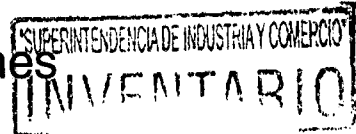


Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

1002
1002

1. EXPEDIENTE No. 04-118560A

54. TÍTULO Nuevas proteínas de fusión con trombomodulina dirigidas contra factores tisulares como anticoagulantes

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A 61 K 33/00

71. SOLICITANTE Schering Aktiengesellschaft

DOMICILIO Berlin, Alemania

74. APODERADO Gustavo Hollman Restrepo
J. JAV. RAJSBECK

22. BOGOTÁ, D. C., _____

89



No. 04-118560-A-00000-0000

Fecha: 2009-11-12 14:51:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 266

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Ref: Expediente No. 04-118.560

Solicitud de patente titulada: "NUEVAS PROTEINAS DE FUSION CON
TROMBOMODULINA DIRIGIDAS CONTRA FACTORES TISULARES COMO
ANTICOAGULANTES"

Solicitante: BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT

J. IAN RAISBECK, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente:

1. Me permito presentar una **SOLICITUD DIVISIONAL** para la solicitud de patente en referencia.

Atentamente,

J. IAN RAISBECK
C.C. 79.376.996 de Bogotá
T.P. 135.799

Anexo: Solicitud Divisional.

OLARTE RAISBECK



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE

PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2004/000180A

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: BAYER SCHERING PHARMA
AKTIENGESELLSCHAFT
Dirección: Müllerstrasse 178, 13353, Berlin
Alemania
Nacionalidad o Domicilio: ALEMANA
Lugar de Constitución: ALEMANIA

Teléfono: _____ Fax: _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: J. IAN RAISBECK
Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10
Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799
E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.376.996 Btá
TP 135.799

4

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: DAVID LIGHT, KIRK MCLEAN,
Dirección: 614 South Freemont Street, San Mateo, CA 94402, E.U.A.; y 291 Capricorn
Avenue, Oakland, CA 94611, E.U.A.
Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2003/13522 Fecha Abril 30, 2003

Publicación Internacional No. WO 03/092602 Fecha Noviembre 13, 2003

6

Título (54): NUEVAS PROTEINAS DE FUSION CON TROMBOMODULINA DIRIGIDAS
CONTRA FACTORES TISULARES COMO ANTICOAGULANTES

7

Clasificación Internacional (51) A61K

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
<u>US</u>	<u>1 Mayo 2002</u>	<u>60/376.566</u>
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

9

Comprobante de pago No. 07-100.917

Fecha 12 de Diciembre 2007

2

10

ANEXOS

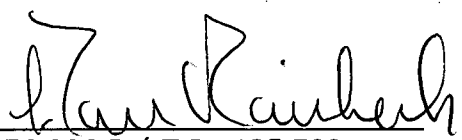
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 07-039.649
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Ver expediente No. 04-118.560
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros. Búsqueda Internacional

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: J. IAN RAISBECK

FIRMA:



C.C. 79.376.996 Btá T.P. 135.799

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-118560- -00009-0000

Fecha: 2007-12-26 16:30:18 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 170

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 100,917
FECHA : DICIEMBRE 12 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	57708169	11/12/2007	6,840,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
0005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

GENERAL INFORMATION CONCERNING THE

RECORDS

OF THE
FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION

U. S. DEPARTMENT OF JUSTICE

NAME OF SUBJECT: _____ DATE OF BIRTH: _____ SEX: _____ RACE: _____

DATE OF DEATH: _____ PLACE OF DEATH: _____ CAUSE OF DEATH: _____

U. S. DEPARTMENT OF JUSTICE

DATE OF BIRTH: _____ PLACE OF BIRTH: _____ SEX: _____ RACE: _____

DATE OF DEATH: _____ PLACE OF DEATH: _____ CAUSE OF DEATH: _____

U. S. DEPARTMENT OF JUSTICE

DATE OF BIRTH: _____ PLACE OF BIRTH: _____ SEX: _____ RACE: _____

DATE OF DEATH: _____ PLACE OF DEATH: _____ CAUSE OF DEATH: _____

4

Certificado de registro según § 21 disposición notarial nacional
(BNotO)

Debido a mi verificación en el registro mercantil del juzgado Charlottenburg del número comercial HRB 283 B el día 27.04.2007 confirmo:

A través de resolución de la Asamblea General del 13.09.2006 Schering Sociedad Anónima ha cambiado la empresa (§ 1 párrafo 1 del reglamento) a Bayer Schering Pharma Sociedad Anónima.

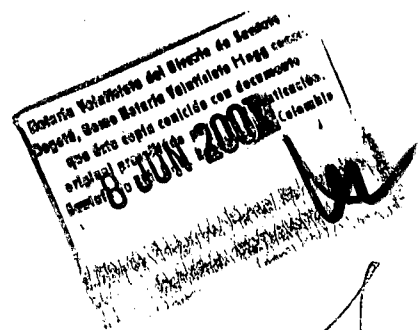
Este cambio entró en vigor el 29.12.2006. La inscripción en el registro mercantil fue efectuada el 20.12.2006.

Berlín, 27. Abril 2007

Firma

Notario

Sello – Dimitri Rempen – Notario en Berlín



A handwritten signature in black ink, appearing to be "Watzke".

Adolf Watzke
Traductor oficial

Res. 2433 Min. Justicia

5

APOSTILLE
(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: República Federal de Alemania

Este documento publico

2. está firmado por Dimitri R E M P E N _____

3. en su calidad de Notario en Berlín _____

4. está proveída con el sello

del Notario _____

confirmado

5. en Berlín

6. el 02.05.2007

7. por el presidente de la audiencia provincial en Berlín

8. bajo el número. 9101 a E-F 2563/07

9. Sello

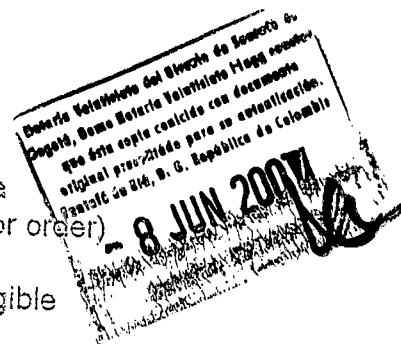
10. Firma
p.o. (por order)

Firma ilegible

Bünning

(jueza presidente de la audiencia provincial)

AVR 95a



Adolf Watzke
Traductor oficial
Res. 2433 Min. Justicia

Apostille
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Dimitri R e m p e n

3. in seiner Eigenschaft als Notar in Berlin

4. sie ist versehen mit dem Siegel

des Notars

Bestätigt

5. in Berlin 6. am 02.05.2007

7. durch den Präsidenten des Landgerichts in Berlin

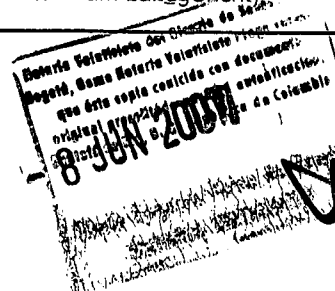
unter Nr. 9101a E-F 2563/07

9. Siegel/
Stempel

10. Unterschrift
Im Auftrage

B ü n n i n g

(Vorsitzende Richterin am Landgericht)



