

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 726**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2013 E 16196780 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3165232**

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

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:

11.03.2020

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 2 747 726 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 acción corta

Campo de la divulgación

5 Se proporcionan en el presente documento variantes del Factor VII de la coagulación humana, procedimientos para obtener dichas variantes, procedimientos para usar dichas variantes, composiciones de las variantes.

Antecedentes

10 La coagulación sanguínea es un proceso que consiste en una compleja interacción entre diversos componentes (o factores) sanguíneos que, en última instancia, dan lugar a un coágulo de fibrina. En general, los componentes sanguíneos, que participan en lo que se ha denominado como "cascada" de coagulación, son proteínas enzimáticamente inactivas (proenzimas o zimógenos) que se convierten en enzimas proteolíticas mediante la acción de un activador (que en sí mismo es un factor de coagulación activado). Los factores de coagulación que se han sometido a dicha 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).

15 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 un 1 % de la masa proteica total del Factor VII. Este complejo está anclado a la célula portadora del 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 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 esta etapa inicial de hemostasia también activa las plaquetas. Después de la acción de la trombina sobre las plaquetas, las plaquetas cambian de forma y exponen fosfolípidos cargados en su superficie. Esta superficie de plaquetas activada forma la plantilla para una activación adicional 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 de Factor IXa y Factor VIIIa formado en la superficie de la plaqueta activada, y el Factor Xa luego convierte protrombina en trombina mientras aún está en la superficie. La trombina luego convierte fibrinógeno en fibrina, que es insoluble y que estabiliza el coágulo 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.

30 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 en la que circula como una glucoproteína 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 desveladas en las Figuras 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 normalmente entre los restos 152 y 153 para producir el Factor VIIa.

40 El Factor VII se convierte *in vitro* en la forma Factor VIIa de dos cadenas por el Factor Xa, el Factor XIIIa, el Factor IXa o la trombina. Al igual que otras proteínas plasmáticas implicadas en la hemostasia, el Factor VII depende de la vitamina K para su actividad, que se requiere para la gamma-carboxilación de múltiples restos de ácido glutámico que se agrupan cerca del extremo 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 del factor tisular, fosfolípidos e iones de calcio, el Factor VIIa de dos cadenas activa rápidamente el Factor X o el Factor IX mediante 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.

45 Se han publicado variantes del Factor VII que tienen una secuencia de aminoácidos procedente del Factor VII de tipo silvestre mediante sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, Dickinson y col. (Proc. Natl. Acad. Sci USA (1996) 93, 14379-14384) se refiere a variantes del Factor VII en las que Lys157, Val158, Glu296, Met298, Asp334, Ser336 o Lys227 se han reemplazado individualmente por Ala. Iwanaga y col. (Thromb. Haemost. (Suplemento de agosto de 1999), 466, resumen 1474) se refiere a variantes del Factor VIIa en las que se eliminan los restos 316-320 o se reemplazan los restos 311-322 con los restos correspondientes de la tripsina. La publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2008/0058255 A1 de Bolt y col., se refiere a variantes del Factor VII que tienen una sustitución que interrumpe la glucosilación en N145 o N322, o en N145 y N322. Toso y col. informó de una serie de estudios de estructura-función del Factor VII basados en mutaciones de origen natural. Las proteínas mutantes del Factor VII recombinante incluían T324M, E385K y dos proteínas mutantes del Factor VII que carecen de secuencias centrales de glucosilación en la cadena pesada del Factor VII (N322Q) o la cadena ligera del Factor VII (N145Q). Toso y col., "Lack of Heavy Chain Glycosylation in Patient with Factor VII Deficiency Not Responsible for Mutant FVIIa Activity", Blood, vol. 96, n.º 11, parte 2 (16 de noviembre de 2000), pág. 79b (42ª Reunión Anual de la Sociedad Americana de Hematología).

La mayoría de los péptidos y proteínas de origen natural contienen fracciones de carbohidratos unidos al péptido o

proteína a través de enlaces específicos a un número selecto de aminoácidos a lo largo de la longitud de la cadena primaria del péptido o proteína. Por lo tanto, muchos péptidos y proteínas de origen natural se denominan "glucopéptidos" o "glucoproteínas", respectivamente. La variabilidad del patrón de glucosilación en cualquier péptido o proteína dada puede afectar la función de ese péptido o proteína. Por ejemplo, la estructura de los polisacáridos 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 de 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 que el péptido o proteína se ha generado para ese fin.

La estructura de carbohidratos unida a la cadena de péptidos o proteínas se conoce como molécula de "polisacárido". La estructura específica de polisacárido presente en un péptido o proteína afecta las características de solubilidad y agregación del péptido o proteína, el plegamiento de la cadena primaria del péptido o proteína y, por lo tanto, su actividad funcional o enzimática, la resistencia del péptido o proteína a 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 restos terminales de ácido siálico presentes en la molécula de polisacárido afectan la duración de la semivida del péptido o proteína en el sistema circulatorio de los mamíferos. Los péptidos y proteínas cuyos polisacáridos no contienen restos terminales de ácido siálico generalmente se eliminan más rápidamente de la circulación por el hígado.

Las estructuras de polisacárido que se encuentran en los glucopéptidos y glucoproteínas de origen natural se dividen normalmente en dos clases, polisacáridos unidos a N y unidos a O. El Factor VIIa de tipo silvestre contiene dos sitios de glucosilación unidos a N y dos sitios unidos a O. La glucosilación unida a N es la modificación covalente más común en eucariotas. La glucosilación unida a N ocurre en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, en la que el polisacárido se une al grupo amina de la asparagina y X representa cualquier aminoácido excepto prolina. Los polisacáridos unidos a N se basan en el pentasacárido de núcleo común, $\text{Man}_3(\text{GlcNAc})_2$, que se puede modificar aún más mediante la adición de monosacáridos tales como N-acetilgalactosamina, 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 se puede unir mediante una N-acetilglucosamina al Asn en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr. Esta modificación co-traduccional químicamente compleja sirve para muchos fines y afecta la biología de la proteína de diversas maneras, incluyendo el plegamiento adecuado, la orientación funcional del grupo y las tasas de aclaramiento.

Se han propuesto una variedad de procedimientos en la materia para personalizar el patrón de glucosilación de un péptido o proteína, incluidos los descritos en la Patente de EE.UU. N.º 8.008.252 de DeFrees y col., aunque se sabe (véase Hrzscovics y col., *Glycoprotein biosynthesis in yeast*, 1993) que la expresión de proteínas recombinantes en levaduras da como resultado una glucosilación que es diferente a la que se encuentra en las células animales, particularmente las de mamíferos. En particular en la levadura, generalmente no se añaden fracciones de ácido siálico a las fracciones de glicosilo.

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; el 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 EE.UU. n.º 5.180.583 de Hedner desvela el uso del Factor VIIa para controlar la hemorragia excesiva en situaciones no causadas por defectos del factor de coagulación o inhibidores del factor de coagulación. Hedner desvela el tratamiento de trastornos hemorrágicos causados, por ejemplo, por una función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand, y composiciones para esos usos. Los documentos WO2004083361, US2009291890 y WO2005123916 también pertenecen a ese campo de esfuerzo.

Existe una 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. La hemorragia es un problema importante en muchos trastornos, tal como en relación con la cirugía, complicaciones después de la cirugía, trasplantes de células madre y órganos, hemorragia intracraneal, aneurisma aórtico y trauma, o sobredosis de ciertos anticoagulantes.

Breve resumen

Es un objeto tratar los trastornos y episodios hemorrágicos con polipéptidos del Factor VII de acción corta. Un objeto del presente trabajo es proporcionar composiciones de polipéptidos del Factor VII (tipo silvestre o variante) que son de acción corta, caracterizados por uno o más rasgos farmacocinéticos tales como una semivida acortada. Es un objeto proporcionar dicha molécula del Factor VII con una oportunidad reducida para eventos trombóticos fuera del

sitio diana y el marco de tiempo de tratamiento. Es un objeto proporcionar polipéptidos del Factor VII (tipo silvestre o variante) con aclaramiento mejorado debido a patrones de glucosilación alterados.

En el presente documento se describe una composición de variantes del polipéptido del Factor VII, en la que la variante del polipéptido del Factor VII comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una alteración de secuencia en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, en la que la relación de moles de ácido siálico conjugado a moles de polisacárido unido a N en la variante del polipéptido del Factor VII de la composición es inferior a 5,0. También se describe en el presente documento una composición de variantes del polipéptido del Factor VII en los que la variante del polipéptido del Factor VII comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una alteración de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, en la que la relación de moles de ácido siálico conjugado por mol de polisacárido unido a N está dentro de un intervalo seleccionado del grupo que consiste en (1) de 0 a 5; (2) de 0 a 4; (3) de 0 a 3; (4) de 0 a 2; (5) de 0 a 1 y (6) de 0 a 0,5.

También se describe en el presente documento una variante aislada del polipéptido del Factor VII que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una alteración de secuencia en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16, en la que el polipéptido tiene una relación de moles de ácido siálico conjugado a moles de polipéptido unido a N inferior a 5,0.

También se describen en el presente documento polipéptidos del Factor VII que tienen una conjugación reducida de ácido siálico con el polipéptido del Factor VII. En determinadas realizaciones, la conjugación reducida de ácido de sílice se puede efectuar mediante el tratamiento del polipéptido con una enzima sialidasa. En otras realizaciones, la conjugación reducida de ácido siálico se puede efectuar mediante la producción de polipéptidos del Factor VII recombinantes en una línea celular que es parcial o completamente deficiente en la sialilación de péptidos. En realizaciones adicionales, la conjugación reducida de ácido siálico se puede efectuar mediante la coexpresión del 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 cantidad eficaz de un polipéptido del Factor VII que tiene una conjugación reducida de ácido siálico. En determinadas realizaciones, la relación de moles de ácido siálico conjugado a moles de polisacárido unido a N es inferior a 0,05. En realizaciones adicionales, la enfermedad o trastorno a tratar se selecciona del grupo que consiste en una hemorragia, hemorragia gastrointestinal, hemorragia no controlada, hemorragia en un mamífero sometido a trasplante o resección o cirugía, hemorragia varicosa, trombocitopenia, hemofilia, hemorragia intracraneal, aneurisma aórtico, y sobre la administración de un anticoagulante.

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

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1H muestran las secuencias de nucleótidos para tres moléculas de Factor VII utilizadas en la presente solicitud. "VI" es una variante del Factor VII humano que tiene cuatro mutaciones de aminoácidos en 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 humana 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 diversas construcciones usadas en los ejemplos.

La Figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos para tres moléculas del Factor VII utilizadas en la presente solicitud. El Factor VII humano de tipo silvestre, 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.

La Figura 3 es un esquema que representa tres moléculas del Factor VII utilizadas en los ejemplos de la presente solicitud. Se muestra la unión de los polisacáridos en los sitios de N-glucosilación. Para la representación de los polisacáridos, un cuadrado negro representa N-acetilglucosamina, un óvalo sombreado representa manosa, un óvalo blanco representa galactosa, un diamante oscuro representa ácido siálico (también conocido como ácido N-acetilneuramínico) y un triángulo negro representa fucosa. La estructura del polisacárido es una representación que utiliza una posible variante de un polisacárido y no representa un polisacárido medido real.

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

La Figura 5 es un esquema que representa dos enfoques utilizados en la presente divulgación 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 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 desialilada para el contenido de ácido siálico.

La Figura 9 muestra los resultados de un ensayo de activación de fosfolípidos del 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 hipoglicosiladas.

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

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 desialilada en comparación con el Factor VII de tipo silvestre.

10 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 aclaramiento diferente para estas moléculas del utilizado por la V2 desialilada.

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

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

La Figura 18 muestra un estudio de eficacia de V2 desialilada en ratones Hema.

La Figura 19 muestra un estudio de eficacia de V2 desialilada en el modelo TVT en Hema.

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

20 La Figura 21 muestra un estudio de eficacia de V2 desialilada en ratones competentes para la coagulación.

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

25 La Figura 23 muestra los resultados del estudio de corte de cola en ratones genomanipulados por inserción del factor tisular humano (TFKI, de sus siglas en inglés) para dWT VIIa en comparación con el Factor VII de tipo silvestre. Se encontró 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 dWT VIIa o Factor VII de tipo silvestre

30 La Figura 25 muestra los resultados de un análisis de la formación de trombos en un modelo de trombosis con FeCl₃. La dosis dada de dWT VIIa 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 de dWT VIIa y Factor VII de tipo silvestre para el factor tisular soluble medido mediante un sustrato fluorogénico.

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

Descripción detallada

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

45 Para explicar el Factor VII y la glucosilación, se proporcionan las Figuras 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 un dominio catalítico y que contiene 2 polisacáridos 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-glucosilación 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.

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

55 Se proporcionan en el presente documento procedimientos para preparar un polipéptido del Factor VII que tiene una semivida corta deseada. Se proporcionan dos procedimientos generales para hacer 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, que utiliza un ejemplo de una variante del Factor VII, una variante de Factor VII glucosilada se puede procesar mediante desialilación o desglucosilación para alterar el patrón de glucosilación de la variante y, por lo tanto, alterar y, preferentemente, acortar, su semivida. Este procedimiento también se podría usar para desialilar un polipéptido del Factor VII de tipo silvestre.

La desialilación puede ocurrir mediante cualquier procedimiento conocido en la materia. Los ejemplos de procedimientos adecuados incluyen la desialilación enzimática por contacto con cualquier enzima conocida que funcione para desialilar, incluidas, sin limitación, sialidasas que incluyen 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 a moles de polisacárido unido a N en la composición de polipéptidos del Factor VII, luego se recomienda poner en contacto con una sialidasa por un período de tiempo limitado antes de que ocurra la desialilación completa. La desialilación parcial también puede obtenerse mediante el uso de una sialidasa modificada, poniendo en contacto el polipéptido del Factor VII con la sialidasa en condiciones que retrasen o deterioren el funcionamiento completo de la sialidasa, o mediante otros procedimientos aparentes 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 polisacárido 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 de ácido siálico. Determinadas líneas celulares se han modificado o pueden modificarse para reducir o eliminar la sialilación. Por ejemplo, las células Lec2 con origen de ovario de hámster chino ("CHO", de sus siglas en inglés) producen glucoproteínas con aproximadamente diez veces menos ácido siálico que la célula de tipo silvestre. Se cree que la desialilación de un polisacárido da como resultado una molécula que se puede eliminar activamente por los receptores hepáticos, incluido el receptor Asialoglucoproteína (ASGPR, de sus siglas en inglés) y, por esta razón, acorta la semivida.

El segundo enfoque es desglucosilar una variante del Factor VII y, de este modo, obtener una molécula con una semivida acortada. La reducción en la glucosilación mejora el aclaramiento del Factor VII a través del aclaramiento renal (corte de 50-60 Kd, rev. 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 y col., "Distribution of glycosaminoglycans in rat renal tubular epithelium," J Am Soc Nephrol. 1997;8(4):586-95, Choi HS y col., "Renal clearance of quantum dots," Nat Biotechnol. 2007;25(10):1165-70), la carga superficial y el cambio del punto isoeléctrico (pI) (que se han relacionado con el aumento de la circulación de glucoproteínas, véase la revisión en Byrne B. y col., "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 glucoproteínas de cualquier cantidad de proteasas plasmáticas (Ton G., y col., 2005, Nie Y y col., 2006).

La desglucosilación, 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 glucosilación unido a N. Por ejemplo, se puede producir una variante del Factor VII con una alteración que interrumpe la glucosilación en uno o más restos de aminoácidos requeridos para la secuencia consenso del polisacárido 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 glucosilación" 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 restos de aminoácidos y que da como resultado una pérdida de uno o más sitios para la glucosilación unida a N. Por ejemplo, los sitios de glucosilación unidos a N pueden eliminarse mediante el reemplazo de N145 y/o N322, ambos presentes en el Factor VII de tipo silvestre, con cualquier aminoácido (de origen natural o de origen no natural). Deben identificarse los sitios de glucosilación que tienen un efecto mínimo sobre la actividad cuando se alteran para interrumpir la glucosilación. En otro ejemplo, la desglucosilación 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 glucosilación. Por ejemplo, se espera que el Factor VII producido en las células bacterianas esté completamente no glucosilado porque las células bacterianas carecen de la maquinaria celular para la glucosilación. En otra realización, el polipéptido del Factor VII se produce en una línea celular que carece de enzimas terminales de glucosilación o que tiene dichas enzimas pero una o más tienen una actividad que es menor que la encontrada en la línea celular de tipo silvestre. Véanse, por ejemplo, Appa R. y col., 2010, Narita M y col., 1998, Seested y col., 2010. En otra realización, el polipéptido del Factor VII se produce en una línea celular que alberga un defecto en una enzima implicada en la síntesis o unión de un polisacárido al Factor VII o un defecto en una enzima implicada en la síntesis del transportador de ácido siálico-CMP. En otra realización, el polipéptido del Factor VII se trata con desglucosilasa o productos químicos para desglucosilar.

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

La Figura 6 es una tabla que muestra ejemplos de variantes hipoglucosiladas. Las variantes de glucosilación se realizaron en las estructuras principales del Factor VII de tipo silvestre (denominado en el presente documento "F7"), V1 y V2. Los sitios genomanipulados de N-polisacárido (N106, N253) en V1 y V2 se volvieron a su secuencia de tipo silvestre (T106, V253). Las variantes pMB113, pMB117 y pMB121 son construcciones del Factor VII de tipo silvestre,

V1 y V2 que contienen respectivamente los dos sitios de N-glucosilación endógena (N145, N322). Todas las otras variantes en la Figura 6 han tenido uno o ambos de sus sitios endógenos de N-polisacárido eliminados mediante la introducción de mutaciones N a Q (N145Q, N322Q). Este enfoque de desglucosilación da como resultado un aclaramiento más rápido.

5 En un aspecto de la presente divulgación, la desglucosilación 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 de glucosilación unidos a N adicionales más allá de los dos presentes en el Factor VII de tipo silvestre. Esta variante puede desialilarse usando uno de los procedimientos descritos en el presente documento. La molécula resultante puede retener la estructura de polisacárido en cada sitio de glucosilación
10 unido a N sin el ácido siálico terminal. En los experimentos informados en el presente documento, los solicitantes informan de dichas variantes que tienen un tiempo de eliminación más rápido que una variante desialilada del Factor VII que tenía menos sitios de glucosilación unidos a N. De manera similar, un polipéptido del Factor VII que tiene solo los dos sitios de glucosilación unidos a N encontrados en el Factor VII de tipo silvestre puede desglucosilarse en uno de estos sitios y luego someterse a desialilación. La variante del Factor VII resultante que tiene un polisacárido 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 glucosilación unido a N basado en la evidencia experimental presentada en el presente documento.

