

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 116**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2013 PCT/US2013/077405**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14105784**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2013 E 13867801 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2938351**

54 Título: **Polipéptidos del Factor VII de corta acción**

30 Prioridad:

24.12.2012 US 201261745674 P

15.03.2013 US 201361787026 P

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

04.03.2020

73 Titular/es:

**COAGULANT THERAPEUTICS CORPORATION
(100.0%)**

**48-6, Gangnam-daero, 5F, Hansock Building,
Yangjae-dong, Seocho-gu
Seoul, KR**

72 Inventor/es:

**BAUZON, MAXINE y
HERMISTON, TERRY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 746 116 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos del Factor VII de corta acción

5 **Campo de la divulgación**

Las variantes del Factor VII de coagulación humana y los procedimientos para usar tales variantes se proporcionan en la presente memoria.

10 **Antecedentes**

La coagulación de la sangre es un proceso que consiste en una interacción compleja de varios componentes (o Factores) de la sangre que finalmente da lugar a un coágulo de fibrina. En general, los componentes sanguíneos, que participan en lo que se ha denominado la "cascada" de la coagulación, son proteínas enzimáticamente inactivas (proenzimas o zimógenos) que se convierten en enzimas proteolíticas por la acción de un activador (que en sí mismo es un factor de coagulación activado). Los factores de coagulación que se han sometido a tal conversión generalmente se denominan "Factores activos" y se designan mediante la adición de la letra "a" al nombre del factor de coagulación (por ejemplo, Factor VIIa).

El inicio del proceso hemostático está mediado por la formación de un complejo entre el factor tisular, que está expuesto a la sangre circulante después de una lesión en la pared del vaso, y el Factor VIIa, que está presente en la circulación en una cantidad correspondiente a aproximadamente 1% de la masa total de proteínas del Factor VII. Este complejo está anclado a la célula portadora de factor tisular y convierte los Factores IX y X en sus formas activas Factor IXa y Factor Xa en la superficie celular. El Factor Xa convierte la protrombina en trombina en la célula portadora del factor tisular, que activa el Factor VIII, el Factor V, el Factor XI y el Factor XIII. Además, la cantidad limitada de trombina formada en este paso inicial de hemostasia también activa las plaquetas. Después de la acción de la trombina sobre las plaquetas, las plaquetas cambian de forma y exponen los fosfolípidos cargados en su superficie. Esta superficie de plaquetas activada forma la plantilla para una mayor activación del Factor X y la generación completa de trombina. La activación adicional del Factor X en la superficie de las plaquetas activadas se produce a través de un complejo del Factor IXa y Factor VIIIa formado en la superficie de las plaquetas activadas, y el Factor Xa luego convierte la protrombina en trombina mientras aún está en la superficie. La trombina luego convierte el fibrinógeno en fibrina, que es insoluble y que estabiliza el tapón inicial de plaquetas. Este proceso se localiza en el sitio de la exposición al factor tisular, lo que minimiza el riesgo de una activación sistémica del sistema de coagulación. En los últimos años, se ha descubierto que el Factor VII y el factor tisular son los principales iniciadores de la coagulación sanguínea.

El Factor VIIa se produce a partir de su precursor, el Factor VII, que se sintetiza en el hígado y se secreta a la sangre donde circula como una glicoproteína de cadena única (peso molecular de aproximadamente 50.000 Da). El Factor VII de tipo silvestre como se usa en el presente documento tiene la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos descritas en las Figs. 1 y 2. El término "Factor VII" pretende abarcar los polipéptidos del Factor VII en su forma no escindida (la forma zimógena), así como aquellos que han sido procesados proteolíticamente o de otro modo para producir sus respectivas formas bioactivas, que pueden denominarse Factor VIIa. El Factor VII de tipo silvestre se escinde típicamente entre los residuos 152 y 153 para producir el Factor VIIa.

El Factor VII se convierte *in vitro* en la forma bicatenaria del Factor VIIa por el Factor Xa, el Factor XIIa, el Factor IXa o la trombina. Al igual que varias otras proteínas plasmáticas involucradas en la hemostasia, el Factor VII depende de la vitamina K para su actividad, que se requiere para la gamma-carboxilación de múltiples residuos de ácido glutámico que se agrupan cerca del extremo terminal amino de la proteína. Estos ácidos glutámicos gamma-carboxilados son necesarios para la interacción inducida por iones metálicos del Factor VII con fosfolípidos. En presencia de factor tisular, fosfolípidos y iones de calcio, el Factor VIIa bicatenario activa rápidamente el Factor X o el Factor IX por proteólisis limitada. El Factor VIIa es susceptible a la escisión proteolítica, dando lugar a una serie de productos de degradación que no tienen actividad de coagulación.

Se han publicado variantes del Factor VII que tienen una secuencia de aminoácidos derivada del Factor VII de tipo silvestre mediante sustitución, eliminación y/o inserción de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, Dickinson et al. (Proc. Natl. Acad. Sci USA (1996) 93, 14379-14384) se refieren a variantes del Factor VII en las que Lys157, Val158, Glu296, Met298, Asp334, Ser336 o Lys227 han sido reemplazadas individualmente por Ala. Iwanaga et al. (Thromb. Haemost. (suplemento de agosto de 1999), 466, resumen 1474) se refiere a variantes del Factor VIIa en las que se eliminan los residuos 316-320 o los residuos 311-322 se reemplazan con los residuos correspondientes de la tripsina. Publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos 2008/0058255 A1 de Bolt et al. se refiere a variantes del Factor VII que tienen una sustitución que interrumpe la glicosilación en N145 o N322, o en N145 y N322. Toso et al. informó una serie de estudios de estructura-función del Factor VII basados en mutaciones naturales. Las proteínas mutantes recombinantes del Factor VII incluían T324M, E385K y dos proteínas mutantes del Factor VII que carecen de secuencias centrales de glicosilación en la cadena pesada del Factor VII (N322Q) o la cadena ligera del Factor VII (N145Q). Toso et al., "Lack of Heavy Chain Glycosylation in Patient with Factor VII

Deficiency Not Responsible for Mutant FVIIa Activity", Blood, vol. 96, no. 11, parte 2 (16 de noviembre de 2000), pág. 79b (42ª Reunión Anual de la Sociedad Americana de Hematología).

5 La mayoría de los péptidos y proteínas de origen natural contienen fracciones de carbohidratos unidas al péptido o proteína a través de enlaces específicos a un número seleccionado de aminoácidos a lo largo de la cadena de péptido o proteína primaria. Por lo tanto, muchos péptidos y proteínas naturales se denominan "glicopéptidos" o "glicoproteínas", respectivamente. La variabilidad del patrón de glicosilación en cualquier péptido o proteína dada puede afectar la función de ese péptido o proteína. Por ejemplo, la estructura de los glicanos unidos a N en un péptido o proteína puede afectar varias características del péptido o proteína, incluida la susceptibilidad a la proteasa, el tráfico intracelular, la secreción, el direccionamiento a los tejidos, la semivida biológica y la antigenicidad del péptido o proteína en una célula u organismo. La alteración de una o más de estas características puede afectar la eficacia de un péptido o proteína en su entorno natural, y también puede afectar la eficacia del péptido o proteína como agente terapéutico en situaciones en las cuales el péptido o proteína ha sido generado para ese propósito.

15 La estructura de carbohidratos unida a la cadena peptídica o proteica se conoce como molécula de "glicano". La estructura de glicano específica presente en un péptido o proteína afecta las características de solubilidad y agregación del péptido o proteína, el plegamiento de la cadena de péptido o proteína primaria y, por lo tanto, su actividad funcional o enzimática, la resistencia del péptido o proteína al ataque proteolítico y el control de proteólisis que conduce a la conversión de formas inactivas del péptido o proteína en formas activas. Por ejemplo, los residuos terminales de ácido siálico presentes en la molécula de glicano afectan la duración de la semivida del péptido o proteína en el sistema circulatorio de los mamíferos. Los péptidos y proteínas cuyos glicanos no contienen residuos terminales de ácido siálico generalmente se eliminan más rápidamente de la circulación por el hígado.

25 Las estructuras de glicano encontradas en glicopéptidos y glicoproteínas de origen natural se dividen típicamente en dos clases, glicanos unidos a N y unidos a O. El Factor VIIa de tipo silvestre contiene dos sitios de glicosilación unidos a N y dos sitios unidos a O. La glicosilación unida a N es la modificación covalente más común en eucariotas. La glicosilación unida a N ocurre en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, en la que el glicano se une al grupo amina de la asparagina y X representa cualquier aminoácido excepto la prolina. Los glicanos unidos a N se basan en el pentasacárido de núcleo común, $\text{Man}_3(\text{GlcNAc})_2$, que puede modificarse aún más mediante la adición de monosacáridos como N-acetil galactosamina, galactosa, ácido neuramínico, N-acetilglucosamina, fructosa, manosa y fucosa. El núcleo $\text{Man}_3(\text{GlcNAc})_2$ con varios monosacáridos que incluyen ácidos siálicos terminales puede unirse mediante una N-acetilglucosamina a la Asn en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr. Esta modificación cotraduccional químicamente compleja sirve para muchos propósitos y afecta la biología de la proteína de diversas maneras, incluyendo el plegamiento adecuado, la orientación funcional del grupo y las tasas de eliminación.

35 Se han propuesto una variedad de procedimientos en la técnica para personalizar el patrón de glicosilación de un péptido o proteína, incluidos los descritos en la patente de Estados Unidos No. 8.008.252 de DeFrees et al.

40 A menudo es deseable estimular o mejorar la cascada de coagulación en un sujeto. El Factor VIIa se ha utilizado para controlar los trastornos hemorrágicos causados por 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. El Factor VIIa recombinante, fabricado y vendido por Novo Nordisk con el nombre comercial NovoSeven®, está aprobado para el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A o B con inhibidores del Factor VIII o Factor IX y en pacientes con hemofilia adquirida; prevención de hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con hemofilia A o B con inhibidores del Factor VIII o Factor IX y en pacientes con hemofilia adquirida; tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con deficiencia congénita del Factor VII y prevención de hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con deficiencia congénita del Factor VII. La patente de Estados Unidos No. 5.180.583 de Hedner describe el uso del Factor VIIa para controlar el sangrado excesivo en situaciones no causadas por defectos del factor de coagulación o inhibidores del factor de coagulación. Hedner describe el tratamiento de trastornos hemorrágicos causados, por ejemplo, por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand, y composiciones para esos usos.

55 Existe la necesidad de tratar la hemorragia por trastornos no causados por deficiencias congénitas o desarrolladas del factor de coagulación o inhibidores de los factores de coagulación. Varios ensayos clínicos han demostrado la eficacia del Factor VIIa recombinante para controlar las hemorragias. Sin embargo, existen preocupaciones sobre un aumento en los eventos tromboembólicos indeseables por el uso de esta molécula. El sangrado es un problema importante en muchos trastornos, tal como en relación con cirugía, complicaciones después de cirugía, trasplantes de células madre y órganos, hemorragia intracraneal, aneurisma aórtico y trauma, o sobredosis de ciertos anticoagulantes.

Breve resumen

65 Es un objetivo tratar los trastornos y episodios hemorrágicos con polipéptidos del Factor VII de acción corta. Un objetivo del presente trabajo es proporcionar polipéptidos del Factor VII (de tipo silvestre o variantes) de acción corta, caracterizados por uno o más rasgos farmacocinéticos, como una semivida más corta. Es un objetivo

proporcionar una molécula de Factor VII con una oportunidad reducida para eventos trombóticos fuera del sitio objetivo y el marco de tiempo del tratamiento. Es un objetivo proporcionar polipéptidos del Factor VII (tipo silvestre o variante) con aclaramiento mejorado debido a patrones de glicosilación alterados.

5 En este documento se describe un polipéptido del Factor VII de la SEQ ID NO: 16 en el que la relación de moles de ácido siálico conjugado con respecto a moles de glicano unido a N es menor que 0,05, menor que 0,1 o menor que 1,0

10 En el presente documento también se describen polipéptidos del Factor VII que tienen una conjugación reducida de ácido siálico con el polipéptido del Factor VII. El polipéptido del Factor VII es un polipéptido del Factor VII de tipo silvestre que tiene una conjugación reducida de ácido siálico. En ciertas realizaciones, la conjugación reducida de ácido siálico puede efectuarse mediante el tratamiento del polipéptido con una enzima sialidasa. En otras realizaciones, la conjugación reducida de ácido siálico puede efectuarse produciendo polipéptidos del Factor VII recombinantes en una línea celular que es parcial o completamente deficiente en la sialilación de péptidos. En 15 realizaciones adicionales, la conjugación reducida de ácido siálico se puede efectuar coexpresando el polipéptido del Factor VII recombinante y una enzima sialidasa recombinante o exógena en una línea celular.

También se describe un procedimiento para tratar a un mamífero que tiene una enfermedad o un trastorno en el que es deseable la formación de coágulos sanguíneos, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una 20 cantidad eficaz de un polipéptido del Factor VII que tiene una conjugación reducida de ácido siálico. En ciertas realizaciones, la relación de moles de ácido siálico conjugado con respecto a moles de glicano unido a N es menor que 0,05, en la que, el polipéptido del Factor VII comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En realizaciones adicionales, la enfermedad o trastorno el tratamiento se selecciona del grupo que consiste en una hemorragia, hemorragia gastrointestinal, hemorragia incontrolada, hemorragia en un mamífero sometido a trasplante 25 o resección o cirugía, hemorragia varicosa, trombocitopenia, hemofilia, hemorragia intracraneal, aneurisma aórtico y administración excesiva de un anticoagulante.

Otras variantes, composiciones, procedimientos y productos y procesos relacionados se describen en detalle a 30 continuación.

Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1A-1H muestran las secuencias de nucleótidos para tres moléculas del Factor VII utilizadas en la presente solicitud. "V1" es una variante del Factor VII humano que tiene cuatro mutaciones de aminoácidos en 35 relación con la secuencia de aminoácidos humana de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 16: (P10Q, K32E, T106N y V253N). "V2" es una variante del Factor VII humano que tiene seis mutaciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos humanos de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 16: (P10Q, K32E, A34E, R36E, T106N y V253N). La Figura 1 también muestra las secuencias de nucleótidos para diversos constructos usados en los ejemplos.

40 La Figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos para tres moléculas de Factor VII usadas en la presente solicitud. El Factor VII humano de tipo silvestre, tal como se usa en el presente documento, tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. V1 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17. V2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18. En V1 y V2, los cambios del Factor VII de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 16 se muestran en negrita.

45 La Figura 3 es un esquema que representa tres moléculas de Factor VII utilizadas en los ejemplos de la presente solicitud. Se muestra la unión de los glicanos en los sitios de N-glicosilación. Para la representación de los glicanos, una caja rellena representa N-acetilglucosamina, un óvalo sombreado representa manosa, un óvalo sin color representa galactosa, un diamante oscuro representa ácido siálico (también conocido como ácido N-acetilneuramínico) y un triángulo relleno representa fucosa. La estructura de glicano es una representación que 50 utiliza una posible variante de un glicano y no representa un glicano medido real.

La Figura 4 es un esquema que representa un glicano unido a N que muestra unión en la Asn en la secuencia de consenso Asn-X-Ser/Thr. Se muestra el núcleo de $\text{Man}_3(\text{GlcNAc})_2$ con varios monosacáridos que incluyen ácidos siálicos terminales.

55 La Figura 5 es un esquema que representa dos enfoques utilizados en la presente descripción para disminuir la semivida de las variantes del Factor VII, ejemplificadas con referencia a V2.

La Figura 6 es una tabla de moléculas del Factor VII hipoglicosiladas.

La Figura 7 muestra los resultados de un procedimiento de LC-MS para identificar el ácido siálico que queda en la cadena pesada de V2 después de la desialilación de acuerdo con las condiciones del experimento.

La Figura 8 muestra el análisis de V2 desialilado para el contenido de ácido siálico.

60 La Figura 9 muestra los resultados de un ensayo de activación del fosfolípido FX.

La Figura 10 muestra los resultados de un ensayo PL-TGA en proteínas desialiladas.

La Figura 11 muestra la expresión de variantes del Factor VII hipoglicosilado.

La Figura 12 es una tabla que muestra la determinación de la "actividad específica" de variantes de FVII hipoglicosiladas usando sobrenadantes de transfección.

65 La Figura 13 muestra los resultados de un ensayo PL-TGA en la variante hipoglicosilada purificada pMB121.

La Figura 14 muestra el aclaramiento de hepatocitos *in vitro* de V2 desialilado en comparación con el Factor VII

de tipo silvestre.

La Figura 15 muestra los resultados del aclaramiento de hepatocitos *in vitro* con variantes del Factor VII. Las variantes hipoglicosiladas no mostraron un aumento en el aclaramiento en este modelo. Este resultado sugiere un mecanismo de depuración diferente para estas moléculas del utilizado por el V2 desialilado.

La Figura 16 muestra los resultados del estudio farmacocinético en ratas. Las semividas de los V2 y V1 desialilados fueron significativamente más cortos que sus moléculas parentales no modificadas en ratas Sprague Dawley, medidas por ELISA de Factor VII.

La Figura 17 muestra los resultados de un estudio farmacocinético en ratones HemA.

La Figura 18 muestra un estudio de eficacia de V2 desialilado en ratones HemA.

La Figura 19 muestra un estudio de eficacia de V2 desialilado en el modelo TVT HemA.

La Figura 20 muestra los resultados de la generación de trombina-antitrombina ("TAT") en ratones HemA con V2 desialilado en comparación con el Factor VII.

La Figura 21 muestra un estudio de eficacia de V2 desialilado en ratones competentes en coagulación.

La Figura 22 muestra la eliminación de hepatocitos *in vitro* del Factor VII desialilado de tipo silvestre (VIIa dWT) en comparación con el Factor VII de tipo silvestre con conjugación normal de ácido siálico.

La Figura 23 muestra los resultados del estudio de corte de cola en ratones con inactivación del factor de tejido humano (TFKI) para el Factor VIIa dWT en comparación con el Factor VII de tipo silvestre. Se descubrió que el Factor VII desialilado es significativamente más eficaz que el Factor VII de tipo silvestre.

La Figura 24 muestra los resultados de un análisis ELISA de complejos de trombina-antitrombina (TAT) después de la administración de Factor VIIa dWT o VII de tipo silvestre

La Figura 25 muestra los resultados de un análisis de la formación de trombos en un modelo de trombosis con FeCl₃. La dosis administrada del Factor VIIa dWT produjo una formación de trombo muy reducida en comparación con el Factor VII de tipo silvestre.

La Figura 26 muestra las afinidades de unión aparentes del Factor VIIa dWT y el Factor VII de tipo silvestre para el factor de tejido soluble medido por un sustrato fluorogénico.

La Figura 27 muestra la conversión de Factor X en Factor Xa por un complejo de factor de tejido soluble y Factor VIIa dWT o VII de tipo silvestre.

Descripción detallada

En el presente documento se describen procedimientos para modular la farmacocinética de polipéptidos recombinantes del Factor VII (tipo silvestre o variante) para limitar las complicaciones trombóticas en el tratamiento de hemorragia aguda, en donde los polipéptidos del Factor VII tienen conjugación reducida de ácido siálico. Dichas variantes del Factor VII recombinante tienen una mejor eliminación de la sangre y una disminución en la duración de la eficacia. Dichas variantes tienen una semivida más corta *in vivo*, debido a patrones de glicosilación alterados. También se describen procedimientos de producción y uso de dichos polipéptidos del Factor VII de acción corta.

Para explicar el Factor VII y la glicosilación, se proporcionan las Figs. 3 y 4. La Figura 3 muestra esquemáticamente tres ejemplos de moléculas del Factor VII con sus dominios. El Factor VII es una proteína que consiste en un Gla, EGF y dominio catalítico y que contiene 2 glicanos unidos a N (N145 y N322). V1 es una variante del Factor VII con cuatro mutaciones (P10Q, K32E, T106N, V253N). V2 es una variante del Factor VII con seis mutaciones (P10Q, K32E, A343, R36E, T106N, V253N). V1 y V2 tienen una mayor afinidad por las plaquetas activadas y contienen dos sitios adicionales de N-glicosilación que dan como resultado semividas más largas en comparación con el Factor VII de tipo silvestre. Se cree que las dos mutaciones encontradas únicamente en V2 (A34E, R36E) explican su independencia del factor tisular.

La Figura 4 muestra esquemáticamente un ejemplo de un glicano unido a N que muestra unión en la Asn en la secuencia de consenso Asn-X-Ser/Thr. Se muestran el núcleo Man₃(GlcNac)₂ con varios monosacáridos que incluyen ácidos siálicos terminales.

En el presente documento se proporcionan procedimientos para preparar un polipéptido del Factor VII que tiene una semivida corta deseada. Se proporcionan dos procedimientos generales para elaborar un polipéptido del Factor VII de acción corta, procedimientos que se pueden usar por separado o en combinación. Como se muestra esquemáticamente en la Figura 5 usando un ejemplo de una variante del Factor VII, una variante del Factor VII glicosilado puede procesarse por desialilación o desglicosilación para alterar el patrón de glicosilación de la variante y de ese modo alterar, y preferiblemente acortar, su semivida. Este procedimiento también podría usarse para desialilar un polipéptido del Factor VII de tipo silvestre.

La desialilación puede ocurrir por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los ejemplos de procedimientos adecuados incluyen la desialilación enzimática por contacto con cualquier enzima conocida que funcione para desialilar, incluidas, entre otras, sialidasas, incluidas perlas de neuraminidasa-agarosa (Sigma N5254) y la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* identificada en GI:40479 y en FEBS Lett. 238 (1), 31-34 (1988). Dicha desialilación se puede lograr poniendo en contacto un polipéptido del Factor VII recombinante parcialmente purificado con una sialidasa *in vitro* en condiciones adecuadas, o mediante la coexpresión de la sialidasa en la célula huésped que expresa el polipéptido del Factor VII recombinante. El contacto *in vitro* puede ser de tal duración que solo se produce la desialilación parcial. Por ejemplo, cuando se puede obtener una semivida deseada a partir de una

molécula con una relación de 0,5 a 1 moles de ácido siálico conjugado con respecto a moles de glicano unido a N en la composición de polipéptidos del Factor VII, luego se recomienda poner en contacto con una sialidasa durante un período de tiempo limitado antes de que ocurra la desialilación completa. La desialilación parcial también puede obtenerse usando una sialidasa modificada, poniendo en contacto el polipéptido del Factor VII con la sialidasa en condiciones que retrasan o deterioran el funcionamiento completo de la sialidasa, o mediante otros procedimientos evidentes para los expertos en la materia para producir solo polipéptidos parcialmente desialilados. La desialilación parcial se puede medir en comparación con la relación de ácido siálico conjugado a glicano en una preparación de referencia que se ha desialilado por completo.

La desialilación también se puede lograr a través de la expresión del polipéptido del Factor VII (tipo silvestre o variante) en una línea celular que carece o es deficiente en uno o más componentes celulares necesarios para la adición del ácido siálico. Ciertas líneas celulares se han modificado o pueden modificarse para reducir o eliminar la sialilación. Por ejemplo, las células Lec2 de ovario de hámster chino ("CHO") producen glicoproteínas con aproximadamente diez veces menos ácido siálico que la célula de tipo silvestre. Se cree que la desialilación de un glicano da como resultado una molécula que puede ser eliminada activamente por los receptores hepáticos, incluido el receptor de asialoglicoproteína (ASGPR) y, por esta razón, acorta la semivida.