Registerbescheinigung gemäß § 21 BNotO

7

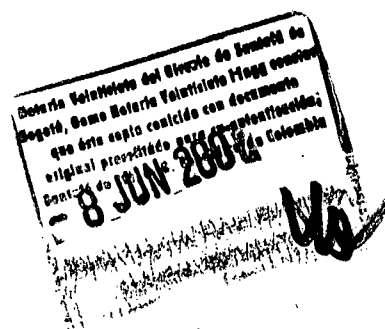
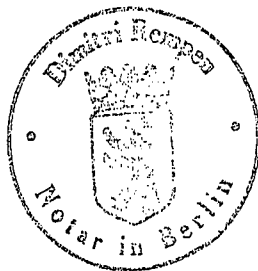
Aufgrund meiner Einsicht in das Handelsregister des Amtsgerichts Charlottenburg zur
Geschäftsnummer HRB 283 B am 27.04.2007 bescheinige ich hiermit:

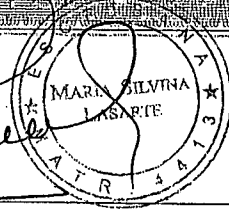
Durch Beschluss der Hauptversammlung vom 13.09.2006 hat die Schering Aktiengesellschaft
die Firma (§ 1 Absatz 1 der Satzung) in Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft geändert.

Die Änderung wurde am 29.12.2006 wirksam. Die Eintragung im Handelsregister erfolgte am
20.12.2006.

Berlin, 27. April 2007

Notar





8

N 007422051

CECBA - LEY404 GCBA
LEG
IZACION
070312117346

13:51:46
\$20.00

CECBA - LEY404 GCBA
APOSTILLA
010312054713

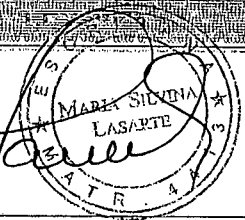
13:51:54
\$39.00

1 FOLIO 85.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: VEINTICUATRO.-
2 SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Dagmar a favor de
3 OLARTE, Carlos Reinaldo y otro del Poder otorgado por BAYER SCHERING
4 PHARMA AG.- En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Capital de la República
5 Argentina, el día NUEVE de MARZO del año DOS MIL SIETE, ante mí María
6 Silvina Lasarte, Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial número 1788,
7 COMPARECE: Dagmar MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968,
8 hija de Walter Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Na-
9 cional de Identidad Número 20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria 27-
10 20383892-7, con domicilio especial en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º,
11 de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es mayor de edad.- INTERVIE-
12 NE: por su propio derecho.- Y la compareciente EXPRESA: PRIMERO: Que la
13 Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con domicilio en Müllerstrasse
14 178, 13353, Berlín, Alemania, le confirió con fecha 22 de enero de 2007 en dicho pa-
15 ís, un Poder, el cual mediante escritura número 14 de fecha 16 de febrero de 2007,
16 otorgada ante la Escribana Mariela Vanina Scardaccione, al folio 44, protocolo co-
17 rriente de este Registro Notarial interinamente a su cargo, fue incorporado y transcrip-
18 to al mismo, cuya primera copia tengo para este acto a la vista, doy fe y en lo perti-
19 nente transcribiré en la presente.- SEGUNDO: Manifiesta bajo juramento que el refe-
20 rido poder se encuentra plenamente vigente en virtud de no haberle sido revocado,
21 suspendido ni limitado en ninguna de sus partes.- TERCERO: En consecuencia, DI-
22 CE: Que en uso de la facultad conferida SUSTITUYE PARCIALMENTE el poder
23 mencionado a favor de Carlos Reinaldo OLARTE y/o James Ian RAISBECK, al
24 solo y único objeto de que en nombre y representación de la Sociedad "BAYER
25 SCHERING PHARMA AG", y actuando en forma individual, indistinta y/o alterna-



N 007422051

damente, se presente exclusivamente ante las autoridades de **COLOMBIA** que co- 26
rrespondan y realicen los actos enumerados en el citado poder y con las facultades que 27
surgen del mismo, el que transcripto en lo pertinente dice: "FOLIO 44.- PRIMERA 28
COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: CATORCE.-- En la Ciudad Autónoma de 29
Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día DIECISÉIS de FEBRERO del 30
año DOS MIL SIETE, ante mí ..., Escribana Autorizante, ..., COMPARECE: Dagmar 31
MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter Messerer y 32
Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Nacional de Identidad Número 33
20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria 27-20383892-7, domiciliada 34
legalmente en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad de Buenos 35
Aires.- La compareciente es mayor de edad.- INTERVIENE: por su propio derecho.- 36
Y la compareciente EXPRESA: Que a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la 37
Autorizante, LA INCORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo del 38
PODER que le fuera conferido en Berlín, Alemania, el 22 de enero de 2007, por la 39
Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con domicilio en Müllerstrasse 178, 4
13353, Berlín, Alemania, sobre cuya plena vigencia responde la requirente bajo jura- 41
mento.- Yo, la Autorizante, hago constar: a) Que el instrumento de poder cuya incor- 42
poración y transcripción a este protocolo solicita la compareciente, se encuentra ex- 43
tendido en idioma castellano, certificadas las firmas por notario en idioma alemán, 44
debidamente legalizado en idioma alemán (Sello de Apostilla de la Convención de La 45
Haya del 5 de octubre de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional por la 46
Traductora Pública Laura Thieberger.- b) Que la compareciente en virtud de lo mani- 47
festado tiene interés legítimo en su requerimiento.- En consecuencia, me hace entrega 48
en este acto del original del instrumento de poder relacionado con su respectiva tra- 49
ducción al idioma nacional, el que agrego a la presente y transcripto dice: "MOE- 50



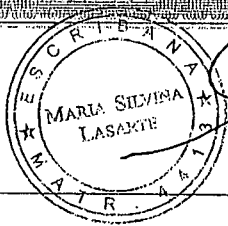
N 007422052

1 LLER & CO. (Sigue aclaración en idioma inglés) - PODER Los abajo firmante/s
2 BAYER SCHERING PHARMA AG domiciliados en Müllerstrasse 178 13353 Berlín
3 - Alemania declaran por el presente otorgar a Dagmar MESSERER poder general am-
4 plio y suficiente para recabar de las autoridades ..., sud y centroamericanas ... que co-
5 rrespondan, la obtención de patentes de invención, el registro y la renovación de mar-
6 cas y modelos y/o derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, a cuyo
7 efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas autoridades todas las gestiones nece-
8 sarias al objeto indicado, presentar solicitudes, formular descripciones, oposiciones,
9 protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, justificar explota-
10 ciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias, recibir documentos y valores, per-
11 cibir y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas de cualquier
12 orden. Por otra parte, les confieren mandato para que en su nombre y representación
13 puedan iniciar y proseguir cualquier juicio que actualmente los que suscriben tengan o
14 en el futuro tuvieran ..., en Sudamérica, Centroamérica ..., con motivo de su nombre,
15 marcas de fábrica o de comercio, patentes de invención y modelos y/o de sus derechos
16 de propiedad intelectual que actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover
17 juicios de cualquier jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales,
18 contra los falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos
19 que infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por oposi-
20 ción u otros en que fueran parte como actores o demandados, defender el nombre, las
21 marcas, patentes y modelos y/o de derechos de propiedad intelectual y/o nombres de
22 dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto, podrán pre-
23 sentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier auto-
24 ridad judicial, presentar testigos, documentos y demás justificativos, rendir pruebas de
25 cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver posiciones, asistir