DEFINICIONES Y REALIZACIONES

20 A menos que se defina de otra manera, todos las expresiones técnicas y científicas utilizadas en el presente documento tienen, normalmente, el mismo significado que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la materia a la que pertenece la presente divulgación. En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de ácidos nucleicos y de hibridación son aquellos bien conocidos y habitualmente utilizados en la materia. Se utilizan técnicas estándar para la síntesis de ácidos nucleicos y polipéptidos. La nomenclatura utilizada en el presente
25 documento y los procedimientos de laboratorio en química analítica y síntesis orgánica descritos a continuación son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la materia. Se utilizan técnicas estándar, o modificaciones de las mismas, para síntesis químicas y análisis químicos. Los procedimientos utilizados para ingeniería genética son bien conocidos y se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.

30 La expresión "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)).

35 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan en el presente documento de forma indistinta y se refieren a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen a través de enlaces amida. Adicionalmente, aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homoarginina, también se incluyen. Los aminoácidos que no están codificados genéticamente también pueden utilizarse con la tecnología desvelada en el presente documento. Además, también se pueden usar aminoácidos que se han modificado para incluir grupos reactivos, sitios de glucosilación, polímeros, fracciones terapéuticas, biomoléculas y similares. Todos los aminoácidos utilizados en el presente
40 documento pueden ser isómeros D o L. Generalmente se prefiere el isómero L. Como se usa en el presente documento, "polipéptido" y "proteína" se refieren a polipéptidos y proteínas tanto glucosilados como no glucosilados, respectivamente.

45 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de un modo similar a los aminoácidos de origen natural. Son aminoácidos de origen natural aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. "Análogos de aminoácidos" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o las estructuras principales de los péptidos modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. "Miméticos de aminoácidos" se refiera a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de un modo similar a un aminoácido de origen natural.

55 El término "semivida" o " $t_{1/2}$ ", como se usa en el presente documento en el contexto de la administración de un fármaco polipeptídico o proteico a un paciente, se define como el tiempo requerido para que la concentración en plasma de un fármaco en un paciente se reduzca a la mitad.

60 La semivida se puede determinar en animales de prueba, por ejemplo, mediante la administración de una dosis de aproximadamente 25-250 microgramos/kg de la preparación; la obtención de muestras de plasma en tiempos predeterminados después de la administración; y la determinación del 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 determinados ejemplos, se usan modelos de rata o murinos para mediciones de la semivida. La biodisponibilidad relativa de un polipéptido del Factor VII o composición del mismo se refiere a la 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 comparador apropiado. Cualquier variante del Factor VII que tenga actividad de coagulación sanguínea del Factor VII es útil para los fines y procedimientos descritos en el presente documento. Las variantes del Factor VII como se usan en el presente documento son polipéptidos. Las expresiones "variantes del polipéptido del Factor VII" y "variantes del Factor VII" se usan indistintamente en el presente documento. En una realización, las variantes del Factor VII tienen una secuencia de aminoácidos procedente del Factor VII de tipo silvestre (SEQ ID NO: 16) mediante sustitución de uno o más aminoácidos. Al designar sustituciones de aminoácidos, la primera letra representa el aminoácido presente en el Factor VII humano de tipo silvestre en una posición. El siguiente número representa la posición en el Factor FVII humano de tipo silvestre. La segunda letra representa el aminoácido que reemplaza al aminoácido que se encuentra en el tipo silvestre. Por ejemplo, "P10Q" representa una sustitución de una glutamina (Q) por una prolina (P) en la posición de aminoácido 10.

En determinados ejemplos, la variante del Factor VII comprende al menos una sustitución de aminoácidos que es V253N. Se pueden seleccionar sustituciones adicionales del grupo que consiste en P10Q, K32E, R36E, A34E y T106N. En otros ejemplos, la variante del Factor VII comprende al menos 2, 3, 4, 5 o 6 de estas sustituciones. En un ejemplo particular, la variante del Factor VII comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos seis alteraciones de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, en la que las al menos seis o las seis alteraciones de secuencia son (1) un resto de glutamina sustituido por el resto de prolina en la posición 10, (2) un resto de ácido glutámico sustituido por el resto de lisina en la posición 32, (3) un resto de ácido glutámico sustituido por el resto de arginina en la posición 36, (4) un resto de ácido glutámico sustituido por el resto de alanina en la posición 34, (5) un resto de asparagina sustituido por el resto de treonina en la posición 106 y (6) un resto de asparagina sustituido por el resto de valina en la posición 253. En otro ejemplo particular, la variante del Factor VII comprende solo estas seis alteraciones. Se encuentran más detalles sobre estas variantes en los documentos WO 200158935 y WO2004111242 de Maxygen, y en la patente de EE.UU. n.º 7.371.543 de Pedersen y col., los cuales se incorporan por referencia en su totalidad en el presente documento.

Las variantes del Factor VII descritas en el presente documento pueden diseñarse utilizando cualquier polipéptido del Factor VII funcional como un polipéptido de inicio. En determinadas realizaciones, el polipéptido del Factor VII es un polipéptido del Factor VII humano. En realizaciones adicionales, el polipéptido del Factor VII es el polipéptido del Factor VII humano de la SEQ ID NO: 16, o una forma modificada o una variante alélica del mismo. Los polipéptidos de inicio útiles también incluyen polipéptidos del Factor VII modificados o variantes que comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 % o 66 % idéntica a la secuencia del Factor VII humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 16) que también posee actividad del Factor VII. Además, en determinados ejemplos, las variantes del polipéptido del Factor VII de la presente divulgación incluyen cualquier polipéptido con al menos aproximadamente un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 % o 66 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 16 que posee la funcionalidad del Factor VII y que también contiene una o más de las alteraciones de aminoácidos discutidas en el presente documento en relación con la SEQ ID NO: 16. En otra realización, el polipéptido del Factor VII comprende una secuencia de aminoácidos que tiene más de un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, o 66 % de homología con la SEQ ID NO: 16 y tiene la actividad del Factor VII, y que también tiene una o más de las alteraciones de aminoácidos a las que se hace referencia en el presente documento, entre ellas al menos una alteración V253N.

Las variantes del Factor VII como se usan en el presente documento también incluyen variantes de glucosilación del Factor VII de tipo silvestre. Por ejemplo, una variante del Factor VII de tipo silvestre parcialmente desialilada y composiciones de la misma pueden ser útiles porque tiene una semivida más corta que el Factor VII de tipo silvestre. También son útiles en el presente documento formulaciones farmacéuticas del Factor VII de tipo silvestre parcial o completamente desialilado y su uso de dichos polipéptidos y formulaciones en el tratamiento de las enfermedades mencionadas en el presente documento que se benefician de un polipéptido de acción corta que tiene actividad del Factor VII. La desialilación parcial o completa se puede medir por la relación de moles de ácido siálico conjugado a moles de polisacárido unido a N en una composición de polipéptidos del Factor VII como se describe en el presente documento.

Los valores de porcentaje de identidad se calculan sobre la región de secuencia de aminoácidos completa. Una serie de programas basados en una diversidad de algoritmos están disponibles para los trabajadores expertos para comparar diferentes secuencias. En al menos una realización, se determina el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos utilizando el algoritmo Needleman y Wunsch (Needleman 1970, J. Mol. Biol. (48):444-453) que se ha incorporado en el programa needle en el paquete del programa informático EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice, P., Longden, I., y Bleasby, A, Trends in Genetics 16(6), 276-277, 2000), que utiliza una matriz de puntuación BLOSUM 45 o PAM250 para proteínas relacionadas lejanamente o una matriz de puntuación BLOSUM 62 o PAM160 para proteínas relacionadas más cercanas y una penalización por

abertura de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una penalización por extensión de hueco de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Se pueden encontrar guías para la instalación local del paquete EMBOSS así como enlaces a los servicios WEB en emboss.sourceforge.net. Un ejemplo no limitante de parámetros a utilizar para alinear dos secuencias de aminoácidos que utilizan el programa needle son los parámetros por defecto, incluyendo la matriz de puntuación EBLOSUM62, una penalización por apertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,5. En otra realización más, se determina el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos utilizando el programa needle en el paquete del programa informático EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice, P., Longden, I., y Bleasby, A, Trends in Genetics 16(6), 276-277, 2000) utilizando la matriz de puntuación EDNAFULL con una penalización por apertura de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una penalización por extensión de hueco de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Un ejemplo no limitante de parámetros a utilizar para alinear dos secuencias de aminoácidos que utilizan el programa needle son los parámetros por defecto, incluyendo la matriz de puntuación EDNAFULL, una penalización por apertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,5. Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas pueden además utilizarse como "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda basada en datos públicos para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Se pueden realizar dichas búsquedas utilizando la serie de programas BLAST (versión 2.2) de Altschul y col. (Altschul 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10). Se puede realizar BLAST utilizando secuencias de ácido nucleico de la presente divulgación como secuencia de consulta con el programa BLASTn, BLASTx o tBLASTx que utiliza parámetros por defecto para obtener secuencias de nucleótidos (BLASTn, tBLASTx) o secuencias de aminoácidos (BLASTx) homólogas a secuencias codificadas mediante las secuencias de ácido nucleico de la presente divulgación. Se puede realizar BLAST utilizando secuencias de proteínas codificadas mediante las secuencias de ácido nucleico de la presente divulgación como secuencia de consulta con el programa BLASTp o tBLASTn que utiliza parámetros por defecto para obtener secuencias de aminoácidos (BLASTp) o secuencias de ácido nucleico (tBLASTn) homólogas a secuencias de la presente divulgación. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, puede utilizarse el Gapped BLAST que utiliza parámetros por defecto como se describe en Altschul y col., 1997, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos del Factor VII se producen de forma recombinante en una célula, tejido u organismo. En determinadas realizaciones, dicha producción recombinante se lleva a cabo mediante la transformación o transfección de una célula huésped con una molécula de ácido nucleico que codifica la variante de polipéptido o un vector que contiene dicho ácido nucleico. Numerosos procedimientos de transformación y transfección son bien conocidos en la materia y los expertos en la materia podrían seleccionar fácilmente un procedimiento apropiado para su aplicación deseada.

Dicha producción recombinante se puede lograr usando células de mamífero. Ejemplos de líneas celulares de mamífero adecuadas son las líneas celulares COS-1 (ATCC CRL 1650), de riñón de cría de hámster (BHK, de sus siglas en inglés), HEK293 (ATCC CRL 1573; Graham y col., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977), 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 Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852, con el número de referencia ATCC CRL 10314. También está disponible una línea celular tk⁻ ts13 BHK de la ATCC con el número de referencia CRL 1632. Además, se puede utilizar un número de otras líneas celulares en la presente divulgación, 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), de 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 y col. Cell 33: 405-412, 1983).

Las composiciones de polipéptidos del Factor VII son útiles en las que los polipéptidos del Factor VII se definen como en el presente documento y la relación de moles de ácido siálico conjugado por mol de polisacárido unido a N en la composición es inferior a 0,05, inferior a 0,1, inferior a 1,0, inferior a 2,0, inferior a 3,0, inferior a 4,0, inferior a 5,0 o composiciones en las que la relación de moles de ácido siálico conjugado por mol de polisacárido unido a N está dentro de un intervalo seleccionado del grupo que consiste en (1) de 0 a 5; (2) de 0 a 4; (3) de 0 a 3; (4) de 0 a 2; (5) de 0 a 1 y (6) de 0 a 0,5, o proporciones de 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, 2 a 4, 2 a 3, 3 a 8, 3 a 7, 3 a 6, 3 a 5, 3 a 4, 4 a 8, 4 a 7, 4 a 6, 4 a 5 y 0,1 a 1. La relación es una medida de los moles de ácido siálico unidos a una glucoproteína en relación con el número de polisacáridos en la glucoproteína. El número de polisacáridos se refiere al número de fracciones de azúcar unidas a un polisacárido unido a N en la glucoproteína, en las que un sitio de glucosilación unido a N puede soportar solo un polisacárido como se define en el presente documento para fines de esta relación. La relación se determina usando un kit de marcaje de fluorescencia de ácido siálico como el vendido por Takara Bio Inc. (n.º de cat. 4400). Dicho kit de marcaje de fluorescencia de ácido siálico incluye una etapa para la liberación de ácido siálico de la glucoproteína unida, tal como mediante hidrólisis parcial de ácido o mediante el uso de sialidasa, tal como sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens*. Los ácidos siálicos libres se marcan luego con un fluoróforo tal como 1,2-diamino-4,5-metilenoexibenceno ("DMB"). Los ácidos siálicos marcados se miden luego 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 polisacárido liberado de todos los polipéptidos del Factor VII de la composición.

En una serie de realizaciones, las composiciones de polipéptidos del Factor VII o los polipéptidos aislados tienen una

semivida medida en plasma humano o de mamífero, por ejemplo plasma murino o de rata, de menos de 2 horas, menos de 1,5 horas, de menos de 1 hora, de menos de ,75 horas, de menos de ,5 horas, de menos de ,25 horas, de menos de 0,1 horas o tan corta que no pueda medirse razonablemente.

5 Como se usa en el presente documento, la actividad del Factor VII es una actividad biológica que puede cuantificarse mediante la medición de la capacidad de una preparación para promover la coagulación de la sangre usando plasma y tromboplastina deficientes en Factor VII, como es bien sabido en la materia. En determinados ejemplos, un polipéptido del Factor VII que tiene actividad del Factor VII muestra al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de la actividad del Factor VII de tipo silvestre, medida en las mismas condiciones.

10 También son útiles las formulaciones farmacéuticas de los polipéptidos del Factor VII y composiciones de las mismas que comprenden el polipéptido del Factor VII y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinados ejemplos, las formulaciones farmacéuticas son para administración parenteral, tal como administración intravenosa, subcutánea o intramuscular y la dosificación puede ser como única dosis en bolo, dosificación intermitente o como infusión intravenosa continua. También son útiles formulaciones tópicas. Una realización comprende una
 15 formulación farmacéutica que comprende un polipéptido del Factor VII aislado como se describe en el presente documento, o que comprende una composición de polipéptidos del Factor VII como se describe en el presente documento, en una preparación liofilizada que se reconstituye en el momento que se utiliza. Como alternativa, la formulación farmacéutica puede ser una formulación líquida estable lista para utilizar que no requiere reconstitución. La formulación farmacéutica puede ser un polvo liofilizado en viales de un solo uso de 1, 2, 5 u 8 mg de polipéptido
 20 del Factor VII. Después de la reconstitución con un volumen específico de líquido, como agua estéril que contiene histidina, la solución final puede contener cualquier cantidad adecuada de polipéptido del Factor VII que produzca un efecto terapéutico, tal como, sin limitación, 1 mg/ml (1000 microgramos/ml), 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 1-2 mg/ml, 1-3 mg/ml, 1-5 mg/ml, 1-10 mg/ml, 0,5-1 mg/ml o 0,5-2 mg/ml de polipéptido del Factor VII. Las personas expertas en la materia pueden determinar fácilmente la dosis adecuada para la administración a un paciente basándose en, por ejemplo, el peso del paciente, el tipo de trastorno hemorrágico o episodio que se está tratando, y la actividad del polipéptido del Factor VII particular que se está empleando. En determinados ejemplos, la dosificación puede estar en el intervalo de 70-110 microgramos/kg, 70-90 microgramos/kg u 80-100 microgramos/kg y puede ser 90 microgramos/kg. El polvo liofilizado puede reconstituirse con un vehículo acuoso, tal como agua, agua tamponada, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 %, etc. Los procedimientos reales para la preparación de composiciones
 30 administrables vía parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen en más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1990). La aplicación tópica, como puede ser aconsejable en caso de traumatismo, puede llevarse a cabo mediante un pulverizador, perfusión, catéteres, endoprótesis, injertos o endoprótesis vasculares, pomada u otras preparaciones conocidas en la materia. En determinados ejemplos, la administración tópica puede ser a través de una matriz sólida o semisólida, tal como una esponja quirúrgica o matriz de colágeno, que se han tratado con, infundidas con, revestidas con o empapadas en una composición que comprende la variante del Factor VII. Los procedimientos de preparación de dichas matrices son bien conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Thrombosis/Hemostasis 12:445, 2006) y el experto en la materia podría determinar fácilmente una dosis apropiada y un procedimiento de aplicación de la composición sobre la matriz dada.

40 Las composiciones de los polipéptidos del Factor VII descritos en el presente documento también son útiles. El Factor VII existe en mezcla con sus productos de degradación naturales. Por consiguiente, una composición de polipéptidos del Factor VII incluye polipéptidos que tienen una de las secuencias de aminoácidos completas como se menciona en el presente documento y productos de degradación que tienen secuencias de aminoácidos parciales de las descritas en el presente documento. Además, debido a que el Factor VII es una glucoproteína, se puede esperar que las
 45 composiciones del Factor VII contengan una mezcla heterogénea de polipéptidos del Factor VII en la que cada glucoproteína en la composición no tiene exactamente la misma glucosilación que las otras. La referencia a composiciones de polipéptidos del Factor VII o polipéptidos del Factor VII aislados pretende abarcar mezclas de dichos polipéptidos en las que los polipéptidos individuales tienen diferente glucosilación y, por lo tanto, los términos "composición" o "polipéptido del Factor VII aislado" abarcan una heterogeneidad de los patrones de glucosilación
 50 dentro de los polipéptidos.

Los polipéptidos y composiciones 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 en el presente documento son útiles para
 55 penetrar una lesión traumática; lesión traumática contundente; hemorragia en cirugía electiva; hemorragia en cirugía cardíaca; hemorragia en cirugía de columna; cirugía ortopédica; neurocirugía; cirugía oncológica; cirugía post-pasto; menorragia; hemorragia en trasplante de células madre; hemorragia en trasplante de hígado; hemorragia gastrointestinal; hemorragia por varices activas en cirrosis; hemorragia no por varices en cirrosis; hemorragia alveolar difusa; aneurisma aórtica; hemorragia intracerebral; lesión cerebral traumática; contusión cerebral; inversión de warfarina; inversión de heparina; inversión de anticoagulantes; inversión de antitrombóticos; deficiencia en el Factor VII; quemaduras; profilaxis en pacientes con hemofilia con inhibidores; hepactetomía parcial para pacientes no cirróticos y cirróticos; hemofilia adquirida; púrpura idiopática trombocitopénica; trombostenia de Glanzmann; trombostenia de Glanzmann refractaria a la transfusión de plaquetas y síndrome de Bernard-Soulier.

También se desvela en el presente documento 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 temporal 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 la que la actividad o cantidad del factor de coagulación sanguínea se determina usando un ensayo ELISA sandwich de doble anticuerpo. El procedimiento puede repetirse en diferentes puntos temporales para desarrollar una gráfica de actividad o cantidad de factor de coagulación sanguínea a lo largo del tiempo.