El segundo enfoque es desglicosilar una variante del Factor VII y de ese modo obtener una molécula con una semivida acortada. La reducción en la glicosilación mejora la eliminación del Factor VII a través de la eliminación renal (corte de 50-60 Kd, revisado en Caliceti P y Veronese FM, " Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates", *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55 (10): 1261-77, Weinstein T et al., " Distribution of glycosaminoglycans in rat renal tubular epithelium", *J Am Soc Nephrol.* 1997; 8 (4): 586-95, Choi HS et al., " Renal clearance of quantum dots", *Nat Biotechnol.* 2007; 25 (10): 1165-70), carga superficial y cambio de punto isoelectrico (pI) (que se han relacionado con el aumento en la circulación de glicoproteínas, véase la revisión en Byrne B. et al., "Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells", *Drug Discovery Today* 2007; 12 (7-8): 319), y a través de una menor protección mediada por glicoproteínas de cualquier cantidad de proteasas del plasma (Ton G., et al., 2005, Nie Y et al., 2006).

La desglicosilación como se usa en el presente documento incluye una modificación genética de un polipéptido del Factor VII que da como resultado una secuencia de aminoácidos alterada en comparación con un polipéptido del Factor VII de referencia, cuya alteración elimina un sitio de glicosilación unido a N. Por ejemplo, se puede producir una variante del Factor VII con una alteración que interrumpe la glicosilación en uno o más residuos de aminoácidos requeridos para la secuencia consenso de glicano unido a N, es decir, Asn-X-Ser/Thr en la que X representa cualquier aminoácido excepto prolina. Como se usa en el presente documento, una "alteración que interrumpe la glicosilación" de una secuencia de aminoácidos del Factor VII se refiere a una alteración en relación con el Factor VII de tipo silvestre que da como resultado una sustitución, adición o eliminación de uno o más residuos de aminoácidos y que da como resultado una pérdida de uno o más sitios para la glicosilación unida a N. Por ejemplo, los sitios de glicosilación unidos a N pueden eliminarse reemplazando N145 y/o N322, ambos presentes en el Factor VII de tipo silvestre, con cualquier aminoácido (natural o no natural). Deben identificarse los sitios de glicosilación que tienen un efecto mínimo sobre la actividad cuando se modifican para interrumpir la glicosilación. En otro ejemplo, la desglicosilación puede ocurrir mediante la expresión del polipéptido del Factor VII (tipo silvestre o variante) en una línea celular que carece de la maquinaria para la glicosilación. Por ejemplo, se espera que el Factor VII producido en las células bacterianas esté completamente no glicosilado porque las células bacterianas carecen de la maquinaria celular para la glicosilación. En otra realización, el polipéptido del Factor VII se produce en una línea celular que carece de enzimas de glicosilación terminal o que tiene tales enzimas pero una o más tienen una actividad que es menor que la encontrada en la línea celular de tipo silvestre. Véase, por ejemplo, Appa R. et al., 201, Narita M et al., 1998, Seested et al., 2010. En otra realización, el polipéptido del Factor VII se produce en una línea celular que alberga un defecto en una enzima involucrada en la síntesis o unión de un glicano al Factor VII o un defecto en una enzima implicada en la síntesis del transportador de CMP-ácido siálico. En otra realización, el polipéptido del Factor VII se trata con desglicosilasa o productos químicos para desglicosilar.

El tratamiento con sialidasa, desglicosilasa o productos químicos para reducir o eliminar los glicanos de un polipéptido del Factor VII puede ocurrir durante la expresión, purificación o después de la purificación.

Por ejemplo, al menos uno de los sitios de glicosilación unidos a N en la variante V1 del Factor VII (N322, N145) o la variante V2 del Factor VII (N322, N145, N106, N253) se eliminó selectivamente con un efecto mínimo sobre la actividad. El sitio de N-glicano fue borrado a nivel de ADN al interrumpir la secuencia consenso de N-glicano. Esto se realizó mediante la eliminación del codón N (asparagina) y el reemplazo con el codón Q (glutamina). La Figura 6 es una tabla que muestra ejemplos de variantes hipoglicosiladas. Las variantes de glicosilación se realizaron en el Factor VII de tipo silvestre (denominado en el presente documento "F7"), cadenas principales de V1 y V2. Los sitios de N-Glicano modificados por ingeniería genética (N106, N253) en V1 y V2 se volvieron a su secuencia de tipo silvestre (T106, V253). Las variantes pMB113, pMB117 y pMB121 son constructos del Factor VII, V1 y V2 de tipo silvestre, respectivamente, que contienen los dos sitios de N-glicosilación endógena (N145, N322). Todas las demás variantes en la Figura 6 han eliminado uno o ambos de sus sitios endógenos de N-glicano mediante la introducción de mutaciones de N por Q (N145Q, N322Q). Este enfoque de desglicosilación da como resultado una eliminación

más rápida.

En un aspecto de la presente descripción, la desglicosilación y la desialilación se combinan para dar como resultado polipéptidos del Factor VII que tienen semividas acortadas deseables. Por ejemplo, una molécula del Factor VII puede modificarse genéticamente para incluir sitios adicionales de glicosilación unidos a N más allá de los dos presentes en el Factor VII de tipo silvestre. Esta variante puede desialilarse usando uno de los procedimientos descritos en este documento. La molécula resultante puede retener la estructura de glicano en cada sitio de glicosilación unido a N sin el ácido siálico terminal. En los experimentos reportados en el presente documento, los solicitantes informan que tales variantes tienen un tiempo de eliminación más rápido que una variante similar del Factor VII desialilado que tenía menos sitios de glicosilación unidos a N. De manera similar, un polipéptido del Factor VII que tiene solo los dos sitios de glicosilación unidos a N encontrados en el Factor VII de tipo silvestre puede desglicosilarse en uno de estos sitios y luego someterse a desialilación. La variante resultante del Factor VII que tiene un glicano unido a N que carece de ácido siálico tiene una farmacocinética diferente que el polipéptido del Factor VII similar que no carecía de un segundo sitio de glicosilación unido a N basado en la evidencia experimental reportada en el presente documento.

Definiciones y realizaciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento generalmente tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta divulgación. Generalmente, la nomenclatura utilizada en este documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química e hibridación de ácidos nucleicos son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para la síntesis de ácidos nucleicos y polipéptidos. La nomenclatura utilizada en este documento y los procedimientos de laboratorio en química analítica y síntesis orgánica descritos a continuación son los conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se utilizan técnicas estándar, o modificaciones de las mismas, para síntesis químicas y análisis químico. Los procedimientos utilizados para la ingeniería genética son bien conocidos y se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York.

El término "ácido siálico" o "sialilo" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es el ácido N-acetil-neuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-onico (a menudo abreviado como Neu5Ac, NeuAc o NANA)).

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen mediante enlaces amida. Además, también se incluyen aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homoarginina. Los aminoácidos que no están codificados por genes también se pueden usar con la tecnología en el presente documento. Además, también se pueden usar aminoácidos que se han modificado para incluir grupos reactivos, sitios de glicosilación, polímeros, fracciones terapéuticas, biomoléculas y similares. Todos los aminoácidos utilizados en el presente documento pueden ser el isómero D o L. El isómero L es generalmente preferido. Como se usa en el presente documento, "polipéptido" y "proteína" se refieren a polipéptidos y proteínas tanto glicosilados como no glicosilados, respectivamente.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que luego se modifican, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los "análogos de aminoácidos" se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales de péptidos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los "miméticos de aminoácidos" se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido natural.

El término "semivida" o " $t_{1/2}$ ", como se usa en el presente documento en el contexto de administrar un fármaco de polipéptido o proteína a un paciente, se define como el tiempo requerido para la concentración en plasma de un fármaco en un paciente para ser reducido a la mitad.

La semivida se puede determinar en animales de prueba, por ejemplo, administrando una dosis de aproximadamente 25-250 microgramos/kg de la preparación; obtener muestras de plasma en tiempos predeterminados después de la administración; y determinar el contenido del polipéptido del Factor VII en las muestras usando uno o más de un ensayo de coagulación (o cualquier bioensayo), un inmunoensayo o un equivalente. Los datos se pueden mostrar gráficamente y luego la biodisponibilidad se determinará como el área bajo la curva. En ciertos ejemplos, se usan modelos de rata o murino para mediciones de semivida. La

biodisponibilidad relativa de un polipéptido del Factor VII o composición del mismo se refiere a relación del área bajo la curva del polipéptido del Factor VII de acción corta con respecto al Factor VII de tipo silvestre u otro polipéptido o proteína de comparación apropiado. Cualquier variante del Factor VII que tenga actividad de coagulación sanguínea del Factor VII es útil para los fines y procedimientos descritos en este documento. Las variantes del Factor VII como se usan en el presente documento son polipéptidos. Los términos "polipéptidos variantes del Factor VII" y "variantes del Factor VII" se usan indistintamente en el presente documento.

El polipéptido del Factor VII es un polipéptido del Factor VII humano de la SEQ ID NO: 16. Las variantes del Factor VII como se usan en el presente documento son variantes de glicosilación del Factor VII de tipo silvestre. Por ejemplo, una variante del Factor VII de tipo silvestre parcialmente desialilado y sus composiciones pueden ser útiles porque tiene una semivida más corta que el Factor VII de tipo silvestre. También son útiles en el presente documento el Factor VII desialilado de tipo silvestre y el uso de dichos polipéptidos en el tratamiento de las enfermedades mencionadas en el presente documento que se benefician de un polipéptido de acción corta que tiene actividad de Factor VII. La desialilación parcial o completa se puede medir por la relación de moles de ácido siálico conjugado con respecto a las moles de glicano unido a N en una composición de polipéptidos del Factor VII como se describe en el presente documento.

Los polipéptidos del Factor VII se pueden producir de forma recombinante en una célula, tejido u organismo. Dicha producción recombinante se logra transformando o transfectando una célula huésped con una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido variante o un vector que contiene dicho ácido nucleico. Numerosos procedimientos de transformación y transfección son bien conocidos en la técnica y los expertos en la materia podrían seleccionar fácilmente un procedimiento apropiado para su aplicación deseada.

Dicha producción recombinante también se puede lograr usando cualquier célula, tejido u organismo huésped adecuado. Las células, tejidos y organismos adecuados son bien conocidos en la técnica y las personas expertas en la técnica podrían seleccionar fácilmente un huésped apropiado para su aplicación deseada. En algunas realizaciones, la célula huésped es mamífero. Ejemplos de líneas celulares de mamífero adecuadas son COS-1 (ATCC CRL 1650), riñón de hámster bebé (BHK), HEK293 (ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977), líneas celulares HEK293T (ATCC CRL 11268; DSM ACC 2494) y HEK293F (Invitrogen R79007). Una línea celular BHK útil es la línea celular tk³¹ ts13 BHK (Waechter y Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1106-1110, 1982, incorporada en el presente documento por referencia), en lo sucesivo denominadas células BHK 570. La línea celular BHK 570 se ha depositado en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852, bajo el número de acceso a la ATCC CRL 10314. También está disponible una línea celular tk ts13 BHK en la ATCC bajo el número acceso CRL 1632. Además, se pueden usar una serie de otras líneas celulares dentro de la presente descripción, incluyendo Hep I de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Hep II de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 61), CHO K1 (ATCC CCL61), células DUKX (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, 1980) y células CHO-DG44 (Urlaub et al., Cell 33: 405-412, 1983).

Los polipéptidos del Factor VII son útiles en los que los polipéptidos del Factor VII se definen como en el presente documento y la relación en moles del ácido siálico conjugado por mol de glicano unido a N en la composición es menor que 0,05, menor que 0,1, menor que 1,0, o en la que la relación de moles de ácido siálico conjugado por mol de glicano unido a N está dentro de un intervalo seleccionado del grupo que consiste de 0 a 1 y de 0 a 0,5. La relación es una medida de las moles de ácido siálico unidas a una glicoproteína en relación con el número de glicanos en la glicoproteína. El número de glicanos se refiere al número de fracciones de azúcar unidas a un glicano unido a N en la glicoproteína, en la que un sitio de glicosilación unido a N puede soportar solo un glicano como se define en el presente documento para los fines de esta relación. La relación se determina usando un kit de marcación de fluorescencia de ácido siálico como el vendido por Takara Bio Inc. (cat. # 4400). Tal kit de marcación de fluorescencia de ácido siálico incluye una etapa para la liberación de ácido siálico de la glicoproteína unida, tal como por hidrólisis parcial con ácido o mediante el uso de sialidasa, tal como sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens*. Los ácidos siálicos libres se marcan con un fluoróforo tal como 1,2-diamino-4,5-metilenoxibenceno ("DMB"). Los ácidos siálicos marcados se miden cuantitativamente usando HPLC y comparando las alturas máximas con una curva de calibración. Por lo tanto, la relación medida es una relación de moles de ácido siálico por mol de glicano liberado de todos los polipéptidos del Factor VII de la composición.

Los polipéptidos del Factor VII tienen una semivida como la medida en plasma humano o de mamífero, por ejemplo plasma murino o de rata, de menos de 0,5 horas, menos de 0,25 horas, menos de 0,1 horas, o tan corta que no puede medirse razonablemente.

Como se usa en este documento, la actividad del Factor VII es una actividad biológica que puede cuantificarse midiendo la capacidad de una preparación para promover la coagulación de la sangre usando plasma y tromboplastina deficientes en Factor VII, como es bien conocido en la técnica. En ciertos ejemplos, un polipéptido del Factor VII que tiene actividad del Factor VII muestra al menos 25%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de los actividad del Factor VII de tipo silvestre medida en las mismas condiciones.

Los polipéptidos del Factor VII descritos en el presente documento son útiles para el tratamiento de trastornos de coagulación de la sangre, y aquellos trastornos que se benefician de la coagulación de la sangre, y particularmente para la coagulación con un fármaco que tiene una semivida más corta que el Factor VII de tipo silvestre. Por consiguiente, los polipéptidos y composiciones del Factor VII de la presente invención son útiles para penetrar lesiones traumáticas; lesión traumática contundente; sangrado en cirugía electiva; sangrado en cirugía cardíaca; sangrado en cirugía espinal; cirugía ortopédica; neurocirugía; cirugía oncológica; cirugía posparto; menorragia; sangrado en el trasplante de células madre; sangrado en el trasplante de hígado; hemorragia gastrointestinal; sangrado varicoso activo en cirrosis; sangrado no varicoso en cirrosis; hemorragia alveolar difusa; aneurisma aórtico; hemorragia intracerebral; lesión cerebral traumática; contusión cerebral; reversión de warfarina; reversión de heparina; reversión de anticoagulantes; reversión de antitrombóticos; deficiencia del Factor VII; quemaduras profilaxis en pacientes con hemofilia con inhibidores; hepatectomía parcial para pacientes no cirróticos y cirróticos; hemofilia adquirida; púrpura trombocitopénica idiopática; trombostenia de Glanzmann; trombostenia de Glanzmann refractaria a la transfusión de plaquetas y el síndrome de Bernard-Soulier.

En el presente documento también se describe un ensayo útil para medir la semivida de factores de coagulación tales como el Factor VII. Existe un procedimiento para determinar la semivida de un factor de coagulación que comprende incubar células viables de hepatocitos de rata con un factor de coagulación sanguínea, retirar una muestra en el punto de tiempo de prueba 1, separar el sobrenadante de las células en la muestra y cuantificar la actividad o la cantidad de factor de coagulación sanguínea en el sobrenadante de la muestra, en el que la actividad o cantidad del factor de coagulación sanguínea se determina usando un ensayo ELISA tipo sándwich de doble anticuerpo. El procedimiento puede repetirse en diferentes puntos de tiempo para desarrollar una gráfica de actividad o cantidad de factor de coagulación sanguínea a lo largo del tiempo.

Ejemplos

Procedimientos para obtener polipéptidos del Factor VII desialilado

Se emplearon numerosos procedimientos para generar polipéptidos del Factor VII desialilados (tanto de tipo silvestre como variantes), que incluyen la desialilación enzimática del polipéptido, la producción del polipéptido del Factor VII en una línea celular deficiente en sialilación y la coexpresión del Factor VII y una sialidasa en una célula recombinante.

Generación de línea celular deficiente en ácido siálico

El ácido siálico endógeno se sintetiza en células de mamíferos que implican una ruta compleja que consiste en 32 enzimas (Wickramasinghe y Medrano 2011). La biosíntesis de ácido siálico comienza en el citosol convirtiendo UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) en Neu5Ac que involucra varias enzimas, tales como UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa/nacetilmanosamina quinasa (GNE), ácido siálico 9-fosfato sintasa (NANS) y ácido siálico 9-fosfato fosfatasa (NANP). Neu5Ac en el citosol se importa al núcleo a través de los poros nucleares y se convierte en CMP-Neu5Ac por una enzima llamada CMP-Sia sintasa (CMAS). La CMP-Neu5Ac sintetizada se transporta nuevamente al citosol a través de los poros nucleares para su posterior modificación y conjugación en el aparato de Golgi. La conversión de Neu5Ac en Neu5Gc en el citosol es catalizada por la enzima CMP-NeuAc-hidroxilasa (CMAH). Luego, CMP-Neu5Ac y CMP-Neu5Gc se transportan al compartimento de Golgi a través de un transportador de membrana hidrofóbico tipo 3, transportador de CMP-ácido siálico (SLC35A1), ubicado en la membrana de la mediana trans-Golgi. El transportador de CMP-ácido siálico es un elemento clave en la ruta de sialilación celular (Hirschberg, et al., 1998). Una mutación homocigota de este gen causa letalidad postnatal en el ratón (MGI 4.32, HomoloGene). En humanos, las mutaciones en SLC35A1 están asociadas con la reducción o pérdida completa de conjugados de sialilo. Algunas mutaciones de inserción y eliminación en SLC35A1 están asociadas con trastornos congénitos de la glicosilación en humanos que conducen a defectos en el desarrollo del sistema nervioso, la coagulación y la inmunodeficiencia (Martinez-Duncker, et al., 2005). Una vez que CMP-Neu5Ac/CMP-Neu5Gc se transporta al aparato de Golgi, se conjugan con carbohidratos, glicoproteínas y glicolípidos por enzimas de la familia de la sialiltransferasa (ST) con 20 miembros.

El transportador de CMP-ácido siálico (SLC35A1) es la molécula clave que soporta la conjugación de ácido siálico en el aparato de Golgi, y las mutaciones en esta proteína transportadora conducen a la síntesis de proteínas que carecen de la sialilación adecuada. Para producir el Factor VII desialilado, se produce una línea celular de producción del Factor VII con el gen transportador de CMP-ácido siálico inactivado. Alternativamente, la desialilación podría lograrse mediante la expresión de la variante del Factor VII en una línea celular que produce proteínas terapéuticas con un nivel muy bajo o sin sialilación en las moléculas terapéuticas. Esta tecnología podría usarse para producir proteínas terapéuticas con T1/2 corto en pacientes.

La célula Lec2 con origen en el ovario de hámster chino (CHO) se identificó con la propiedad de producir aproximadamente 10 veces menos ácido siálico en glicoproteínas y glicolípidos que las células de tipo silvestre respectivas (Stanley y Siminovitch, 1977, Stanley, 1980 y 1983) Un estudio posterior mostró que los mutantes de Lec2 no podían translocar CMP-ácido siálico a través de las membranas de las vesículas de Golgi en un ensayo *in vitro*, mientras que la translocación de otros derivados de nucleótidos era comparativamente normal en células

mutantes (Deutscher, et al., 1984). Mediante el uso de la clonación de expresión, se informó el gen que codifica el transportador de CMP-ácido siálico de células Lec2 (Eckhardt et al., 1996). La investigación adicional indicó que la eliminación de los nucleótidos 575-751 en el gen transportador de CMP-ácido siálico fue responsable del fenotipo Lec2 (Eckhardt, et al., 1998). Otras mutaciones en el gen transportador de CMP-ácido siálico, como en el caso de las células 1E3, 6B2, 8G8 y 9D3, también conducen al fenotipo Lec2 (Eckhardt, et al., 1998).

Experimento 1

Este experimento está diseñado para determinar si la mutación en el gen del transportador de CMP-ácido siálico, tal como en el caso de las células Lec2, da como resultado una proteína recombinante expresada (por ejemplo, Factor VII) deficiente en sialilación en comparación con la misma proteína expresada a partir de células CHO normales.

(1) Prueba de la expresión de proteína recombinante, tal como el Factor VII, a partir de células Lec2. Los vectores de expresión que contienen un gen variante del Factor VII (por ejemplo, PMB117 y pMB121) se transfecan en células Lec2 y células CHO normales en condiciones de transfección normales. Los niveles de expresión del Factor VII del cultivo celular de estas células se controlan mediante un ensayo de actividad del Factor VII. El cultivo de células transfectadas se amplía y los medios de cultivo condicionados se cosechan para la purificación del Factor VII.

(2) Prueba del contenido de ácido siálico del Factor VII purificado expresado a partir de células Lec2 en comparación con la misma proteína expresada a partir de células CHO normales. La purificación del Factor VII a partir de estos medios condicionados se realiza siguiendo los procedimientos normales de purificación del Factor VII. El Factor VII purificado de células Lec2 o células CHO normales se analiza para determinar el contenido de ácido siálico del Factor VII purificado. La actividad biológica y los parámetros farmacocinéticos (PK) se analizan como se describe en el presente documento.

Experimento 2

Para producir una línea celular de fabricación para expresar una variante del Factor VII sin ácido siálico en las proteínas recombinantes expresadas, se usan procedimientos de eliminación de genes dirigidos al gen transportador de CMP-ácido siálico para modificar una línea celular que expresa el Factor VII (por ejemplo, una línea celular CHO). Para inhibir completamente la sialilación en la célula, otros objetivos, tales como UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa/N-acetilmanosamina quinasa (GNE), ácido siálico 9-fosfato sintasa (NANS), ácido siálico 9-fosfato fosfatasa (NANP), y la CMP-Sia sintasa (CMAS) como se mencionó anteriormente en la introducción, opcionalmente también se puede eliminar para mejorar la inhibición de la biosíntesis de CMP-Neu5Ac que proporciona el sustrato para el transportador de CMP-ácido siálico.

Se pueden usar dos tecnologías de eliminación de genes, las nucleasas TALE (TALEN) de Life Technologies y las nucleasas ZFP (ZFN) de Sangamo BioSciences/Sigma-Aldrich, para llevar a cabo la inactivación del gen transportador de CMP-ácido siálico, o la inactivación de múltiples genes en la ruta de síntesis de ácido siálico.

La línea celular de expresión del Factor VII con la inactivación de genes del transportador de CMP-ácido siálico se evalúa para confirmar la eliminación del gen del transportador de CMP-ácido siálico. La línea celular confirmada se cultiva para producir el Factor VII. El Factor VII de la línea celular con gen suprimido del transportador de CMP-ácido siálico se purifica y evalúa como se describe en el presente documento y se compara con el Factor VII de la línea celular de expresión del Factor VII parental para el contenido de ácido siálico en la molécula.

Producción del Factor VII desialilado por coexpresión del Factor VII y una sialidasa bacteriana

Para generar una forma desialilada de FVII, se coexpresó FVII junto con una variante de sialidasa bacteriana derivada de la sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (AU sialidasa) (N-acetilneuraminato glicohidrolasa, EC 3.2.1.18). Las células CHO de expresión estable FVII (por ejemplo, SEQ ID NO 16 con mutaciones P10Q, K32E, A34E y R36E) se transfecaron adicionalmente con AU sialidasa usando un vector de expresión pJ608. La proteína expresada tiene una secuencia señal de hormona de crecimiento en el terminal N para promover la secreción de la proteína. Se seleccionaron clones estables que producían AU sialidasa detectada por un ensayo cromogénico para sialidasa en el medio. También se demostró que las células continuaron expresando altos niveles de proteína FVII, que se detectó mediante el ensayo ELISA, SDS PAGE y transferencia Western, utilizando anticuerpos específicos del FVII como sonda. Usando un ensayo de transferencia de lectina, no se pudo detectar ácido siálico en la proteína de FVII en los medios acondicionados, usando FVII purificado. En contraste, niveles similares de FVII purificado derivado de células no transfectadas con sialidasa mostraron una fuerte señal de unión a lectina. Tomados en conjunto, estos datos muestran que la AU sialidasa se expresó en el medio celular CHO a niveles suficientes para desialilar eficientemente el FVII que fue coexpresado por las células.