N 007422052

a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, recusar, apelar, transar, 26
someter a arbitraje o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar cauciones, pedir embar- 27
gos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, pedir la venta de los 28
bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de sentencias, prestar ju- 29
ramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en general practicar 30
todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este mandato. Podrán 31
asimismo substituir el presente poder en todo o en parte.- Dado y firmado en Berlín 32
(Sigue fecha en idioma inglés). Bayer Schering Pharma AG (Sigue texto en idioma 33
inglés). ppa. Sigue una firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Noeske-Jungblut. ppa. Sigue 34
otra firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Klose". ES COPIA FIEL, doy fe.- En hoja adjunta 35
consta la certificación notarial de las firmas obrantes en el poder en idioma alemán, 36
efectuado el 22 de enero de 2007 por el Escribano Dimitri Rempen, de Berlín, Alema- 37
nia, y a continuación consta la respectiva legalización de la firma y sello del nombra- 38
do Notario (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 39
1961), en idioma alemán, efectuado por el Presidente del Tribunal Regional de Berlín, 40
Alemania.- En hojas adjuntas sigue la referida traducción al idioma nacional la que 41
transcripta textualmente, dice: "TRADUCCIÓN PUBLICA - (Sobre papel con mem- 42
brete de "MOELLER y CO" - América Latina - Agentes de la Propiedad Intelectual - 43
figura un Poder otorgado por la Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con 44
sede en Berlín, Alemania, redactado en idioma nacional, luego del que aparecen los 45
siguientes textos, que traducidos dicen:) "BAYER SCHERING PHARMA AG" - 46
Patentes y licencias - (Firmado y Aclarado:) pp Dr. Noeske-Jungblut - pp (Firmado y 47
Aclarado:) Dr. Klose.- La versión en inglés es para su información únicamente.- Re- 48
gistro de Actas N° R 17/2007.- Me he referido a la prohibición de intervención según 49
el artículo 3, párrafo 1, N° 7, de la Ley de Certificaciones. Mi pregunta de si ha existi- 50



[Handwritten signature]

N 007422053

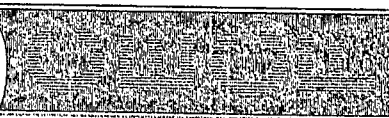
10

do una intervención previa en el sentido de la norma me fue contestaba por la negati-
va.- Las firmas trazadas ante mi por el Dr. Walter Klose, que nació el 26 de diciembre
de 1952, y de la Dra. Chistiane Noeske-Jungblut de soltera Noeske, que nació el 26 de
junio de 1957 – Ambos de mi personal conocimiento – Ambos con domicilio comer-
cial en 13353 Berlín, Müllerstrasse 178 son auténticas, de lo que doy fe.- Al mismo
tiempo certifico en base a que tuve a la vista en el día de hoy las actas del Registro de
Comercio del Tribunal de Primera Instancia de Charlottenburg, N° de Registro HR B
28 que la Sociedad “Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft”, con sede en Ber-
lín, está inscripta con el número mencionado arriba en el Registro de Comercio y que
la arriba mencionada Dra. Noeske-Jungblut y el arriba mencionado Dr. Walter Klose
están facultados en su carácter de mandatarios a representar en forma conjunta a la
Sociedad “Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft” de Berlín. Berlín, 22 de enero
de 2007.- El escribano (firma ilegible) y liquidación de derechos. (Hay un sello en
oblea sobre precinto:) Dimitri Rempen, Escribano de Berlín.- 9101ª E-F.- APOSTI-
LLA – (Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961) - País: República Federal
de Alemania - Este instrumento público fue firmado por Dimitri Rempen, actuando en
su carácter de escribano de Berlín, estando provisto del sello del escribano.- Certifica-
do en Berlín, el 24 de enero de 2007, por el Presidente del Tribunal Regional de Ber-
lín, con el N° 9101 a E-F 536/07 - Sello (hay un sello:) el Presidente del Tribunal Re-
gional de Berlín – Firma el Funcionario autorizado (firmado y aclarado:) Holldorf –
Juez Principal del Tribunal Regional.- ES TRADUCCIÓN FIEL de las partes perti-
nentes en los idiomas alemán e inglés del documento que se acompaña, que he vertido
al idioma nacional, en Buenos Aires, a 6 de febrero de 2007.- Hay una firma ilegible.
Hay un sello que dice: “LAURA THIEBERGER – MATRÍCULA DE TRADUCTO-
RES ALEMÁN – FRANCÉS – Tomo II Folio 254 (Cap.) Tomo III – 98 – (La Plata) –



N 007422053

INGLÉS – Tomo III: Folio 14 (Cap.) – Tomo III Folio 329 (La Plata) – COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS N° 173”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- A continuación hay un sello que dice: “COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES Corresponde a la Legalización N° T4-3278/07. Sigue una firma ilegible: Esteban Santiago Allegretti”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- Al dorso en el margen superior hay un sello timbrador ...”.- A continuación sigue la legalización de la firma de la nombrada traductora, ...”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- En este estado la compareciente DICE: que en la forma expresada deja INCORPORADO y TRANSCRIPTO en este Protocolo el Poder que agrego a la presente, solicitando de mí, la Escribana Autorizante, expida primera copia de la presente para la nombrada apoderada Dagmar MESSERER.- Constancias Notariales: Identidad de la compareciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de la Autorizante.- ...- LEO esta escritura a la compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad, la firma ante mí, doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARIELA VANINA SCARDACCIONE. Escribana. Está mi sello. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 44 del Registro Notarial número 1788, interinamente a mi cargo.- PARA LA APODERADA expido la presente PRIMERA COPIA en tres (3) sellos de actuación notarial numerados correlativamente desde el número N 007376153 al presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.- Sigue una firma ilegible y un sello que dice: Mariela V. Scardaccione – Escribana – Mat. 4527.”.- **ES COPIA FIEL**, de las partes pertinentes de la escritura de referencia, doy fe.- **CUARTO**: Finalmente la compareciente expresa: a) Que el presente otorgamiento no significa renunciar al ejercicio de las facultades sustituidas; y b) Que los nombrados apoderados sustitutos no podrán sustituir el presente poder en ninguna de sus partes.- Constancias Notariales: Identidad de la Compare-



N 007422054

1 ciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de
2 la Autorizante.-Yo, la Escribana Autorizante impongo y advierto a la compareciente, a
3 tenor de lo dispuesto en el artículo 77 inciso h) de la Ley Orgánica Notarial Número
4 404, respecto de los alcances y consecuencias de las cláusulas contenidas en la presen-
5 te escritura y del derecho de leer por sí este instrumento.- LEO esta escritura a la
6 compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad la firma ante mí, doy
7 fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARIA SILVINA LASARTE. Escribana. Está
8 ni o. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 85 del Re-
9 gistro Notarial número 1788, a mi cargo. PARA LA PODERDANTE expido la pre-
10 sente **PRIMERA COPIA** en cuatro (4) sellos de actuación notarial numerados corre-
11 lativamente desde el número N 007422051 al presente inclusive, que sello y firmo en
12 la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.-