Ejemplos

10 Procedimientos para obtener polipéptidos del Factor VII desialilados

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

15 El ácido siálico endógeno se sintetiza en células de mamíferos que implican una ruta compleja que consta de 32 enzimas (Wickramasinghe y Medrano 2011). La biosíntesis de ácido siálico comienza en el citosol convirtiendo UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) en Neu5Ac que implica varias enzimas, tales como UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa/N-acetilmanosamina cinasa (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). El CMP-Neu5Ac sintetizado 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 se cataliza por la enzima CMP-NeuAc-hidroxilasa (CMAH). Después, CMP-Neu5Ac y CMP-Neu5Gc se transportan al compartimento de Golgi a través de un transportador de membrana hidrófobo tipo 3, transportador de ácido siálico-CMP (SLC35A1), ubicado en la membrana de la mediana trans-Golgi. El transportador de ácido siálico-CMP es un elemento clave en la ruta de sialilación celular (Hirschberg, y col. 1998). Una mutación homocigota de este gen causa letalidad posnatal en el ratón (MGI 4.32, HomoloGene). En seres 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 glucosilación en seres humanos que conducen a defectos en el desarrollo del sistema nervioso, la coagulación y la inmunodeficiencia (Martínez-Duncker, y col., 2005). Una vez que CMP-Neu5Ac/CMP-Neu5Gc se transporta al aparato de Golgi, se conjugan con carbohidratos, glucoproteínas y glucolípidos mediante enzimas de la familia de la sialiltransferasa (ST) con 20 miembros.

El transportador de ácido siálico-CMP (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 gen de eliminación del gen transportador de ácido siálico-CMP. Como alternativa, 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 cortas en pacientes.

40 La célula Lec2 con origen en ovario de hámster chino (CHO) se identificó con la propiedad de producir aproximadamente 10 veces menos ácido siálico en glucoproteínas y glucolípidos que las respectivas células de tipo silvestre (Stanley y Siminovich, 1977, Stanley, 1980 y 1983). Un estudio posterior mostró que los mutantes Lec2 no pudieron traslocar el ácido siálico-CMP a través de las membranas de las vesículas de Golgi en un ensayo *in vitro*, mientras que la traslocación de otros derivados de nucleótidos fue comparativamente normal en las células mutantes (Deutscher, y col., 1984). Mediante el uso de la clonación de expresión, se informó el gen que codifica el transportador de ácido siálico-CMP de células Lec2 (Eckhardt y col., 1996). Una investigación adicional indicó que la eliminación de los nucleótidos 575-751 en el gen transportador de ácido siálico-CMP fue responsable del fenotipo Lec2 (Eckhardt, et y col., 1998). Otras mutaciones en el gen transportador de ácido siálico-CMP, como en el caso de las células 1E3, 6B2, 8G8 y 9D3, también conducen al fenotipo Lec2 (Eckhardt, y col., 1998).

50 Experimento 1

Este experimento está diseñado para determinar si la mutación en el gen del transportador de ácido siálico-CMP, 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.

55 (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 del Factor VII variante (por ejemplo, pMB117 y pMB121) se transfectan 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 a partir 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, de sus siglas en inglés) se analizan como se describe en el presente documento.

Experimento 2

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

Se pueden utilizar 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 eliminación del gen transportador de ácido siálico-CMP, o la eliminación de múltiples genes en la ruta de síntesis de ácido siálico.

- Se evalúa la línea celular de expresión del Factor VII con la eliminación de genes del transportador de ácido siálico-CMP para confirmar la eliminación del gen del transportador de ácido siálico-CMP. La línea celular confirmada se cultiva para producir Factor VII. El Factor VII de la línea celular con gen suprimido del transportador de ácido siálico-CMP 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.

25 *Producción del Factor VII desialilado mediante coexpresión del Factor VII y una sialidasa bacteriana*

- Para generar una forma desialilada del FVII, se coexpresa el FVII junto con una variante de sialidasa bacteriana procedente de la sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (AU sialidasa) (N-acetilneuraminato glucohidrolasa, EC 3.2.1.18). El FVII de expresión estable en células CHO (por ejemplo, SEQ ID NO 16 con mutaciones P10Q, K32E, A34E y R36E) se transfectó adicionalmente con AU sialidasa usando un vector de expresión pJ608. La proteína expresada tiene una secuencia señal de hormona de crecimiento en el extremo 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 de Western, utilizando anticuerpos específicos de FVII como sonda. Usando un ensayo de transferencia de lectina, no se pudo detectar ácido siálico en la proteína FVII en los medios de la condición, usando FVII purificado. Por el contrario, niveles similares de FVII purificado procedente de células no transfectadas con sialidasa mostraron una fuerte señal de unión a lectina. Tomados en conjunto, los datos muestran que la AU sialidasa se expresó en el medio celular CHO a niveles suficientes para desialilar eficazmente el FVII que fue coexpresado por las células.

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

- Los siguientes materiales de partida se utilizaron en esta prueba experimental:

Factor VII: 20 mg de Factor VIIa de tipo silvestre, concentración de aproximadamente 1 mg/ml

Sialidasa: 20µg, 0,25 mg/ml, 50000U/ml, P0720L, comprado en 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

- 45 Tampón de formulación del FVIIa: 2,3 mg/ml de cloruro sódico, 1,5 mg/ml de cloruro cálcico deshidratado, 1,3 mg/ml de glicilglicina, 0,1 g/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 de 5 ml HiTrap Q Sepharose HP

Con estos materiales, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- 50 1. A 20 mg de FVIIa (aproximadamente 1 mg/ml), añadir 20 µg de sialidasa (0,25 mg/ml, relación de masa 1:1000) de sialidasa
2. Incubar la reacción a temperatura ambiente durante la noche (aproximadamente 19 horas) antes de purificar cromatográficamente el FVIIa desialilado como se describe a continuación.
3. Purificar el FVIIa desialilado en una columna HiTrapQ Sepharose HP de 5 ml de la siguiente manera:
- 55 a) Equilibrar la columna Q-Sepharose con 5 VC 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.

c) Cargar a un caudal de 2,5 ml/min usando un sistema AKTA Explorer mientras monitorea A280. Recoger el flujo a través de la fracción.

d) Después de completar la carga, lavar la columna con 10 VC de tampón A.

5 e) Eluir la columna con 20 VC de 0-50 % de tampón B (histidina 25 mM, NaCl 1 M, pH 6,4) en 40 min. Recoger las fracciones máximas (NovoSeven desialilado)

f) Dializar las fracciones máximas frente al tampón de formulación del FVIIa a 4 °C durante la noche

g) Congelar la muestra a -80 °C en alícuotas.

10 El producto demostró ser 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 LC-MS de la cadena pesada no mostró una alteración significativa de la estructura del polisacárido que no sea la eliminación del ácido siálico.

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

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

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 de filtro-proteína.

20 La V2 se intercambió con el tampón de su tampón de formulación V2 (que contiene histidina, CaCl₂, trehalosa, metionina y niveles traza de Tween®-20, a un pH de 6,4 a 6,6) en un tampón MES (que contiene MES 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, pH 6,0, filtrado estéril). Esto se logró de tres maneras. En la primera opción, V2 se intercambió en 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 la V2 en la columna y se eluyó con 1,5 veces el volumen de carga del tampón MES. En la segunda opción, V2 se intercambió con tampón mediante diálisis durante la noche en tampón MES. Los casetes de diálisis se empaparon previamente en tampón MES y la V2 se cargó con una jeringa en los casetes Slide-a-Lyzer de 3.500 MWCO (Thermo Scientific, 66130), durante la noche a 4 °C en jarras de 10 litros con tampón MES filtrado estéril. En la tercera opción, V2 se intercambió con 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.

30 La V2 intercambiada con 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 mediante centrifugación a 1000 rcf durante 3 minutos a 4 °C, y el líquido sobrenadante se separó con pipeta y se desechó. A las perlas lavadas, se añadió la V2 intercambiada con tampón y se mezcló suavemente mediante 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, esto se redujo 1:10, a 0,208 ml de perlas por mg de proteína. Posteriormente, la V2 desialilada se recuperó mediante centrifugación y se separó con pipeteo. Las perlas se lavaron una vez suavemente durante 5 minutos mediante rotación en 1:1 en volumen de tampón MES nuevo; la mezcla de lavado se centrifugó como antes y el sobrenadante se combinó con la V2. Finalmente, las perlas se eliminaron mediante filtración estéril a través de un filtro de jeringa de 0,2 micras o mediante filtración al vacío a través de un filtro de 0,45 micras.

35 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 la V2 desialilada durante la noche a temperatura ambiente. La resina se eliminó mediante centrifugación y luego se filtró a través de una jeringa o un filtro de vacío.

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

50 La V2 desialilada se separó adicionalmente de las especies de mayor peso molecular (y endotoxina agregada) con una columna de exclusión de tamaño HiLoad 26/60 Superdex 200. La columna y el sistema purificador AKTA se desinfectaron previamente con NaOH 0,1 N + EtOH al 20 %. El sistema se neutralizó con pH, 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 muestras de 12 ml y se cargaron en una columna de exclusión por tamaño a un caudal de 3 ml/min; el eluido se recuperó y se fraccionó con un Frac-900 en tubos de poliestireno (17X100 mm, Fisherbrand, 14-956-6D). Al principio, se excluyeron los máximos 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 la V2 desialilada.

55 Se realizaron cinco lotes de exclusión por tamaño y los eluidos recogidos se agruparon en un lote que se concentró a 1,0 mg/ml en Ultracels. La preparación final se filtró 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.

Caracterización - Análisis de proteínas y ensayo *in vitro*

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

Análisis del contenido de ácido siálico

15 Se usó un procedimiento LC-MS para identificar el ácido siálico en el N-polisacárido 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 4000A, 0,3x150 mm, 75 °C. Sistemas de tampón: A: Agua con ácido fórmico al 0,2 % + TFA al 0,01 %; B: ACN con ácido fórmico al 0,2 % + TFA al 0,01 %. Gradiente: 50 µE/min, B al 10 % en 2 min, a B al 90 % en 25 min, lavado con B al 90 % 5 min, equilibrio con B al 10 % durante 5 min.

20 Sistema Agilent 6520 Q-TOF: Fuente DualEsi, temperatura del gas: 350 °C, gas de secado: 7psi, nebulizador: 10psi, Intervalo de barrido: 500-3000 uma, 1 espectro/s. Iones de referencia: 1221,990637 y 2421,91399 uma, ventana de 50 ppm, Min 1000 recuentos. Los resultados se informan en la Figura 7.

Cuantificación de ácido siálico usando el kit de marcaje DMB

25 El kit de marcaje de fluorescencia de ácido siálico (Takara Bio Inc., n.º de catalogo 4400) es para el análisis cuantitativo y altamente sensible de los sialoglucoconjugados. Esta técnica de marcaje de fluorescencia de ácido siálico basada en HPLC que usa 1,2-diamino-4,5-metileneoxibenceno (DMB) es un procedimiento cuantitativo simple y altamente sensible. En este procedimiento, los ácidos siálicos libres se analizan mediante HPLC de fase inversa (GlycosepR, de Glyko, n.º 1-4727) después de marcar con DMB.

Conclusión

30 La cadena pesada de V2 tiene dos sitios de N-glucosilación. Los N-polisacáridos son estructuras bi, tri y tetra-fucosiladas, 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-polisacárido del Factor VII.

Ensayo de semivida con hepatocitos de rata

Preparación de hepatocitos

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

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

Ensayo de aclaramiento *in vitro* de hepatocitos

45 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 + BSA al 0,25 %, en tubos Eppendorf con mezcla suave de extremo a extremo a 37 °C en un volumen inicial de 1,2 ml. En cada uno de los puntos temporales indicados, se eliminaron 0,25 ml de la mezcla y se centrifugó inmediatamente para sedimentar las células (1000 rpm, 3 minutos en una centrifuga Eppendorf). Se eliminaron 0,18 ml del sobrenadante aclarado, 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 temporal cero. Cada incubación se hizo por triplicado. Los valores de aclaramiento intrínseco se calcularon con base en el procedimiento de Lu y col. (Lu ref.) 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 ($T_{1/2}$) *in vitro* se calculó utilizando el programa WinNonLin

(Pharsight Corporation, Sunnyvale, CA). Los sobrenadantes de las incubaciones de hepatocitos se analizaron usando un formato ELISA sandwich de doble anticuerpo. Se añadieron 0,1 ml por pocillo de anticuerpo monoclonal antiFactor VII (1,0 µg/ml, en PBS) a placas de 96 pocillos Greiner Microlon 655061. 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 % (TrisHCl 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 añadieron a las placas muestras relevantes de Factor VII estándar y desconocidas. Se diluyeron 0,18 ml de cada sobrenadante de hepatocitos dos veces mediante la adición de 0,18 ml de tampón de dilución (TrisHCl 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 ELISA. Los patrones 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 patrón 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 describe anteriormente, y luego se añadió anticuerpo de detección biotinilado, 1 µg/ml en tampón de dilución (TrisHCl 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 describe anteriormente, y luego se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante, se diluyó 1/1000 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 (CellDirect), fueron de Invitrogen/life Technologies (Grand Island, NY). El sustrato de 1-Step Ultra-TMB (One Step), n.º de catálogo 34028, fue de Thermo Scientific (Rockford, IL). La estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP), n.º de catálogo DY998, fue de R&D Systems, Minneapolis, MN. La solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2 fue de Invitrogen (Carlsbad, CA). El plasma de rata Sprague-Dawley (anticoagulante de citrato de sodio al 5 %) fue de Bioreclamation (Westbury, NY). Las placas Greiner Microlon (n.º de catálogo 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-polisacáridos (N322 y N145), y V1 y V2 tienen cada una 4 N-polisacáridos (N106, N145, N253, N322). Los 2 N-polisacáridos 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-polisacárido endógeno (N145 y N322) se eliminaron luego a nivel de ADN mediante manipulación genómica en mutaciones N → Q en estos sitios. (Figura 6)

El Factor VII de tipo silvestre se clonó en pmCMV para hacer pMB113. Los insertos que contienen una sola mutación N a Q en las posiciones aa 145 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 luego en pMB113-116 usando AscI y AfeI y dieron como resultado las construcciones 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 procedente de CHO) se transfectaron transitoriamente mediante electroporación con cada construcción en un formato de 6 pocillos. 4 días después de la transfección, se recogió el sobrenadante y se analizó mediante transferencia de Western para la expresión, seguido de un ensayo de actividad de hFVII ELISA (AssayPro) y FVII. Un subconjunto de variantes se clonó luego en una sola célula. La variante 2-N-polisacárido de V2 denominada pMB121 se purificó y activó para su posterior análisis.

Procedimiento para la purificación/activación del FVIIa a partir de la expresión WAVE 10L

Sumario del procedimiento

La purificación y activación del FVII a partir de medios acondicionados concentrados diafiltrados se realizó usando un procedimiento de múltiples pasos 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. Una etapa de captura de pseudoafinidad que emplea una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharose) eluida con CaCl₂ se usa para concentrar aún más la proteína FVII y cambiar el tampón. A continuación, se usa una columna de hidroxapatita para purificar aún más la proteína FVII. Luego se usa una columna Q-Sepharose 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, glucoanálisis, endotoxina y ensayo de actividad del FVIIa.

ELISA del FVII

Inmunoensayo Zymutest ligado a enzimas del 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. Se introduce la muestra seguida de un anticuerpo policlonal anti-FVII de conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP, de sus siglas en inglés). Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, 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 recubierta con anti-FVII de conejo proporcionada 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 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. Se leyó la absorbancia a 450 nm. Los niveles del Factor VII se obtuvieron comparando los valores de la muestra con una curva de calibración de la 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. El FX, añadido 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 FXa. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, 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 la 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 Gla (P10Q/K32E) aumenta la potencia en la activación del FX, la generación de trombina y la coagulación de la sangre completa en presencia de fosfolípidos aniónicos o plaquetas activadas como resultado de la 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 FluCa, de Thrombinoscope, BV. Las vesículas de fosfolípidos (PL, de sus siglas en inglés) compuestas de fosfatidilserina (PS, de sus siglas en inglés) al 20 %, fosfatidiletanolamina (PE, de sus siglas en inglés) al 40 % y fosfatidilcolina (PC, de sus siglas en inglés) al 40 % eran de Avanti Polar Lipids y se prepararon mediante sonicación en NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,2) durante 10 minutos.

Se dispensaron veinte µl de vesículas de PL (500 µM) 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 mediante la adición de solución FluCa y las reacciones se monitorearon continuamente durante 60 minutos siguiendo el procedimiento de trombografía automatizada calibrada (CAT, de sus siglas en inglés) descrito por Thrombinoscope^{BV}. Los datos se obtuvieron y analizaron usando el programa informático 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 generada, el "potencial de trombina endógena" (ETP, de sus siglas en inglés) 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).

Ensayo de activación del FX dependiente de fosfolípidos

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

activación de FX de las muestras con una curva de calibración F7.

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

5 Las proteínas (F7, V2, V1, dV2 y dV1) se administraron por vía intravenosa a 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 FVII.

Estudio PK-HemA

Las proteínas (F7, dV1) se administraron i.v. a 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 FVII ensayo sTF-PT.

ELISA FVII en muestras de plasma

10 Materiales

15 Se usaron anticuerpos monoclonales contra FVIIa. Además, se biotiniló un anticuerpo monoclonal. Las variantes del 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, de sus siglas en inglés) 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 (n.º 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 en 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 de grado reactivo.

20 Procedimiento para el inmunoensayo de sándwich del FVIIa

25 Las placas de ensayo de 96 pocillos se recubren con 0,1 ml/pocillo de anticuerpo contra FVIIa, 1 µg/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 en plasma al 5 % en ADB y se incuban 0,1 ml/pocillo durante al menos 1,5 horas a temperatura ambiente con rotación. Todos los estándares, controles y muestras se miden en pocillos por triplicado. Después de lavar las placas como se describió previamente, se añade anticuerpo biotinilado contra FVIIa, 42 ng/ml en ADB, 0,1 ml/pocillo, y las placas se incuban durante al menos 1 hora a temperatura ambiente con rotación. Las placas se lavan, seguido de incubación con estreptavidina-HRP, 1:1000 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 DO-450 nm, y los datos se analizan y calibran. El límite inferior de cuantificación (LLOQ, de sus siglas en inglés) para el ensayo es normalmente 15-30 ng/ml de FVIIa en plasma al 100 %.

35 Ensayo de PT modificado basado en factor tisular soluble (sTF, de sus siglas en inglés) para medir la actividad del rFVIIa

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

40 En resumen, se mezclaron 50 µl de muestra que contenía 10 % de plasma de ratón HemA y 50 % de plasma humano deficiente en FVII (George King Inc) en tampón aPTT (NaCl 0,15 M, Tris 0,05 M pH 7,5, BSA al 0,1 %) con 50 µl de reactivo sTF-PT e se incubaron a 37 °C durante 30 segundos. El reactivo sTF-PT estaba compuesto por 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 CaCl₂ 25 mM y el tiempo de coagulación se registró en un analizador de coagulación STA (Diagnostica Stago Inc). Los patrones consistieron en rFVIIa (wt-rFVII o variantes modificadas de rFVIIa) diluidas 2 veces en serie de 200 a 0,78 ng/ml.