Preparación enzimática del Factor VII desialilado utilizando un tratamiento de sialidasa soluble

Se utilizaron los siguientes materiales de partida en esta prueba experimental:

Factor VII: 20 mg de Factor VIIa tipo silvestre, concentración de aproximadamente 1 mg/ml
 Sialidasa: 20ug, 0,25mg/ml, 50.000U/ml, P0720L, adquirido a través de New England BioLabs
 Solución tampón A: histidina 25 mM, NaCl 50 mM, pH 6,4
 Solución tampón B: histidina 25 mM, NaCl 1 M, pH 6,4

5 Tampón de formulación de FVIIa: 2,3 mg/ml de cloruro de sodio, 1,5 mg/ml de cloruro de calcio deshidratado, 1,3 mg/ml de glicilglicina, 0,1 mg/ml de polisorbato 80, 25 mg/ml de manitol, 10 mg/ml de sacarosa, 0,5 mg/ml de metionina, 1,6 mg/ml de histidina, pH 6,0
 Columna de purificación: columna HP de 5 ml HiTrapQ de Sefarosa.

10 Usando estos materiales, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. A 20 mg de FVIIa (aproximadamente 1 mg/ml), agregar 20 ug de sialidasa (0,25 mg/ml, relación de masa 1:1.000) de sialidasa
 2. Incubar la reacción a temperatura ambiente durante la noche (aproximadamente 19 h) antes de purificar cromatográficamente el FVIIa desialilado como se describe a continuación.
 15 3. Purificar el FVIIa desialilado en una columna HP de 5 ml HiTrapQ de Sefarosa de la siguiente manera:

a) Equilibrar la columna Q-Sefarosa con 5CV de tampón A (histidina 25 mM, NaCl 50 mM, pH 6,4).
 b) Antes de aplicar a la columna, diluir la reacción de FVIIa y sialidasa con 200 ml de tampón A y ajustar el pH a 6,4.
 20 c) Cargar a un caudal de 2,5 ml/min usando un sistema AKTA Explorer mientras se monitorea A280. Recoger el flujo a través de la fracción.
 d) Después de completar la carga, lavar la columna con 10CV de tampón A.
 e) Eluir la columna con 20CV de tampón B al 0-50% (histidina 25 mM, NaCl 1 M, pH 6,4) en 40 min. Recoger fracciones de pico (NovoSeven desialilado)
 25 f) Dializar las fracciones pico frente al tampón de formulación del FVIIa a 4 °C durante la noche
 g) Congelar la muestra a -80 °C en alícuotas.

Se demostró que el producto es altamente puro mediante SDS-PAGE, aSEC y activo en ensayos biológicos para FVIIa. Los ensayos para el contenido de ácido siálico no mostraron ácido siálico residual y el análisis por LC-MS de la cadena pesada no mostró una alteración significativa de la estructura del glicano que no sea la eliminación del ácido siálico.
 30

Preparación enzimática del Factor VII desialilado utilizando perlas de neuraminidasa-agarosa

35 El Factor VII recombinante de tipo silvestre tal como se usa en el presente documento es NovoSeven® obtenido a través de Novo Nordisk y denominado en el presente documento como "F7". Otros materiales de partida son V1 y V2 como se describió anteriormente.

40 El material de partida congelado se descongeló rápidamente en un baño de agua a 37 °C y se reunió. La proteína se concentró 2,5 veces por centrifugación; el concentrado se mezcló suavemente pipeteando para minimizar cualquier superconcentración (agregación) en la interfaz del filtro de proteína.

45 El V2 se intercambió en tampón desde su tampón de formulación V2 (que contiene histidina, CaCl₂, trehalosa, metionina y niveles traza de Tween®-20, a un pH de 6,4 - 6,6) en tampón MES (que contiene MES 10 mM, CaCl₂ 10 mM), NaCl 50 mM, pH 6,0, filtrado en forma estéril). Esto se logró de tres maneras. En la primera opción, V2 se cambió de tampón con columnas de flujo por gravedad NAP-10 (GE, 17-0854-01), que se lavaron previamente 3-5 veces con 3 volúmenes de columna de tampón MES cada una. Luego se cargó el V2 en la columna y se eluyó con 1,5 veces el volumen de carga del tampón MES. En la segunda opción, V2 se cambió de tampón mediante diálisis durante la noche en tampón MES. Los casetes de diálisis se empaparon previamente en tampón MES y el V2 se cargó con una jeringa en los casetes Slide-A-Lyzer de corte de peso molecular 3.500 (Thermo Scientific, 66130), durante la noche a 4 °C en jarras de 10 L con tampón MES filtrado en forma estéril. En la tercera opción, V2 se cambió de tampón en tampón MES a través de una columna de filtración en gel Sephadex G-25 (Sigma, G-25-80) y se equilibró con tampón MES.

55 El V2 con cambio de tampón se desialiló con neuraminidasa-agarosa (Sigma N5254). El producto de perlas de agarosa se proporciona en una mezcla de suspensión al 50%, almacenada en tampón de sulfato de amonio; las perlas se lavaron previamente 3-5 veces en tampón MES; la mezcla de perlas/tampón se separó por centrifugación a 1.000 rcf durante 3 minutos a 4 °C, y el líquido sobrenadante se separó por pipeta y se desechó. A las perlas lavadas, se añadió el V2 con cambio de tampón y se mezcló suavemente por rotación a temperatura ambiente durante 16 a 22 horas. Se usaron 2,08 ml de perlas empaquetadas por mg de proteína para la desialilación; para una preparación a mayor escala, esta se redujo 1:10 a 0,208 ml de perlas por mg de proteína. Posteriormente, el V2 desialilado se recuperó por centrifugación y se separó por pipeteo. Las perlas se lavaron una vez suavemente durante 5 minutos mediante rotación en proporción 1:1 en volumen de tampón MES fresco; la mezcla de lavado se centrifugó como antes y el sobrenadante se combinó con el V2. Finalmente, las perlas se eliminaron por filtración estéril a través de un filtro de jeringa de 0,2 micras o por filtración al vacío a través de un filtro de 0,45 micras.
 65

Se realizaron varias rondas de eliminación de endotoxinas con resina EndoTrap HD (Hyglos). La resina se lavó 3-5 veces en tampón MES y se descartó el tampón de lavado. En dos lotes, 1-3 ml de resina lavada se mezclaron suavemente con el V2 desialilado durante la noche a temperatura ambiente. La resina se retiró por centrifugación y luego se filtró a través de una jeringa o un filtro de vacío.

5 El V2 desialilado se concentró 4,75 veces a 2,1 mg/ml por centrifugación en Ultracels durante ciclos de 10 minutos; los concentrados se mezclaron suavemente mediante pipeteo para reducir cualquier agregación en la interfaz de filtro de proteína.

10 El V2 desialilado se separó adicionalmente de las especies de mayor peso molecular (y endotoxina agregada) con una columna de exclusión por tamaño HiLoad 26/60 Superdex 200. La columna y el sistema purificador AKTA se desinfectaron previamente con NaOH 0,1 N + EtOH al 20%. Se neutralizó el pH del sistema, se enjuagó con agua y se equilibró con tampón de formulación V2 reconstituido y agrupado. Se inyectaron manualmente varios lotes de concentrado en un circuito de muestra de 12 ml y se cargaron en una columna de exclusión por tamaño a un caudal de 3 ml/min; el eluato se recuperó y se fraccionó con un Frac-900 en tubos de poliestireno (17X100 mm, Fisherbrand, 14-956-6D). Al principio, se excluyeron los picos de alto peso molecular y se agruparon las fracciones V2 deseadas y se analizaron los niveles y la concentración de endotoxinas usando Charles River EndoSafe PTS y NanoDrop ND-1000. El tampón V2 se usó para eluir el V2 desialilado.

20 Se realizaron cinco lotes de exclusión por tamaño y los eluatos recogidos se agruparon en un lote que se concentró a 1,0 mg/ml en Ultracels. La preparación final se filtró en forma estéril a través de filtros de jeringa de 0,2 micras y se probó la endotoxina y la concentración. Se pipetearon alícuotas de 1 ml en tubos marcados de 2 ml (Sarstedt, 72.694.006), se congelaron rápidamente en un lote de etanol/hielo seco y se almacenaron en una caja marcada a -80 °C hasta su uso.

25 Caracterización: análisis de proteínas y ensayo *in vitro*

30 El material de la preparación final, así como el material de partida no tratado, se caracterizaron por análisis en gel de proteína con 4-12% de Bis-Tris NuPAGE (Novex NP0335BOX) en tampón de procesamiento MES y mediante una columna de exclusión por tamaño analítica (columna TSK3000; tampón de procesamiento: KH₂PO₄ 200 mM, KCl 150 mM, pH 6,8, caudal: 0,15 ml/min, detección de fluorescencia). Las muestras de prueba pequeñas se analizaron por LC-MS para determinar el contenido de ácido siálico en la cadena pesada del Factor VII, así como la cuantificación del ácido siálico marcado con DMB de la proteína total usando el kit de Takara Bio Inc. discutido en el presente documento. La actividad se probó mediante activación de Factor X dependiente de fosfolípidos y ensayos de generación de trombina.

35 Análisis del contenido de ácido siálico

40 Se usó un procedimiento de LC-MS para identificar el ácido siálico en el N-glicano de la cadena pesada del Factor VII para el control no tratado y el Factor VII desialilado. Se redujeron 10 µg de proteína con una mezcla de DTT 10 mM a 37 °C durante 30 minutos y luego se analizaron en el sistema LC capilar Agilent 1200: Columna: PLRP-S 8 µm 4000 A, 0,3 x 150 mm, 75 °C. Sistemas tampón: A: agua con 0,2% de ácido fórmico + 0,01% de TFA; B: ACN con 0,2% de ácido fórmico + 0,01% de TFA. Gradiente: 50 µl/min, 10% de B en 2 min, a 90% de B en 25 min, 90% de B lavado 5 min, 10% de B equilibrado durante 5 min.

45 Sistema Agilent 6520 Q-TOF: fuente DualEsi, temperatura del gas: 350 °C, gas de secado: 1,01 kPa, nebulizador: 1,45 kPa, intervalo de barrido: 500-3000 amu, 1 espectro/s. Iones de referencia: 1221,990637 y 2421,91399 amu, ventana de 50 ppm, recuento mínimo de 1.000.

50 Los resultados se informan en la Figura 7.

Cuantificación de ácido siálico usando el kit de marcación DMB

55 El kit de marcación de fluorescencia de ácido siálico (Takara Bio Inc., Cat # 4400) es para análisis cuantitativo y altamente sensible de sialoglicoconjugados. Esta técnica de marcación de fluorescencia de ácido siálico basada en HPLC que usa 1,2-diamino-4,5-metilenoisobenceno (DMB) es un procedimiento cuantitativo simple y altamente sensible. En este procedimiento, los ácidos siálicos libres se analizan por HPLC de fase inversa (GlycoSepR, de Glyko, # 1-4727) después de marcación con DMB.

60 Conclusión

La cadena pesada de V2 tiene dos sitios de N-glicosilación. Los N-glicanos son estructuras bi, tri y tetrafucosiladas, muy sialiladas. No se encuentran ácidos siálicos terminales en la muestra desialilada, lo que sugiere que la muestra está completamente desialilada y que se ha eliminado > 99,9% del ácido siálico en el N-glicano del Factor VII.

65 Ensayo de semivida con hepatocitos de rata

Preparación de hepatocitos

Se obtuvieron hepatocitos de rata primarios criopreservados de CellzDirect (Invitrogen). Cada vial que contenía aproximadamente 5 millones de células se descongeló y las células se agregaron a 10 ml de medio de descongelación, seguido de centrifugación a 60 g durante 3 minutos. Las células se resuspendieron en medio de incubación + 0,25% de BSA (aproximadamente 4 ml) y las células se contaron usando un hemocitómetro. Las células viables se contaron después de la tinción con azul de tripano para identificar las células muertas. La viabilidad celular fue del 80-82%. Las células se usaron en el ensayo de eliminación inmediatamente después del recuento.

Medio de descongelación: Paquete de suplemento de descongelación/recubrimiento Invitrogen CM3000 agregado a 500 ml de medio Williams E. Medio de incubación: Paquete de suplemento de mantenimiento celular Invitrogen CM4000 agregado a 500 ml de medio Williams E.

Ensayo de aclaramiento de hepatocitos *in vitro*

Se incubaron hepatocitos primarios de rata, 1 millón de células viables por ml, con 25 ng/ml de diversas variantes del Factor VII en medio de incubación CellzDirect + 0,25% de BSA, en tubos Eppendorf con mezcla suave girando hacia arriba y hacia abajo a 37 °C en un volumen inicial de 1,2 ml. En cada uno de los puntos de tiempo indicados, se retiraron 0,25 ml de la mezcla y se centrifugó inmediatamente para sedimentar las células (1.000 rpm, 3 minutos en una centrífuga Eppendorf). Se eliminaron 0,18 ml del sobrenadante clarificado, se congelaron rápidamente y se almacenaron durante la noche a -80 °C. Al día siguiente, el Factor VII en los sobrenadantes se cuantificó usando un ensayo ELISA en el que se usó la proteína mutante purificada correspondiente como el estándar. Los sobrenadantes de control sin células en los que se incubaron variantes del Factor VII durante 2 horas a 37 °C en medio solo se usaron como valores de punto de tiempo cero. Cada incubación se realizó por triplicado. Los valores de aclaramiento intrínseco se calcularon con base en el procedimiento de Lu et al. (referencia de Lu) usando la ecuación $CL_{int} = 0,693 / T_{1/2}$ *in vitro*, normalizada para el volumen de incubación y el número de células. La semivida *in vitro* ($T_{1/2}$) se calculó utilizando el programa WinNonLin (Pharsight Corporation, Sunnyvale, CA). Los sobrenadantes de las incubaciones de hepatocitos se analizaron usando un formato ELISA tipo sándwich de doble anticuerpo. Se añadieron 0,1 ml por pocillo de anticuerpo monoclonal anti-Factor VII (1,0 µg/ml, en PBS) a las placas Greiner Microtron 655061 de 96 pocillos. Después de la incubación durante la noche a 4 °C, las placas se bloquearon con 0,2 ml por pocillo de tampón de bloqueo de caseína al 1% (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 al 0,05% pH 7,2) durante 1,5 horas a 37 °C. Las placas se lavaron cuatro veces con 0,3 ml por pocillo de PBS + Tween 20 al 0,05% (usando un lavador de placas BioTek ELx405), y luego se agregaron a las placas muestras relevantes de Factor VII estándar y desconocidas. Se diluyeron 0,18 ml de cada sobrenadante de hepatocitos dos veces añadiendo 0,18 ml de tampón de dilución (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, caseína al 0,1%, Tween 20 al 0,05% pH 7,2). Se añadieron 0,10 ml de cada sobrenadante diluido por triplicado a la placa de ELISA. Los estándares se hicieron a partir de la variante del Factor VII purificada correspondiente diluida en tampón de dilución. Se hicieron diluciones en serie de dos veces del estándar en tampón de dilución para producir diluciones en el intervalo de concentración final de 50 a 0,8 ng/ml. Los patrones y muestras del Factor VII (0,1 ml por pocillo) se incubaron 2 horas a temperatura ambiente (21 °C). Las placas se lavaron cuatro veces como se describió anteriormente, y luego se añadió anticuerpo de detección biotinilado, 1 µg/ml en tampón de dilución (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, caseína al 0,1%, Tween 20 al 0,05% pH 7,2) (0,1 ml por pocillo) seguido de incubación durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces como se describió anteriormente, y luego se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante, se diluyó 1/1.000 en tampón de dilución (0,1 ml por pocillo) seguido de incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente y se añadió Ultra-TMB, 0,1 ml por pocillo. Después de la incubación durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo con la adición de 0,05 ml por pocillo de H₂SO₄ 2 M. Se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas Molecular Devices Spectramax M2. El análisis de los datos se realizó con Softmax Pro 5.4 (Molecular Devices).

Los hepatocitos de rata criopreservados, el medio de descongelación y el medio de incubación (CellzDirect), eran de Invitrogen/Life Technologies (Grand Island, NY). Sustrato de 1 paso Ultra-TMB (One Step), catálogo no. 34028, era de Thermo Scientific (Rockford, IL), estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP), catálogo no. DY998, era de R&D Systems, Minneapolis, MN. Solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2 era de Invitrogen (Carlsbad, CA). El plasma de rata Sprague-Dawley (anticoagulante de citrato de sodio al 5%) era de Bioreclamation (Westbury, NY). Las placas Greiner Microtron (cat. No. 655061) se obtuvieron a través de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

Procedimientos para obtener variantes desglucosiladas: variantes moleculares

El Factor VIIa de tipo silvestre tiene dos N-glicanos (N322 y N145), y V1 y V2 tienen cada uno 4 N-glicanos (N106, N145, N253, N322). Los 2 N-glicanos adicionales (N106, N253) encontrados en V1 y V2 fueron diseñados originalmente para aumentar la semivida. Para este trabajo, estos sitios se eliminan volviéndolos a la secuencia de aminoácidos endógena del Factor VII de tipo silvestre (T106, V253). Los 2 sitios restantes de N-glicano endógeno (N145 y N322) se eliminaron luego a nivel de ADN mediante ingeniería genética en mutaciones N → Q en estos sitios. (Figura 6)

El Factor VII de tipo silvestre se clonó en pmCMV para elaborar pMB113. Los insertos que contienen una sola mutación N por Q en las posiciones aa145 o 322, así como el mutante doble (aa 145 y 322) se sintetizaron y clonaron en pMB113 usando el sitio XbaI y PmlI dando como resultado los clones pMB114-116. Los insertos que codifican los dominios Gla de V1 y V2 se clonaron en pMB113-116 usando AclI y AfeI y dieron como resultado los constructos pMB117-120 (variantes basadas en V1) y pMB121-124 (variantes basadas en V2). Todas las construcciones se verificaron en secuencia (McLab). Las células de mamífero (línea celular derivada de CHO) se transfectaron transitoriamente mediante electroporación con cada constructo en un formato de 6 pocillos. 4 días después de la transfección, se recogió el sobrenadante y se analizó mediante Western Blot para la expresión, seguido de un ELISA de hFVII (AssayPro) y un ensayo de actividad de FVII. Un subconjunto de variantes se clonó en una sola célula. La variante 2-Nglicano de V2 denominada pMB121 se purificó y activó para su posterior análisis.

Procedimiento para la purificación/activación de FVIIa a partir de 10 l de WAVE Expression

Resumen del procedimiento

La purificación y activación de FVII a partir de medios acondicionados concentrados diafiltrados se realizó usando un proceso de múltiples etapas que tiene lugar durante varios días. Los medios se descongelan primero y se centrifugan para eliminar cualquier agregado que pueda haberse formado durante la congelación/descongelación. Se usa una etapa de captura de pseudoafinidad que emplea una columna de intercambio aniónico (Q-Sefarosa) eluida con CaCl_2 para concentrar aún más la proteína FVII y cambiar el tampón. A continuación, se usa una columna de hidroxiapatita para purificar aún más la proteína FVII. Luego se usa una columna de Q-Sefarosa más pequeña para purificar más el FVII antes de que se active durante 24 horas en solución a pH 7,8 - 8,2. La reacción de activación se detiene bajando el pH a 4,0. El FVIIa finalmente se dializa en el tampón de formulación (pH 6,5) y se almacena congelado.

La proteína purificada final se caracteriza por SDS-PAGE, aSEC, ELISA, glicoanálisis, endotoxina y ensayo de actividad de FVIIa.

ELISA de FVII

Inmunoensayo unido a enzimas Zymutest FVII (Aniara, West Chester, Ohio). El ELISA es un inmunoensayo de dos sitios con un anticuerpo policlonal anti-FVII de conejo unido a los pocillos de una microplaca de 96 pocillos. La muestra se introduce seguida de un anticuerpo policlonal anti-FVII de conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP). Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras y el calibrador se diluyeron en tampón de ensayo en una placa de dilución de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos. Se transfirieron alícuotas de 50 μl de muestra diluida a la placa provista recubierta con anti-FVII de conejo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 200 μl de anti-FVII de conejo acoplado a HRP y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 5 veces con 300 μl del tampón de lavado proporcionado. Se añadió TMB a razón de 200 μl /pocillo y se incubó durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la introducción de 50 μl de ácido sulfúrico 0,45 M. La absorbancia se leyó a 450 nm. Los niveles del Factor VII se obtuvieron comparando los valores de la muestra con una curva de calibración de V2 generada usando un ajuste de curva de 4 parámetros.

Ensayo cromogénico del Factor VII

Se usó el ensayo cromogénico Biophen FVII (Aniara, West Chester, Ohio). El principio del ensayo cromogénico implica la formación de un complejo enzimático que consiste en el Factor VII de la muestra y la tromboplastina de conejo (factor tisular) suministrada por el fabricante. FX, agregado en exceso, se activa a FXa, que a su vez escinde un sustrato cromogénico específico de FXa (Sxa-11) que genera pNA. La cantidad de pNA liberada es directamente proporcional a la actividad de FXa. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras y el calibrador se diluyeron en tampón de ensayo Tris-BSA en una placa de dilución de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos (Fisher Scientific). Los reactivos del kit, R1, R2 y R3 y una placa de ensayo de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Costar) se calentaron a 37 °C antes de su uso. Se transfirieron 30 μl de muestra y calibrador de la placa de dilución a la placa de ensayo seguido de 30 μl de reactivo R2 y luego 60 μl de reactivo R1. La placa de ensayo se mezcló y se incubó durante 7 minutos a 37 °C en un agitador de placa Jitterbug (Boekel Scientific). Se añadieron 60 μl de R3 y se midió la velocidad de cambio en la absorbancia (cambio en DO a 405 nm/min) a 37 °C usando un lector de microplacas SpectraMax Plus (Molecular Devices). Los niveles del Factor VII se obtuvieron comparando los valores de la muestra con una curva de calibración de V2 generada usando un ajuste de curva de 4 parámetros.

Ensayo de generación de trombina dependiente de fosfolípidos

En comparación con el FVIIa de tipo silvestre, la modificación del dominio de Gla (P10Q/K32E) aumenta la potencia en la activación de FX, la generación de trombina y la coagulación de sangre completa en presencia de fosfolípidos aniónicos o plaquetas activadas como resultado de γ -carboxilación adicional. El TGA dependiente de PL se diseñó para medir la actividad de rFVIIa en presencia de fosfolípidos aniónicos y se realizó usando un calibrador de

trombina y reactivo de sustrato, kit de FluCa, de Thrombinoscope, BV. Las vesículas de fosfolípidos (PL) compuestas de fosfatidilserina (PS) al 20%, fosfatidiletanolamina (PE) al 40% y fosfatidilcolina (PC) al 40% eran de Avanti Polar Lipids y se prepararon por sonicación en NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,2) durante 10 minutos.

5 Se dispensaron veinte μ l de vesículas de PL (500 μ M) o calibradores de trombina en placas de 96 pocillos. Se diluyeron diversas concentraciones de rFVIIa en plasma de HemA humano, se añadieron por triplicado a la mezcla de PL y se equilibraron a 37 °C durante 10 min. Las reacciones de generación de trombina se iniciaron agregando solución FluCa y las reacciones se monitorearon continuamente durante 60 minutos siguiendo el procedimiento de trombograpía automatizada calibrada (CAT) descrito por Thrombinoscope^{BV}. Los datos se adquirieron y analizaron
10 utilizando el software Thrombinoscope^{BV} (3.4.0), que corrigió la actividad de α_2 -macroglobulina utilizando un calibrador de trombina. El parámetro de análisis 'altura máxima' representaba el nivel máximo de trombina generado, el 'potencial de trombina endógena' (ETP) correspondía a la cantidad total de trombina generada. Los parámetros de generación de trombina se analizaron con el procedimiento de ajuste de curva no lineal de 4 parámetros utilizando Prism 4.0 (GraphPad Inc).