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

[Handwritten signature]



N 007422054

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50



12

L 007495419

COLEGIO DE ESCRIBANOS
CIUDAD DE BUENOS AIRES
CAPITAL FEDERAL - REPUBLICA ARGENTINA

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, **LEGALIZA** la firma y sello del escribano **MARIA SILVINA LASARTE** obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° **070312117346/0**. La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Lunes 12 de Marzo de 2007

[Handwritten signature]

ESC. EDDA ENRIQUETA SINELLI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

CONSEJERO

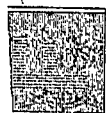


APOSTILLE

REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00115229



13

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por EDDA ENRIQUETA SINELLI

3. Quien actúa en calidad de CONSEJERA

4. Lleva el sello / timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS

AIRES

5. En LA CIUDAD DE BUENOS AIRES 6. El día 12/03/2007

7. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

ajo el número: 070312054713

10. Sello / timbre
BA. LOS
CIUDAD de
OS AIRES



10. Firma

SECRETARIO P. ROVARO
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 November 2003 (13.11.2003)

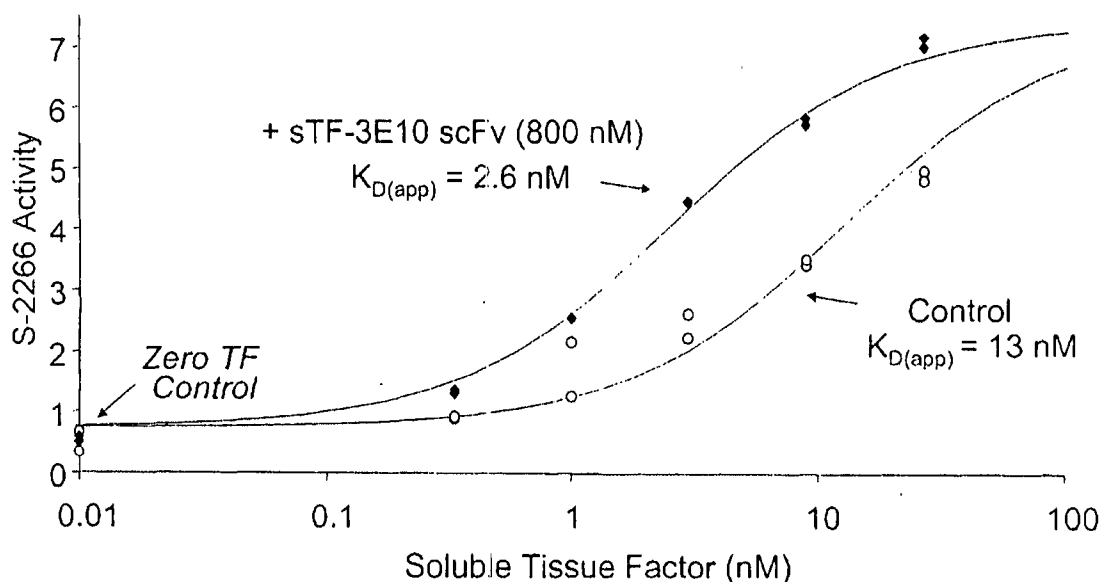
PCT

(10) International Publication Number
WO 03/092602 A2

- (51) International Patent Classification⁷: **A61K**
- (21) International Application Number: PCT/US03/13522
- (22) International Filing Date: 30 April 2003 (30.04.2003)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/376,566 1 May 2002 (01.05.2002) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; D-13342 Berlin (DE).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **LIGHT, David** [US/US]; 614 South Freemont Street, San Mateo, CA 94402 (US). **MCLEAN, Kirk** [US/US]; 291 Capricorn Avenue, Oakland, CA 94611 (US).
- (74) Agents: **ZELANO, Anthony, J.** et al.; Millen, White, Zelano & Branigan, P.C., Arlington Courthouse Plaza I, Suite 1400, 2200 Clarendon Boulevard, Arlington, VA 22201 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL TISSUE FACTOR TARGETED THROMBOMODULIN FUSION PROTEINS AS ANTICOAGULANTS



(57) Abstract: This invention relates to novel fusion proteins which are comprised of a targeting protein that binds tissue factor (TF), which is operably linked to the thrombomodulin (TM) EGF456 domain alone or in combination with at least one other TM domain selected from the group consisting of the N-terminal hydrophobic region domain, the EGF123 domain, the interdomain loop between EGF3 and EGF4, and the O-glycosylated Ser/Thr-rich domain, or analogs, fragments, derivatives or variants thereof. The fusion protein binds at the site of injury and prevents the initiation of thrombosis. The fusion protein can be used to treat a variety of thrombotic conditions including but not limited to deep vein thrombosis, disseminated intravascular coagulation, and acute coronary syndrome.

WO 03/092602 A2



For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

15

NOVEL TISSUE FACTOR TARGETED THROMBOMODULIN FUSION PROTEINS AS ANTICOAGULANTS

16

BACKGROUND

Maintaining the proper balance between procoagulant and anticoagulant activity within blood vessels is essential for normal hemostasis (Davie, E.W. *et al.* (1991) *Biochemistry*, 30(43):10363-10370). Perturbing the balance toward coagulation leads to thrombosis, which can cause heart attack, stroke, pulmonary embolism, and venous thrombosis. There is a need for more effective and safer anticoagulants for the treatment of specific thrombotic disorders.

Tissue factor ("TF") is a transmembrane glycoprotein that is the major initiator of the coagulation cascade (Nemerson, Y. (1995) *Thromb. Haemost.* 74(1):180-184). Under normal physiological conditions active TF is not in contact with blood. During vascular injury, exposure to blood of subendothelial TF and collagen leads to activation of coagulation factors and platelets and subsequently to hemostatic plug formation. The inappropriate induction of TF expression in a variety of clinical settings can lead to life threatening thrombosis and/or contribute to pathological complications. TF exposure following plaque rupture is believed to be responsible for thrombotic occlusion leading to acute myocardial infarction and stroke. In these settings, proinflammatory signaling pathways activated by coagulation factors also contribute to edema formation and increased infarct size. Vascular injury associated with angioplasty leads to upregulation of TF on SMC's which is believed to induce cell signaling pathways associated with restenosis. TF overexpression in cancer and gram-negative sepsis leads to life threatening thrombosis and activation of inflammatory pathways.