45 Eficacia de V2 desialilada en ratones con hemofilia A (HemA)

Estudio de eficacia aguda de corte de cola

50 Para determinar la pérdida de sangre, los ratones se anestesiaron con isoflurano y las colas se colocaron en calor a 37-38 °C con solución salina al 0,9 % en tubos de plástico de 15 ml durante 10 minutos. Se cortó la cola a 4 mm de la punta con el bisturí e inmediatamente se volvió a colocar en un tubo de plástico de 15 ml precalentado que contenía 10 ml de solución salina. Se permitió que el ratón sangrara libremente durante 40 minutos. F7 y V2 desialilada 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 la transección de la vena de la cola (TVT, de sus siglas en inglés)

Los ratones HemA se dosificaron con F7 y V2 desialilada mediante inyección en la vena de la cola 1 hora antes o 5 minutos después de la lesión de transección de la vena de la cola. Se usó anestesia apropiada. La vena de la cola se transectó con una hoja recta de bisturí n.º 11 y se inició un temporizador. Luego, el ratón regresó a su jaula limpia individual con un lecho de papel blanco (Versi-Dri™) colocado encima de una almohadilla térmica de 4X8 pulgadas. El estado de la actividad animal se controló cada hora durante las siguientes 9 horas y en el punto temporal de 24 horas. Cualquier ratón que mostró signos de nivel de actividad reducido se observó en el formulario 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

Reactivos:

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

Tampones

- (1) Tampón estándar de TAT: Tris-HCL 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM, heparina 0,05 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 muestra: añadir HEPES 0,1 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, BSA al 1 %, Tween20 al 0,05 %, filtrar y formar alícuotas, almacenar a -20 °C; (5) Tampón de sustrato: añadir 50 µl de Amplex Red 5 mg/ml, 20 µl de H2O2 al 3 % al tampón PBS. Mezclar, recién preparado antes de agregar a las placas; (6) Preparación de una solución madre patrón de TAT 1 µM: añadir 100 µl de AT-III humana a 1,36 mg/ml y 5,93 µl de trombina humana a 3,28 mg/ml a 419 µl de tampón TAT, mezclar, incubar 10-20 min a 37 °C; (7) Preparación de una solución madre patrón de TAT 60 nM: Añadir 50 µl de complejo TAT 1 µM a 783 µl de plasma deficiente en AT-III, mezclar. Alícuota de 50 µl/viales, almacenar a -80 °C.

Procedimiento de ensayo

1. Diluir AcP antitrombina (anticuerpo de captura) en tampón de bicarbonato (dilución 1:100: para una placa de 96 pocillos, añadir 110 µl de anticuerpo a 11 ml de tampón de bicarbonato).
2. Añadir 100 µl de anticuerpo de recubrimiento diluido a cada pocillo en una placa de 96 pocillos de 2HB Immulon. Golpear suavemente la placa para asegurar que todo el líquido cubre el fondo de la placa. Cerrar herméticamente 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 golpearlo contra una toalla de papel limpia.
4. Añadir 150 µl de tampón de bloqueo (BSA-PBS al 2 %) a cada pocillo. Cerrar herméticamente la placa e incubar 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 la placa y golpearlo contra una toalla de papel limpia.
6. Añadir 100 µl de muestra estándar y control de calidad 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 golpearlo contra una toalla de papel limpia.
8. Añadir 100 µl de anticuerpo de detección de HRP (1/100, Añadir 110 µl de anticuerpo a 11 ml de diluyente conjugado), a cada pocillo. Cerrar herméticamente 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 golpearlo contra una toalla de papel limpia.
10. Añadir 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 DO 485nm/595nm.
13. Trazar patrones con ajuste de curva de 4 parámetros; La concentración de los controles y de cada muestra se calcularon a partir del patrón en cada placa ELISA.

Eficacia de V2 desialilada en ratones competentes para la coagulación

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

gravimétricamente pesando tubos antes y después de recoger la sangre.

Resultados

Caracterización *in vitro* de proteínas desialiladas o desglucosiladas

5 La cadena pesada de dV2 se analizó mediante LC-TOF MS. El análisis mostró que los N-polisacáridos en la cadena pesada no contenían ácido siálico después del tratamiento con 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 el marcaje de fluorescencia de 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 desialilada para el contenido de ácido siálico. Se utilizaron el análisis LC-TOF MS y el marcaje fluorescente de 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 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. Las V1 y V2 desialiladas (dV1, dV2) se probaron para determinar la actividad usando el ensayo de activación de fosfolípidos FXa. 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. Mediante PL-TGA, dV2 y dV1 exhibieron una actividad ligeramente aumentada sobre sus moléculas parentales no modificadas. Los resultados se normalizaron a F7.

20 El ensayo PL-Xa mostró consistentemente un aumento medible en la actividad de dV2 y dV1 sobre sus moléculas parentales no modificadas. Las moléculas de wtFVIIa, V2 y V1 hipoglucosiladas se expresaron (Figura 11) y se analizaron como extractos de expresión brutos tanto para la expresión como para la actividad. La Figura 11 muestra la expresión de variantes del FVII hipoglucosiladas. Se analizaron muestras de medios 4 días después de la electroporación para determinar la expresión del FVII. El análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo anti-dominio de Gla muestra la expresión de las variantes. La eliminación de los sitios de N-polisacárido 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 del FVII hipoglucosiladas usando sobrenadantes de transfección. La actividad de los sobrenadantes brutos de expresión de dos transfecciones transitorias de las variantes hipoglucosiladas 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-polisacáridos. Como se esperaba en este ensayo, las proteínas V1 y F7 tuvieron actividades similares, mientras que las moléculas V2 tuvieron menor actividad, como resultado de su independencia del TF. Esto se demostró aún más por el ensayo de actividad PL-TGA llevado a cabo en V2 hipoglucosilada purificada con solo 2N-polisacáridos (N322 y N145) denominado pMB121. La Figura 13 muestra el ensayo PL-TGA en la variante hipoglucosilada purificada pMB121. Mediante el ensayo PL-TGA, pMB121 muestra una actividad mejorada sobre F7 similar a la V2 no modificada. El aclaramiento *in vitro* de estas moléculas se probó en un modelo de aclaramiento de hepatocitos. dV2 demostró un aclaramiento significativo en este modelo sobre el V2 no modificada (Figura 14), mientras que se observó un aumento marginal o nulo en el aclaramiento para las variantes hipoglucosiladas (Figura 15).

PK en ratas y PK en HemA

40 Los estudios farmacocinéticos en ratas Sprague Dawley demostraron que las proteínas desialiladas e hipoglucosiladas se eliminan significativamente más rápido que sus equivalentes no modificadas según lo medido por un ELISA FVII. La Figura 16 muestra los resultados farmacocinéticos en ratas. Las semividas de las V2 y V1 desialiladas fueron significativamente más cortas que sus moléculas parentales no modificadas en ratas Sprague Dawley, medidas mediante ELISA FVII. Esto fue cierto para V2 desialilada, V1 desialilada y pMB121 (V2 hipoglucosilada). 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. El aclaramiento de la molécula V2 hipoglucosilada pMB121 fue equivalente a la de F7 con una $t_{1/2}$ de 1,6 horas. El estudio PK en ratones HemA tuvo un resultado similar con dV2 y F7 con semividas de aproximadamente 3 min y 2,6 horas, 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 de PK en HemA. La semivida de la V2 desialilada fue significativamente más corta que su molécula parental no modificada en ratones HemA, medida por A) ELISA FVII y B) el ensayo sTF-PT.

Modelos de eficacia en HemA

55 Se evaluó la eficacia de dV2 en ratones HemA. Usando el modelo de corte de cola en 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 aclaró más rápidamente que la de F7 (Figura 18 (B)). La Figura 18 muestra los resultados del estudio de eficacia de V2 desialilada en ratones HemA. Los estudios con dV2 muestran que esta molécula es A) más eficaz que y B) tiene un aclaramiento de eficacia más rápido que F7 en el modelo de corte de cola en HemA.

Usando el modelo de TVT más sensible, también se demostró el aclaramiento de eficacia más rápido de dV2 sobre F7 y se confirmó la dosis eficaz. La Figura 19 muestra un estudio de eficacia de dV2 en el modelo TVT HemA. Los estudios de TVT que utilizan un modelo de eficacia (TVT) con mayor sensibilidad confirmaron que dV2 tiene un aclaramiento de eficacia más rápido 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 administrada a su dosis eficaz (1 mg/kg) generó menos trombina antitrombina (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 para la coagulación

10 La dV2 se probó en ratones tratados con tPA, competentes para la coagulación para determinar su eficacia. 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 desialilada en ratones tratados con tPA, competentes para la coagulación.

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

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

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

25 El aclaramiento de dWT VIIa y el Factor VII de tipo silvestre (1 mg/kg) también se analizaron y compararon usando el modelo de ratón en ratones genomanipulados por inserción del factor tisular humano (TFKI). Como se muestra en la Figura 22, la semivida de dWT VIIa fue significativamente más corta que la del Factor VII de tipo silvestre y el aclaramiento (ml/h/kg) fue más de 40 veces más rápido.

30 La eficacia de dWT VIIa en comparación con la del Factor VII de tipo silvestre se investigó usando ratones TFKI y el procedimiento de corte de cola descrito anteriormente. En resumen, se inyectaron 5 mg/kg de tPA por vía intravenosa en los ratones, seguido del corte de la cola a 50 mm de la punta. El Factor VII de tipo silvestre (NovoSeven®) o dWT VIIa se inyectó 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 dWT VIIa era significativamente más eficaz que el Factor VII de tipo silvestre. Más específicamente, una dosis de 3 mg/kg de dWT VIIa 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 dWT VIIa es una dosis bioequivalente a 6 mg/kg de Factor VII de tipo silvestre.

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

45 Además, la capacidad de dWT VIIa y Factor VII de tipo silvestre (NovoSeven®) para causar la formación de trombos también se investigó en un modelo de trombosis con FeCl₃. Se trataron los ratones con dosis bioequivalentes de dWT VIIa (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 frente al 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 de tipo silvestre NovoSeven® generó un flujo sanguíneo significativamente reducido (promedio aproximadamente 40 %), mientras que el dWT VIIa mostró casi ninguna reducción en el flujo sanguíneo (promedio > 90 %). Este experimento demostró que la dosis dada de dWT VIIa produjo una formación de trombo muy reducida en comparación con el Factor VII de tipo silvestre.

La actividad y eficacia de dWT VIIa en comparación con el Factor VII de tipo silvestre se investigó adicionalmente mediante el examen de las afinidades de unión aparentes de estos péptidos para el factor tisular soluble (sTF) usando un sustrato fluorogénico tripéptido (HTI) SN-17c. Como se muestra en la Figura 26, este análisis demostró que dWT

VIIa (dF7) y el Factor VII de tipo silvestre (F7) tenían afinidades de unión aparentes 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 mediante la titulación de la concentración del Factor X en presencia de complejos Factor VII-sTF (Factor VII 0,5 nM [dWT VIIa o de tipo silvestre], sTF 125 nM), la cinética de Michaelis Menten para dWT VIIa y Factor VII de tipo silvestre demuestra que dWT VIIa (dF7) puede activar el Factor X de manera más eficaz (aproximadamente 2 veces) que el Factor VII de tipo silvestre (F7). Estos datos sugieren que dWT VIIa es capaz de convertir más Factor X en Factor Xa por sitio activo del Factor VII que su equivalente de tipo silvestre.

Discusión

Existe una necesidad médica insatisfecha de desarrollar un medicamento 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-glucosilación, lo que da como resultado 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 de la diana y, como resultado de ello, aumentaría su índice terapéutico. En el presente documento se ha demostrado que la eliminación de los ácidos siálicos presentes en las cadenas de carbohidratos de V2 y V1 da como resultado un aclaramiento significativamente más rápido de las moléculas en un modelo de aclaramiento de hepatocitos *in vitro*. Las variantes hipoglucosiladas no se eliminaron más rápido en este modelo *in vitro*, lo que sugiere que el mecanismo de aclaramiento entre las moléculas desialiladas e hipoglucosiladas difiere. Los estudios *in vivo* realizados en ratas Sprague Dawley demostraron que las moléculas desialiladas (dV2 y dV1), así como la variante hipoglucosilada pMB121, tenían una semivida significativamente menor. De forma interesante, tanto V2 como V1 desialiladas tuvieron tasas de aclaramiento aumentadas en comparación con la tasa informada para FVIIa de tipo silvestre desialilado, (Appa y col., *Thrombosis and Haemostasis* 104.2/2010), una característica que puede deberse a sus 2 N-polisacáridos adicionales. Una posible teoría para esta actividad, sin limitación de lo que se reivindica en el presente documento, es que estos N-polisacáridos adicionales, después de la desialilación, se convertirían en ligandos adicionales para el ASGPR o un receptor similar y mediarían un aclaramiento más rápido. La actividad de estas moléculas se retuvo o aumentó en comparación con sus moléculas parentales según se midió mediante ensayos de actividad *in vitro*. El aclaramiento más rápido de dV2 se verificó adicionalmente *in vivo* en un estudio PK de ratón con Hema y se demostró que era eficaz en los estudios de corte de cola y TVT en Hema.

Además, la desialilación del Factor VII de tipo silvestre produjo un polipéptido del Factor VII que se aclaró 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-polisacáridos o la modificación de la composición de monosacáridos de los N-polisacáridos del Factor VIIa o las variantes de 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 aclaramiento rápido 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 acción corta

<130> BHC115011 PCT

<150> 61/754.674
<151> 24/12/2012

<150> 61/787.026
<151> 15/03/2013

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1218

ES 2 747 726 T3

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

gccaacgcgt tcttggagga 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
tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag	300
tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tctgtcggg gccacgaggg gtactctctg	360
ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt	420
ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc	480
aaaggggagt gtccatggca ggtcctggtt ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg	540
accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac	600
tggaggaacc tgatcgcggt gctgggagag caccgacctc gcgagcacga cggggatgag	660
cagagccggc ggggtggcga ggtcatcacc ccagcagct acgtcccggg caccaccaac	720
cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtggtgccc	780
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg	840
gtcagcggct ggggcccagct 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 ggggcccagg ctgcgcaacc gtgggcccact ttgggggtga caccagggtc	1140
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc	1200
ctgcgagccc catttccc	1218

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

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

<400> 2

ES 2 747 726 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctc tgcaggaggg cggggagatc ttogaagacg 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 ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggg gctgggagag cagcagctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcgca ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtgaacc tcaactgacca tgtggtgccc 780
 ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgag cttctcattg 840
 gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
 aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 960
 ccaaataatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggtg cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggcccact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtctc 1200
 ctgagagccc catttcctt 1219

<210> 3
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos variante del FVII humano
 <400> 3

ES 2 747 726 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcgccag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcct tcgaggaggg 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 ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggatgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtgggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggg gctggggcag cagcagctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcatc ccagcagct acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtgaacc tcaactgacca tgtgggtgcc 780
 ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg 840
 gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
 aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 960
 ccaaataatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggtg cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtggggcact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

<210> 4
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de plásmido

<400> 4

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

ES 2 747 726 T3

tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
 tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgtcctg cacacccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctggtg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtggtctcc ggggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggg gctgggagag cagcagctca 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
 ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggta cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggcccact ttggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

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

5

<220>
 <223> Secuencia de plásmido
 <400> 5

ES 2 747 726 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggccg 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
 tgtgagacgc acaaggatga ccagctgata tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
 tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccaca 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 tgatcgcggg gctgggagag cagcagctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcctc 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
 ccaaataatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggtg cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtggggcact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

<210> 6

<211> 1218

<212> **ADN**

<213> Secuencia **artificial**

<220>

<223> Secuencia de plásmido

<400> 6

5

ES 2 747 726 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggccg ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcct tcgaggaggc cgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc 120
 tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 240
 tgtgagacgc acaaggatga ccagctgata 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 ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggg gctgggagag cagcactca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcctc ccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca 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 gcacgtggtg cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggcccact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1200
 ctgagagccc catttccc 1218

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

5

<220>
 <223> Secuencia de plásmido

<400> 7

ES 2 747 726 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcgcccg ggctccctgg agagggagtg caaggaggag	60
cagtgtcctc tcgaggaggg 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 ggggtgtcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt	420
ctagaaaaaa gacaggccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc	480
aaaggggagt gtccatggca ggtcctggtg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg	540
accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac	600
tggaggaacc tgatcgcggg gctgggagag cagcactca gcgagcacga cggggatgag	660
cagagccggc ggggtggcga ggtcatcacc 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
ccacagatca 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> 8

<211> 1218

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de plásmido

<400> 8

ES 2 747 726 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctc tgcaggaggg 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 cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtgggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggg gctggggcag cagcagctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtgggtgcc 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 gtggggcact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

<210> 9
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de plásmido

<400> 9

ES 2 747 726 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctc tgcaggaggg 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 cacaccaca 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 tgatcgcggg gctgggagag cagcagctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtggtgccc 780
 ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg 840
 gtcagcggct ggggcccagct 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 ggggcccagg ctgcgcaacc gtgggcccact ttggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

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

5

<220>
 <223> Secuencia de plásmido

<400> 10

ES 2 747 726 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcct tcgaggaggc cggggagatc 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 cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctggtt ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggt gctgggcgag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcgca ggtcatcctc 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 gtgggcccact ttgggggtga caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

<210> 11

<211> 1218

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de plásmido

<400> 11

5

ES 2 747 726 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcct 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 cacaccaca 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 tgatcgcggg gctgggagag caccgacctc gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcacc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 caccgacatg 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 gtgggcccact ttggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

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

5

<220>
 <223> Secuencia de plásmido

<400> 12

ES 2 747 726 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcct tcgaggaggc ccgggagatc ttcgaagacg aagaggaaac gaagctgttc 120
 tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 240
 tgtgagacgc acaaggatga ccagctgata 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 ggtcctggtg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggg gctgggcgag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcgca ggtcatcacc 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 gcacgtggtg cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtggggccact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

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

5

<220>
 <223> Secuencia de plásmido

<400> 13

ES 2 747 726 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcct tgcaggaggg ccgggagatc ttcgaagacg 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 accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gacaggccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtgggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggg gctggggcag cagcagctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga 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
 ccaaatatca 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> 14
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de plásmido

<400> 14

ES 2 747 726 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcct tcgaggaggg ccgggagatc ttogaagacg 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 accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggatgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtgggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggg gctggggcag cagcagctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtgggtgcc 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> 15
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de plásmido

<400> 15

gccaacgcgt tcctggagga gctgcggcag ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60

ES 2 747 726 T3

cagtgtcct tcgaggaggc ccgggagatc ttogaagacg 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 accacacggg caccaagcgc tctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gacaggccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctggtg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggg gctgggagag cagcactca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc ggggtggcga ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tctactgacca 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> 16
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 16

5

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro 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 Lys
 20 25 30
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35 40 45
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50 55 60

ES 2 747 726 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 2 747 726 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

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica variante del FVII humano

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (407)..(407)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<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 2 747 726 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

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica variante del FVII humano

<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

ES 2 747 726 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 2 747 726 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

