	
10	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala
				340					345					350		
15	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln
		355						360					365			
	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr
	370						375					380				
20	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys
	385					390					395					400
25	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp
					405					410					415	
30	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly
				420					425					430		
	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln
			435					440					445			
35	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro
	450						455					460				
40	Phe	Pro														
	465															
45	<210>	19														
	<211>	461														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	19														
50	Met	Gln	Arg	Val	Asn	Met	Ile	Met	Ala	Glu	Ser	Pro	Ser	Leu	Ile	Thr
	1				5					10					15	
55	Ile	Cys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Cys	Thr	Val	Phe	Leu
			20						25					30		

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
 35 40 45
 Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
 50 55 60
 Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Pro Arg Glu Val Phe Glu Asn
 65 70 75 80
 Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
 85 90 95
 Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
 100 105 110
 Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
 115 120 125
 Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
 130 135 140
 Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
 145 150 155 160
 Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
 165 170 175
 Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
 180 185 190
 Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Pro Thr Glu Ala Glu
 195 200 205
 Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Gly Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
 210 215 220
 Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
 225 230 235 240
 Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
 245 250 255
 Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
 260 265 270
 Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
 275 280 285
 His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn

ES 2 524 974 T3

	290	295	300
5	Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu 305 310 315 320		
10	Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile 325 330 335		
15	Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr 340 345 350		
20	Val Ser Gly Trp Ala Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val 355 360 365		
25	Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg 370 375 380		
30	Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His 385 390 395 400		
35	Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val 405 410 415		
40	Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly 420 425 430		
45	Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser 435 440 445		
50	Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr 450 455 460		

<210> 20
 <211> 676
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

ES 2 524 974 T3

	Met	Arg	Val	Leu	Gly	Gly	Arg	Cys	Gly	Ala	Pro	Leu	Ala	Cys	Leu	Leu
	1				5					10					15	
5	Leu	Val	Leu	Pro	Val	Ser	Glu	Ala	Asn	Phe	Leu	Ser	Lys	Gln	Gln	Ala
				20					25					30		
10	Ser	Gln	Val	Leu	Val	Arg	Lys	Arg	Arg	Ala	Asn	Ser	Leu	Leu	Glu	Glu
			35					40					45			
15	Thr	Lys	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Ile	Glu	Glu	Leu	Cys	Asn
		50					55					60				
20																
25																
30																
35																
40																
45																
50																
55																

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

Lys Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Asp Pro Glu Thr Asp Tyr
 65 70 75 80
 Phe Tyr Pro Lys Tyr Leu Val Cys Leu Arg Ser Phe Gln Thr Gly Leu
 85 90 95
 Phe Thr Ala Ala Arg Gln Ser Thr Asn Ala Tyr Pro Asp Leu Arg Ser
 100 105 110
 Cys Val Asn Ala Ile Pro Asp Gln Cys Ser Pro Leu Pro Cys Asn Glu
 115 120 125
 Asp Gly Tyr Met Ser Cys Lys Asp Gly Lys Ala Ser Phe Thr Cys Thr
 130 135 140
 Cys Lys Pro Gly Trp Gln Gly Glu Lys Cys Glu Phe Asp Ile Asn Glu
 145 150 155 160
 Cys Lys Asp Pro Ser Asn Ile Asn Gly Gly Cys Ser Gln Ile Cys Asp
 165 170 175
 Asn Thr Pro Gly Ser Tyr His Cys Ser Cys Lys Asn Gly Phe Val Met
 180 185 190
 Leu Ser Asn Lys Lys Asp Cys Lys Asp Val Asp Glu Cys Ser Leu Lys
 195 200 205
 Pro Ser Ile Cys Gly Thr Ala Val Cys Lys Asn Ile Pro Gly Asp Phe
 210 215 220
 Glu Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Arg Tyr Asn Leu Lys Ser Lys Ser
 225 230 235 240
 Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Ser Glu Asn Met Cys Ala Gln Leu Cys
 245 250 255
 Val Asn Tyr Pro Gly Gly Tyr Thr Cys Tyr Cys Asp Gly Lys Lys Gly
 260 265 270
 Phe Lys Leu Ala Gln Asp Gln Lys Ser Cys Glu Val Val Ser Val Cys
 275 280 285
 Leu Pro Leu Asn Leu Asp Thr Lys Tyr Glu Leu Leu Tyr Leu Ala Glu
 290 295 300
 Gln Phe Ala Gly Val Val Leu Tyr Leu Lys Phe Arg Leu Pro Glu Ile
 305 310 315 320