The factor VIIa ("FVIIa")/TF complex is involved in the pathogenic mechanism in a variety of thrombotic diseases and the circulating level of TF is a risk factor for certain patients. FVIIa and TF play unique roles in vascular injury in maintaining hemostasis and initiating thrombosis. TF is expressed in the adventitia normally, but is upregulated and expressed inappropriately in the media and neointima in vascular disease. TF expression in atherosclerotic plaques is increased and shielded from the blood by a thin fibrous cap that may

17

rupture to expose TF. Surgical interventions such as balloon angioplasty, stenting, or endarterectomy damage the vessel wall and expose underlying TF. In the atherosclerotic, lipid-rich, thin-walled plaque, spontaneous rupture or endothelial erosion leads to TF exposure and thrombosis, resulting in unstable angina and myocardial infarction. TF can circulate in cell derived microparticles and circulating TF levels are elevated in unstable angina suggesting that this circulating TF may contribute to thrombus formation (Soejima, H. *et al.* (1999) *Circulation* 99(22):2908-2913). Often cancer is associated with a hypercoagulable state attributed to overexpression of TF on tumor cells. This predisposes the patient to deep vein thrombosis, pulmonary embolism and low grade disseminated intravascular coagulation ("DIC"). DIC results in microvascular fibrin deposition contributing to multi-organ failure. Results from acute arterial injury models of thrombosis indicate that protein based inhibitors of FVIIa/TF, such as active site inhibited factor VIIa ("FVIIai") and tissue factor pathway inhibitor ("TFPI"), are effective antithrombotics with less bleeding compared to thrombin and factor Xa ("FXa") inhibitors. In addition, FVIIa/TF inhibition is superior to other anticoagulants (e.g., heparin, FXa inhibitors) in preventing neointimal thickening and vascular stenosis following balloon injury Jang, Y. *et al.* (1995) *Circulation* 92(10):3041-3050).

Thrombomodulin ("TM") is a transmembrane glycoprotein that has anticoagulant properties and is predominantly expressed on the luminal surface of endothelial cells lining blood vessels (Esmon, N.L. *et al.* (1982) *J. Biol. Chem.* 257(2):859-864; Salem, H.H. *et al.* (1983) *J. Biol. Chem.* 259(19):12246-12251). The mature, full length TM is a 557 amino acid residue modular protein composed of 5 structural domains: an N- terminal, hydrophobic region (residues 1-226); a cysteine-rich region (residues 226-462); a O-glycosylated Ser/Thr-rich region (residues 463-497); a hydrophobic transmembrane region (residues 498-521); and a C-terminal cytoplasmic tail (residues 522-557).

The cysteine-rich region includes six repeated structures homologous to epidermal growth factor ("EGF") precursor, called EGF-like, EGF-homology or EGF domains. The cysteine-rich region can be further divided into 3 domains: the EGF-like repeats 1, 2 and 3 ("EGF123", residues 226-344), the interdomain loop between EGF3 and EGF4 (residues 345-349), and the EGF-like domains 4, 5 and 6 ("EGF456", residues 350-462). The function of EGF456 is to mediate thrombin binding and protein C activation. One study has suggested that the fifth and sixth EGF-like repeats ("EGF5", residues 390-407, and "EGF6", residues 427-462, respectively) have the capacity to bind thrombin (Kurosawa, S. *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.*

263(13):5993-5996); another suggests the EGF456 domain is sufficient to act as cofactor for thrombin-mediated protein C activating activity (Zushi, M. *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264(18):10351-10353). The Ser/Thr-rich domain enhances EGF456-mediated thrombin binding. The third EGF-like repeat ("EGF3", residues 311-344) is required for the activation of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor ("TAFI"). Several point mutants in EGF3 have been described that interfere with the activation of TAFI (Wang, W. *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275(30):22942-22947). The thrombin/TM complex converts protein C to activated protein C ("APC"), which in turn degrades factors Va and VIIIa, thereby preventing further thrombin generation. Therefore, TM functions as a molecular switch converting thrombin from a procoagulant to an anticoagulant.

The K_m of protein C for the thrombin/TM complex is reduced 10-fold when TM is localized to a membrane surface (Esmon, C.T. (1995) *FASEB J.* 9(10):946-955). The concentration of protein C in blood (0.065 μM) is significantly below the reported K_m (5 μM) for the soluble TM/thrombin complex, therefore establishing that TM on the procoagulant membrane surface will result in a marked local enhancement of the rate of protein C generation.

TM inhibits thrombosis by a different mechanism from heparin or its derivatives. Heparin is a cofactor for antithrombin III and inhibits both FXa and thrombin through an antithrombin III-dependent mechanism. Thrombus-bound thrombin is protected from the action of antithrombin III, which limits the antithrombotic efficacy of heparin or low molecular weight heparin ("LMWH") on preexisting clots. This explains the failure of heparin or LMWH to inhibit thrombus growth triggered by clot-bound thrombin or prothrombinase in non-human primate studies. In contrast, recombinant TM attenuates clot induced thrombin generation and fibrin formation in a dose dependent manner (Mohri, M. *et al.* (1998) *Thromb. Haemost.* 80(6):925-929). The inhibitory effect of TM is abolished by anti-protein C antibody. Inhibiting clot-bound procoagulant activity is clinically relevant because clot-bound procoagulant activity results in more rapid thrombus growth and ultimately in vascular occlusion or thromboembolic complications. Inhibition of thrombus growth allows the endogenous fibrinolytic systems to remove clots more rapidly and completely. In addition, TM is also expected to be more effective than heparin in pathological conditions where plasma antithrombin is depleted, such as DIC. While both TM and heparin inhibit platelet and fibrinogen consumption in experimental DIC, only TM was effective when antithrombin III levels were depleted.

18

SUMMARY OF THE INVENTION

19

The present invention provides novel fusion proteins, which act as anticoagulants, and comprise a targeting protein, that interacts with either tissue factor ("TF") or the factor VIIa/tissue factor ("FVIIa/TF") complex, which is operably linked to the thrombomodulin ("TM") EGF456 domain alone or in combination with at least one other TM domain selected from the group consisting of the N-terminal hydrophobic region domain, the EGF123 domain, the interdomain loop between EGF3 and EGF4, and the O-glycosylated Ser/Thr-rich domain, or analogs, fragments, derivatives or variants thereof.

The anticoagulant fusion protein of this invention targets and binds TF or the FVIIa/TF complex at the site of injury, localizing TM to the injury site, and thus preventing thrombus formation and thereby performing more effectively as an anticoagulant compared to either a soluble anti-TF antibody or soluble TM or fragments of TM. The fusion protein is more effective than low molecular weight heparin ("LMWH") in the treatment of certain diseases including but not limited to sepsis, disseminated intravascular coagulation, ischaemic stroke, deep vein thrombosis, acute coronary syndromes, thrombotic complications following angioplasty, and coagulopathy in advanced cancer. Further, the fusion protein has use in microvascular surgery, skin and vein grafts and organ transplants.

In another aspect, the invention provides pharmaceutical compositions including the subject fusion proteins.

In another aspect, the invention provides for a method of protecting a patient against thrombus formation comprising administering a therapeutically effective amount of the fusion protein to said patient, and thereby inhibiting the generation of thrombin without directly affecting other coagulation parameters such as the activation and aggregation of platelets.

In another aspect, the invention relates to a method for preventing and treating deep vein thrombosis ("DVT") or disseminated intravascular coagulation ("DIC") or acute coronary syndrome or cancer with evidence of coagulopathy in a patient comprising administering a therapeutically effective amount of the fusion protein to said patient.

In another aspect, the invention relates to a method for regulating the inflammatory response in a patient comprising administering a therapeutically effective amount of the fusion protein to said patient.

20

In yet another aspect, the fusion protein of the invention can be used to form a non-thrombogenic coating on the surface of medical devices contacting blood.

In another aspect, the invention relates to a kit comprising a fusion protein comprising a targeting protein, that binds TF or the FVIIA/TF complex, and TM domains. Alternately, the kit may comprise DNA sequences encoding the fusion protein components.