1. Una variante aislada del polipéptido del Factor VII producida en una célula huésped de mamífero, **caracterizada por** una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una alteración de secuencia en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, en la que la al menos una alteración de secuencia es V253N, en el que la variante aislada del polipéptido del Factor VII tiene una relación de moles de ácido siálico conjugado a moles de glicano ligado a N entre 0 y 5,0.
2. La variante aislada del polipéptido del Factor VII de la reivindicación 1, **caracterizada por** tener al menos un 50 % de la actividad para promover la coagulación sanguínea como el Factor VII de tipo silvestre medido en las mismas condiciones.
3. La variante aislada del polipéptido del Factor VII de la reivindicación 1, en la que la variante del polipéptido del Factor VII comprende dos o más alteraciones de secuencia, siendo una V253N y la otra seleccionada del grupo que consiste en P10Q, K32E, R36E, A34E y T106N.
4. La variante aislada del polipéptido del Factor VII de la reivindicación 1, en la que la variante del polipéptido del Factor VII comprende tres o más alteraciones de secuencia, siendo una V253N y las otras seleccionadas del grupo que consiste en P10Q, K32E, R36E, A34E y T106N.
5. La variante aislada del polipéptido del Factor VII de la reivindicación 1, en la que la variante del polipéptido del Factor VII comprende cuatro o más alteraciones de secuencia, siendo una V253N y las otras seleccionadas del grupo que consiste en P10Q, K32E, R36E, A34E y T106N.
6. La variante aislada del polipéptido del Factor VII de la reivindicación 1, en la que la variante del polipéptido del Factor VII comprende las alteraciones de secuencia de P10Q, K32E, R36E, A34E, T106N y V253N.
7. La variante aislada del polipéptido del Factor VII de la reivindicación 1, en la que la variante del polipéptido del Factor VII comprende las alteraciones de secuencia P10Q, K32E, T106N y V253N.
8. La variante aislada del polipéptido del Factor VII de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la relación de moles de ácido siálico conjugado a moles de glicano unido a N es inferior a 0,1.
9. Un procedimiento de preparación de la variante aislada del polipéptido del Factor VII de la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento
- (a) producir un polipéptido del Factor VII que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una alteración de secuencia en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, en la que la al menos una alteración de secuencia es V253N, en una línea celular de mamífero recombinante que es deficiente en su capacidad de sialilar péptidos de tal manera que produce un polipéptido del Factor VII desialilado que tiene una relación de moles de ácido siálico conjugado a moles de glicano unido a N entre 0 y 5,0; y
- (b) aislar la variante del polipéptido del Factor VII producido de ese modo.
10. Un procedimiento de preparación de la variante aislada del polipéptido del Factor VII aislado de la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento
- (a) obtener una línea celular de mamífero recombinante que coexpresa (a) un polipéptido del Factor VII recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una alteración de secuencia en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, en la que la al menos una alteración de secuencia es V253N, y (b) una enzima sialidasa recombinante;
- (b) cultivar dicha línea celular de mamífero recombinante para permitir la expresión tanto del polipéptido del Factor VII recombinante como de la enzima sialidasa recombinante, en el que dicha enzima sialidasa recombinante elimina cantidades suficientes de restos de ácido siálico unidos covalentemente para producir un polipéptido del Factor VII desialilado que tiene una relación de moles de ácido siálico conjugado a moles de glicano ligado a N entre 0 y 5,0; y
- (c) aislar la variante del polipéptido del Factor VII producida de ese modo.
11. La variante aislada del polipéptido del Factor VII aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno en el que es deseable la formación de coágulos sanguíneos, en el que la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en una hemorragia, hemorragia gastrointestinal, hemorragia no controlada, hemorragia en un mamífero sometido a trasplante o resección o cirugía, hemorragia varicosa, trombocitopenia, hemofilia, hemorragia intracraneal, aneurisma aórtico, y sobre la administración de un anticoagulante.
12. Una composición farmacéutica que comprende la variante aislada del polipéptido del Factor VII de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

FACTOR VII DE TIPO SILVESTRE

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGTCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGGCCGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTGCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTTCATCCTCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCCCTCACTGACCATGTG
GTGCCCCCTGCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCCACTTTGGGGTGTAC
ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 1)

VI

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGTCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGGCCGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACAACGGCACCAAGCGCTCCTGTGCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTTCATCCTCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGAACCTCACTGACCATGTG
GTGCCCCCTGCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCCACTTTGGGGTGTAC
ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC

Figura 1A

V2

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGACGAAGAGGAAACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACAACGGCACCAAGCGCTCCTGTCCGGTGCCACGAGGGGTTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGAAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCGTGAACCTCACTGACCATGTG
GTGCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTAC
ACCAGGGTCTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 3)

pMB113

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCCGGTGCCACGAGGGGTTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGAAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCTCACTGACCATGTG
GTGCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTAC
ACCAGGGTCTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 4)

Figura 1B

pMB114

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGACAGGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCAGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGTGTCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTTCCTCACTGACCATGTG
GTGCCCCCTGCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTAC
ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 5)

pMB115

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCAGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGTGTCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTTCCTCACTGACCATGTG
GTGCCCCCTGCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCACAGATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGTACTCGGATGGCAGCAAGG
ACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
CTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTAC
CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 6)

Figura 1C

pMB116

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTA
CTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGTCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGACAGGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCGTGGTCTCCTACTGACCATGTG
GTGCCCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCACAGATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGG
ACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTAC
CTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTAC
CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 7)

pMB117

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTA
CTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGTCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCTCCTACTGACCATGTG
GTGCCCCCTCTGCCTGCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTAC
ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 8)

Figura 1D

pMB118

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCGAAGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCCGGTGCCACGAGGGGTTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGTCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGACAGGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAAGTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCTCCTACTGACCATGTG
GTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTAC
ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 9)

pMB119

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCGAAGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTA'ATA'CT'GCT'TCT'GCCT'CCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCCGGTGCCACGAGGGGTTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGTCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAAGTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCTCCTACTGACCATGTG
GTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCACAGATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGG
ACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
CTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTAC
CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 10)

Figura 1E

pMB120

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCGAAGACGCGGAGAGGACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGTCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGACAGGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTTCCTCACTGACCATGTG
GTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCACAGATCAGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGG
ACTCCTGCAAGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
CTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTAC
CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 11)

pMB121

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCGAAGACGAAGAGGAAACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGTCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTTCCTCACTGACCATGTG
GTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTAC
ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 12)

Figura 1F

pMB122

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGACGAAGAGGAAACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGACAGGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTG
GTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
CTCCTGCAAGGGGACAGTGGAGGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
TGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTAC
ACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 13)

pMB123

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGACGAAGAGGAAACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTG
GTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCACAGATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGG
ACTCCTGCAAGGGGACAGTGGAGGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACC
CTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTAC
CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCC
AGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 14)

Figura 1G

pMB124

GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCAGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGA
GCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCGAAGACGAAGAGGAAACGAAGCTGT
TCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCT
CCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA
ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAG
CAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCT
CTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCT
ATTCTAGAAAAAAGACAGGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTG
CCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGG
GGGACCCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAA
GAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACC
ACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCGTGGTCTCACTGACCATGTG
GTGCCCTCTGCCTGCCCCAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTC
TCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATG
GTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG
AGACTCCCCACAGATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGG
ACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTAC
CTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTA
CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGGTGCAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCC
AGGAGTCTCCTGCGAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 15)

Figura 1H

Péptido del factor VII de tipo silvestre

ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGS
CKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGKRSCRCHEGYSL
LADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGAQLCGG
TLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTN
HDIALLRHLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVL
NVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCA GYS DGSCKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTG
IVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (SEQ ID NO: 16)

Péptido V1

ANAFLEELRQGS LERECKEEQCSFEEAREIFE DAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGS
CKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHNGTKRSCRCHEGYSL
LADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGAQLCGG
TLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTN
HDIALLRHLHQPVNLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVL
NVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCA GYS DGSCKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTG
IVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (SEQ ID NO: 17)

Péptido V2

ANAFLEELRQGS LERECKEEQCSFEEAREIFE DEEETKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGS
CKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHNGTKRSCRCHEGYSL
LADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGAQLCGG
TLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTN
HDIALLRHLHQPVNLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVL
NVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCA GYS DGSCKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTG
IVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (SEQ ID NO: 18)

Figura 2

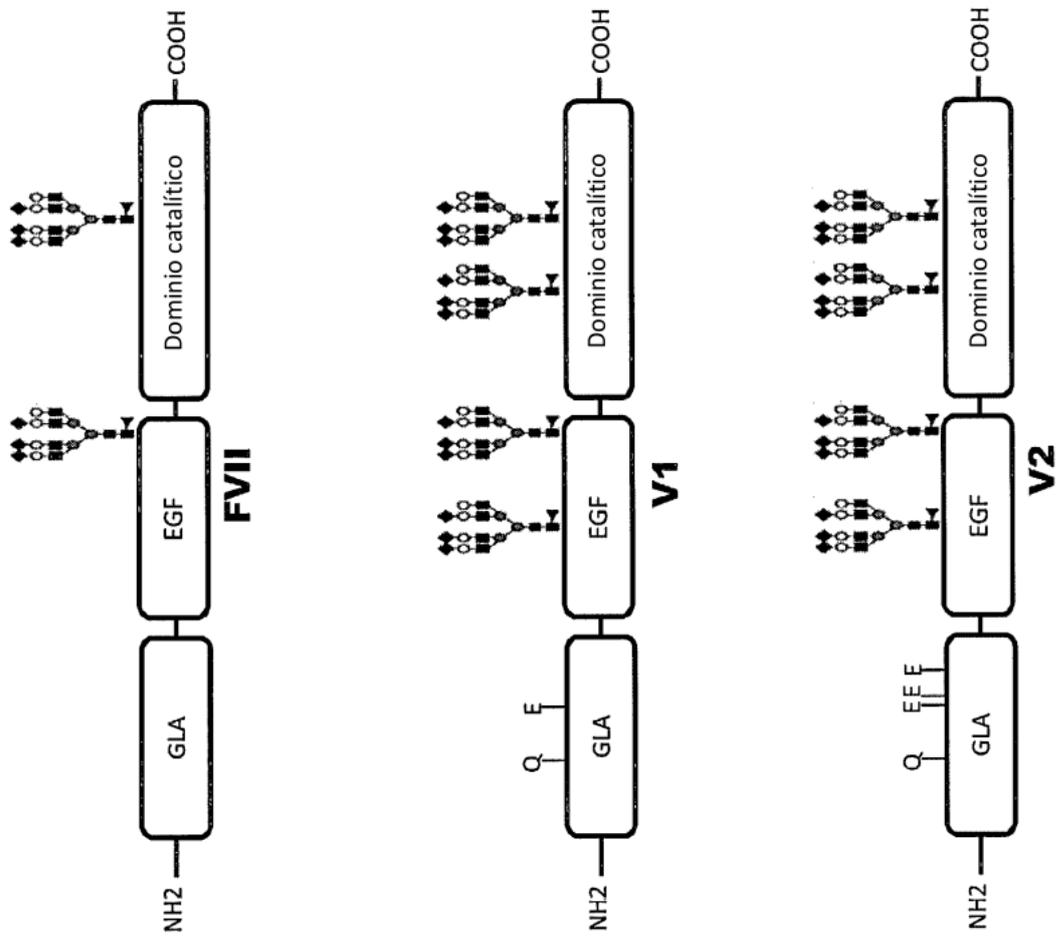
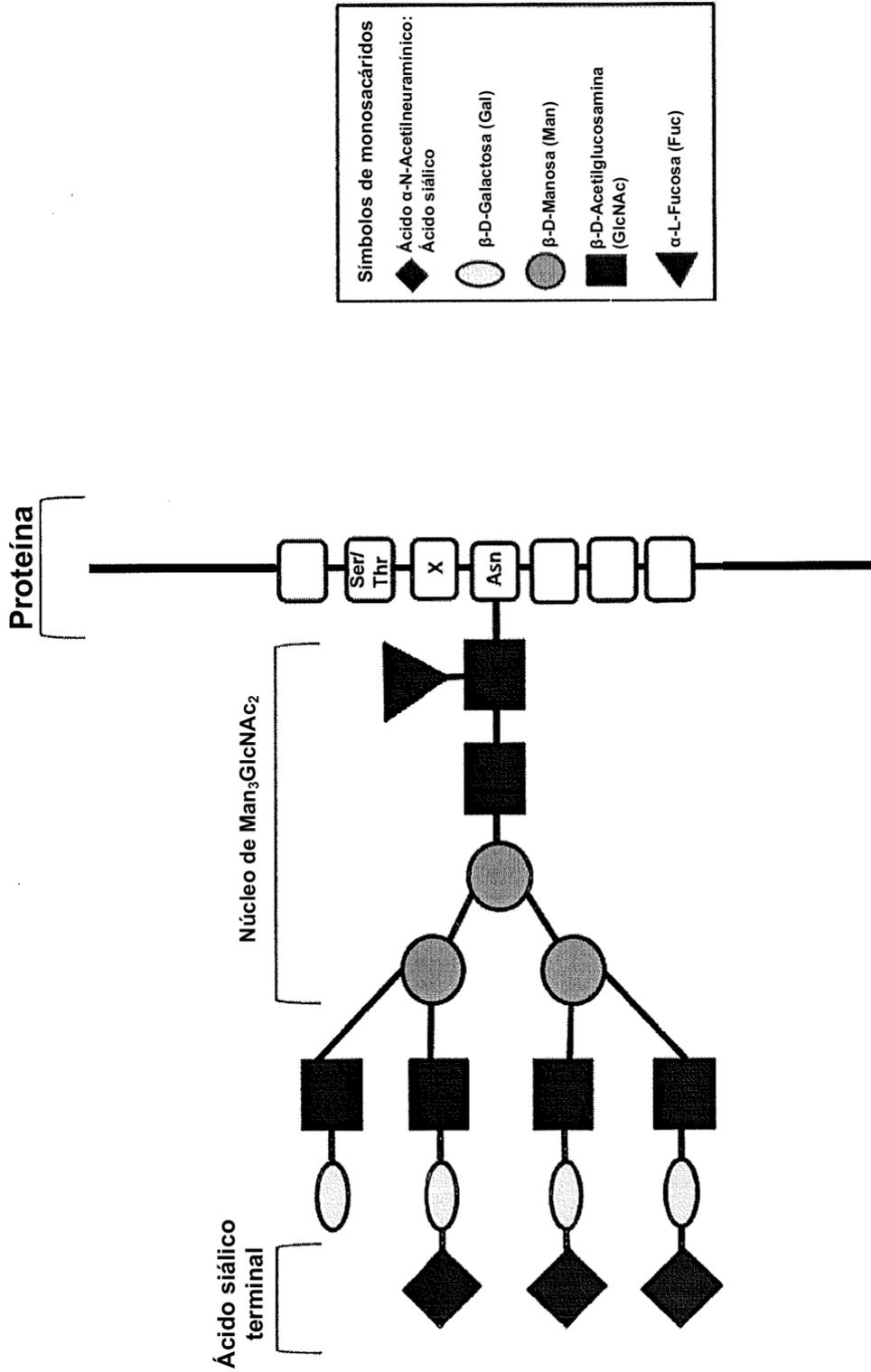


Figura 3



Ejemplo de un glicano complejo unido a N

Figura 4

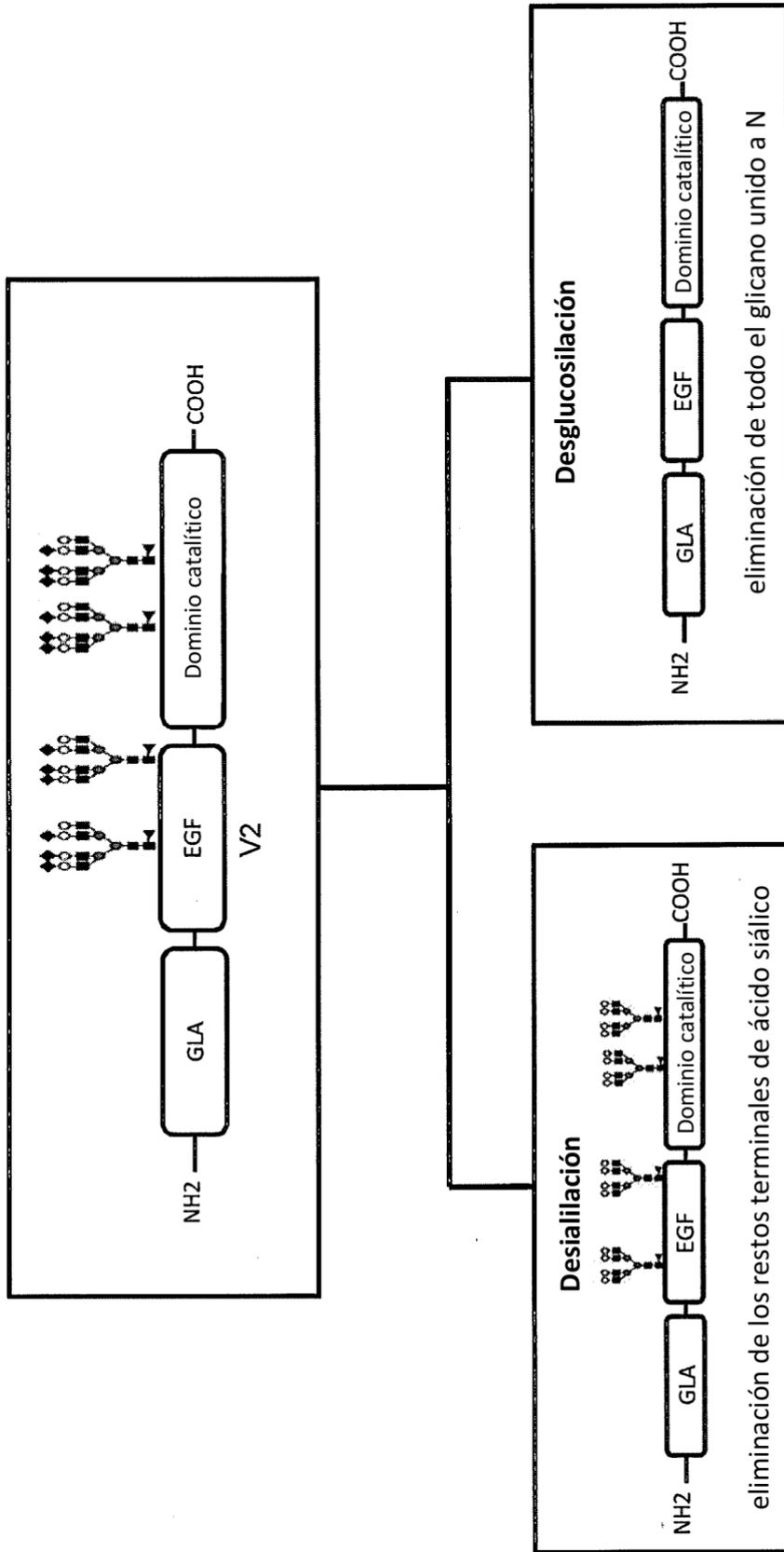
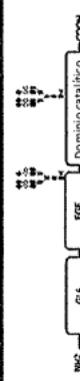
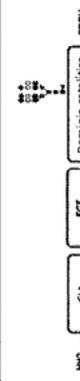
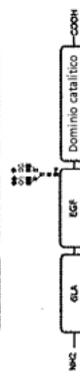
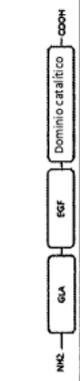
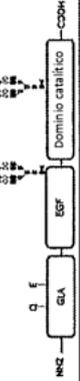
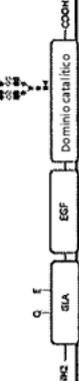
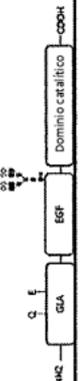
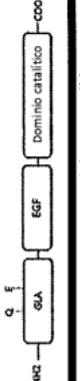
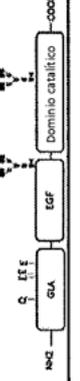
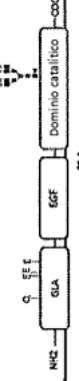
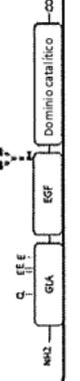
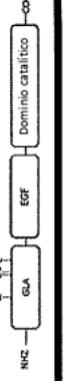