	Ser	Arg	Phe	Ser	Ala	Glu	Phe	Asp	Phe	Arg	Thr	Tyr	Asp	Ser	Glu	Gly	
					325					330					335		
5	Val	Ile	Leu	Tyr	Ala	Glu	Ser	Ile	Asp	His	Ser	Ala	Trp	Leu	Leu	Ile	
				340					345					350			
	Ala	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys	Ile	Glu	Val	Gln	Leu	Lys	Asn	Glu	His	Thr	
			355					360					365				
10	Ser	Lys	Ile	Thr	Thr	Gly	Gly	Asp	Val	Ile	Asn	Asn	Gly	Leu	Trp	Asn	
		370					375					380					
	Met	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Glu	His	Ser	Ile	Ser	Ile	Lys	Ile	Ala	
15		385				390					395					400	
	Lys	Glu	Ala	Val	Met	Asp	Ile	Asn	Lys	Pro	Gly	Pro	Leu	Phe	Lys	Pro	
				405						410					415		
20	Glu	Asn	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	Lys	Val	Tyr	Phe	Ala	Gly	Phe	Pro	Arg	
				420					425					430			
	Lys	Val	Glu	Ser	Glu	Leu	Ile	Lys	Pro	Ile	Asn	Pro	Arg	Leu	Asp	Gly	
25			435					440					445				
	Cys	Ile	Arg	Ser	Trp	Asn	Leu	Met	Lys	Gln	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Lys	
		450				455						460					
30	Glu	Ile	Ile	Gln	Glu	Lys	Gln	Asn	Lys	His	Cys	Leu	Val	Thr	Val	Glu	
		465				470					475					480	
	Lys	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Ile	Ala	Gln	Phe	His	Ile	Asp	
35				485						490					495		
	Tyr	Asn	Asn	Val	Ser	Ser	Ala	Glu	Gly	Trp	His	Val	Asn	Val	Thr	Leu	
				500					505					510			
40	Asn	Ile	Arg	Pro	Ser	Thr	Gly	Thr	Gly	Val	Met	Leu	Ala	Leu	Val	Ser	
			515					520					525				
	Gly	Asn	Asn	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Val	Ser	Leu	Val	Asp	Ser	Thr	Ser	
45			530				535					540					
	Glu	Lys	Ser	Gln	Asp	Ile	Leu	Leu	Ser	Val	Glu	Asn	Thr	Val	Ile	Tyr	
		545			550						555					560	
50	Arg	Ile	Gln	Ala	Leu	Ser	Leu	Cys	Ser	Asp	Gln	Gln	Ser	His	Leu	Glu	
				565						570					575		
55	Phe	Arg	Val	Asn	Arg	Asn	Asn	Leu	Glu	Leu	Ser	Thr	Pro	Leu	Lys	Ile	

5															
10															
15															
20															
25															
30															
35															
40															
45															