Also disclosed are methods of making the fusion proteins of the invention, both recombinant and synthetic.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1. Binding of scFv(TF)3e10 to sTF increases the apparent affinity of sTF for FVIIa. The sTF/FVIIa activation assay was performed as described under Example 5 entitled "sTF/FVIIa activation assay" using 2 nM FVIIa in the presence and absence of 800 nM scFv(TF)3e10. The sTF was titrated into the assay and the rate of cleavage of the chromogenic substrate (S-2266) was determined. The K_D apparent for sTF was calculated using a standard 4-parameter fit.

Figure 2. Measurement of binding affinity of scFv(TF)3e10 for sTF. The sTF/FVIIa assay was as described under Example 5 entitled "sTF/FVIIa activation assay" using 3 nM sTF and 2 nM FVIIa. The concentration of sTF used was below the K_D for binding to FVIIa. Binding of the scFv(TF)3e10 antibody reduced the K_D of sTF for binding to FVIIa, leading to increased formation of the sTF/FVIIa complex and, therefore, the rate of cleavage of the chromogenic substrate S2266. ScFv(TF)3e10 was added at increasing concentrations and the increased rate of reaction was used to determine the K_D apparent of the antibody for sTF using a standard 4-parameter fit.

Figure 3. Microcalorimetry analysis shows scFv(TF)3e10 has a 20-fold higher affinity for the sTF/FVIIa complex than sTF alone. Isothermal titration calorimetry was performed using a MicroCal VP-ITC instrument. The sTF/FVIIa complex was preformed by adding a 2.3 fold molar excess of FVIIa to sTF. Size exclusion chromatography was used to verify that the sTF was completely complexed. For determination of the antibody affinity for the complex, 1.2 μ M sTF/FVIIa complex was added to the microcalorimeter cell and 65 μ M scFv(TF)3e10 antibody was added to the syringe. For determination of the antibody affinity for sTF alone, 10 μ M sTF was added to the cell and 141 μ M scFv(TF)3e10 was added to the syringe. Data analysis was done using MicroCal Origin software. The data was fit to a single binding site.

21

Figure 4. scFv(TF)3e10 dose dependently inhibits the FX activation assay. The details of this assay are described under Example 5 entitled "Factor X activation assay". The IC_{50} represents the dose required to reach 50% maximum inhibition.

Figure 5. The fusion protein more potently inhibits coagulation than TF antibody or TMI456 alone. A prothrombin time (PT) assay was performed to compare the fusion protein with TF antibody or TMI456 alone. An appropriate volume of concentrated inhibitor, either TF antibody (scFv(TF)3e10), TMI456, or fusion (scFv(TF)3e10-TMI456), was added to 100 μ l of recombinant human thromboplastin (Ortho Recombiplastin). Approximately 2 minutes later 100 μ l reconstituted human plasma was added. Coagulation time was determined in a Haemoliance Coagulometer. Dose response curves were generated for each inhibitor and then regression analysis was used to calculate the concentration (in nM) necessary for a two-fold extension of the clotting time.

Figure 6. The fusion protein retains full cofactor activity for the activation of protein C. The assay described under Example 5 entitled "Protein C activation assay (chromogenic)" contained 0 μ l TM sample, either TMI456, which contains the EGF domains 4-6 and the interdomain loop between EGF3 and EGF4, or fusion (scFv(TF)3e10-TMI456), 20 μ l 1.5 μ M protein C, and 20 μ l 3 nM alpha thrombin. Activation was allowed to proceed for 1 hour. The activation phase was stopped by adding 20 μ l 0.16 u/ml hirudin. 100 μ l of 1 mM S2266 was then added and the A405 determined every 10 seconds for 30 minutes. The rate of reaction is dependent on the amount of activated protein C generated. Data is expressed in mOD/min.

Figure 7. The rate of protein C activation by the fusion protein is enhanced on TF-containing phospholipid surfaces. The rate of protein C activation by TMI456 is not affected by the addition of TF vesicles. The assay described under Example 5 entitled "Protein C activation assay (on TF-rich surface)" contained 20 μ l TM sample, either TMI456 or fusion (scFv(TF)3e10-TMI456), 20 μ l of 1.5 μ M protein C, 20 μ l of 3 nM alpha thrombin, and 20 μ l of buffer or TF vesicles (Innovin, human recombinant TF, 4X normal concentration for PT). Activation was allowed to proceed for 1 hour. The activation phase was stopped by adding 20 μ l 0.16 u/ml hirudin. 100 μ l of 1 mM S2266 was then added and the A405 determined every 10 seconds for 30 minutes. The rate of reaction is dependent on the amount of activated protein C generated. Data is expressed in mOD/min.

Figure 8. The fusion protein shows greater specificity for TF-induced coagulation than TMI456. The activated partial thromboplastin time (APTT) assay is sensitive to inhibitors of the intrinsic and central pathways of coagulation. Coagulation that occurs in this assay is independent of TF. The inhibitors, either TF antibody (scFv(TF)3e10), TMI456, or fusion (scFv(TF)3e10-TMI456), were diluted into 50 μ l reconstituted human plasma to a final concentration that gave a two-fold extension in the PT assay. The coagulometer then added 50 μ l of APTT (Alexin HS) reagent and 50 μ l of CaCl_2 reagent (0.02 mol/L) and determined the clotting time in seconds.

Figure 9. The fusion protein more potently inhibits TF-induced whole blood coagulation than either of its components alone. Whole blood coagulation was analyzed using a Haemoscope Thromboelastograph (TEG) analyzer. To citrated whole blood, 120 nM of TF antibody (scFv(TF)3e10), TMI456, or fusion (scFv(TF)3e10-TMI456) was added along with 10 μ l of a thromboplastin reagent (1:64 dilution) and 20 μ l of 0.2M CaCl_2 . The R-value (time to initial fibrin formation) was obtained for each sample. This value was then converted to a % uninhibited control R-value.

Figure 10. The fusion protein shows a more predictable dose response than LMWH in a whole blood coagulation assay (TEG). To citrated whole blood, increasing concentrations (15 nM starting and increased by 2X increments) of fusion (scFv(TF)3e10-TMI456), or increasing concentrations (0.15 u/ml starting and increased by 2X) of enoxaparin (LMWH), were added along with 10 μ l of a thromboplastin reagent (1:64 dilution) and 20 μ l of 0.2M CaCl_2 . The R-value (time to initial fibrin formation) was obtained for each sample and plotted versus relative

concentration (set the lowest concentration as 1 for each (similar R-value), then increase subsequent concentrations 2X).