Figura 5

Figura 6

Número pMB	Cadena principal	Sitios de N-glucosilación
pMB113	F7wt	
pMB114		
pMB115		
pMB116		
pMB117	V1	
pMB118		
pMB119		
pMB120		
pMB121	V2	
pMB122		
pMB123		
pMB124		

FVII-B0189 humano, cadena pesada

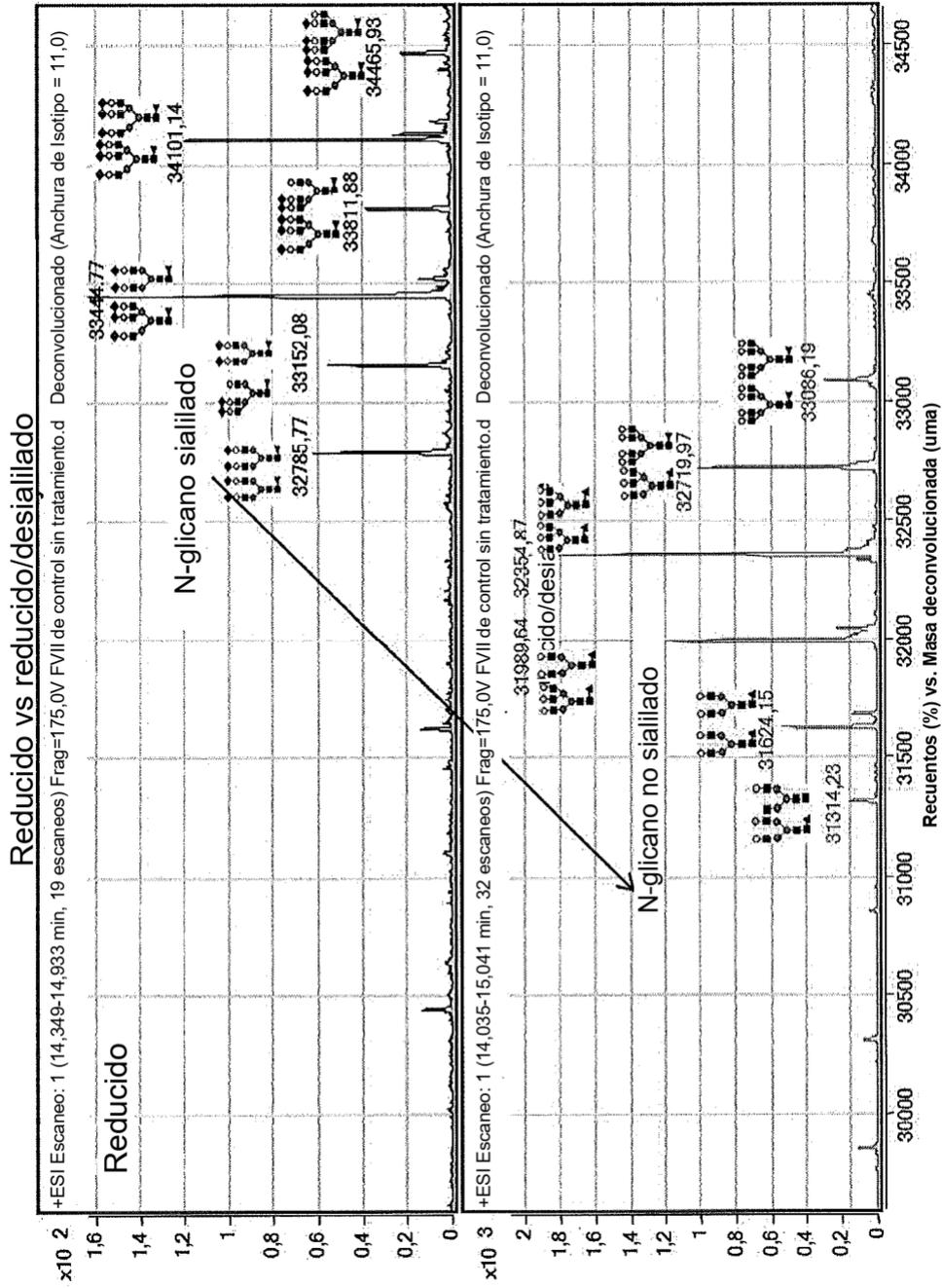


Figura 7

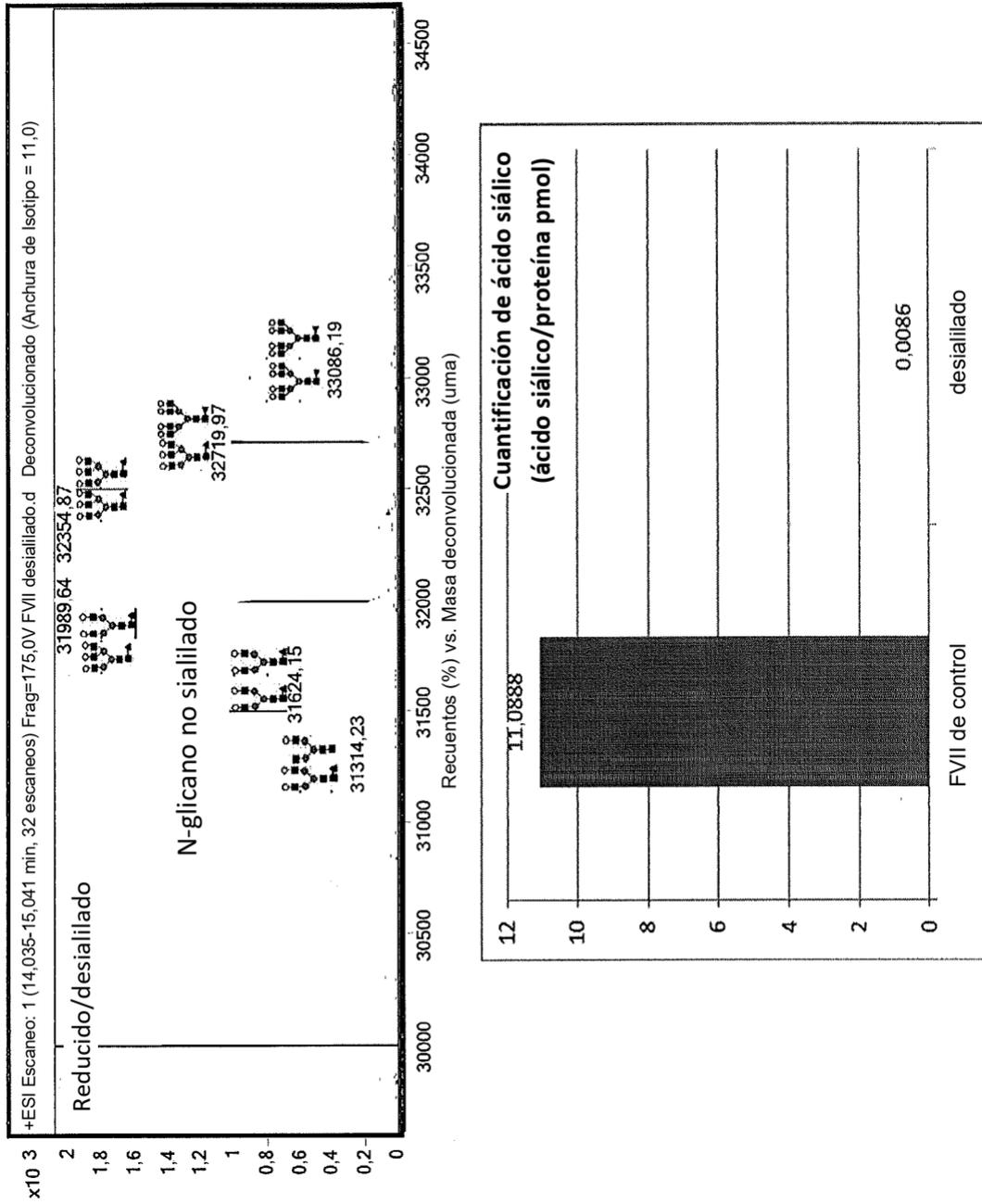


Figura 8

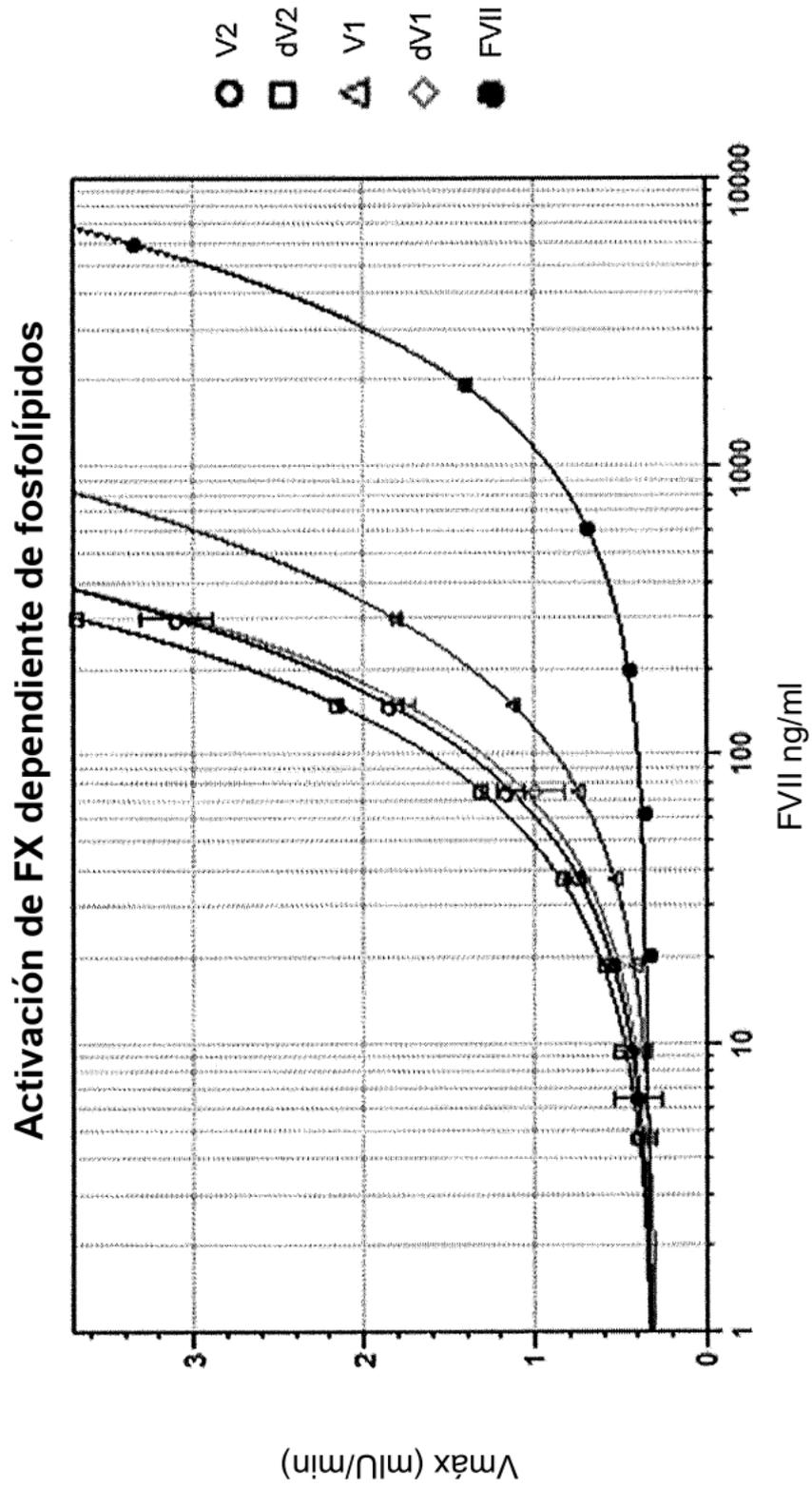
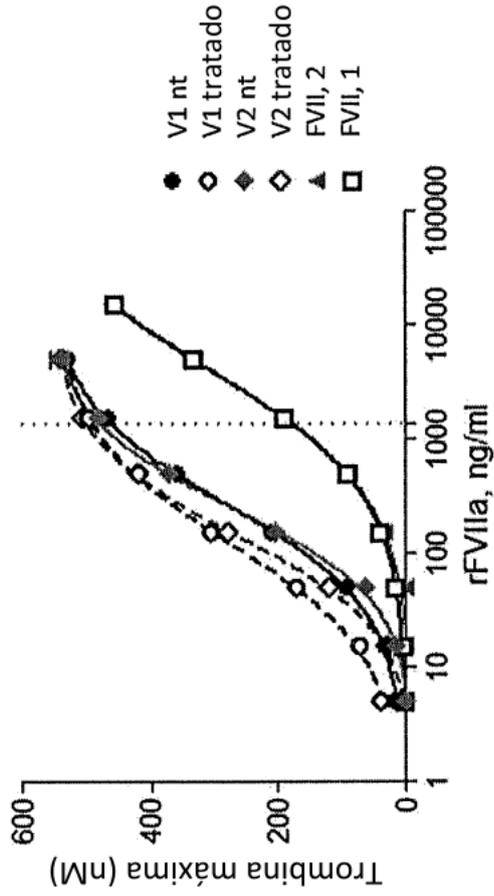


Figura 9

Comparaciones de actividad in vitro de variantes de rFVIIa
(ensayo PL-TGA en plasma de pacientes graves con hema)

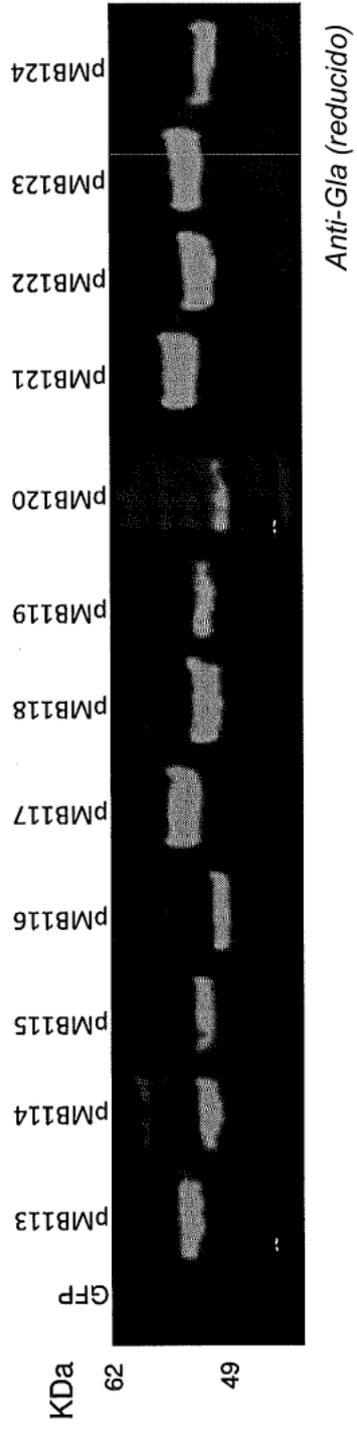


Cantidad de trombina generada por 1300 ng/ml de diversas proteínas rFVIIa

	V1 sin tratamiento	V1 tratado	V2 sin tratamiento	V2 tratado	FVII
Trombina máxima	463 nM	492 nM	480 nM	502 nM	178 nM
Veces más de FVII	2,60	2,76	2,70	2,82	1