Reivindicaciones

- 5 1. Un polipéptido del Factor VIIa quimérico, en donde el polipéptido del Factor VIIa quimérico comprende los dominios EGF-2 y catalíticos del Factor VII; un dominio GLA seleccionado del grupo que consiste en el dominio GLA del Factor IX y el dominio GLA de la proteína S; y un dominio EGF-1 seleccionado del grupo que consiste en el dominio EGF-1 del Factor IX y el dominio EGF-1 de la proteína S, para usar en el tratamiento de un trastorno de sangrado en un sujeto que tiene un trastorno de sangrado.
- 10 2. Un polipéptido del Factor VIIa quimérico para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el trastorno de sangrado es seleccionado del grupo que consiste en: deficiencias del factor de coagulación; función plaquetaria defectuosa; trombocitopenia; enfermedad de von Willebrand; inhibición de los factores de coagulación; sangrado inducido por cirugía; y, sangrado inducido por trauma.
- 15 3. Un polipéptido del Factor VIIa quimérico para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el trastorno de sangrado es una deficiencia del factor de coagulación.
4. Un polipéptido del Factor VIIa quimérico para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la deficiencia del factor de coagulación es hemofilia.
- 20 5. Un polipéptido del Factor VIIa quimérico para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el tratamiento del trastorno de sangrado comprende administrar al sujeto una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del Factor VIIa quimérico.
- 25 6. Un polipéptido del Factor VIIa quimérico para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el dominio GLA es un dominio GLA del Factor IX y el dominio EGF-1 es un dominio EGF-1 del Factor IX.
7. Un polipéptido del Factor VIIa quimérico para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el dominio GLA del Factor IX incluye una sustitución en el residuo 5 de lisina por arginina.
- 30 8. Un polipéptido del Factor VIIa quimérico para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el dominio GLA es un dominio GLA de Proteína S y el dominio EGF-1 es un dominio EGF-1 del Factor IX.
9. Una proteína de coagulación quimérica que comprende:
35 un dominio GLA de la proteína S;
 un dominio EGF-1 seleccionado del dominio EGF-1 de la proteína S; y, el dominio EGF-1 del Factor IX; y
 el dominio EGF-2 y dominio catalítico del Factor VII.
- 40 10. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de coagulación quimérica de la reivindicación 9.
11. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 10.
12. Una célula que comprende la proteína de coagulación quimérica de la reivindicación 9.
- 45 13. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 11.