15 Ensayo de activación de FX dependiente de fosfolípidos

La capacidad de FVIIa para activar FX en presencia de vesículas de fosfolípidos sin factor tisular se midió usando un ensayo de activación de FX dependiente de PL. Las variantes del Factor VIIa o FVIIa se incuban con FX en presencia de vesículas de fosfolípidos. La activación de FX se mide mediante la adición de S-2765, un sustrato cromogénico para FXa. Brevemente, el calibrador y las muestras se diluyen en una placa de fondo redondo de polipropileno en tampón Tris-HCl. Se añadieron 30 μ l de FX de 4 μ g/ml (Haematologic Technologies Inc.) a todos los pocillos de una placa de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos, seguido de 30 μ l de vesículas de fosfolípidos que consisten en fosfatidilserina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina en una relación en % en peso de 20:40:40. Se transfirieron 30 μ l de muestra diluida y calibrador a la mezcla FX/fosfolípido. La placa se selló, se mezcló suavemente y se incubó durante 20 - 23 horas a 37 °C. Se añadieron 40 μ l de una solución 5 mM de S-2765 (DiaPharma) a todos los pocillos. La placa se selló y se incubó durante 6 horas a 37 °C. La absorbancia se leyó a 405 nm en un lector de microplacas. La actividad de las muestras se determinó comparando los niveles de activación de FX de las muestras con una curva de calibración F7.

30 Animales de estudio PK en ratas, protocolo de estudio (inyección de preparaciones, muestreo de sangre y preparación, ELISA, análisis de datos, sacrificio de animales).

35 Las proteínas (F7, V2, V1, dV2 y dV1) se administraron por vía intravenosa a razón de 0,1 mg/kg en ratas Sprague Dawley. Se tomaron muestras de plasma a partir de 1 minuto después de la administración y se analizaron mediante ELISA de FVII.

Estudio PK en HemA

40 Las proteínas (F7, dV1) se administraron en forma i.v. a razón de 1,0 mg/kg en ratones HemA. Se tomaron muestras de plasma a partir de 5 minutos después de la administración y se analizaron mediante ELISA de FVII y ensayo sTF-PT.

ELISA de FVII en muestras de plasma

45 Materiales

Se usaron anticuerpos monoclonales contra FVIIa. Además, se biotiniló un anticuerpo monoclonal. Las variantes de FVIIa purificadas (de tipo silvestre o desialiladas) se usan como calibradores de ensayo y controles de ensayo. El tampón de bloqueo es caseína al 1% (p/v) en Tris 30 mM, pH 7,2, NaCl 60 mM, Tween-20 al 0,03%. El tampón de dilución del ensayo (ADB) es caseína al 0,1% (p/v), Tris 50 mM, pH 7,2, NaCl 0,1 M, Tween-20 al 0,05%. El tampón de lavado de ensayo es PBS + Tween-20 al 0,05%. Las placas de inmunoensayo son placas de alta unión Greiner Microlon (# 655061). La estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP) es de R&D Systems. El sustrato de HRP Ultra-TMB es de ThermoFisher Pierce. El plasma de ratón blanco se obtuvo de ratones CD1 o HemA, ya sea comercialmente (Bioreclamation) o a través de fuentes internas. Todos los demás materiales (caseína, Tris, NaCl, Tween-20, PBS, ácido sulfúrico) son de calidad grado reactivo.

Procedimiento para el inmunoensayo tipo sándwich de FVIIa

60 Las placas de ensayo de 96 pocillos se recubren con 0,1 ml/pocillo de anticuerpo contra FVIIa, 1 μ g/ml en PBS, durante la noche a 4 °C. Las placas se aspiran y se bloquean con 0,2 ml/pocillo de tampón de bloqueo durante al menos 2 horas a temperatura ambiente con rotación (150 rpm). Después del bloqueo, los pocillos se lavan 4 x 0,3 ml/pocillo de tampón de lavado. Las muestras o patrones de FVIIa se diluyen 1:20 a una concentración final de plasma al 5% en ADB y se incuban 0,1 ml/pocillo durante al menos 1,5 horas a temperatura ambiente con rotación.
65 Todos los estándares, controles y muestras se miden en pocillos por triplicado. Después de lavar las placas como se describió previamente, se agrega anticuerpo biotinilado contra FVIIa, 42 ng/ml en ADB, 0,1 ml/pocillo, y las placas se

5 incuban durante al menos 1 hora a temperatura ambiente con rotación. Las placas se lavan, seguido de incubación con estreptavidina-HRP, 1:1.000 en ADB, incubando al menos 1 hora a temperatura ambiente con rotación. Después de un lavado final de la placa, los pocillos se desarrollan con 0,1 ml/pocillo de Ultra-TMB, deteniendo la reacción con 0,05 ml/pocillo de ácido sulfúrico 2M. Las reacciones detenidas se leen a una DO de 450 nm, y los datos se analizan y calibran. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para el ensayo es típicamente 15-30 ng/ml de FVIIa en 100% de plasma.

Ensayo de PT modificado basado en el factor de tejido soluble (sTF) para medir la actividad de rFVIIa

10 Se realizó un ensayo de tiempo de protrombina (PT) para medir la actividad de rFVIIa humano en muestras de plasma *ex vivo* de ratón HemA.

15 En resumen, se mezclaron 50 µl de muestra que contenía 10% de plasma de ratón HemA y 50% de plasma deficiente en FVII humano (George King Inc) en tampón de aPTT (NaCl 0,15 M, Tris 0,05 M pH 7,5, BSA al 0,1%) con 50 µl de reactivo sTF-PT y se incubó a 37 °C durante 30 segundos. El reactivo sTF-PT estaba compuesto de 1 volumen de TF soluble humano recombinante 2 µM (sTF₁₋₂₂₁) y 1 volumen de vesículas de fosfolípidos 8 µM (PS²⁰: PC⁴⁰:PE⁴⁰). La coagulación se inició mediante la adición de 50 µl de 25 mM de CaCl₂ y el tiempo de coagulación se registró en un analizador de coagulación STA (Diagnostica Stago Inc). Los estándares consistieron en rFVIIa (rFVII tipo silvestre o variantes de rFVIIa modificadas) diluidas 2 veces en serie de 200 a 0,78 ng/ml.

20 Eficacia de V2 desialilado en ratones con hemofilia A (HemA)

Estudio de eficacia de corte de cola agudo

25 Para determinar la pérdida de sangre, los ratones se anestesiaron con isoflurano y las colas se colocaron en solución salina al 0,9% calentada a 37-38 °C, en tubos de plástico de 15 ml durante 10 minutos. La cola se cortó a 4 mm desde la punta usando un bisturí e inmediatamente se volvió a colocar en un tubo separado de plástico precalentado de 15 ml que contenía 10 ml de solución salina. Se permitió que el ratón sangrara libremente durante 40 minutos. V2 y F7 desialilados se dosificaron por vía intravenosa 5 minutos después o 15 y 30 minutos antes de la lesión por corte de cola. La pérdida de sangre se cuantificó gravimétricamente pesando tubos antes y después de recoger la sangre.

Estudio de eficacia de corte de la vena de la cola (TVT)

35 Los ratones HemA se dosificaron con V2 o F7 desialilados mediante inyección en la vena de la cola 1 hora antes o 5 minutos después de la lesión por corte de la vena de la cola. Se usó anestesia apropiada. La vena de la cola se cortó con una hoja recta de bisturí # 11 y se inició el registro de tiempo. Luego, el ratón regresó a su jaula limpia individual con un lecho de papel blanco (Versi-Dri^{MR}) colocado encima de una almohadilla térmica de 10,16X20,32 centímetros. El estado de la actividad animal se controló cada hora durante las siguientes 9 horas y hasta el punto de tiempo de 24 horas. Cualquier ratón que mostró signos de nivel de actividad reducido se anotó en el formato del monitor y cualquier ratón que mostró signos de pérdida de sangre excesiva se sacrificó de inmediato.

Ensayo de trombina-antitrombina (TAT) en plasma de ratón HemA

45 Reactivos:

(1) Anticuerpo de captura: anticuerpo policlonal antitrombina de Enzyme Research Labs, Cat # TAT-EIA-C; (2) Anticuerpo de detección: anticuerpo policlonal anti-AT-III conjugado con HRP, de Enzyme Research Labs, Cat # TAT-EIA-D, (3) Diluyente de ensayo: de Enzyme Research Labs, Cat # TAT-EIA-D, (4) Substrato de HRP: Amplex Red, Invitrogen, cat # A12216, (5) Alfa-Trombina: de Enzyme Research Labs, Cat # HT-1002a, almacenada a -80 °C, (6) AT-III: de Enzyme Research Labs, Cat # HAT, almacenada a -80 °C, (7) BSA: de Sigma, Cat # A-7030; (8) Plasma deficiente en AT-III: adquirido a través de Enzyme Research Labs, Cat: AT-DP, almacenado a -80 °C.

Tampones

55 (1) tampón estándar de TAT: Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM, 0,05 de heparina U/ml; (2) Tampón de recubrimiento: 1 comprimido de bicarbonato + 100 ml de dH₂O, almacenado a 4 °C; (3) tampón de bloqueo: BSA-PBS al 2%; (4) tampón de dilución de la muestra: agregar HEPES 0,1 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, BSA al 1%, Tween20 al 0,05%, filtro y tomar alícuotas, almacenar a -20 °C; (5) Tampón de sustrato: agregar 50 µl de 5 mg/ml de Amplex Red, 20 µl de H₂O₂ al 3% al tampón de PBS. Mezclar, la solución recientemente preparada antes de agregarla a las placas; (6) Preparación de una solución patrón de TAT 1 µM: agregar 100 µl de AT-III humano a 1,36 mg/ml y 5,93 µl de trombina humana a razón de 3,28 mg/ml hasta 419 µl de tampón TAT, mezclar, incubar 10-20 minutos a 37 °C; (7) Preparación de una soluciones patrón de TAT 60 nM: Añadir 50 µl de complejo TAT 1 µM a 783 µl de plasma deficiente en AT-III, mezclar. Tomar alícuotas de 50 µl/vial, almacenar a -80 °C.

Procedimiento de ensayo

1. Diluir pAb antitrombina (anticuerpo de captura) en tampón de bicarbonato (dilución 1:100: para una placa de 96 pocillos, agregar 110 µl de anticuerpo a 11 ml de tampón de bicarbonato).
2. Agregar 100 µl de anticuerpo de recubrimiento diluido a cada pocillo en una placa de 96 pocillos 2HB Immulon. Golpear suavemente la placa para asegurar que todo el líquido cubra el fondo de la placa. Sellar la placa e incubar durante la noche a 4 °C.
3. Lavar 4 veces con 300 µl de tampón de lavado en un lavador de placas automatizado. Después del último lavado, invertir la placa y golpearla contra una toalla de papel limpia.
4. Agregar 150 µl de tampón de bloqueo (BSA-PBS al 2%) a cada pocillo. Sellar la placa e incuba a temperatura ambiente durante 1,5 horas.
5. Lavar 4 veces con 300 µl de tampón de lavado con un lavador de placas automatizado. Después del último lavado, invertir el plato y golpearla contra una toalla de papel limpia.
6. Agregar 100 µl de la muestra estándar, y QC a cada pocillo por triplicado e incubar las placas a temperatura ambiente durante 2 horas a temperatura ambiente.
7. Lavar 4 veces con 300 µl de tampón de lavado con un lavador de placas automatizado. Después del último lavado, invertir la placa y golpearla contra una toalla de papel limpia.
8. Agregar 100 µl de anticuerpo de detección con HRP (1/100, agregue 110 µl de anticuerpo a 11 ml del diluyente conjugado) a cada pocillo. Sellar la placa e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
9. Lavar 4 veces con 300 µl de tampón de lavado con un lavador de placas automatizado. Después del último lavado, invertir la placa y golpearla contra una toalla de papel limpia.
10. Agregar 70 µl de sustrato Amplex Rd (recién preparado) a cada pocillo.
11. Colocar la placa en la oscuridad a temperatura ambiente e incubar durante 15-30 min.
12. Leer la placa a una DO de 485nm/595nm.
13. Graficar los estándares con ajuste de curva de 4 parámetros; la concentración de los controles y cada muestra se calcularon a partir del estándar en cada placa de ELISA.

Eficacia de V2 desialilado en ratones competentes en coagulación

Se realizó un estudio de corte de cola agudo para determinar la eficacia de dV2 en ratones competentes en coagulación. Los ratones competentes en coagulación se anestesiaron con isoflurano y las colas se colocaron en solución salina al 0,9% calentada a 37-38 °C en tubos de plásticos de 15 ml durante 10 minutos. Después de una administración iv de 5 mg/kg de activador de plasminógeno tisular (tPA), se cortó la cola a 50 mm de la punta con bisturí y se volvió a colocar en un tubo de plástico precalentado de 15 ml que contenía 10 ml de solución salina. V2 y F7 desialilados se dosificaron por vía intravenosa inmediatamente después de la lesión del corte de la cola. Se permitió que el ratón sangrara libremente durante 45 minutos. La pérdida de sangre se cuantificó gravimétricamente pesando los tubos antes y después de recoger la sangre.

Resultados

Caracterización *in vitro* de proteínas desialiladas o desglucosiladas

La cadena pesada de dV2 se analizó por LC-TOF MS. El análisis mostró que los N-glicanos en la cadena pesada no contenían tratamiento con ácido siálico después de la sialidasa. Tal análisis en la cadena ligera se complicó por la presencia del dominio Gla. Para obtener una imagen global del contenido de ácido siálico de la molécula tratada, se llevó a cabo la marcación con fluorescencia del ácido siálico. Este procedimiento mostró que se eliminó más del 99,9% de ácido siálico en V2 durante el proceso de desialilación. La Figura 7 muestra el análisis de V2 desialilado para el contenido de ácido siálico. Se utilizaron el análisis LC-TOF MS y la marcación fluorescente del ácido siálico. El análisis del contenido de ácido siálico se realizó también en dV1 con resultados similares (datos no mostrados). Se probó la actividad de las moléculas desialiladas tanto por la activación de Xa dependiente de fosfolípidos como por el ensayo de TGA dependiente de fosfolípidos. Los ensayos PL-Xa y PL-TGA demostraron que la actividad de las proteínas después de la desialilación no se redujo (véase la Figura 9 y la Figura 10). La Figura 9 muestra el ensayo de activación de PL-FXa en proteínas desialiladas. El V1 y el V2 desialilados (dV1, dV2) se probaron para determinar la actividad usando el ensayo de activación de FXa con fosfolípido. Ambas proteínas desialiladas tuvieron una actividad ligeramente mayor en este ensayo en comparación con sus moléculas parentales no modificadas. La Figura 10 muestra el ensayo PL-TGA en proteínas desialiladas. Por PL-TGA, dV2 y dV1 exhibieron una actividad ligeramente aumentada sobre sus moléculas parentales no modificadas. Los resultados se normalizaron a F7.

El ensayo de PL-Xa mostró consistentemente un aumento medible en la actividad de dV2 y dV1 sobre sus moléculas parentales no modificadas. Las moléculas de FVIIa de tipo silvestre, V2 y V1 hipoglicosiladas se expresaron (Figura 11) y se analizaron como extractos de expresión crudos tanto para la expresión como para la actividad. La Figura 11 muestra la expresión de variantes de FVII hipoglicosiladas. Se analizaron muestras de medios 4 días después de la electroporación para determinar la expresión de FVII. El análisis de transferencia Western usando un anticuerpo de dominio anti-Gla muestra la expresión de las variantes. La eliminación de los sitios de N-Glicano no pareció afectar la actividad cuando se normalizó para los niveles de expresión. La Figura 12 muestra la determinación de la "actividad específica" de variantes de FVII hipoglicosiladas usando sobrenadantes de transfección. La actividad de los sobrenadantes de expresión cruda de dos transfecciones transitorias de las

variantes hipoglicosiladas se ensayó mediante el ensayo de activación Xa. Cuando se normalizó para la expresión medida por ELISA, no se observó disminución de la actividad como resultado de la eliminación de N-glicano. Como se esperaba en este ensayo, las proteínas V1 y F7 tuvieron actividades similares, mientras que las moléculas de V2 tuvieron menor actividad, como resultado de su independencia de TF. Esto se demostró aún más por el ensayo de actividad PL-TGA realizado en V2 hipoglicosilado purificado con solo 2N-glicanos (N322 y N145) denominado pMB121. La Figura 13 muestra el ensayo PL-TGA en la variante hipoglicosilada purificada pMB121. Mediante el ensayo PL-TGA, pMB1212 muestra una actividad mejorada sobre F7 similar a la de V2 no modificada. La eliminación *in vitro* de estas moléculas se probó en un modelo de eliminación de hepatocitos. dV2 demostró una eliminación significativo en este modelo sobre el V2 no modificado (Figura 14), mientras que se observó un aumento marginal o nulo en la eliminación para las variantes hipoglicosiladas (Figura 15).

PK de rata y PK de HemA

Los estudios farmacocinéticos en ratas Sprague Dawley demostraron que las proteínas desialiladas e hipoglicosiladas se eliminan significativamente más rápido que sus contrapartes no modificadas de acuerdo a lo medido por un ELISA de FVII. La Figura 16 muestra los resultados farmacocinéticos de ratas. Las semividas de los V2 y V1 desialilados fueron significativamente más cortos que sus moléculas parentales no modificadas en las ratas Sprague Dawley, medidas por ELISA de FVII. Esto fue cierto para V2 desialilado, V1 desialilado y pMB121 (V2 hipoglicosilado). La t_{1/2} para las dos moléculas desialiladas fue inferior a 1 minuto, mientras que la t_{1/2} de sus proteínas parentales fue de aproximadamente 2,5 horas. La eliminación de la molécula pMB121 de V2 hipoglicosilada fue equivalente a la de F7 con una t_{1/2} de 1,6 h. El estudio PK en ratones HemA tuvo un resultado similar con dV2 y F7 con semividas de aproximadamente 3 min y 2,6 h, respectivamente (Figura 17 (A)). La corta semivida se confirmó mediante el ensayo de coagulación sTF-PTT (Figura 17 (B)). La Figura 17 muestra los resultados PK de HemA. La semivida del V2 desialilado fue significativamente más corta que su molécula parental no modificada en ratones HemA, medida por A) ELISA de FVII y B) el ensayo sTF-PT.

Modelos de eficacia de HemA

Se evaluó la eficacia de dV2 en ratones HemA. Usando el modelo de corte de cola de HemA, se demostró que dV2 es eficaz a una dosis de 1 mg/kg (bolo, iv). En comparación, en este modelo, la dosis eficaz para F7 fue de 2,5 mg/kg (bolo, iv). Estos resultados demuestran que dV2 es más eficaz que F7 (Figura 18 (A)). Este modelo también se utilizó para mostrar que la eficacia de dV2 se elimina más rápidamente que la de F7 (Figura 18 (B)). La Figura 18 muestra los resultados del estudio de eficacia de V2 desialilado en ratones HemA. Los estudios con dV2 muestran que esta molécula es A) más eficiente y B) tiene una eliminación de eficacia más rápida que F7 en el modelo de corte de cola de HemA.

Usando el modelo TVT más sensible, también se demostró la eliminación de eficacia más rápida de dV2 sobre F7 y se confirmó la dosis eficaz. La Figura 19 muestra un estudio de eficacia de dV2 en el modelo TVT de HemA. Los estudios de TVT que utilizan un modelo de eficacia (TVT) con mayor sensibilidad confirmaron que dV2 tiene una eliminación de eficacia más rápida que F7. Las mediciones de trombina antitrombina (TAT) como marcador de trombogenicidad realizada a los 30 y 60 minutos después de la administración en ratones HemA mostraron niveles significativamente más bajos para dV2. La Figura 20 muestra mediciones de TAT. En ratones HemA, dV2 administrado a su dosis eficaz (1 mg/kg) generó menos antitrombina de trombina (TAT) que la dosis eficaz de F7 (2,5 mg/kg). Estos datos, tomados con los datos de eficacia, sugerirían que dV2 tiene un índice terapéutico más favorable que F7.

Eficacia en ratones competentes en coagulación

Se evaluó la eficacia de dV2 en ratones tratados con tPA y competentes en coagulación. Usando el modelo de corte de cola, se demostró que dV2 es eficaz a dosis de 0,3-1 mg/kg (bolo, iv). En comparación, en este modelo, la dosis eficaz para F7 fue de 5 mg/kg (bolo, iv). Estos resultados demuestran que dV2 es más eficaz que F7 (Figura 21). La Figura 21 muestra los resultados del estudio de eficacia de V2 desialilado en ratones tratados con tPA, competentes en coagulación.

Eliminación y eficacia del Factor VII desialilado de tipo silvestre (VIIa dWT)

El Factor VII desialilado de tipo silvestre (VIIa dWT) se produjo como se describió anteriormente usando NovoSeven® obtenido de Novo Nordisk como material de Factor VII de partida y desialilando ese polipéptido de partida usando la enzima sialidasa soluble, tal como se describió anteriormente. Se descubrió que el VIIa dWT tenía una pureza > 99%, baja endotoxina y ningún ácido siálico detectable. Además, el análisis de espectrometría de masas mostró la eliminación selectiva de ácido siálico.

La actividad de este material VIIa dWT se analizó y comparó con el Factor VII de tipo silvestre usando el ensayo cromogénico Biophen FVII y el ensayo PT modificado, como se describió anteriormente. Cada uno de estos análisis mostró que el VIIa dWT tenía una actividad casi idéntica al polipéptido del Factor VII de tipo silvestre.

La eliminación del Factor VIIa dWT y el Factor VII de tipo silvestre (1 mg/kg) también se analizaron y compararon usando el modelo de ratón con ratones con activación del factor de tejido humano (TFKI). Como se muestra en la Figura 22, la semivida de VIIa dWT fue significativamente más corta que el Factor VII de tipo silvestre y la eliminación (ml/h/kg) fue más de 40 veces más rápido.

La eficacia de VIIa dWT en comparación con el Factor VII de tipo silvestre se investigó usando ratones TFKI y el procedimiento de corte de cola descrito anteriormente. Brevemente, se inyectaron 5 mg/kg de tPA por vía intravenosa en los ratones, seguido del recorte de la cola a 50 mm de la punta. El Factor VII de tipo silvestre (NovoSeven®) o VIIa dWT se inyectaron por vía intravenosa con dosis que oscilaban entre 1 y 6 mg/kg. Luego se recogió sangre de la cola durante 45 minutos, con coágulos inestables que se interrumpieron cada seis minutos durante el período de recolección. Como se muestra en la Figura 23, se descubrió sorprendentemente que VIIa dWT era significativamente más eficaz que el Factor VII de tipo silvestre. Más específicamente, una dosis de 3 mg/kg de VIIa dWT causó una pérdida de sangre reducida en comparación con una dosis de 6 mg/kg de Factor VII de tipo silvestre. Dados los resultados de este análisis, se determinó que 2 mg/kg de VIIa dWT es una dosis bioequivalente a 6 mg/kg del Factor VII de tipo silvestre.

La capacidad del VIIa dWT y el Factor VII de tipo silvestre (NovoSeven®) para causar coagulación sistémica también se investigó mediante el procedimiento de Trombina Anti-Trombina (TAT) descrito anteriormente. Los ratones fueron tratados con dosis bioequivalentes de VIIa dWT (2 mg/kg) y Factor VII de tipo silvestre (6 mg/kg) y luego se midió la formación de complejos TAT por ELISA. Como se muestra en la Figura 24, el Factor VII NovoSeven® de tipo silvestre generó un nivel significativamente más alto de TAT que VIIa dWT. Dado el hecho de que VIIa dWT generó solo niveles basales de TAT, este experimento sugiere que esta dosis de VIIa dWT no produce coagulación sistémica observable, a pesar de que el polipéptido es tan eficaz como el Factor VII de tipo silvestre.