Figura 10

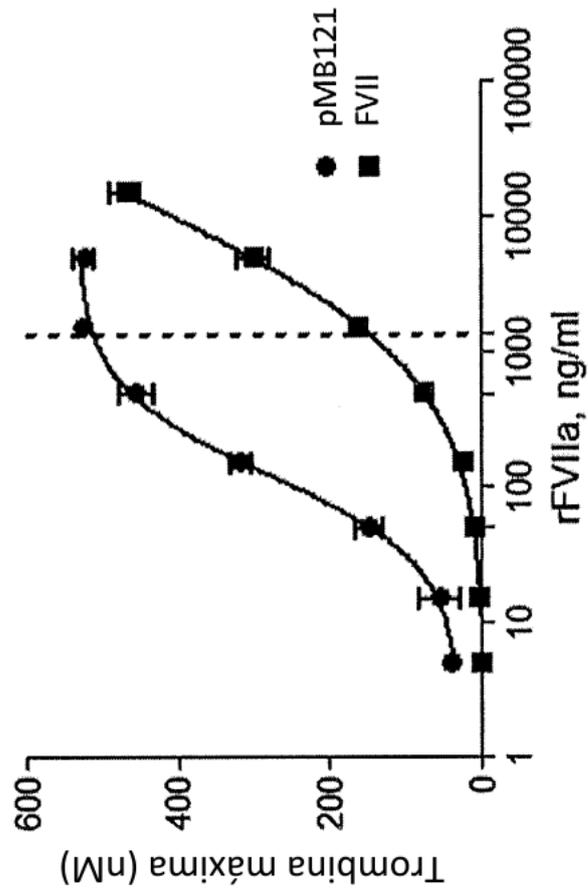
Figura 11



	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

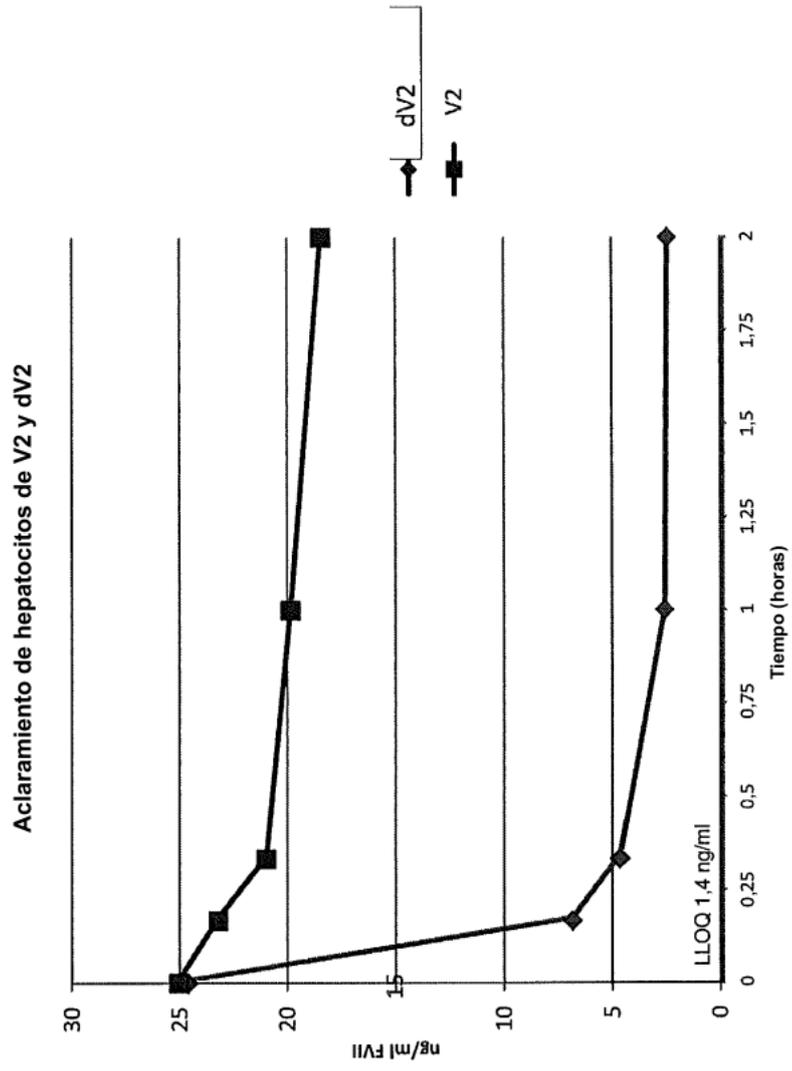
Comparaciones de actividad in vitro de variantes de rFVIIa
(ensayo PL-TGA en plasma de pacientes graves con hemaA)



	pMB121	FVII
Trombina máxima	511 nM	148 nM
Veces más de FVII	3,45	1

Figura 13

Figura 14



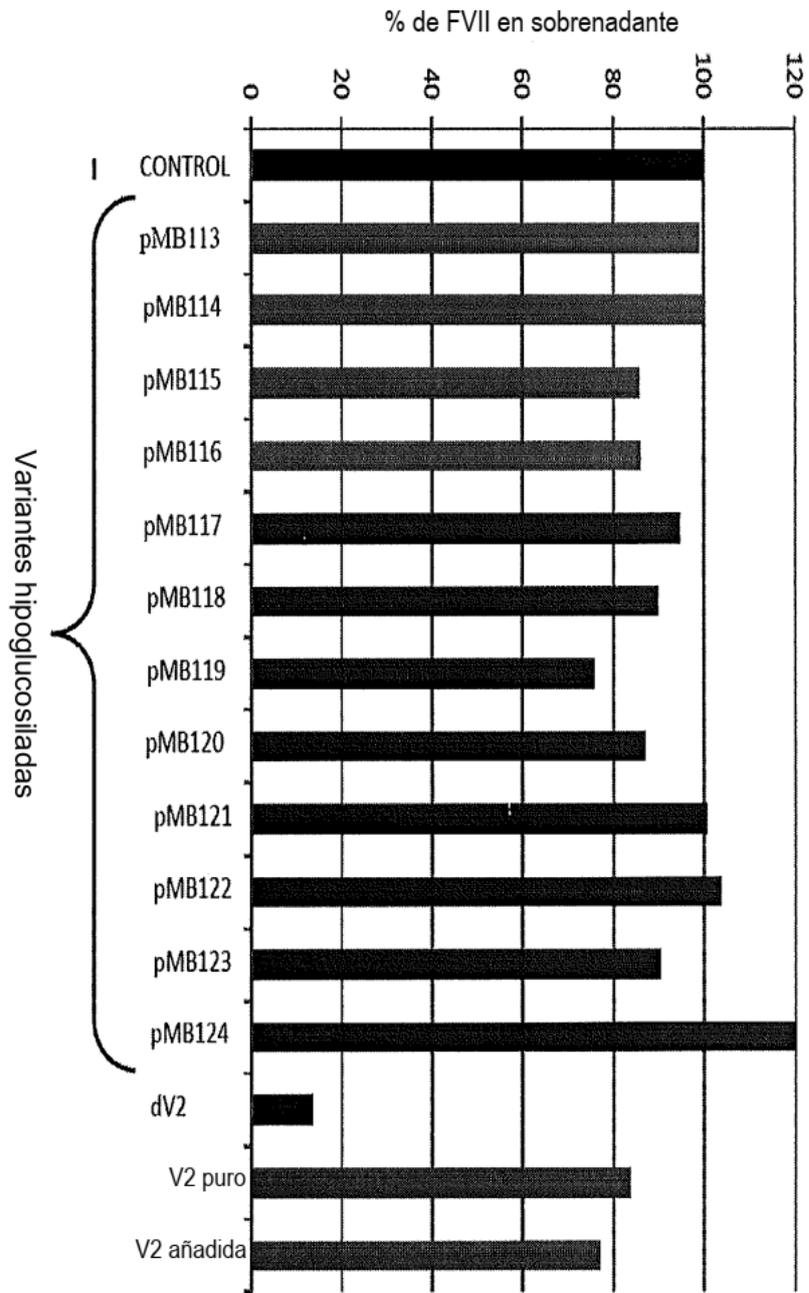
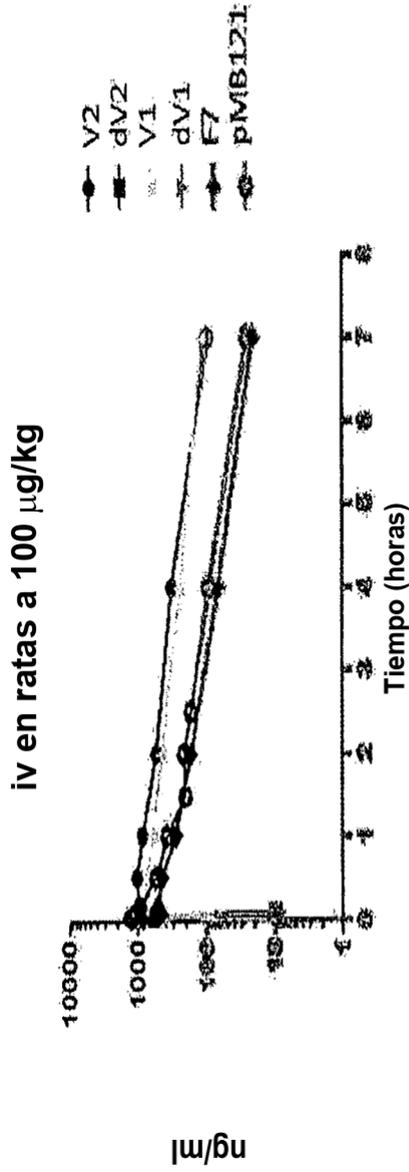


Figura 15

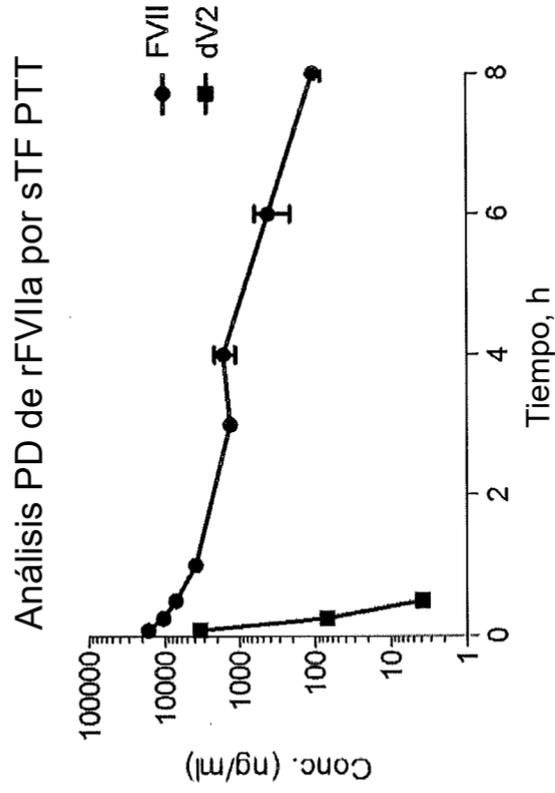


	T _{1/2} (h)	MRT (h)	CL(ml /h/kg)	V _{ss} (L/kg)
V2	2,7	3,3	26	80
V1	2,5	3,3	33	109
F7	1,6	2,0	91	181
pMB121	1,6	1,9	68	129
dV2	~ 1 min	n.c.	n.c.	n.c.
dV1	~ 1 min	n.c.	n.c.	n.c.

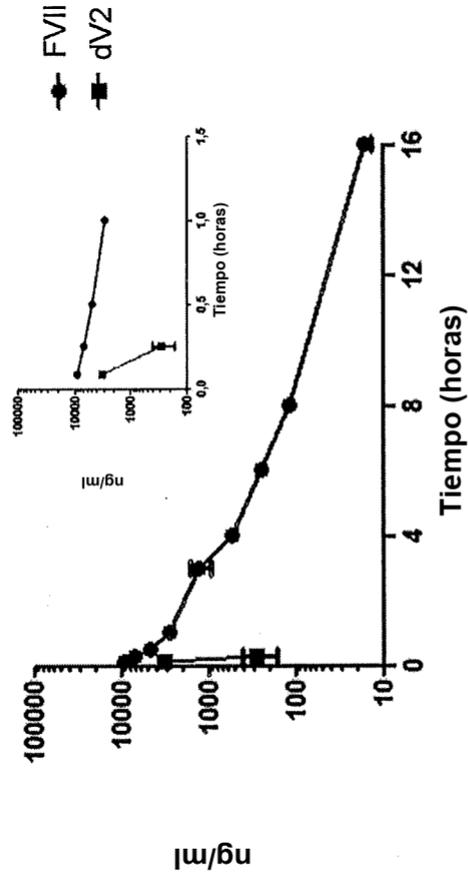
Figura 16

Figura 17

B) ensayo de coagulación TF PTT soluble

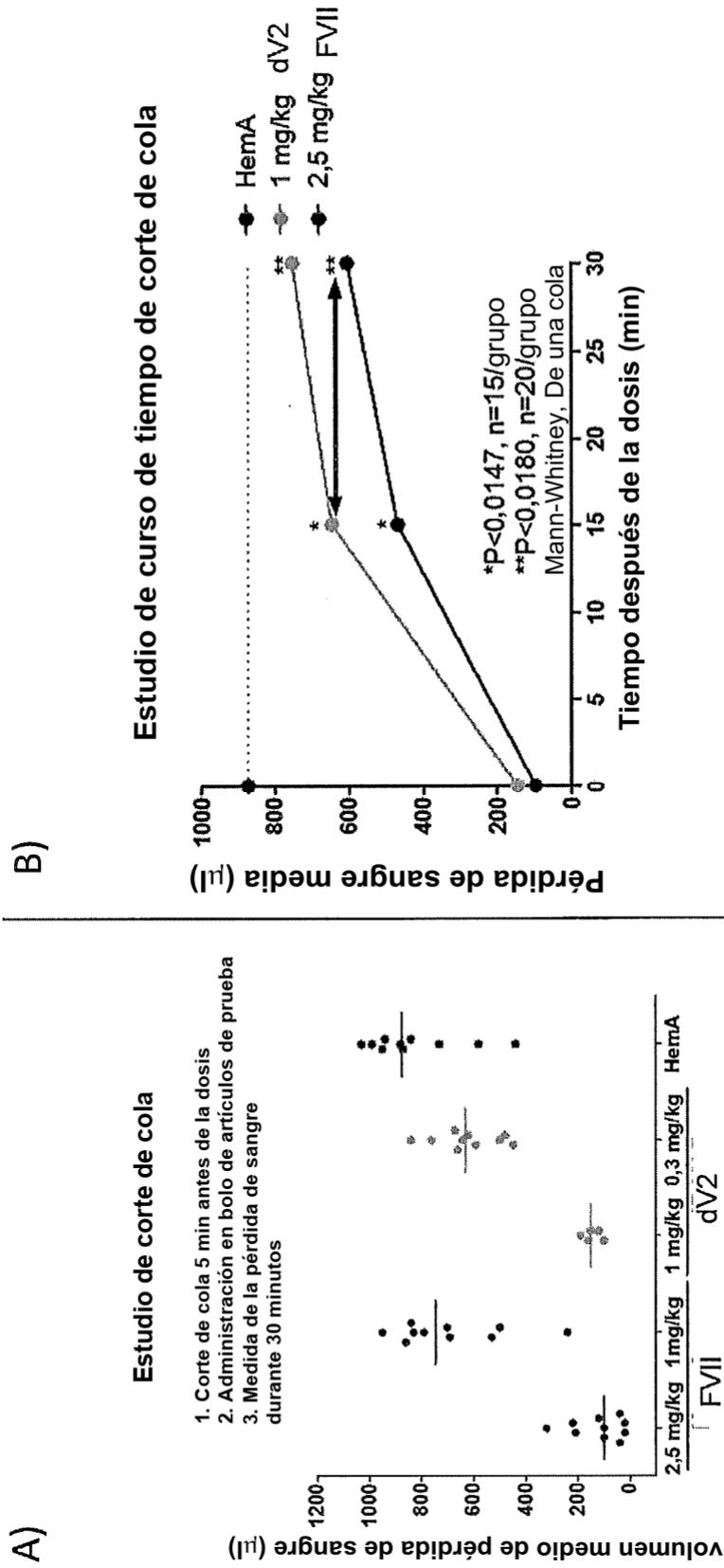


A) Ensayo ELISA



	T _{1/2} (h)	MRT (h)	CL (ml/h/kg)	V _{ss} (ml/kg)
FVII	2,6	1,9	79	152
dV2	~ 3 min	n.c.	n.c.	n.c.

Figura 18



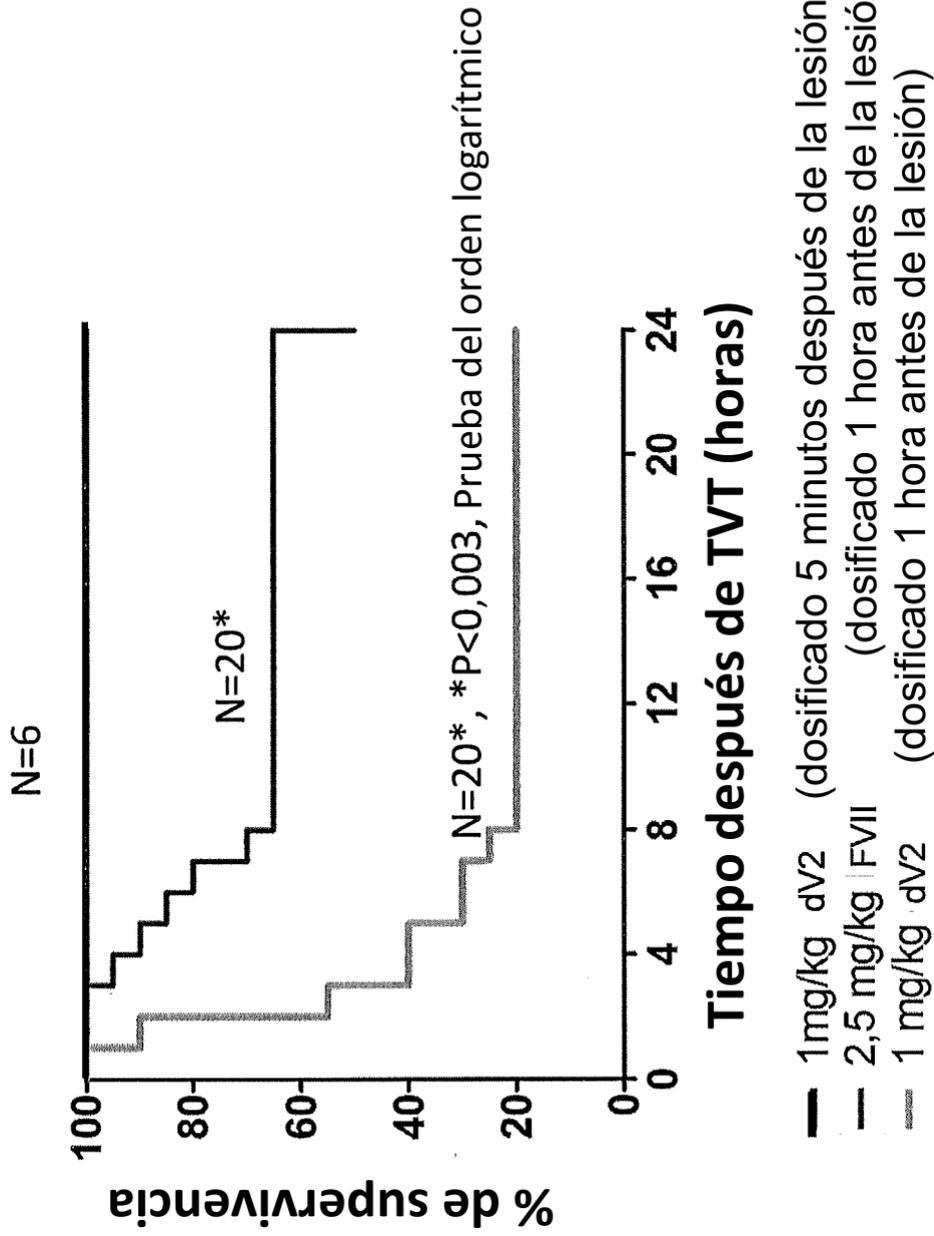


Figura 19

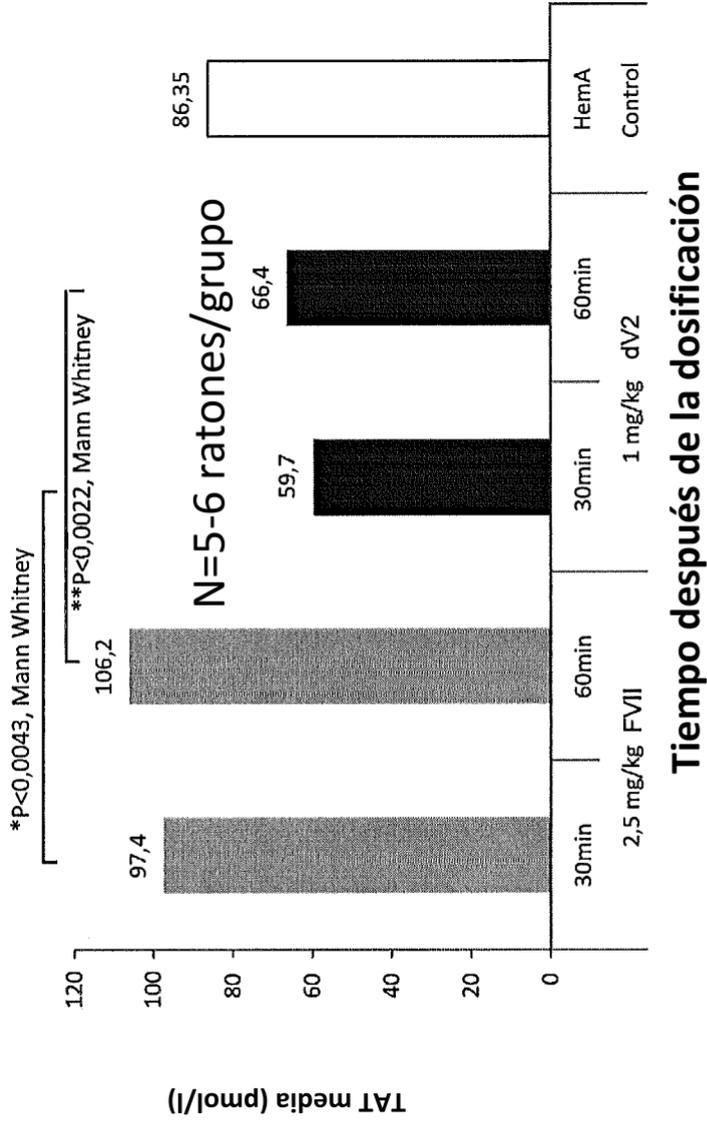


Figura 20

Eficacia de F7 y dV2 en ratones competentes en coagulación tratados con activador de plasminógeno tisular (tPA):