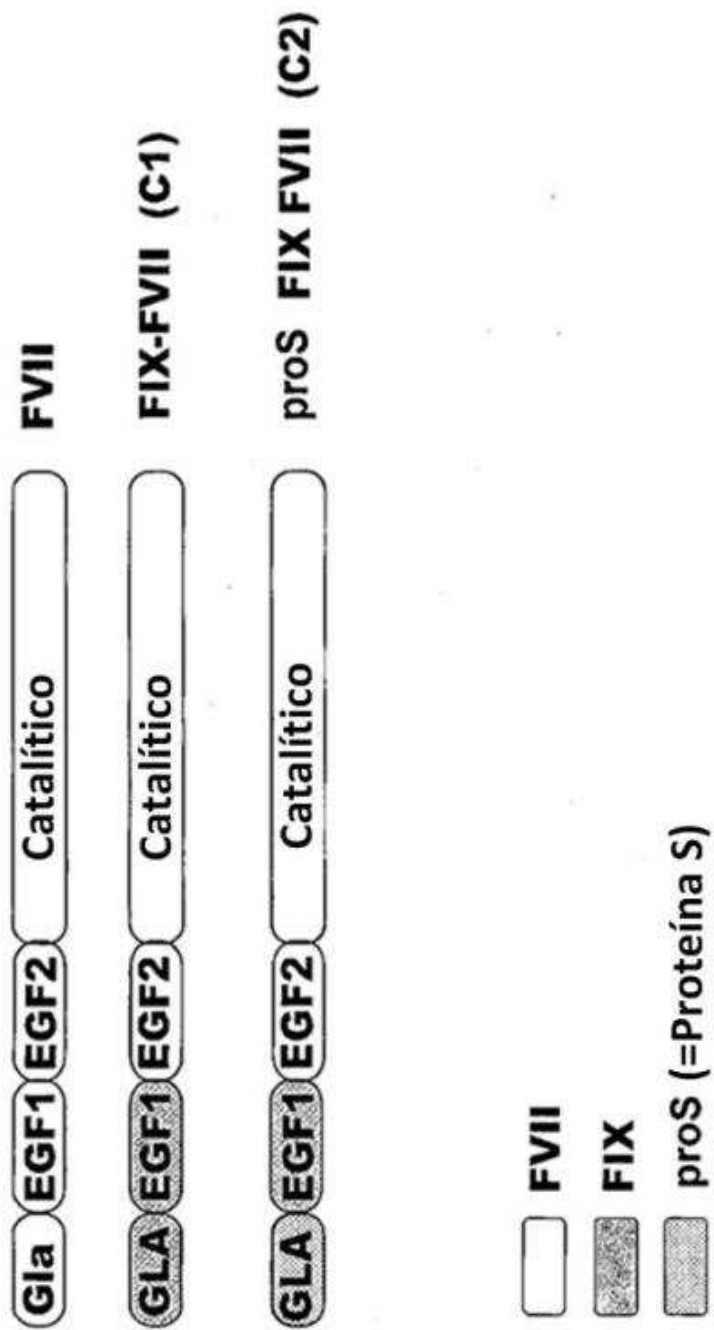


FIGURA 1

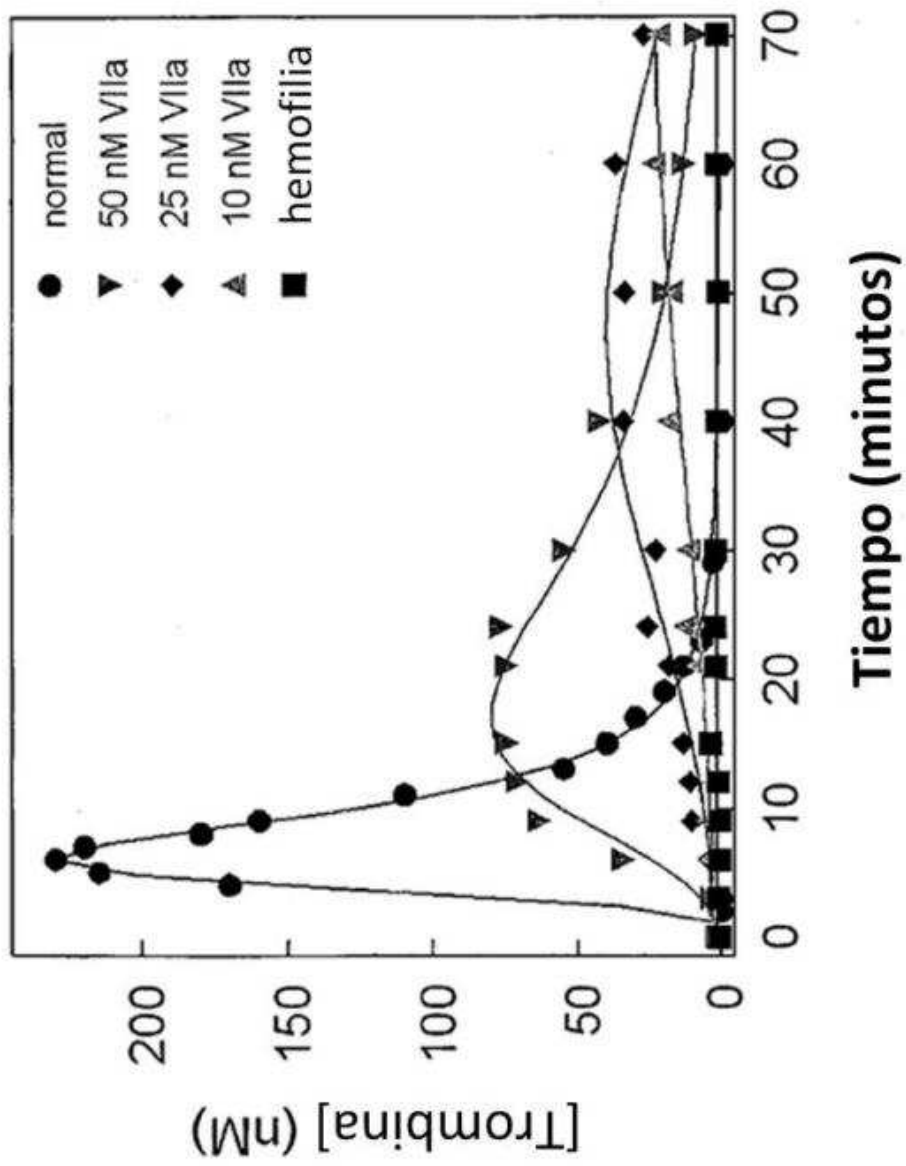


FIGURA 2

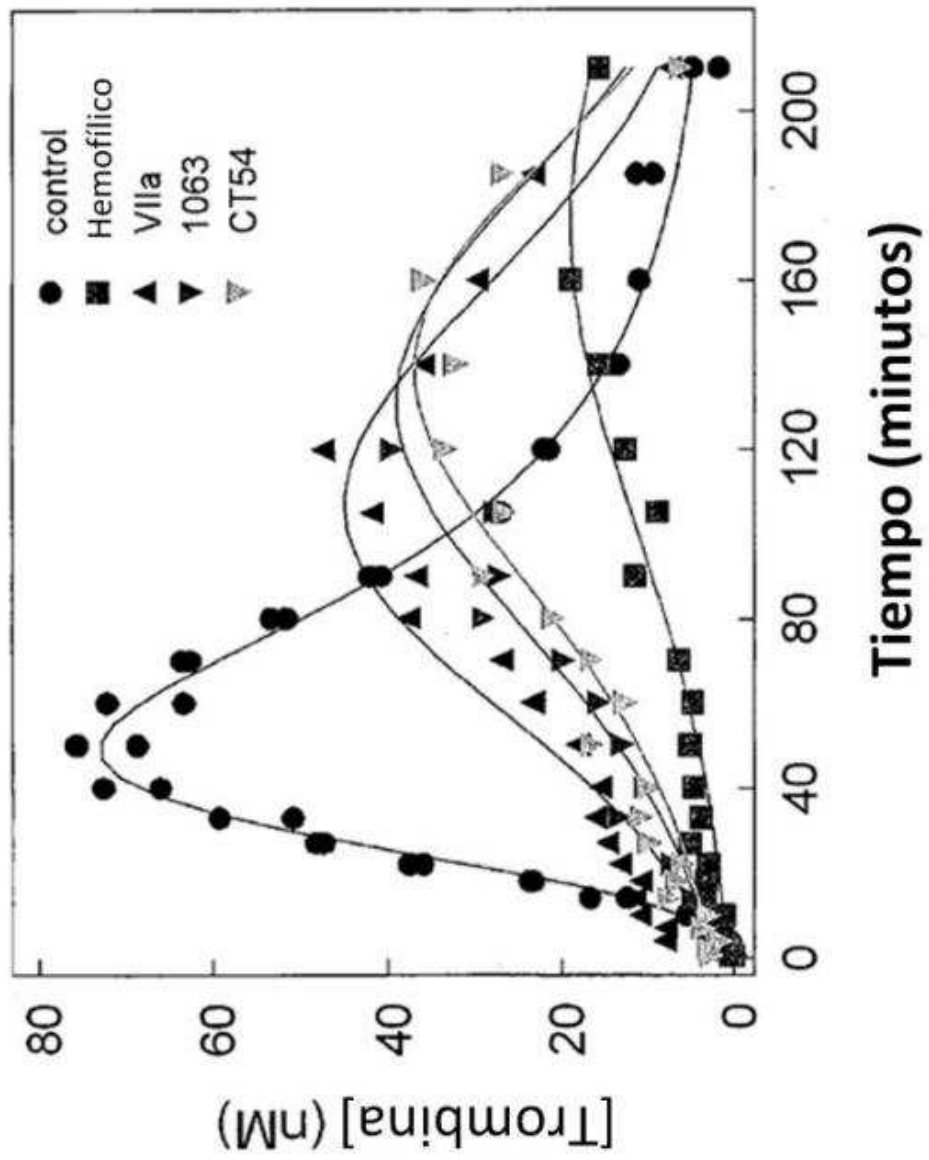


FIGURA 3

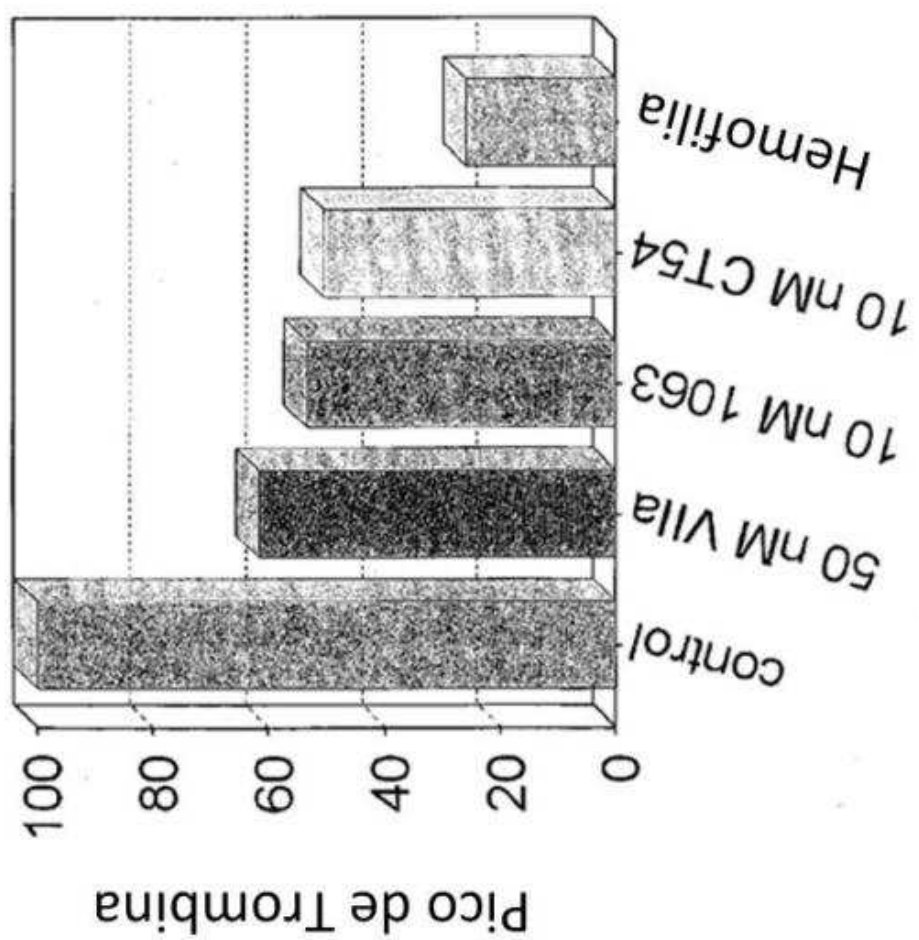


FIGURA 4

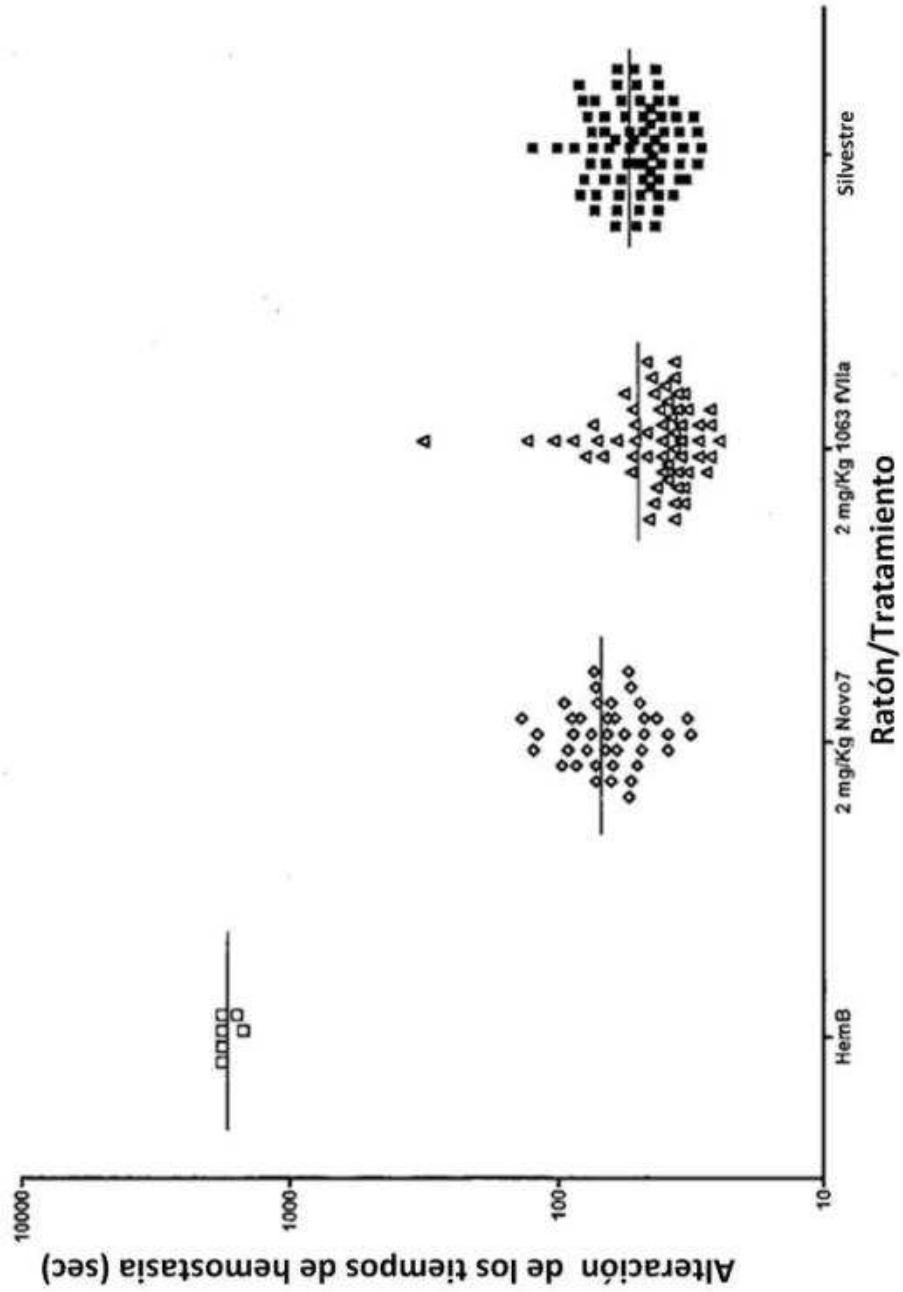


FIGURA 5

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLE
EFVQGNLERECMEEKCSFEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCL
NGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNCELHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHT
 GTKRSCRCHEGYSLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKV
 CPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGE
 HDLSEHDGDEQSRRAQVIIPSTVYPGTTNHDIALRLHQPVWLTDHVWPLCL
 PERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQS
 RKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSW
 GQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP

FIGURA 6

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKR**ANSLLEETKQ**
GNLERECIEELCNKEEAREVFENDPETDYFYPKYLVDGDQCESNPCLNGGSCK
DDINSYECWCPFGFEGKNCELHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTRSCRCH
EGYSLLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPCPKECPWQVL
 LLVNGAQLCGGTLINTIWWVSAAHCFDKIKNWRNLI/VLGEHDLSEHDGDEQSRR
 VAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLTDHVWPLCLPERTFSERTLAFVRFSLV
 SGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSNPITEYMFAGYS
 GSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVVSQYIEW
 LQKLMRSEPRPGVLLRAPFP

FIGURA 7