Además, la capacidad del Factor VIIa dWT y el Factor VII de tipo silvestre (NovoSeven®) para causar la formación de trombos también se investigó en un modelo de trombosis de FeCl₃. Los ratones fueron tratados con dosis bioequivalentes de VIIa dWT (2 mg/kg) y Factor VII de tipo silvestre (6 mg/kg) 15 minutos antes del inicio del estudio de trombosis. Luego se inició la trombosis mediante la administración de una solución de FeCl₃ al 3,25% y luego se midió la formación de trombos mediante Doppler durante 30 minutos. Los datos del flujo sanguíneo resultante se trazaron en un gráfico de flujo sanguíneo versus tiempo y luego se calculó el porcentaje del área bajo la curva para la muestra de control para determinar la reducción en el flujo sanguíneo causada por la formación de trombos para cada uno de los grupos de tratamiento del Factor VII. Como se muestra en la Figura 25, el Factor VII NovoSeven® de tipo silvestre generó un flujo sanguíneo significativamente reducido (promedio aproximadamente 40%), mientras que el VIIa dWT mostró casi ninguna reducción en el flujo sanguíneo (promedio > 90%). Este experimento demostró que la dosis dada de VIIa dWT produjo una formación de trombo muy reducida en comparación con el Factor VII de tipo silvestre.

La actividad y eficacia de VIIa dWT en comparación con el Factor VII de tipo silvestre se investigó adicionalmente examinando las afinidades de unión aparentes de estos péptidos para el factor de tejido soluble (sTF) usando un sustrato fluorogénico de tripéptido SN-17c (HTI). Como se muestra en la Figura 26, este análisis demostró que VIIa dWT (dF7) y el Factor VII de tipo silvestre (F7) tenían afinidades aparentes de unión equivalentes por sTF. Sin embargo, como se muestra en la Figura 27, en un modelo experimental que examina la capacidad de estos péptidos para activar el Factor X titulando la concentración de Factor X en presencia de complejos de sTF-Factor VII (Factor VII 0,5 nM [VIIa dWT o de tipo silvestre], sTF 125 nM), la cinética de Michaelis-Menten para VIIa dWT y el Factor VII de tipo silvestre demuestra que VIIa dWT (dF7) puede activar el Factor X de manera más efectiva (aproximadamente 2 veces) que el Factor VII de tipo silvestre (F7). Estos datos sugieren que VIIa dWT es capaz de convertir más Factor X en Factor Xa por sitio activo de Factor VII que su contraparte de tipo silvestre.

Discusión

Existe una necesidad médica insatisfecha de desarrollar un fármaco terapéutico que sea eficaz para el tratamiento del sangrado agudo pero con una trombogenicidad reducida. Un polipéptido eficaz del Factor VII con una semivida corta podría dar como resultado una molécula con una ventana terapéutica más grande adecuada para su uso en hemorragias agudas.

V2 y V1 son dos variantes del Factor VIIa (Figuras 1-3). Estas variantes contienen mutaciones en sus dominios Gla que aumentan su afinidad por las plaquetas activadas y, en el caso de V2, dan como resultado la independencia del factor tisular. Ambas variantes también tienen dos sitios adicionales de N-glicosilación, lo que resulta en una semivida prolongada en comparación con el Factor VIIa de tipo silvestre, un rasgo que es ventajoso para el tratamiento de la hemofilia. Sin embargo, su uso como tratamientos para el sangrado agudo se beneficiaría de la disminución de la semivida. Esta modificación reduciría el riesgo de efectos fuera del objetivo y, como resultado, aumentaría su índice terapéutico. En este documento se ha demostrado que la eliminación de los ácidos siálicos presentes en las cadenas de carbohidratos de V2 y V1 da como resultado una eliminación significativamente más rápida de las moléculas en un modelo de eliminación de hepatocitos *in vitro*. Las variantes hipoglicosiladas no se eliminaron más rápido en este modelo *in vitro*, lo que sugiere que el mecanismo de eliminación entre las moléculas desialiladas e hipoglicosiladas difiere. Los estudios *in vivo* realizados en ratas Sprague Dawley demostraron que las

moléculas desialiladas (dV2 y dV1), así como la variante hipoglicosilada pMB121, tenían una semivida significativamente menor. Curiosamente, tanto V2 como V1 desialilados tuvieron tasas de eliminación mayores en comparación con la tasa informada para FVIIa de tipo silvestre desialilado. (Appa et al., *Thrombosis and Haemostasis* 104.2/2010), una característica que puede deberse a sus 2 N-glicanos adicionales. Una posible teoría para esta actividad, sin limitación de lo que se reivindica en el presente documento, es que estos N-glicanos adicionales, después de la desialilación, se convertirían en ligandos adicionales para el ASGPR o un receptor similar y mediarían una eliminación más rápida. La actividad de estas moléculas se retuvo o aumentó en comparación con sus moléculas parentales de acuerdo a lo medido mediante los ensayos de actividad *in vitro*. La eliminación más rápida de dV2 se verificó adicionalmente *in vivo* en un estudio PK de ratón HemA y se demostró que era eficaz en los estudios de corte de cola de HemA y TVT.

Además, la desialilación del Factor VII de tipo silvestre produjo un polipéptido del Factor VII que se eliminó mucho más rápidamente que el tipo silvestre, al tiempo que proporciona el sorprendente resultado de una mayor eficacia como se muestra en numerosos modelos experimentales.

La eliminación de los N-glicanos o la modificación de la composición de monosacáridos de los N-glicanos del Factor VIIa o de las variantes del Factor VIIa da como resultado moléculas de eliminación más rápidas. Estas moléculas retienen actividad y son eficaces *in vivo*. El desarrollo de estas moléculas de Factor VIIa de eliminación rápida sería beneficioso para el tratamiento de las indicaciones de hemorragia aguda, además de ser potencialmente un antídoto para los diversos anticoagulantes en el mercado.

Listado de secuencias

<110> Bayer HealthCare LLC
Bauzon, Maxine
Hermiston, Terry

<120> Péptidos del Factor VII de corta acción

<130> BHC115011 PCT

<150> 61/754,674
<151> 2012-12-24

<150> 61/787,026
<151> 2013-03-15

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1218
<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 746 116 T3

```

gccaacgcgt tcctggagga gctgcgcccg ggctccctgg agagggagtg caaggaggag      60
cagtgtcctt tcgaggaggc ccgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc      120
tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc      180
tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac      240
tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag      300
tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg      360
ctggcagacg ggggtgcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt      420
ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc      480
aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttgggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg      540
accctgatca acaccatctg ggtgggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac      600
tggaggaacc tgatcgcggt gctgggcgag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag      660
cagagccggc gggtggcgca ggtcatcadc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac      720
cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtggtgccc      780
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtggg cttctcattg      840
gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc      900
aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc      960
ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctaactcg atggcagcaa ggactcctgc     1020
aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc     1080
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttgggggtgta caccagggtc     1140
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtccctc     1200
ctgcgagccc catttccc                                     1218

```

5 <210> 2
 <211> 1219
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de la variante del FVII humano
 <400> 2

ES 2 746 116 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctt tgcaggaggc ccgggagatc ttcgaagacg cggagaggac gaagctgttc 120
 tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 240
 tgtgagacgc acaaggatga ccagctgacg tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
 tactgcagtg accacaacgg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggcgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttgggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtgggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggg gctggggcag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcctc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtgaacc tctactgacca tgtggtgccc 780
 ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtggg cttctcattg 840
 gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
 aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 960
 ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctaactcg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtggggcact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tgcagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1200
 ctgcgagccc catttcctt 1219

<210> 3

<211> 1218

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de nucleótidos de la variante del FVII humano

<400> 3

ES 2 746 116 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcgccag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctc tcgaggaggc ccgggagatc ttcaagacg aagaggaaac gaagctgttc 120
 tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 240
 tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
 tactgcagtg accacaacgg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggcgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtggctctc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggt gctgggcgag cacgacctca gcgagcagca cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtgaacc tcaactgacca tgtggtgccc 780
 ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgtgg ccttcgtgcg cttctcattg 840
 gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
 aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 960
 ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

<210> 4

<211> 1218

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia del plásmido

<400> 4

gccaacgcgt tcctggagga gctgcgcccg ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctc tcgaggaggc ccgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc 120
 tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 240

ES 2 746 116 T3

tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
 tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgcctg cacacccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggcgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctggtt ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtgggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggt gctgggcgag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcacc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtgggtc tcaactgacca tgtggtgccc 780
 ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg 840
 gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
 aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt ggggagctcc 960
 ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcaaaccc gtggggccact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtccctc 1200
 ctgcaagccc catttccc 1218

<210> 5
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia del plásmido

10

<400> 5

gccaacgcgt tcctggagga gctgcccggg ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctt tcgaggaggc ccgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc 120
 tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggtctc 180
 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 240
 tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
 tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgcctg cacacccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gacaggccag caaaccccaa ggcgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctggtt ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540

ES 2 746 116 T3

```

accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac      600
tggaggaacc tgatcgcggt gctgggagag cagcactca gcgagcacga cgggatgag      660
cagagccggc ggggtggcgca ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac      720
cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtggtgccc      780
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg      840
gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc      900
aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaagggt gggagactcc      960
ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc     1020
aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc     1080
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttggggtgta caccagggtc     1140
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtccctc     1200
ctgcgagccc catttccc                                           1218

```

<210> 6
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia del plásmido

10

<400> 6

```

gccaacgcgt tcctggagga gctgcccggc ggctccctgg agagggagtg caaggaggag      60
cagtgtcctc tcgaggaggc cgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc     120
tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc     180
tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttoga gggccggaac     240
tgtgagacgc acaaggatga ccagctgacg tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag     300
tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg     360
ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt     420
ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc     480
aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg     540
accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac     600
tggaggaacc tgatcgcggt gctgggagag cagcactca gcgagcacga cgggatgag     660
cagagccggc ggggtggcgca ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac     720
cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtggtgccc     780
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg     840
gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc     900

```

ES 2 746 116 T3

aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 960
 ccacagatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtccctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

<210> 7
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del plásmido

<400> 7

gccaacgcgt tcctggagga gctgcgcccg ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctt tcgaggaggc ccgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc 120
 tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 240
 tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
 tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gacaggccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttgggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtgggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggg gctgggagcag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cagacatcgc cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtggtgccc 780
 ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg 840
 gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
 aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 960
 ccacagatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtccctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

<210> 8
 <211> 1218
 <212> ADN

ES 2 746 116 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del plásmido

5

<400> 8

```

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag      60
cagtgtcctc tcgaggaggc ccgggagatc ttcgaagacg cggagaggac gaagctgttc      120
tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc      180
tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac      240
tgtgagacgc acaaggatga ccagctgacg tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag      300
tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg      360
ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt      420
ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggcgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc      480
aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg      540
accctgatca acaccatctg ggtgggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac      600
tgagggaacc tgatcgcggg gctgggcgag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag      660
cagagccggc gggtgggcga ggtcatcadc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac      720
cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtggtgccc      780
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg      840
gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc      900
aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc      960
ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc     1020
aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc     1080
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttgggggtgta caccagggtc     1140
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtctc     1200
ctgcgagccc catttccc                                     1218
    
```

10 <210> 9

<211> 1218

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia del plásmido

<400> 9

ES 2 746 116 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctt tcgaggaggc ccgggagatc ttcgaagacg cggagaggac gaagctgttc 120
 tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttoga gggccggaac 240
 tgtgagacgc acaaggatga ccagctgacg tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
 tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gacaggccag caaaccccaa ggcgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtggctctc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggt gctgggagcag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggctc tcaactgacca tgtggtgccc 780
 ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg 840
 gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
 aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 960
 ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggcccact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

<210> 10
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia del plásmido

<400> 10

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctt tcgaggaggc ccgggagatc ttcgaagacg cggagaggac gaagctgttc 120
 tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttoga gggccggaac 240
 tgtgagacgc acaaggatga ccagctgacg tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300

ES 2 746 116 T3

tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgtcctg cacacccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggt gctgggagag cacgacctca gcgagcacga cgggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcctc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cagcagatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tctactgacca tgtggtgccc 780
 ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgag cttctcattg 840
 gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
 aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 960
 ccacagatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtggggcact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtccctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

<210> 11
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia del plásmido

10

<400> 11

gccaacgcgt tcctggagga gctgcccag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctc tcgaggaggc ccgggagatc ttcgaagacg cggagaggac gaagctgttc 120
 tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 240
 tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
 tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgtcctg cacacccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gacaggccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggt gctgggagag cacgacctca gcgagcacga cgggatgag 660

ES 2 746 116 T3

cagagccggc ggggtggcgca ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtggtgccc 780
 ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg 840
 gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
 aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 960
 ccacagatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtggggcact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

<210> 12
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia del plásmido

10

<400> 12

gccaacgcgt tcctggagga gctgcccag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctc tcgaggaggc ccgggagatc ttcgaagacg aagaggaaac gaagctgttc 120
 tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttoga gggccggaac 240
 tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
 tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggt gctgggcgag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcgca ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtggtgccc 780
 ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg 840
 gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
 aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 960

ES 2 746 116 T3

ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1080
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttgggggtgta caccagggtc 1140
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1200
ctgcgagccc catttccc 1218

<210> 13
<211> 1218
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia del plásmido

<400> 13

gccaacgcgt tcctggagga gctgcgccag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
cagtgtcctc tcgaggaggc ccgggagatc ttcgaagacg aagaggaaac gaagctgttc 120
tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttoga gggccggaac 240
tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
ctagaaaaaa gacaggccag caaaccccaa ggcgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
accctgatca acaccatctg ggtgggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
tggaggaacc tgatcgcggt gctgggagcag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 660
cagagccggc ggggtggcgca ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggctc tcaactgacca tgtggtgccc 780
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgtgg ccttcgtgag cttctcattg 840
gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 960
ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1080
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttgggggtgta caccagggtc 1140
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1200
ctgcgagccc catttccc 1218

15 <210> 14
<211> 1218
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 746 116 T3

<220>

<223> Secuencia del plásmido

<400> 14

5

```

gccaacgcgt tcctggagga gctgcccag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag      60
cagtgtcctt tcgaggaggc ccgggagatc ttcgaagacg aagaggaaac gaagctgttc      120
tgattttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc      180
tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttoga gggccggaac      240
tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag      300
tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg      360
ctggcagacg ggggtgtcctg cacacccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt      420
ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggcogaattg tggggggcaa ggtgtgcccc      480
aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg      540
accctgatca acaccatctg ggtgggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac      600
tgaggaacc tgatcgcggt gctgggcgag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag      660
cagagccggc ggggtggcga ggtcatcacc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac      720
cacgacatcg cgctgtctcc cctgcaccag cccgtggctc tcaactgacca tgtggtgccc      780
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg      840
gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc      900
aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc      960
ccacagatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc     1020
aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc     1080
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttggggtgta caccagggtc     1140
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc     1200
ctgcgagccc catttccc                                1218

```

<210> 15

<211> 1218

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del plásmido

<400> 15

15

```

gccaacgcgt tcctggagga gctgcccag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag      60

```


ES 2 746 116 T3

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

ES 2 746 116 T3

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

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

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

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

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

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405

<210> 17
 <211> 407
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia peptídica de la variante del FVII humano

10 <220>
 <221> Característica nueva
 <222> (407)..(407)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15 <400> 17

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Gln Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15

Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Glu
 20 25 30

Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50 55 60

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65 70 75 80

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly

ES 2 746 116 T3

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

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

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

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

Leu Arg Ala Pro Phe Pro Xaa
 405

<210> 18

<211> 406

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica de la variante del FVII humano

10

<400> 18

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Gln Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15

Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Glu
 20 25 30

Asp Glu Glu Glu Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50 55 60

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65 70 75 80

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85 90 95

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Asn Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100 105 110

Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115 120 125

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg

15

ES 2 746 116 T3

130						135						140					
Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro		
145					150					155					160		
Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln		
				165					170					175			
Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala		
			180					185					190				
His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu		
		195					200					205					
Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg		
	210					215					220						
Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn		
225					230					235					240		
His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	Pro	Val	Asn	Leu	Thr	Asp		
				245					250					255			
His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr		
			260					265					270				
Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu		
		275					280					285					
Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg		
	290					295					300						
Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser		
305					310					315					320		
Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser		
				325					330					335			
Lys	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr		
			340					345					350				
Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys		
		355					360					365					
Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile		
	370					375					380						

ES 2 746 116 T3

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

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido del Factor VIIa humano para su uso en el tratamiento de una enfermedad en la que se desea la coagulación de la sangre, en el que la relación de moles de ácido siálico a moles de glicano unido a N conjugado con el polipéptido del Factor VIIa humano es menor que 1,0 y en el que el polipéptido del Factor VIIa humano comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.
- 10 2. El polipéptido del Factor VIIa humano para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido del Factor VIIa humano está glicosilado.
3. El polipéptido del Factor VIIa humano para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la relación de moles de ácido siálico conjugado a moles de glicano unido a N es inferior a 0,1.
- 15 4. El polipéptido del Factor VIIa humano para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la semivida del polipéptido del Factor VIIa humano es inferior a 0,5 horas.
5. El polipéptido del Factor VIIa humano para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad o trastorno es hemorragia.
- 20 6. El polipéptido del Factor VIIa humano para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en hemorragia, sangrado gastrointestinal, sangrado incontrolado, sangrado mientras se somete a un trasplante o resección o cirugía, sangrado de varices, trombocitopenia, hemofilia, hemorragia intracraneal, aneurisma aórtico y administración excesiva de un anticoagulante.
- 25 7. El polipéptido del Factor VIIa humano para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en lesión traumática penetrante; lesión traumática contundente; sangrado en cirugía electiva; sangrado en cirugía cardíaca; sangrado en cirugía espinal; cirugía ortopédica; neurocirugía; cirugía oncológica; cirugía posparto; menorragia; sangrado en el trasplante de células madre; sangrado en el trasplante de hígado; sangrado gastrointestinal; sangrado varicoso activo en cirrosis; sangrado no varicoso en la cirrosis; hemorragia alveolar difusa; aneurisma aórtico; hemorragia intracerebral; lesión cerebral traumática; contusión cerebral; reversión de warfarina; reversión de heparina; reversión de anticoagulantes; reversión de antitrombóticos; deficiencia del Factor VII; quemaduras; profilaxis en pacientes de hemofilia con inhibidores; hepatectomía parcial para pacientes no cirróticos y cirróticos; hemofilia adquirida; púrpura trombocitopénica idiopática; trombostenia de Glanzmann; trombostenia de Glanzmann refractaria a transfusión de plaquetas y síndrome de Bernard-Soulier.
- 35

FACTOR VII DE TIPO SILVESTRE

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
 GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
 TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
 CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
 ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
 CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
 CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
 ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
 CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
 GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
 GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
 ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
 ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCTCACTGACCATGTG
 GTGCCCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
 TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
 GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
 A GACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
 CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
 TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTAC
 ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
 AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 1)

VI

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
 GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
 TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
 CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
 ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
 CAGTACTGCAGTGACCACAACGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
 CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
 ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
 CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
 GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
 GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
 ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
 ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGAACCTCACTGACCATGTG
 GTGCCCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
 TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
 GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
 A GACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
 CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
 TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTAC
 ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
 AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCCT

Figura 1A

V2

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
 GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCGAAGACGAAGAGGAAACGAAGCTGT
 TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
 CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
 ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
 CAGTACTGCAGTGACCACAACGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
 CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
 ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGC AAGGTGTG
 CCCC AAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
 GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCACTGTTTCGACAAAATCAA
 GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCAGACCTCAGCGAGCACGACGGG
 ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
 ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGAACCTCACTGACCATGTG
 GTGCCCCCTGCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
 TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
 GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
 AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
 CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
 TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTAC
 ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
 AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 3)

pMB113

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
 GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
 TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
 CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
 ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
 CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
 CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
 ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
 CCCC AAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
 GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCACTGTTTCGACAAAATCAA
 GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCAGACCTCAGCGAGCACGACGGG
 ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
 ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTG
 GTGCCCCCTGCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
 TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
 GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
 AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
 CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
 TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTAC
 ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
 AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 4)

Figura 1B

pMB114

GCCAACGCGTTCCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
 GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
 TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
 CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
 ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
 CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTA
 CTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCTTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
 ATTCTAGAAAAAGACAGGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
 CCCCAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
 GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCACTGTTTCGACAAAATCAA
 GA
 ACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCAGACCTCAGCGAGCAGCAGCGGGG
 ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
 ACCAACACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCTCCTACTGACCATGTG
 GTGCCCTCTGCCTGCCCAGCGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
 TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
 GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
 AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
 CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
 TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTAC
 ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
 AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 5)

pMB115

GCCAACGCGTTCCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
 GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
 TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
 CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
 ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
 CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTA
 CTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCTTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
 ATTCTAGAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
 CCCCAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
 GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCACTGTTTCGACAAAATCAA
 GA
 ACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCAGACCTCAGCGAGCAGCAGCGGGG
 ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
 ACCAACACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCTCCTACTGACCATGTG
 GTGCCCTCTGCCTGCCCAGCGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
 TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
 GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
 AGACTCCCCACAGATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGG
 ACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
 CTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTAC
 CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
 AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 6)

Figura 1C

pMB116

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
 GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
 TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
 CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
 ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
 CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
 CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
 ATTCTAGAAAAAAGACAGGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
 CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
 GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCACTGTTTCGACAAAAATCAA
 GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
 ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
 ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCTCACTGACCATGTG
 GTGCCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
 TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
 GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTACGGAAGGTGGG
 AGACTCCCCACAGATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGG
 ACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTAC
 CTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTAC
 CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
 AGGAGTCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 7)

pMB117

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
 GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
 TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
 CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
 ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
 CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
 CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
 ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
 CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
 GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCACTGTTTCGACAAAAATCAA
 GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
 ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
 ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCTCACTGACCATGTG
 GTGCCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
 TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
 GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTACGGAAGGTGGG
 AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
 CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
 TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTAC
 ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
 AGGAGTCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 8)

Figura 1D

pMB118

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCGAAGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGACAGGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTG
GTGCCCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTAC
ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 9)

pMB119

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCGAAGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCATATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTG
GTGCCCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCACAGATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGG
ACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
CTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTAC
CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 10)

Figura 1E

pMB120

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCGAAGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCATATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGTCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGACAGGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTG
GTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCACAGATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGG
ACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTAC
CTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCCACTTTGGGGTGT
CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 11)

pMB121

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCGAAGACGAAGAGGAAACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCATATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGTCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTG
GTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCCACTTTGGGGTGT
ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 12)

Figura 1F

pMB122

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
 GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGACGAAGAGGAAAACGAAGCTGT
 TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
 CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
 ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
 CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
 CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
 ATTCTAGAAAAAAGACAGGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
 CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
 GGGGACCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
 GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
 ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
 ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTG
 GTGCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
 TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
 GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
 AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
 CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
 TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCCACTTTGGGGTGTAC
 ACCAGGGTCTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
 AGGAGTCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 13)

pMB123

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
 GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGACGAAGAGGAAAACGAAGCTGT
 TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
 CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
 ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
 CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
 CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
 ATTCTAGAAAAAAGAAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
 CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
 GGGGACCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
 GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
 ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
 ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTG
 GTGCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
 TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
 GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
 AGACTCCCCACAGATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGG
 ACTCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTAC
 CTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCCACTTTGGGGTGT
 CACCAGGGTCTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
 AGGAGTCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 14)

Figura 1G

pMB124

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCGAAGACGAAGAGGAAACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGACAGGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCTCACTGACCATGTG
GTGCCCTCTGCCTGCCC GAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCACAGATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGG
ACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTAC
CTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTA
CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGGTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 15)