Figure 11. The fusion protein scFv(TF)3e10-TMi456 is efficacious in an *in vivo* model of disseminated intravascular coagulation ("DIC"). TF antibody (scFv(TF)3e10) and fusion (scFv(TF)3e10-TMi456) were evaluated in the rat thromboembolism model described in Example 8 for (A) percent mortality and (B) morbidity-mortality score. (A) In the vehicle-treated group, the dose of TF used resulted in 60% lethality (LD₆₀). scFv(TF)3e10-TMi456 at 0.7 nmol/kg completely prevented death. In contrast, scFv(TF)3e10 at 0.7 nmol/kg had no impact on death. scFv(TF)3e10-TMi456 was more efficacious than a 10-fold higher dose of scFv(TF)3e10. (B) In the vehicle-treated group, the *in vivo* dose of TF resulted in an average morbidity-mortality score of 2.6, based on the following scoring system: 0 = unaffected; 1 = mild respiratory distress (recover within 30 min); 2 = severe respiratory distress (moribund, recovery required more than 60 min); and 3 = death. scFv(TF)3e10-TMi456 dose-dependently prevented TF induced death and respiratory distress with an ED₅₀ value of 0.46 nmol/kg (0.019 mg/kg). scFv(TF)3e10-TMi456 at 7.0 nmol/kg completely prevented both death and respiratory distress, and at 0.7 nmol/kg completely prevented death and significantly reduced respiratory distress. In contrast, scFv(TF)3e10 at 0.7 nmol/kg had no impact on death and little or no effect on respiratory distress. scFv(TF)3e10-TMi456 was more efficacious than a 10-fold higher dose of scFv(TF)3e10.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The anticoagulant fusion protein of the present invention is comprised of a targeting protein that interacts with either tissue factor ("TF") or the factor VIIa/tissue factor ("FVIIa/TF") complex, which is operably linked to the thrombomodulin ("TM") EGF456 domain alone or in combination with at least one other TM domain selected from the group consisting of the N-terminal hydrophobic region domain, the EGF123 domain, the interdomain loop between EGF3 and EGF4, and the O-glycosylated Ser/Thr-rich domain, or analogs, fragments, derivatives or variants thereof.

Definitions:

In describing the present invention, the following terms are defined as indicated below.

24

"Recombinant proteins or polypeptides" refer to proteins or polypeptides produced by recombinant DNA techniques, i.e., produced from cells, microbial or mammalian, transformed by an exogenous DNA construct encoding the desired polypeptide. Proteins or polypeptides expressed in most bacterial cultures will be free of glycan. Proteins or polypeptides expressed in yeast may have a glycosylation pattern different from that expressed in mammalian cells.

"Native" proteins or polypeptides refer to proteins or polypeptides recovered from a source occurring in nature. The term "native TM" would include naturally occurring TM and fragments thereof.

A DNA "coding sequence" is a DNA sequence which is transcribed into mRNA and translated into a polypeptide in a host cell when placed under the control of appropriate regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence are determined by a start codon at the 5' N-terminus and a translation stop codon at the 3' C-terminus. A coding sequence can include prokaryotic sequences, cDNA from eukaryotic mRNA, genomic DNA sequences from eukaryotic DNA, and synthetic DNA sequences. A transcription termination sequence will usually be located 3' to the coding sequence.

"Fusion protein" is a protein resulting from the expression of at least two operatively linked heterologous coding sequences. The fusion protein of this invention is comprised of a targeting protein that interacts with either TF or the FVIIa/TF complex, which is operably linked to the thrombomodulin ("TM") EGF456 domain alone or in combination with at least one other TM domain selected from the group consisting of the N-terminal hydrophobic region domain, the EGF123 domain, the interdomain loop between EGF3 and EGF4, and the O-glycosylated Ser/Thr-rich domain, or analogs, fragments, derivatives or variants thereof.

"Targeting protein" is a protein that binds to or interacts with another protein or a protein complex. The targeting protein of this invention is a protein that binds to or interacts with TF or the FVIIa/TF complex. For example, an anti-TF or anti-FVIIa/TF complex antibody, is a targeting protein of this invention. Two other examples of targeting proteins are active site inhibited factor VIIa ("FVIIai"), which can bind TF to form an inactive FVIIai/TF complex, and tissue factor pathway inhibitor ("TFPI"), which can bind to and inactivate the FVIIa/TF complex.

"Nucleotide sequence" is a heteropolymer of deoxyribonucleotides (bases adenine, guanine, thymine, or cytosine). DNA sequences encoding the fusion proteins of this invention can be assembled from synthetic cDNA-derived DNA fragments and short oligonucleotide linkers to provide a synthetic gene that is capable of being expressed in a recombinant expression vector. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5' to 3' direction along the nontranscribed strand of cDNA. 

"Recombinant expression vector" is a replicable DNA construct used either to amplify or to express DNA encoding the fusion proteins of the present invention. An expression vector contains DNA control sequences and a coding sequence. DNA control sequences include promoter sequences, ribosome binding sites, polyadenylation signals, transcription termination sequences, upstream regulatory domains and enhancers. Recombinant expression systems as defined herein will express the fusion proteins upon induction of the regulatory elements.

"Transformed host cells" refer to cells that have been transformed and transfected with exogenous DNA. Exogenous DNA may or may not be integrated (covalently linked) to chromosomal DNA making up the genome of the cell. In prokaryotes and yeast, for example, the exogenous DNA may be maintained on an episomal element, such as a plasmid or stably integrated into chromosomal DNA. With respect to eukaryotic cells, a stably transformed cell is one in which the exogenous DNA has become integrated into the chromosome replication. This stability is demonstrated by the ability of the eukaryotic cell lines or clones to produce a population of daughter cells containing the exogenous DNA

"Thrombomodulin (TM)" refers to an endothelial cell surface glycoprotein that forms a high affinity complex with thrombin. The genes encoding native TM (both its genomic form and as cDNA) have been isolated and sequenced from bovine and human (Jackman, R.W. *et al.* 1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(23):8834-8838 and Jackman, R.W. *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(18):6425-6429, both of which are herein incorporated by reference). The sequences for bovine, human and mouse TM exhibit a high degree of homology with one another. The cDNA of human TM encodes a 60.3 kDa protein of 575 amino acids, including a signal sequence of about 18 amino acids, see e.g., U.S. Patent 5,827,824.

26

When thrombin binds to TM there may be one thousand-fold or more increase in the activation rate of protein C which forms the anticoagulant enzyme activated protein C. In addition, when thrombin is bound to TM, thrombin no longer works as a procoagulant enzyme. Specifically, thrombin-catalyzed fibrin formation, factor V activation, and platelet activation, are all inhibited in the presence of TM. Thus, TM converts thrombin into a physiological anticoagulant.

"Thrombomodulin (TM) domain" refers to a discrete amino acid sequence that can be associated with a particular function or characteristic of TM, such as a characteristic tertiary structural unit. The full-length TM gene encodes a precursor or pro-polypeptide containing the following domains: amino acids -18--1 is the signal sequence; amino acids 1-226 is the N-terminal hydrophobic region; amino acids 227-462 is the cysteine-rich region; consisting of 6 tandem EGF-like repeats joined by small interdomain peptides or loops; amino acids 463-497 is an O-glycosylated Ser/Thr-rich region; amino acids 498-521 is a hydrophobic transmembrane region; and amino acids 522-557 is the C-terminal cytoplasmic tail. The cysteine-rich region can be further divided into 3 domains: amino acids 226-344 is EGF123, consisting of the EGF-like repeats 1, 2 and 3 (residues 226-344); amino acids 345-349 is the interdomain loop between EGF3 and EGF4; and amino acids 350-462 is EGF456, consisting of the EGF-like domains 4, 5 and 6. See e.g., Yost, C.S. *et al.* (1983) *Cell* 34(3):759-766; Wen, D.Z. *et al.* (1987) *Biochemistry* 26(14):4350-4357; and Wang, W. *et al.* (2000), *supra*, all of which are incorporated herein by reference.