Modelo de sangrado en corte de la punta de la cola

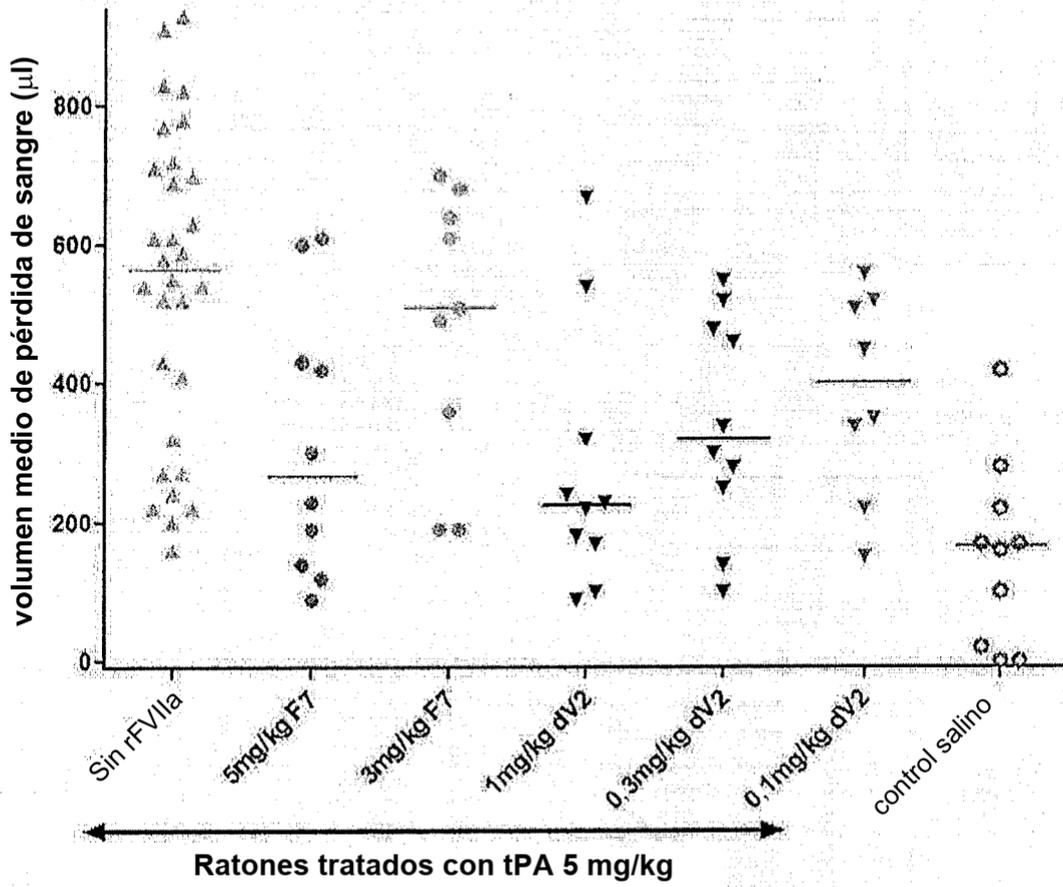
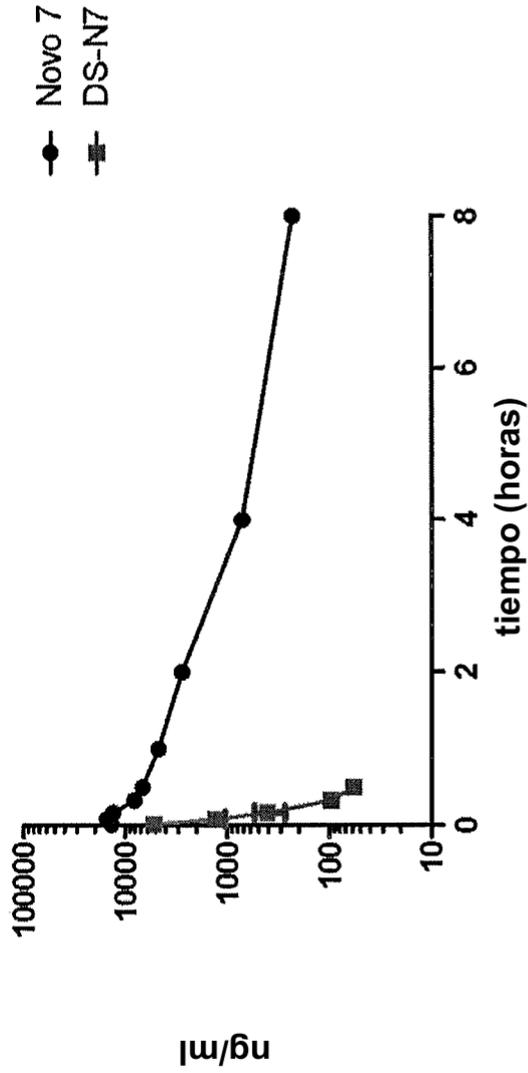


Figura 21



	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. 5mg/kg tPA iv
2. Cortar la cola a 50 mm de la punta
3. dWT Vila o Novo7 por IV
4. Alterar los coágulos inestables cada 6 minutos durante el periodo de recolección
5. Recoger sangre durante 45 min

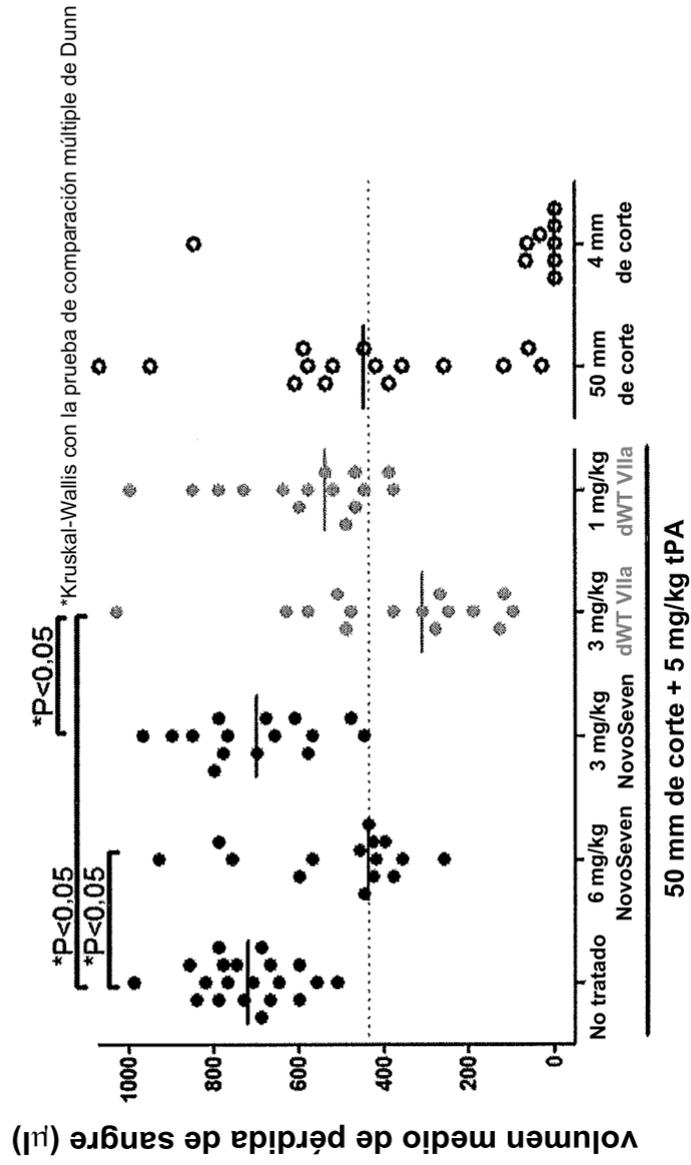


Figura 23

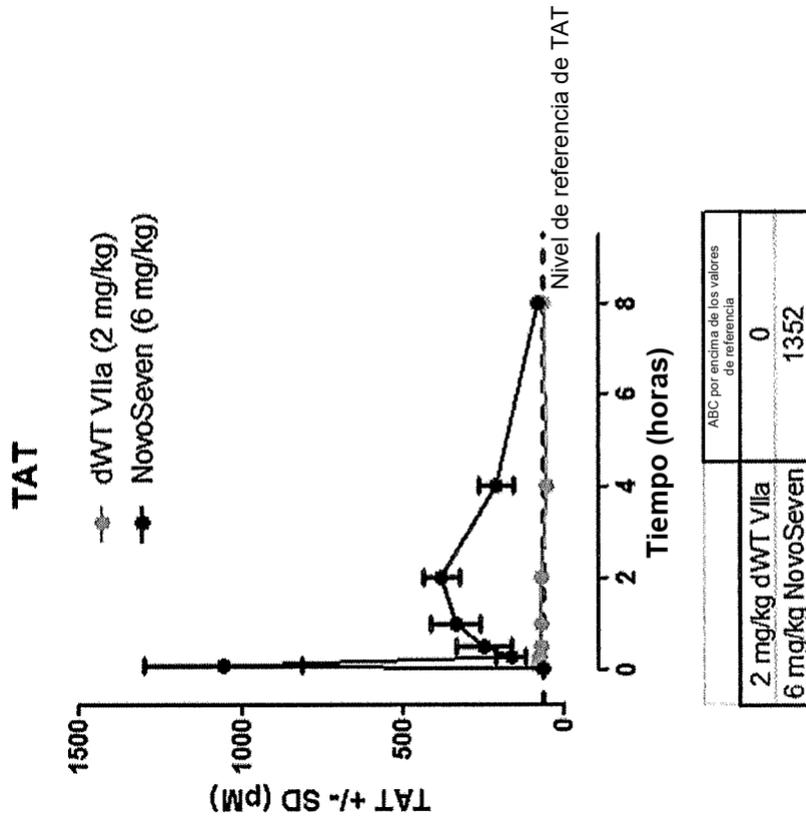


Figura 24

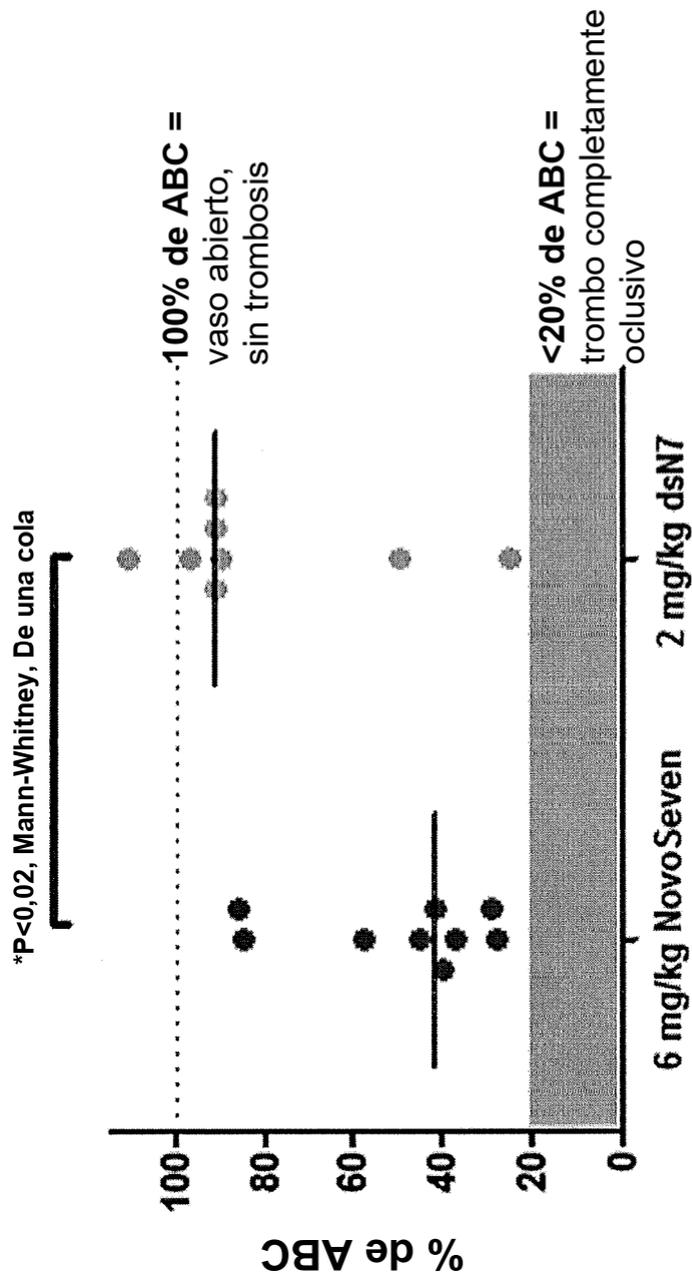


Figura 25

sustrato fluorogénico de Villa

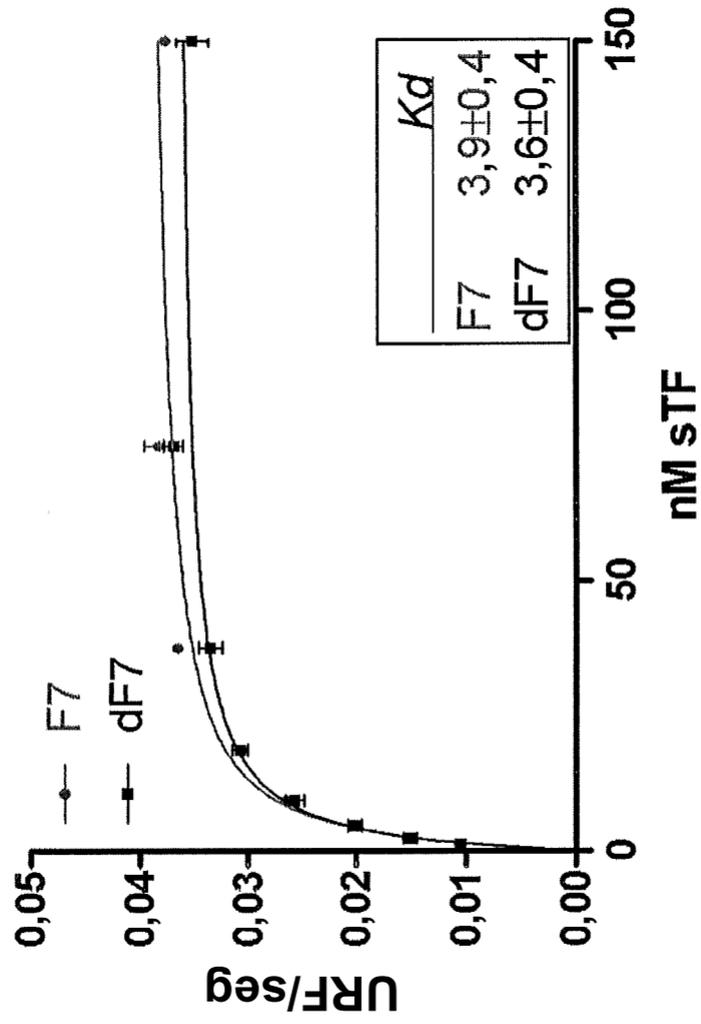


Figura 26

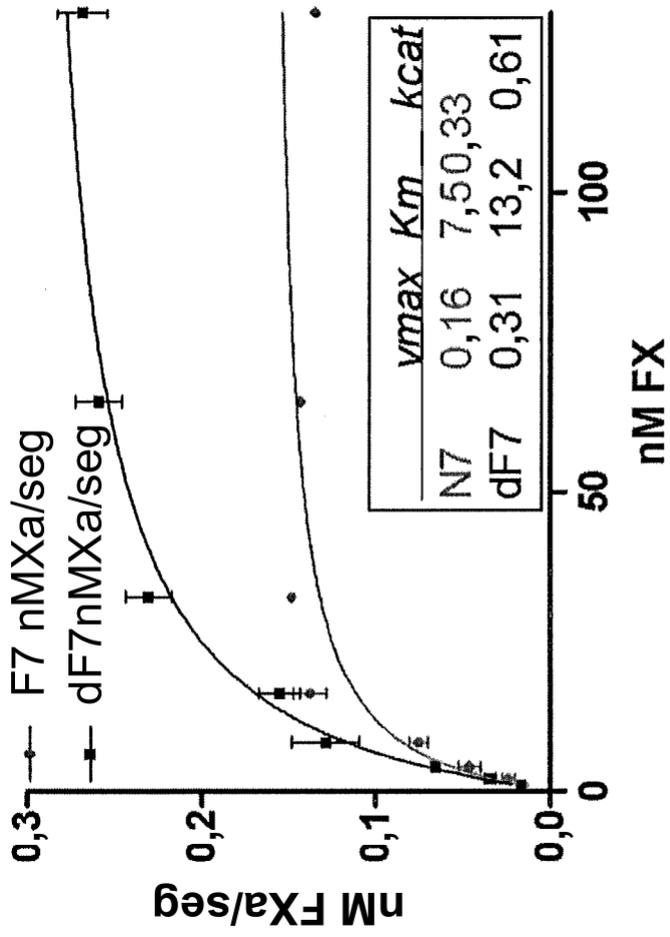


Figura 27