Figura 1H

Péptido del Factor VII de Tipo Silvestre

ANAFLEELRQGLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGS
CKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHNGTKRSCRCHEGYSL
LADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCCKGECWQVLLLVNGAQLCGG
TLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTN
HDIALRLHQPVNLTDHVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVL
NVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTG
IVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (SEQ ID NO: 16)

Péptido V1

ANAFLEELRQGLERECKEEQCSFEEAREIFEDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGS
CKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHNGTKRSCRCHEGYSL
LADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCCKGECWQVLLLVNGAQLCGG
TLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTN
HDIALRLHQPVNLTDHVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVL
NVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTG
IVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (SEQ ID NO: 17)

Péptido V2

ANAFLEELRQGLERECKEEQCSFEEAREIFEDEEETKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGS
CKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHNGTKRSCRCHEGYSL
LADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCCKGECWQVLLLVNGAQLCGG
TLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTN
HDIALRLHQPVNLTDHVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVL
NVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTG
IVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (SEQ ID NO: 18)

Figura 2

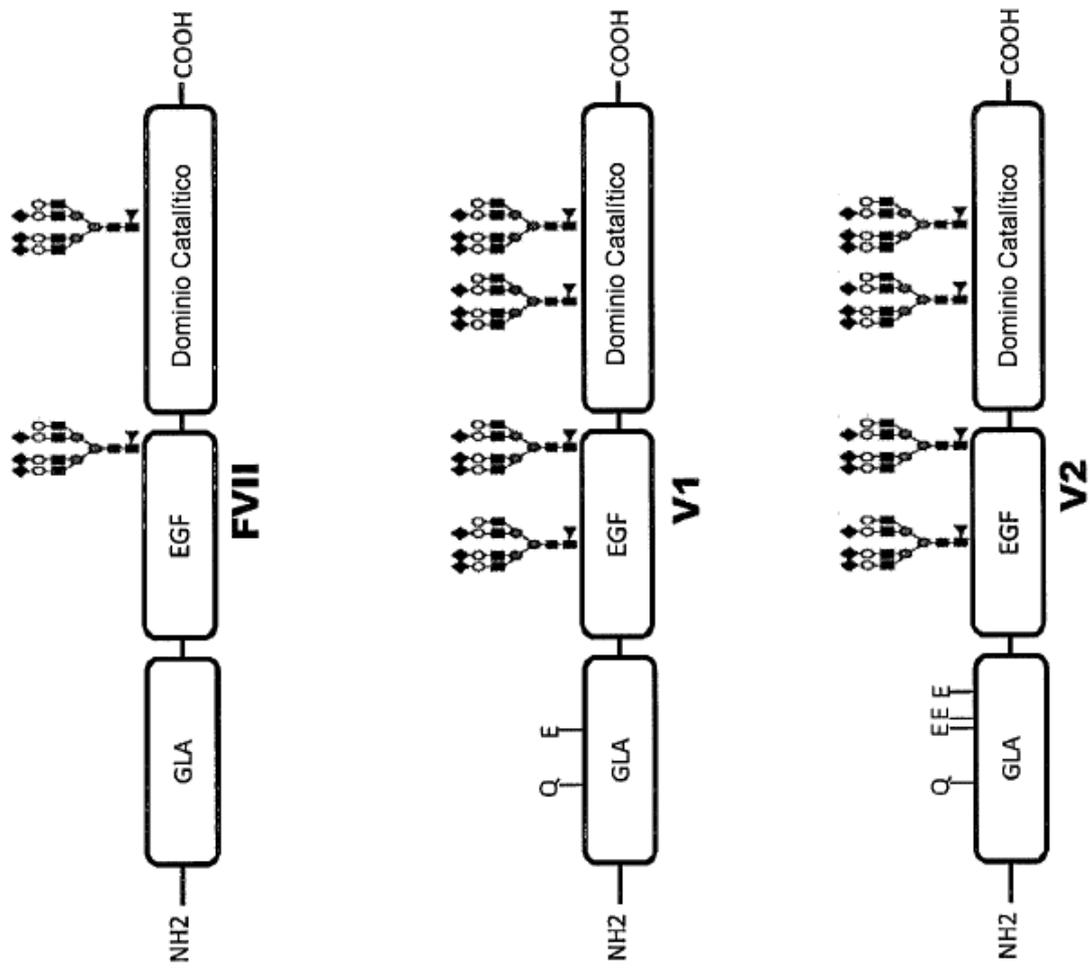
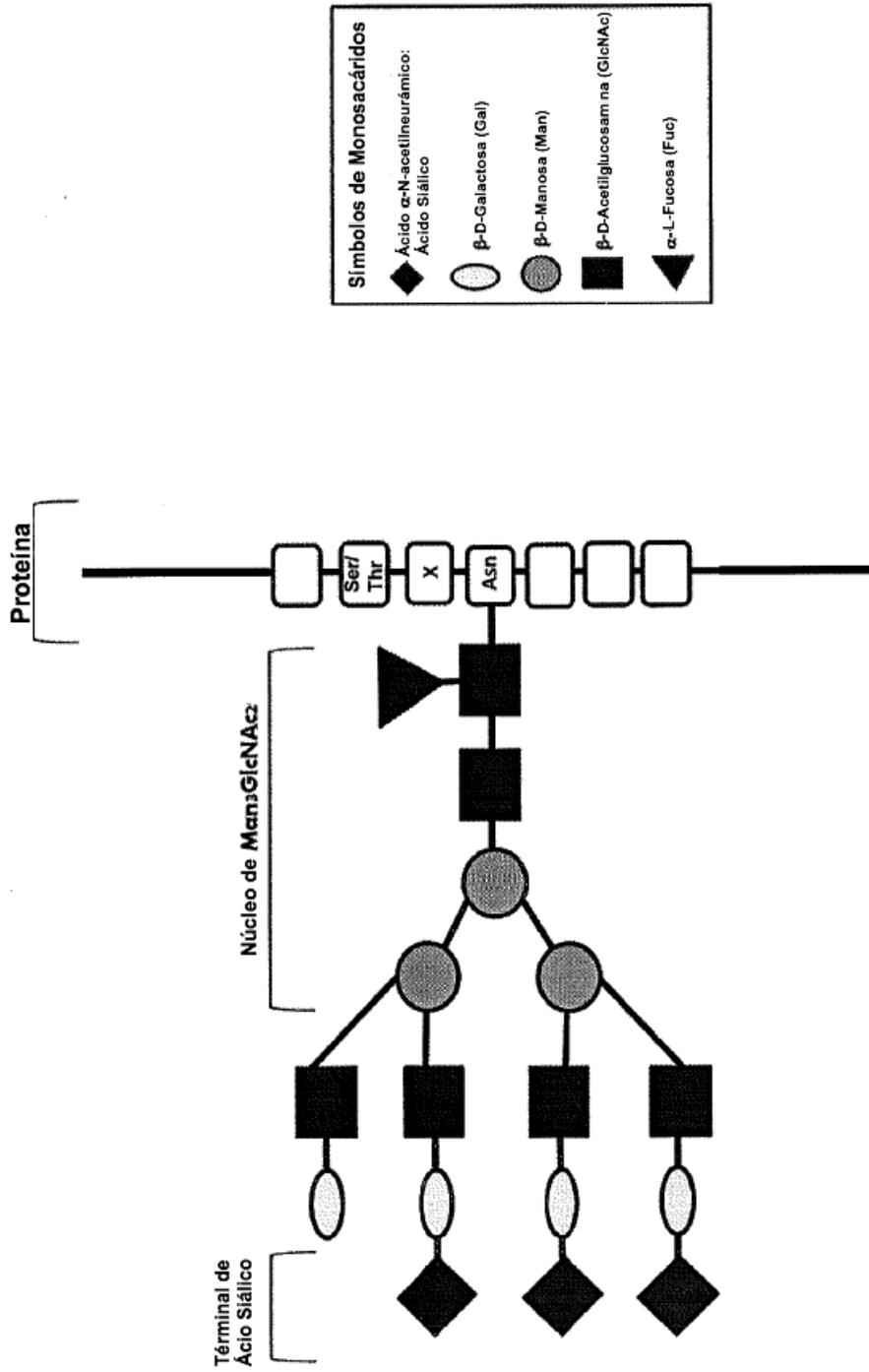


Figura 3



Ejemplo de un complejo de glicano unido a N
Figura 4

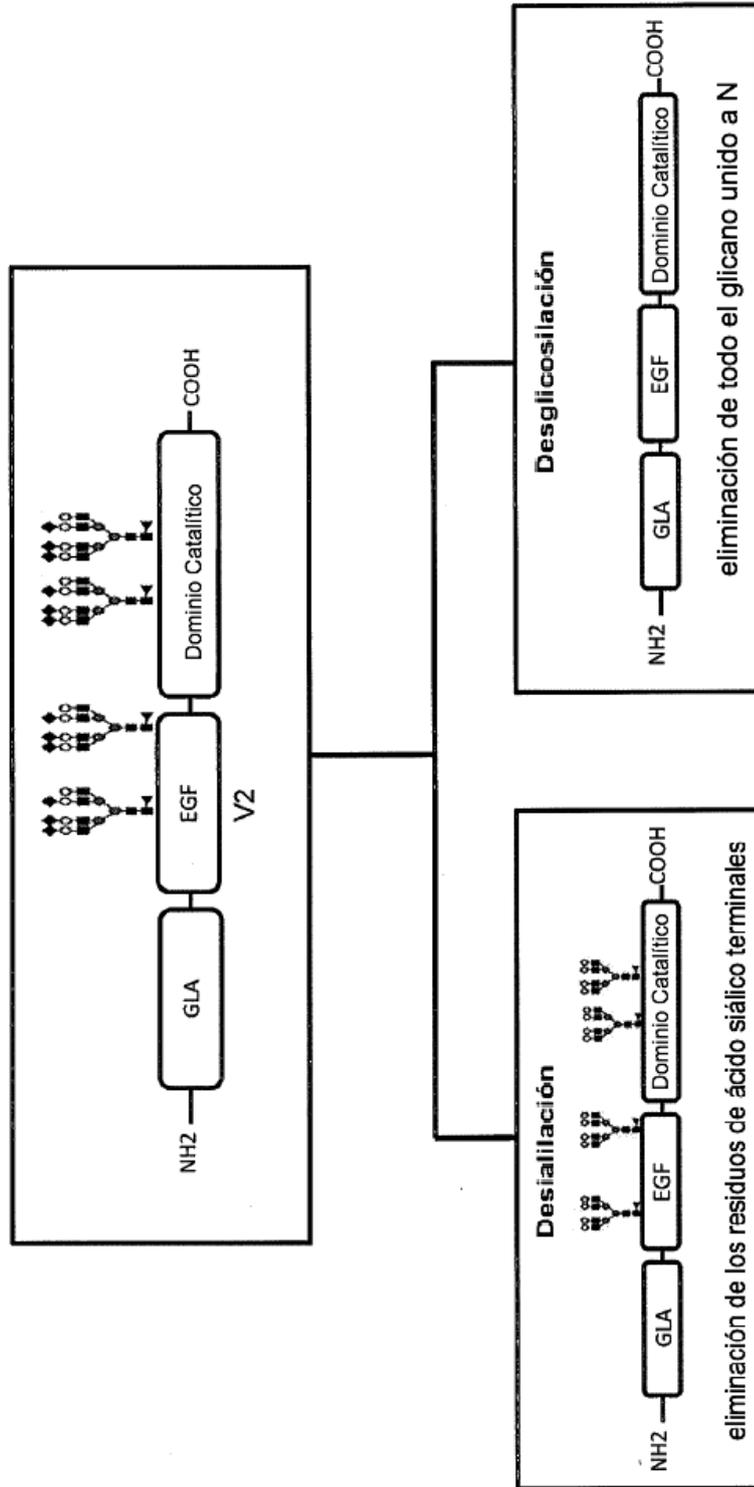


Figura 5

Figura 6

Número pBM	Cadena principal	Sitios de N-glicosilación	Diagrama de N-glicosilación
pMB113	F7 ts	N145, N322	
pMB114		N145Q, N322	
pMB115		N145, N322Q	
pMB116		N145Q, N322Q	
pMB117	V1	N145, N322	
pMB118		N145Q, N322	
pMB119		N145, N322Q	
pMB120		N145Q, N322Q	
pMB121	V2	N145, N322	
pMB122		N145Q, N322	
pMB123		N145, N322Q	
pMB124		N145Q, N322Q	

FVII-B0189 Humano, cadena pesada

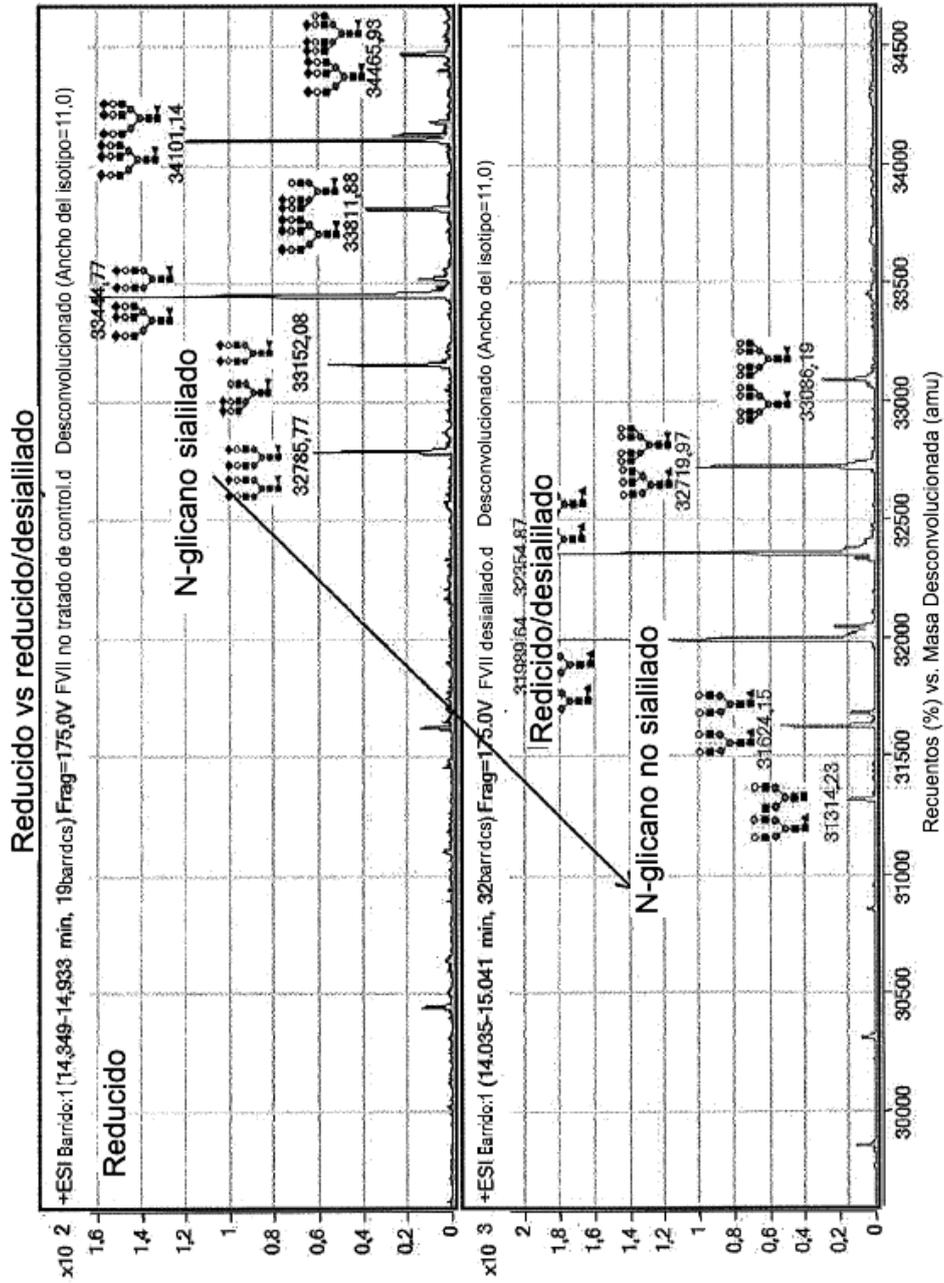


Figura 7

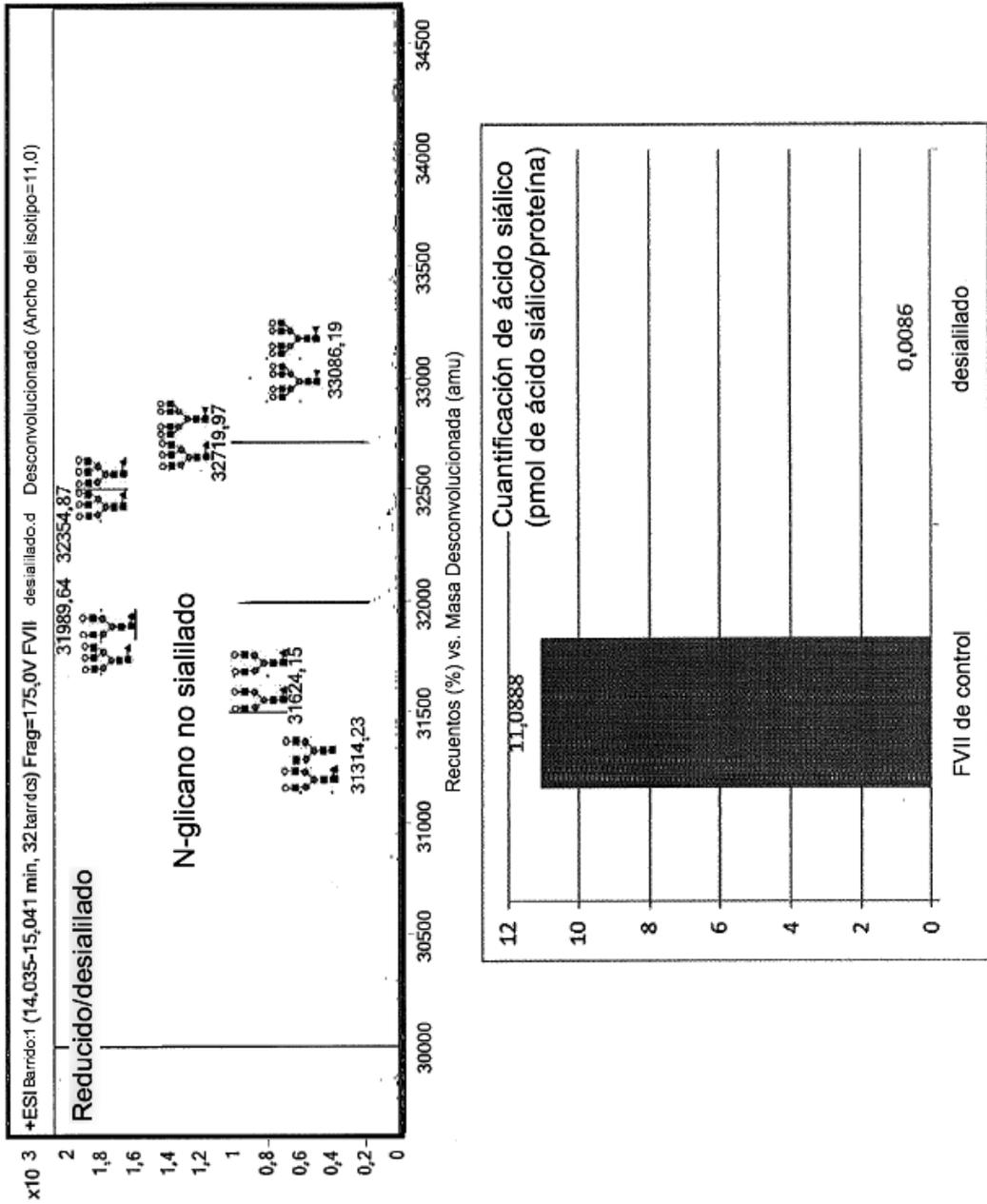


Figura 8

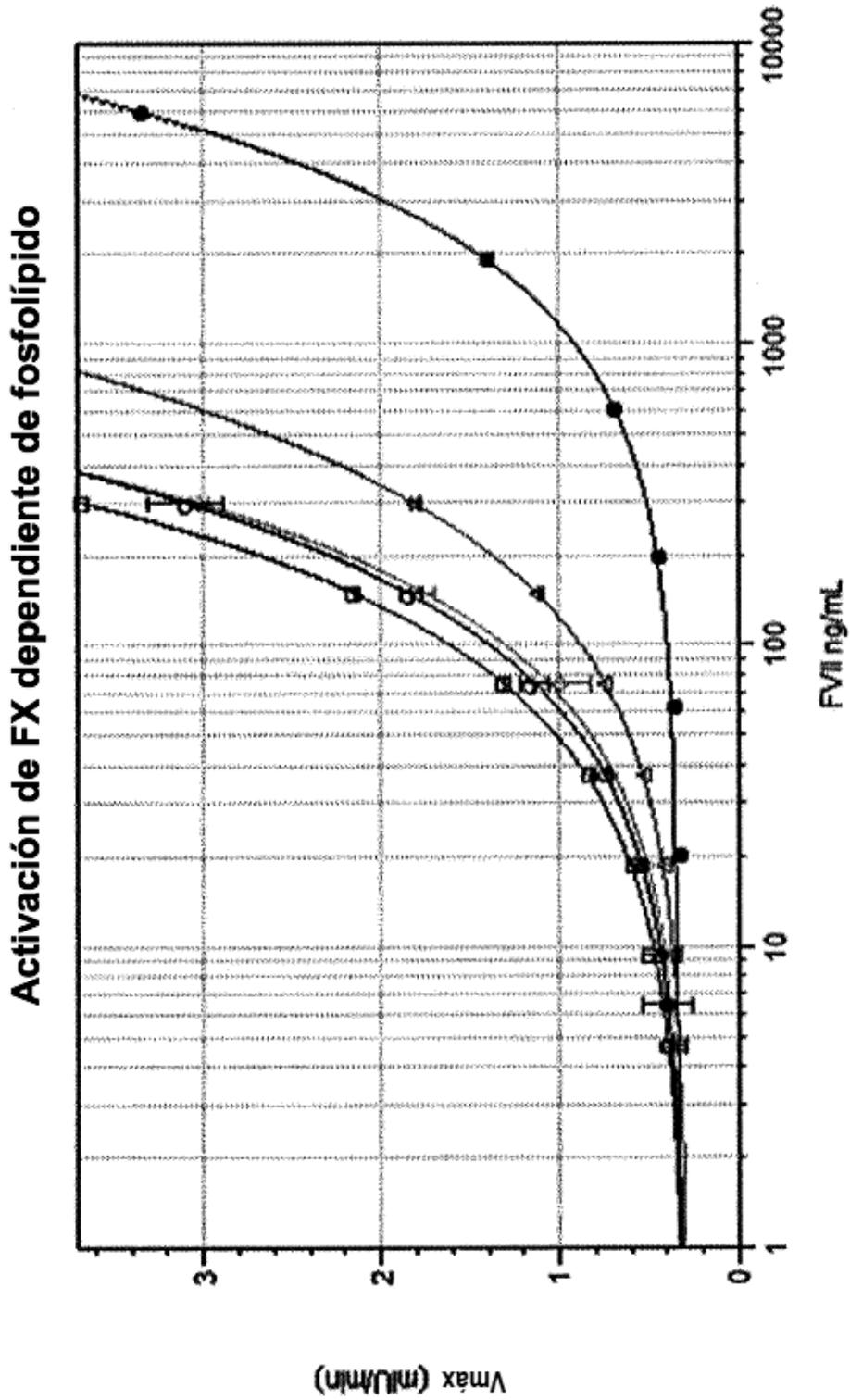
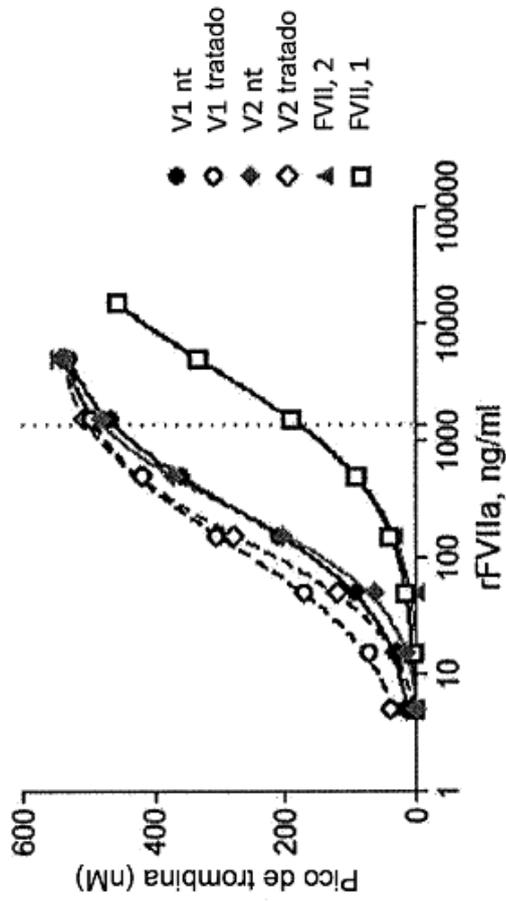


Figura 9

Comparaciones de la actividad in vitro de variantes de rFVIIa

(Ensayo PL-TGA en plasma de paciente con hemA severo)

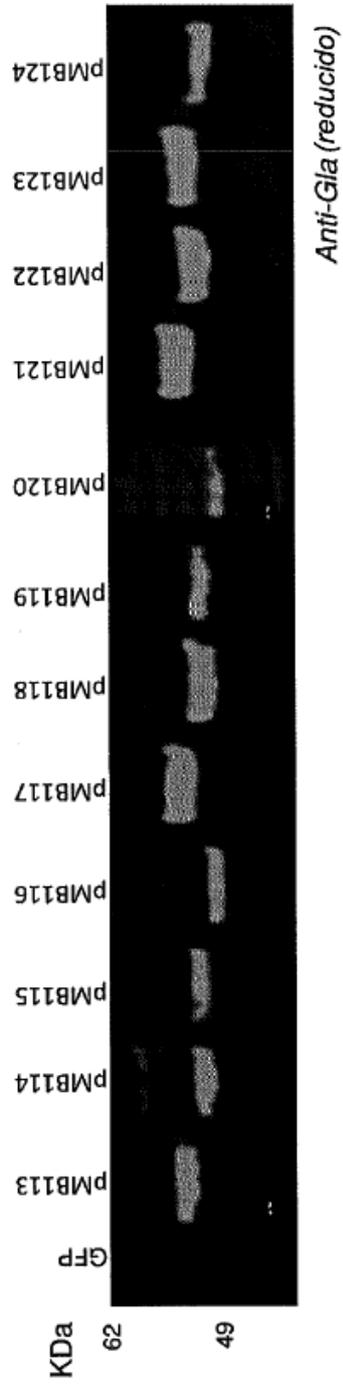


Cantidad de trombina generada por 1.300 ng/ml de diferentes proteínas de rFVIIa

	V1 sin tratamiento	V1 con tratamiento	V2 sin tratamiento	V2 con tratamiento	FVII
Pico de Trombina	463 nM	492 nM	480 nM	502 nM	178 nM
FVII doblado	2,60	2,76	2,70	2,82	1

Figura 10

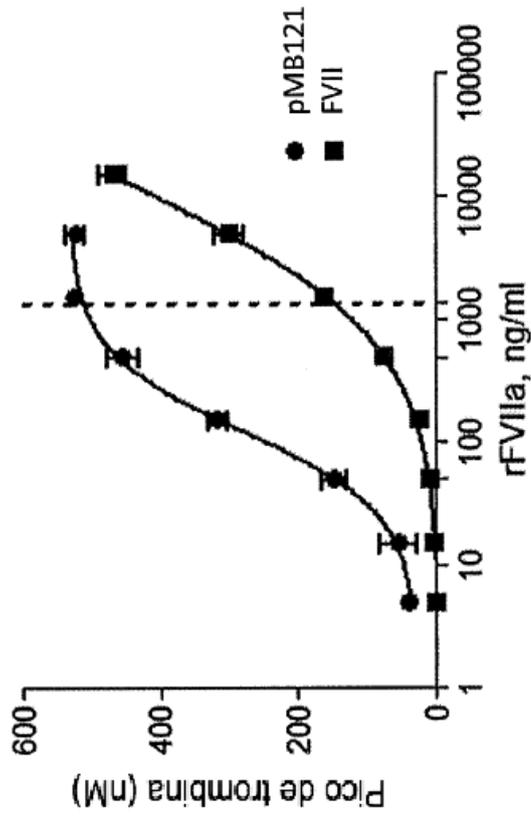
Figura 11



	Cromo de FVII (ng/ml)	ELISA de FVII (ng/ml)	Relación Cromo/ELISA
pMB113	740,4	788,2	0,9
pMB114	619,8	601,0	1,0
pMB115	554,2	426,8	1,3
pMB116	498,9	430,0	1,2
pMB117	1248,3	870,8	1,4
pMB118	1272,1	890,5	1,4
pMB119	601,7	346,8	1,7
pMB120	292	236,8	1,2
pMB121	166,3	808,2	0,2
pMB122	155,6	711,9	0,2
pMB123	181,5	514,5	0,4
pMB124	78,9	277,2	0,3

Figura 12

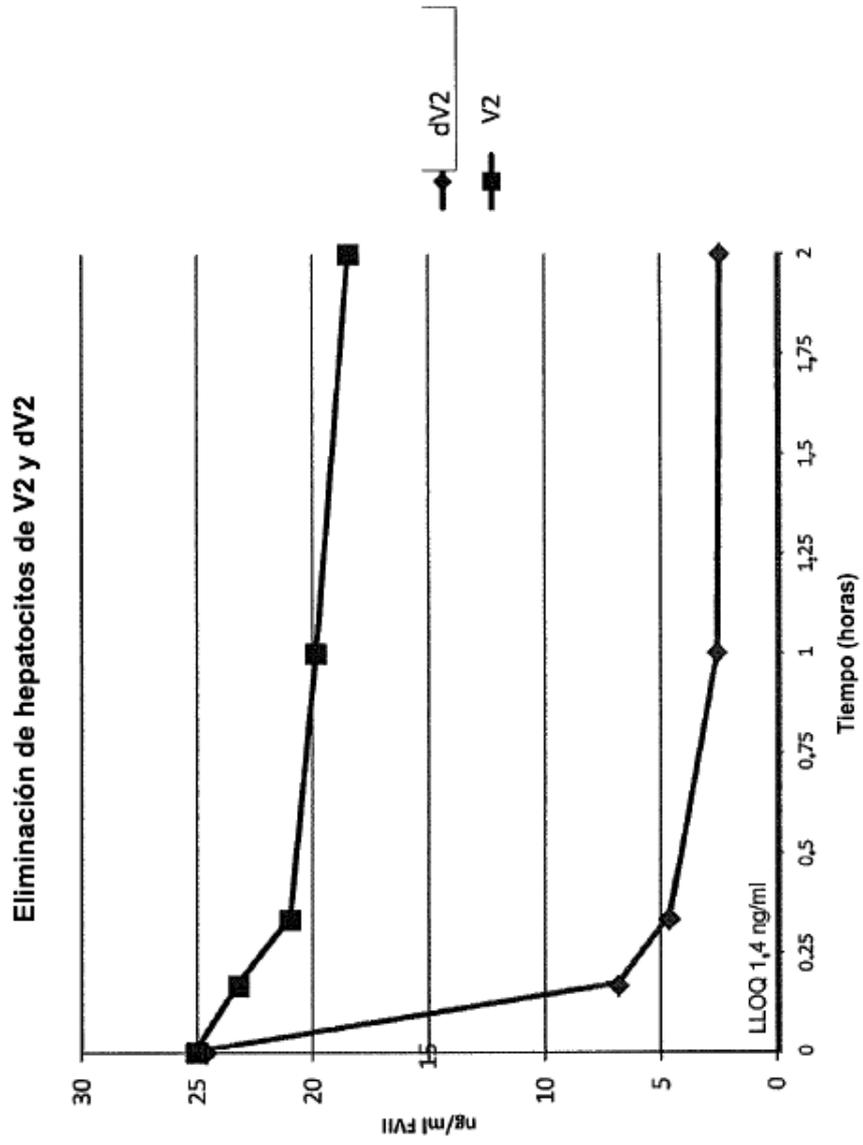
Comparaciones de la actividad in vitro de variantes de rFVIIa
 (Ensayo PL-TGA en plasma de paciente con hemA severo)



	pMB121	FVII
Pico de Trombina	511 nM	148 nM
FVII doblado	3,45	1

Figura 13

Figura 14



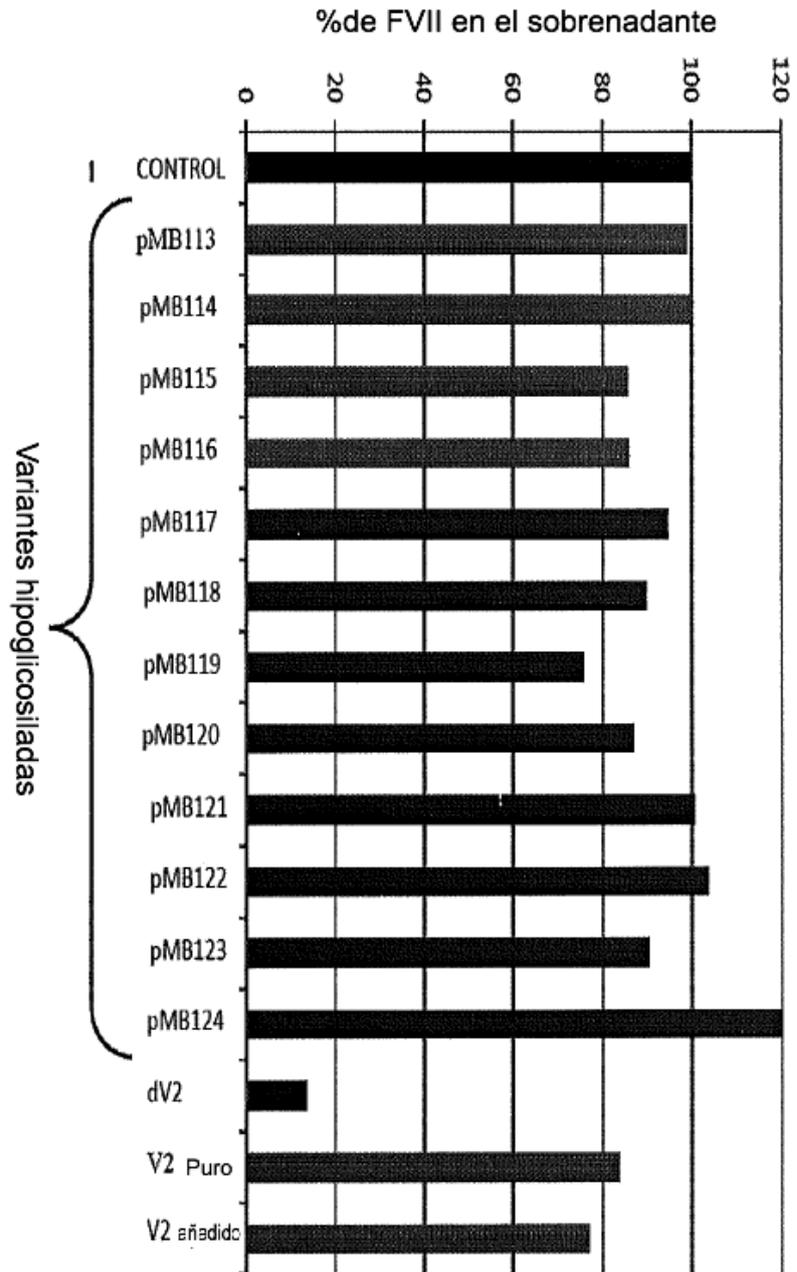
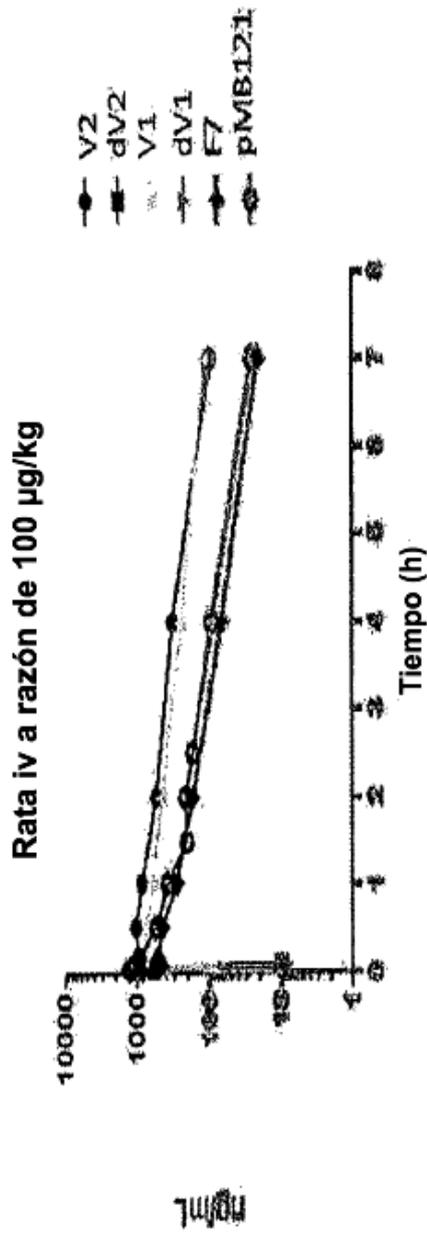


Figura 15



	T _{1/2} (h)	MRT (h)	CL (mL/h/kg)	V _{ss} (L/kg)
V2	2,7	3,3	26	80
V1	2,5	3,3	33	109
F7	1,6	2,0	91	181
pMB121	1,6	1,9	68	129
dV2	~ 1 min	n.c.	n.c.	n.c.
dV1	~ 1 min	n.c.	n.c.	n.c.

Figura 16

Figura 17

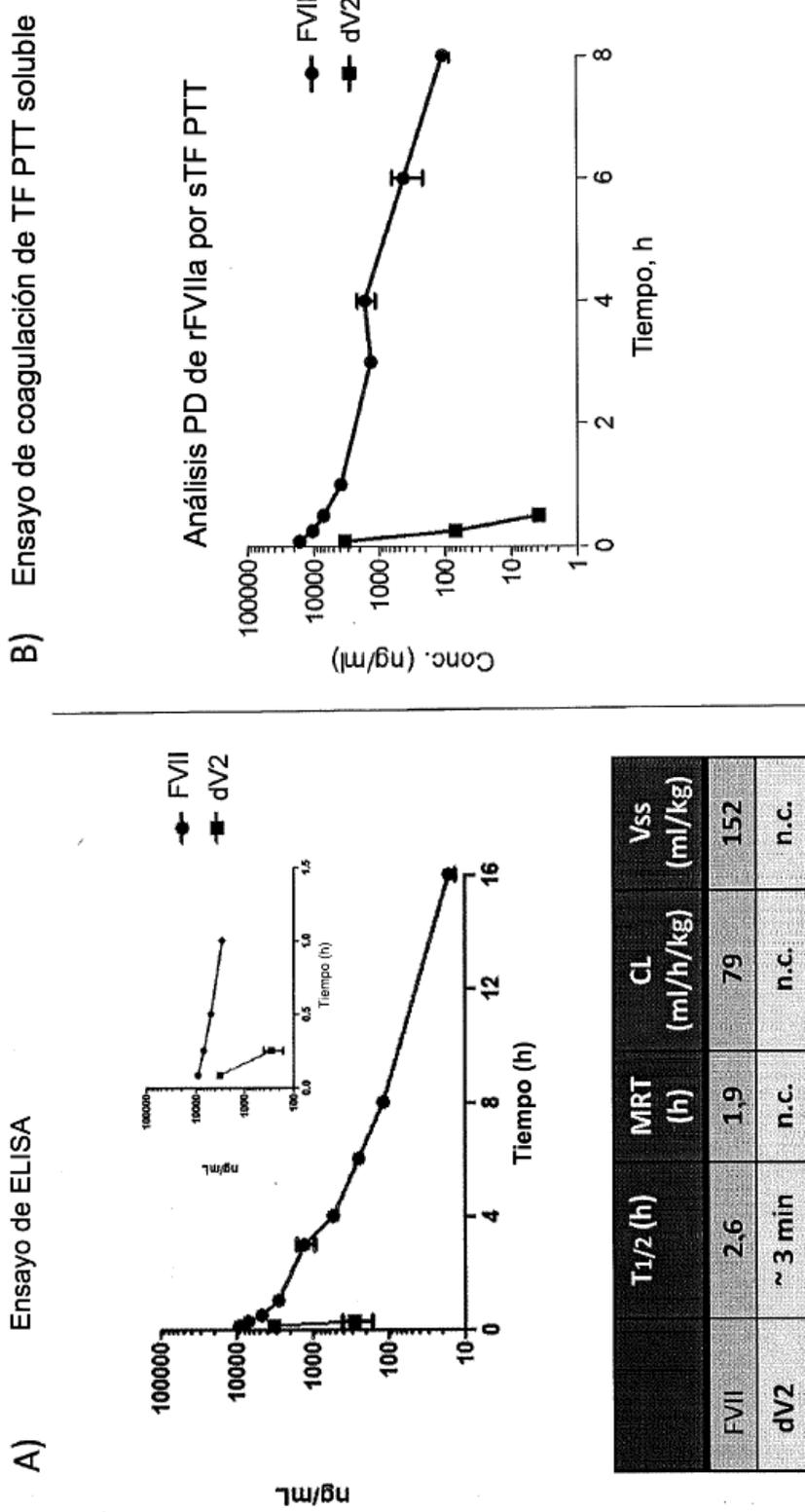
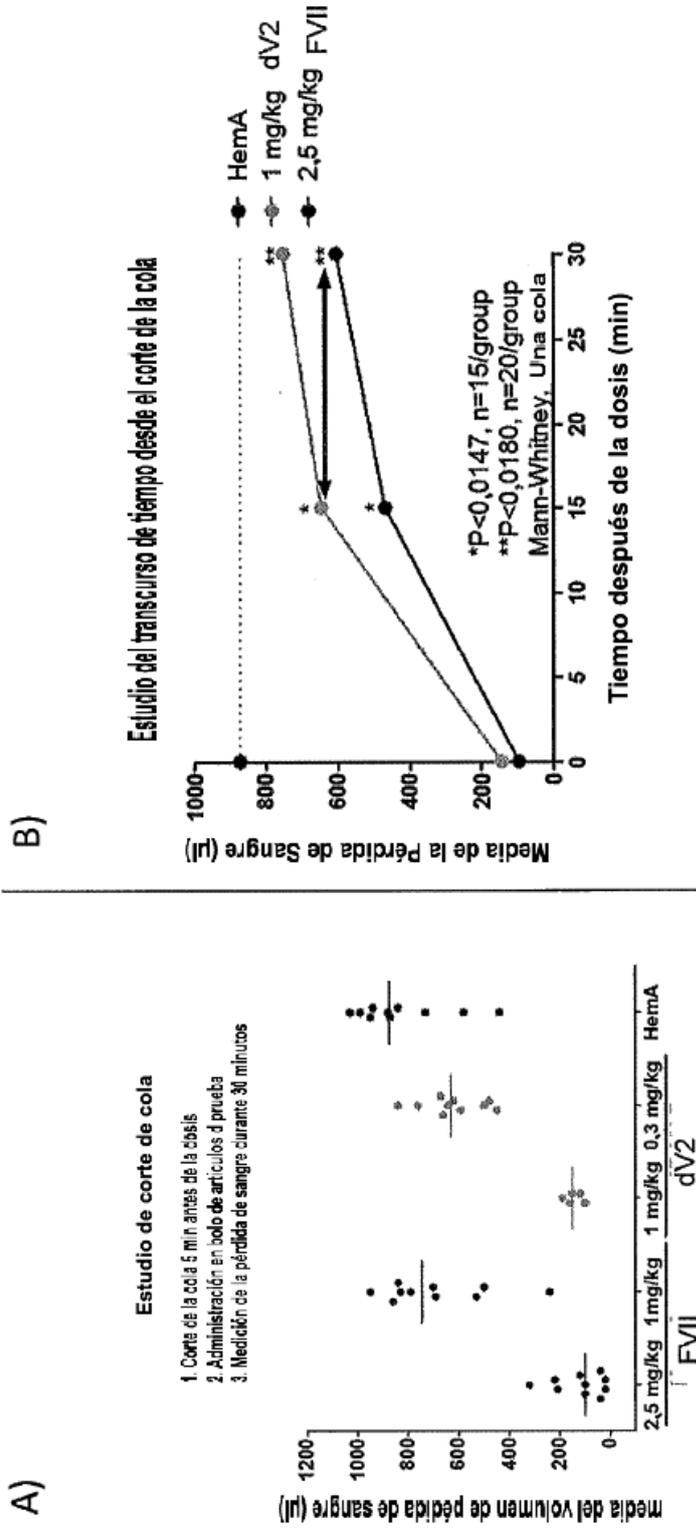


Figura 18



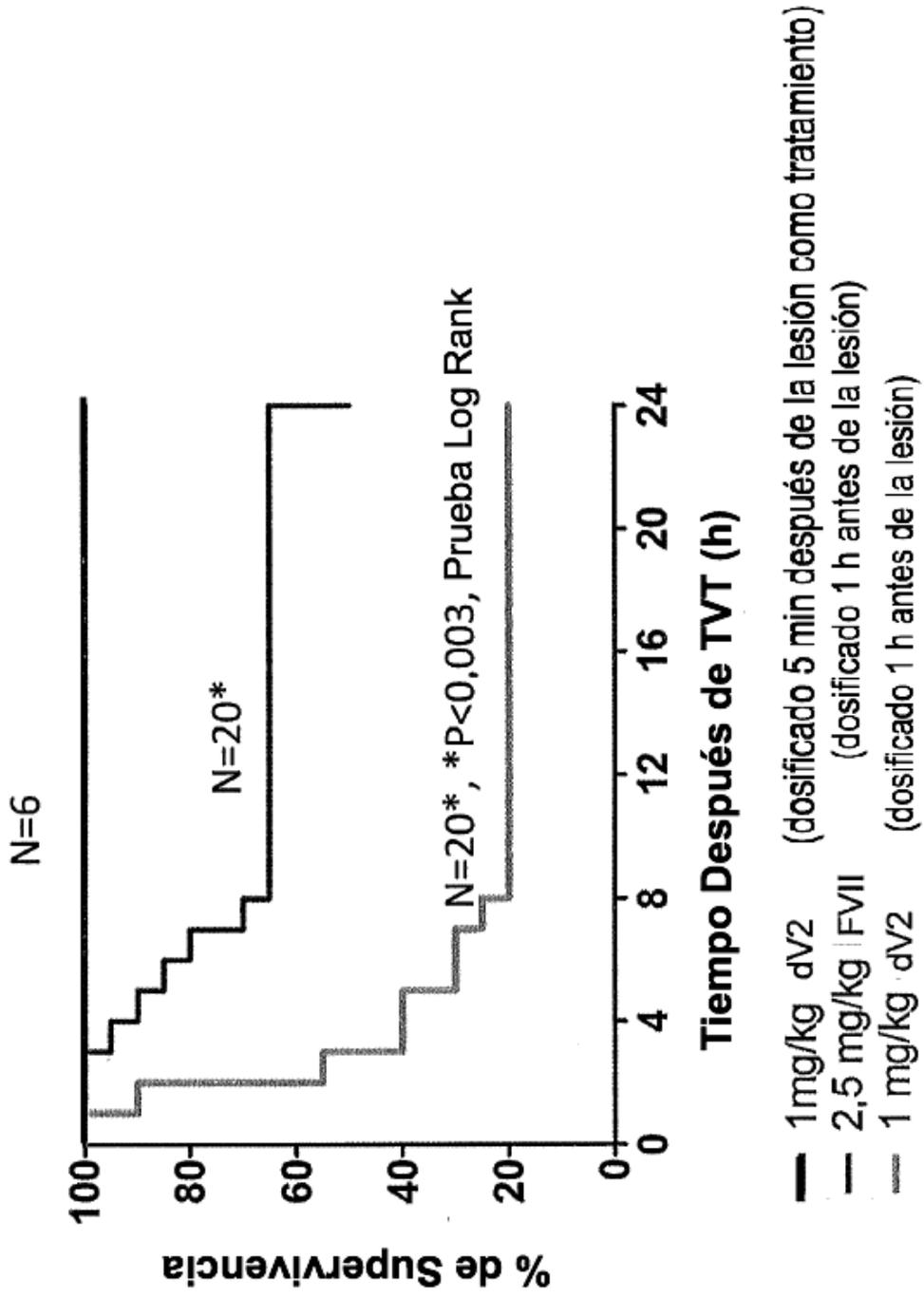


Figura 19

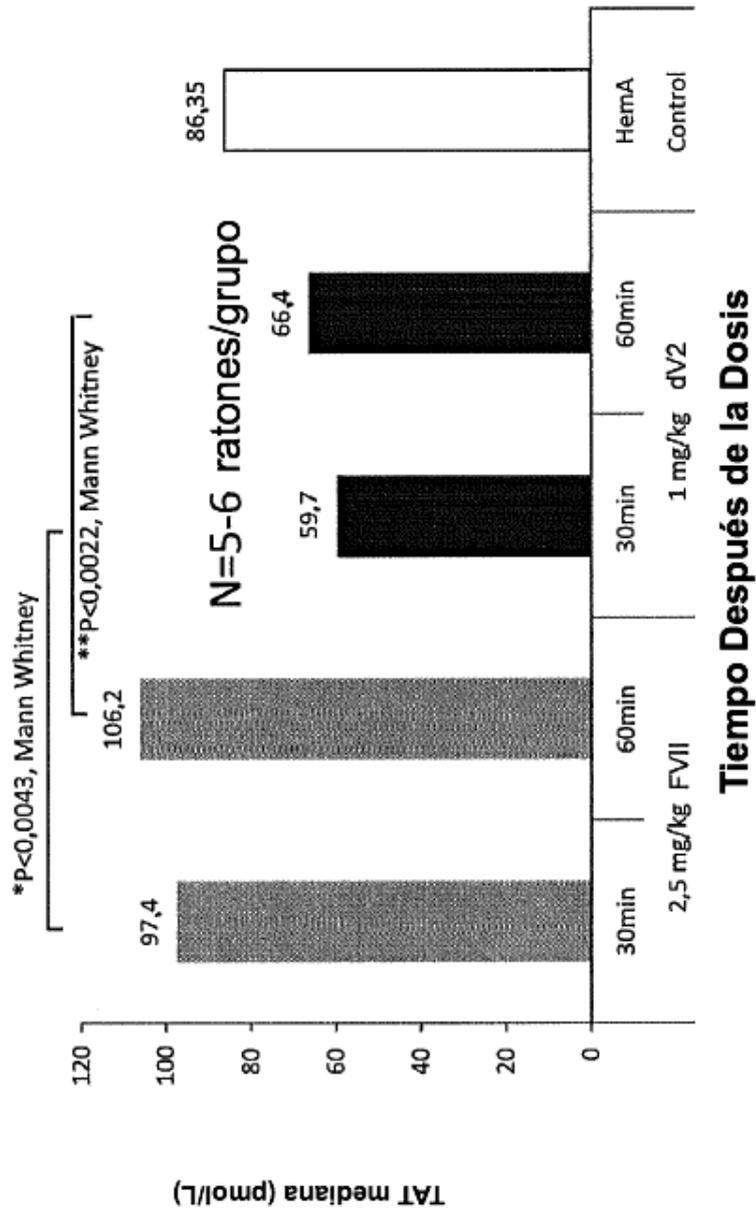


Figura 20

Eficacia de F7 y dV2 en Ratones Competentes para Coagulación Tratados con Activador Plasminógeno Tisular (tPA): Modelo de Sangrado por Corte de la Cola

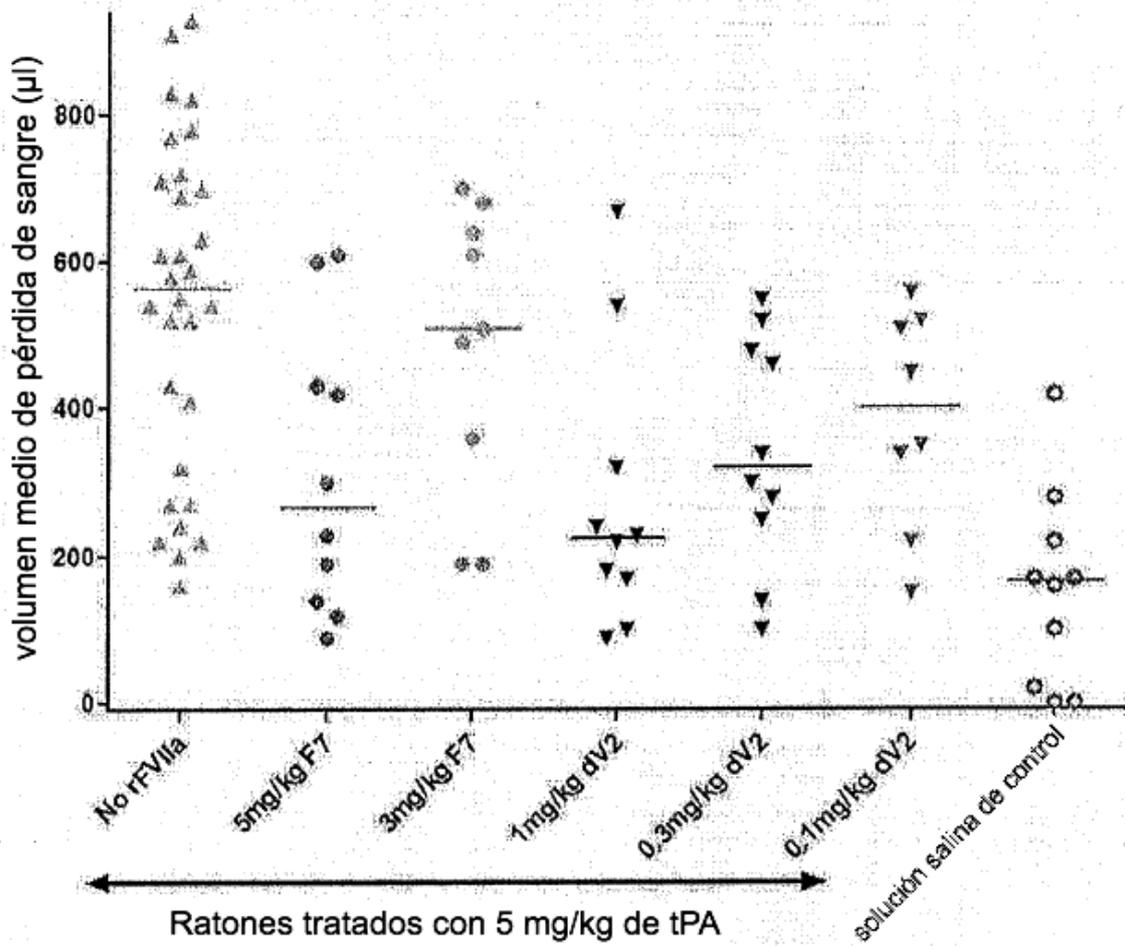
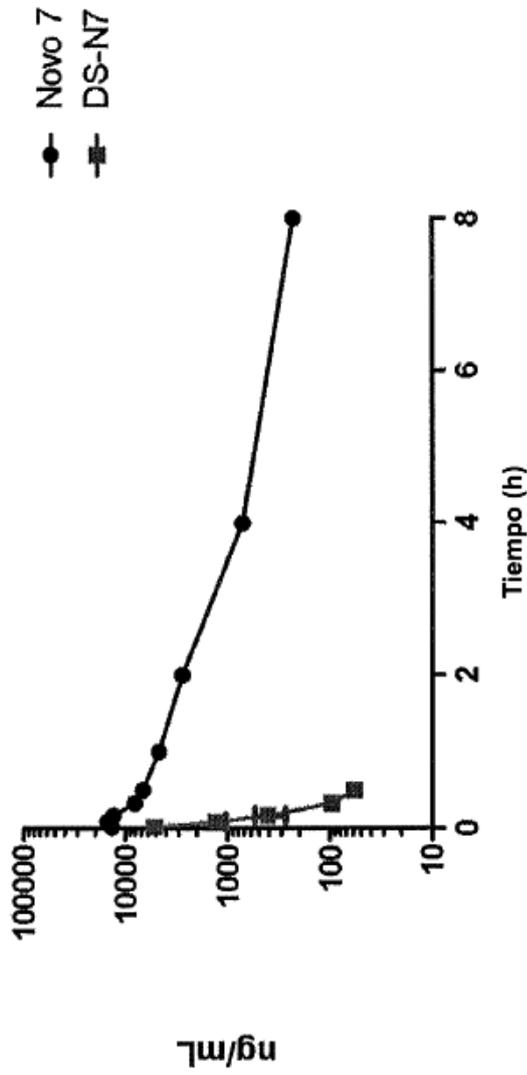


Figura 21



	T1/2 (h)	MRT (h)	CL (ml/h/kg)	Vss (ml/kg)
F7	1,7	1,9	59	110
dF7	0,12	0,09	2400	210

Figura 22

Estudio de Corte de Cola

1. 5 mg/kg tPA iv
2. Corte de cola a 50 mm desde la punta
3. dWT VIIa o Novo7 por IV
4. Romper coágulos inestables cada 6 min durante el periodo de recolección
5. Recoger la sangre durante 45 min

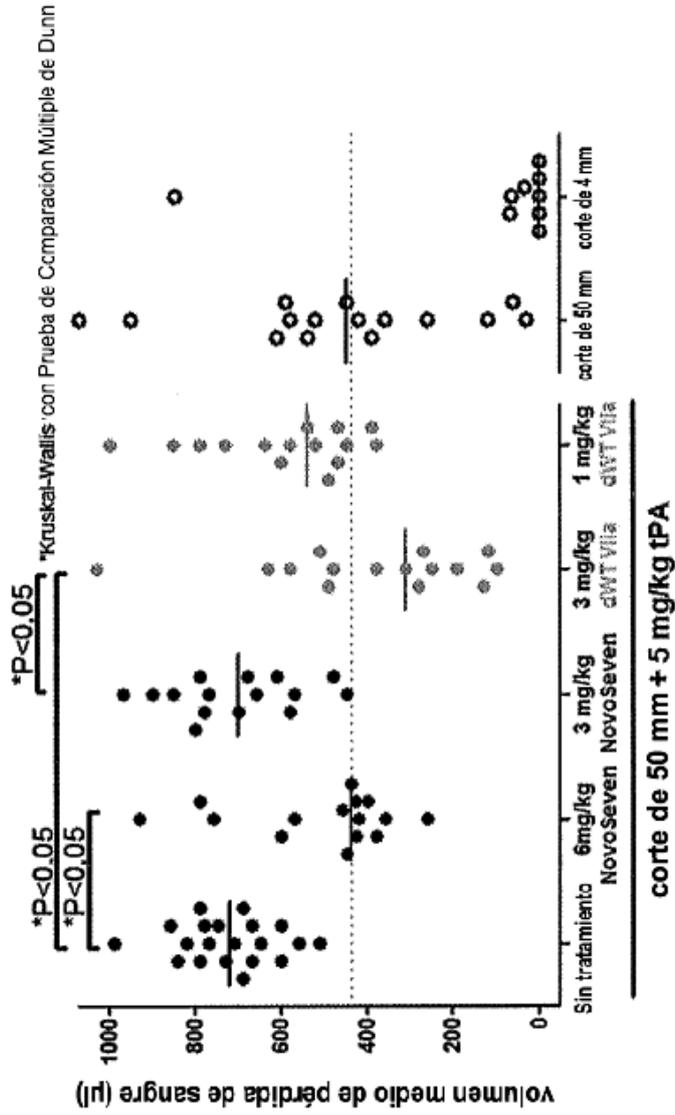


Figura 23

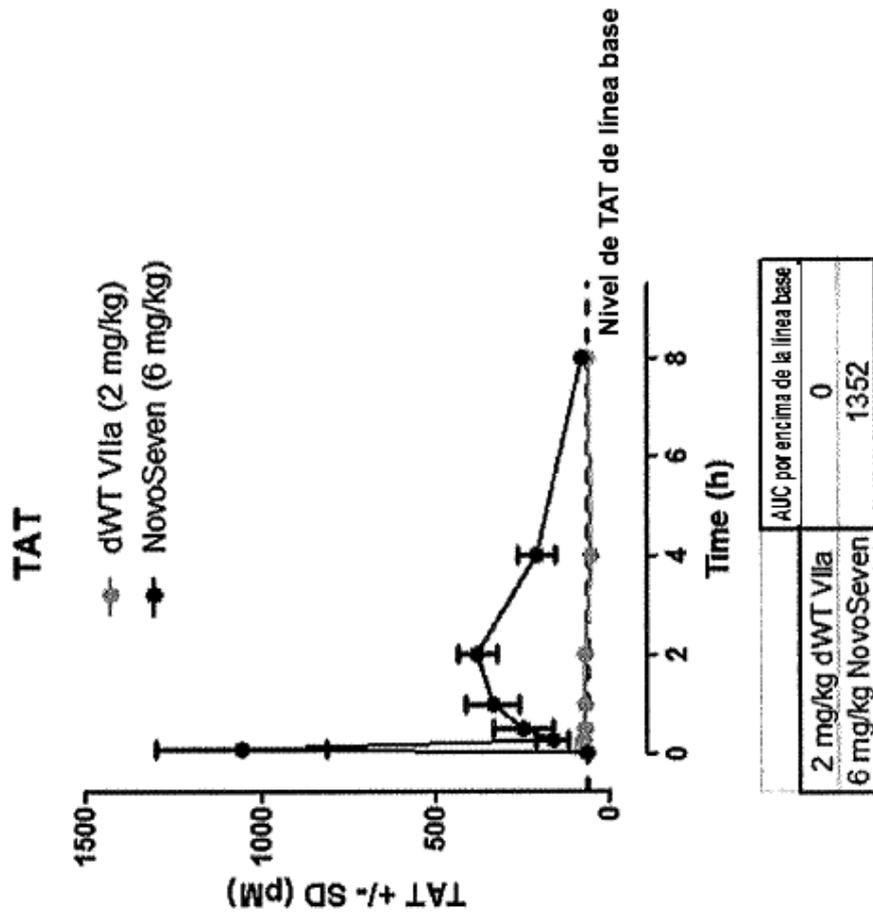


Figura 24

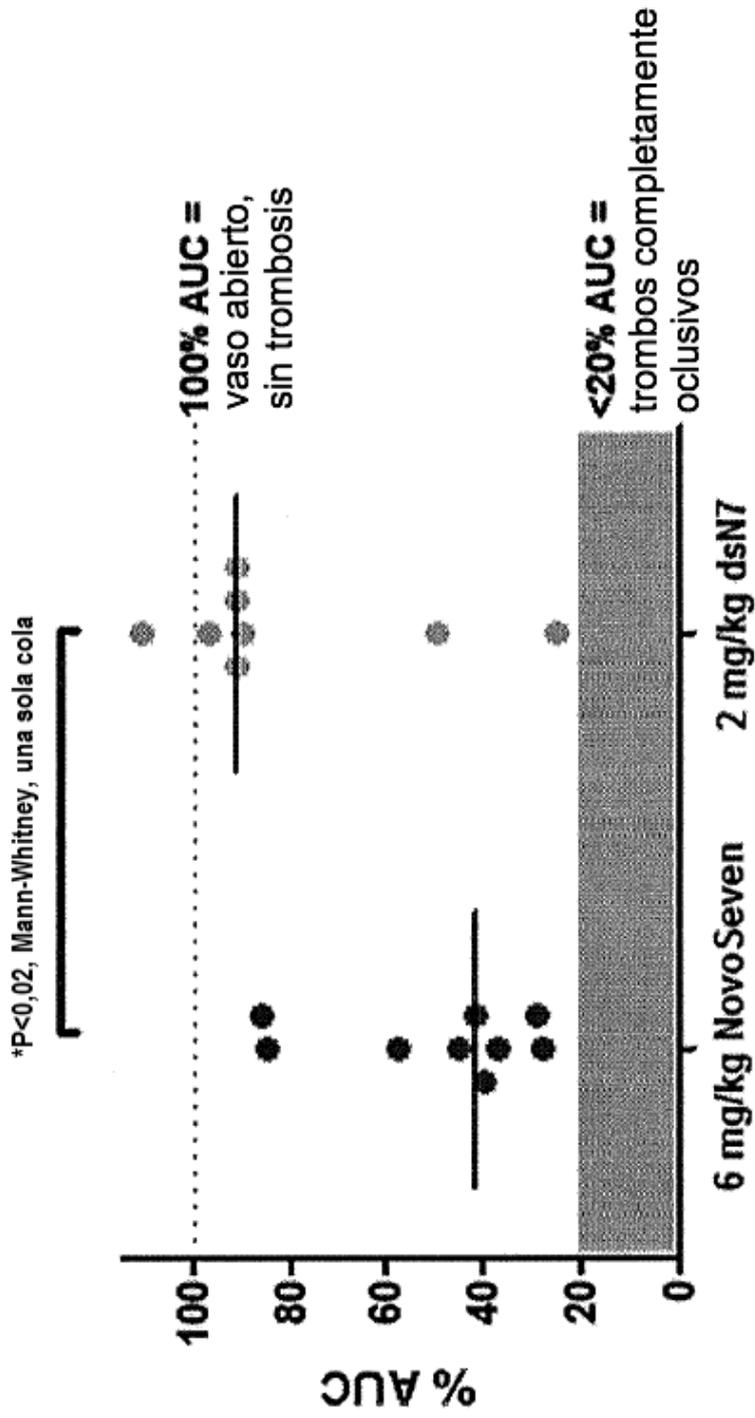


Figura 25

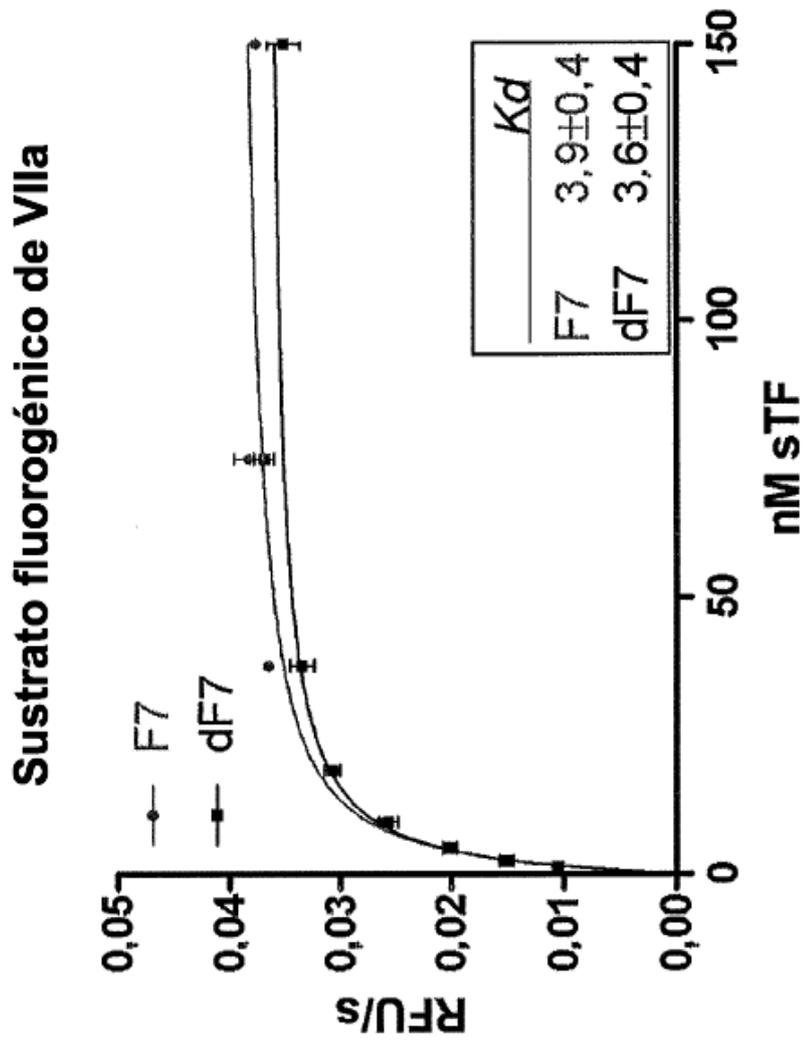


Figura 26

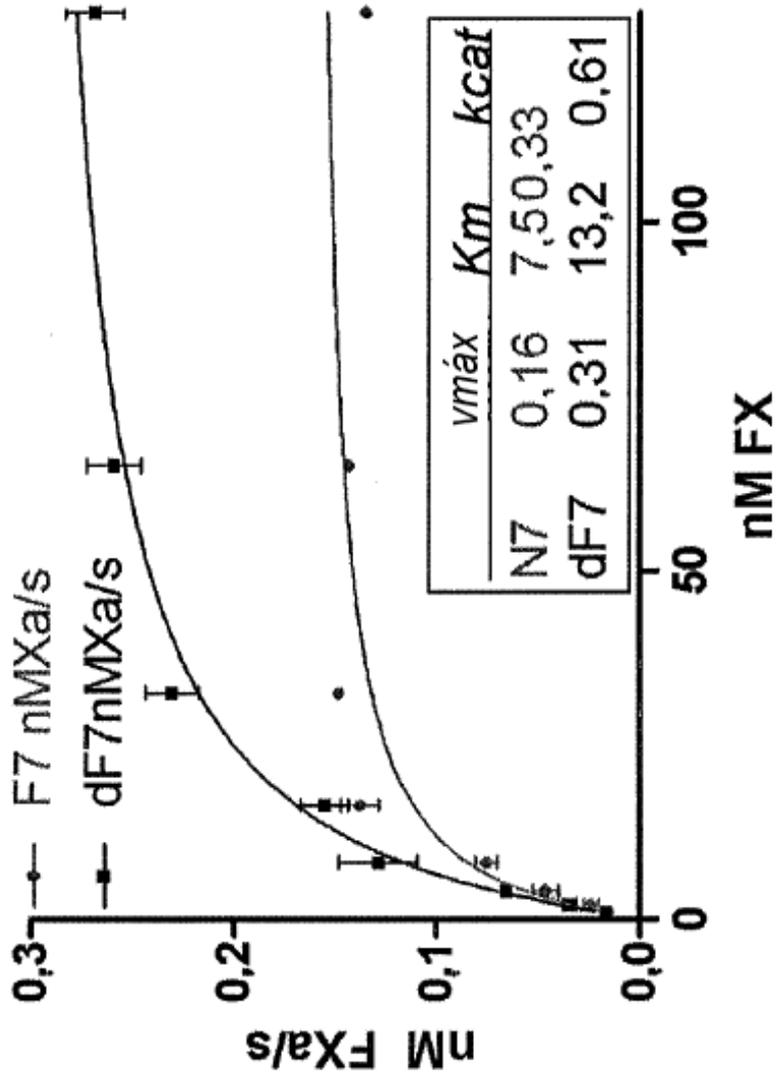


Figura 27