The terms "analog", "fragment", "derivative", and "variant", when referring to the fusion proteins of this invention, as well as the targeting proteins and the TM domain(s), means analogs, fragments, derivatives, and variants of the fusion proteins, targeting proteins and TM domain(s) which retain substantially the same biological function or activity, as described further below.

An "analog" includes a pro-polypeptide which includes within it, the amino acid sequence of the fusion protein of this invention. The active fusion protein of this invention can be cleaved from the additional amino acids that complete the pro-fusion protein molecule by natural, *in vivo* processes or by procedures well known in the art such as by enzymatic or chemical cleavage. For example, native TM is naturally expressed as a 575 amino acid pro-

polypeptide which is then processed *in vivo* to release the 557 amino acid active mature polypeptide.

27

A "fragment" is a portion of the fusion protein, targeting protein or TM domain(s) which retains substantially similar functional activity, as shown in the *in vitro* assays disclosed herein as described further below.

A "derivative" includes all modifications to the fusion protein which substantially preserve the functions disclosed herein and include additional structure and attendant function, e.g., PEGylated fusion proteins which have greater half-life, O-glycosylated fusion proteins modified by the addition of chondroitin sulfate, and biotinylated fusion proteins; as described further below.

"Substantially similar functional activity" and "substantially the same biological function or activity" each means that the degree of biological activity that is within about 30% to 100% or more of that biological activity demonstrated by the polypeptide to which it is being compared when the biological activity of each polypeptide is determined by the same procedure or assay. For example, a fusion protein or TM domain(s) that has substantially similar functional activity to the fusion protein of Example 2 (SEQ ID NO:2) is one that, when tested in the protein C activation assay (chromogenic) described in Example 5, demonstrates accumulation of activated protein C. A targeting protein that has substantially similar functional activity to the anti-TF antibody of Example 1 (SEQ ID NO:1) is one that, when tested in the sTF/FVIIa assay or FX activation assays described in Example 5, demonstrates the ability to bind to or neutralize TF or the FVIIa/TF complex.

"Similarity" between two polypeptides is determined by comparing the amino acid sequence and its conserved amino acid substitutes of one polypeptide to the sequence of a second polypeptide. Such conservative substitutions include those described above in *The Atlas of Protein Sequence and Structure* 5 by Dayhoff (1978) and by Argos (1989) *EMBO J.* 8:779-785. For example, amino acids belonging to one of the following groups represent conservative changes:

-Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr;

-Cys, Ser, Tyr, Thr;

-Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe;

-Lys, Arg, His;
-Phe, Tyr, Trp, His; and
-Asp, Glu.



All other technical terms used herein have the same meaning as is commonly used by those skilled in the art to which the present invention belongs.

Targeting Protein:

The targeting protein of this invention is a protein that has the ability to specifically bind to a particular preselected target molecule, e.g., TF or the FVIIa/TF complex, and then serves to direct the fusion protein to a cell or tissue bearing the preselected target molecule.

In one embodiment of this invention, the targeting protein is an antibody that can bind to and neutralize TF or the FVIIa/TF complex. "Antibody" as used herein includes intact immunoglobulin ("Ig") molecules, as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, and Fv, which are capable of binding an epitope of TF or the FVIIa/TF complex. Typically, at least 6, 8, 10, or 12 contiguous amino acids are required to form an epitope. However, epitopes which involve non-contiguous amino acids may required more, e.g. at least 15, 25, or 50 amino acids.

Typically, an antibody that binds specifically to TF or the FVIIa/TF complex provides a detection signal at least 5-, 10-, or 20- fold higher than a detection signal provided with other proteins when used in an immunochemical assay. Preferably, antibodies that bind specifically to TF or the FVIIa/TF complex do not detect other proteins in immunochemical assays and can immunoprecipitate TF or the FVIIa/TF complex from solution.

TF or the FVIIa/TF complex can be used to immunize a mammal, such as a mouse, rat, rabbit, guinea pig, monkey, or human to produce polyclonal antibodies. If desired, TF or the FVIIa/TF complex can be conjugated to a carrier protein, such as bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin. Depending on the host species, various adjuvants can be used to increase the immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's adjuvant, mineral gels (e.g., aluminum hydroxide), and surface active substances (e.g., lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol). Among adjuvants used in humans, BCG (*bacilli Calmette-Guerin*) and *Cornybacterium parvum* are especially useful.

Monoclonal antibodies that bind specifically to TF or the FVIIa/TF complex can be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These techniques include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (Kohler *et al.* (1985) *Nature* 256:495-497; Kozbor *et al.* (1985) *J. Immunol. Methods* 81:31-42; Cote *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030; and Cote *et al.* (1984) *Mol. Cell Biol.* 62:109-120).

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity, can be used (Morrison *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855; Neuberger *et al.* (1984) *Nature* 312:604-608; Takeda *et al.* (1985) *Nature* 314:452-454). Monoclonal and other antibodies also can be "humanized" to prevent a patient from mounting an immune response against the antibody when it is used therapeutically. Such antibodies may be sufficiently similar in sequence to human antibodies to be used directly in the fusion protein or may require alteration of a few key residues. Sequence differences between rodent antibodies and human sequences can be minimized by replacing residues which differ from those in the human sequences by site directed mutagenesis of individual residues or by grafting of entire complementarity determining regions. Alternatively, humanized antibodies can be produced using recombinant methods, as described in GB2188638B. Antibodies that bind specifically to TF or the FVIIa/TF complex can contain antigen-binding sites which are either partially or fully humanized, as disclosed in U.S. Patent 5,565,332.

Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies can be adapted using methods known in the art to produce single chain antibodies that specifically bind to TF or the FVIIa/TF complex. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, can be generated by chain shuffling from random combinatorial Ig libraries (Burton (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:11120-11123).

Single chain antibodies also can be constructed using a DNA amplification method, such as PCR, using hybridoma cDNA as a template (Thirion *et al.* (1996) *Eur. J. Cancer Prev.* 5:507-511). Single chain antibodies can be mono- or bispecific, and can be bivalent or tetravalent.

Construction of tetravalent, bispecific single chain antibodies is taught, for example, in Coloma and Morrison (1997) *Natl. Biotechnol.* 15:159-163. Construction of bivalent, bispecific single chain antibodies is taught in Mallendar and Voss (1994) *J. Biol. Chem.* 269:199-216.

20

A nucleotide sequence encoding a single chain antibody can be constructed using manual or automated nucleotide synthesis, cloned into an expression construct using standard recombinant DNA methods, and introduced into a cell to express the coding sequence. Alternatively, single chain antibodies can be produced directly using, for example, filamentous phage display technology (Verhaar *et al.* (1995) *Int. J. Cancer* 61:497-501; and Nicholls *et al.* (1993) *J. Immunol. Meth.* 165:81-91).

Antibodies that bind specifically to TF or the FVIIa/TF complex can also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening Ig libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature. (Orlandi *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833-3837; Winter *et al.* (1991) *Nature* 349:293-299).

In another embodiment of this invention, the targeting protein is a targeting moiety other than an antibody that can bind to and neutralize TF. Two such examples are active site inhibited factor FVIIa (FVIIai) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI).

Both FVIIa and FVIIai form a high affinity complex with TF (Sorenson, B.B. and Rao, L.V. (1998) *Blood Coagul. Fibrinolysis* 9(Suppl 1):S67-71). FVIIai is a TF neutralizing anticoagulant that acts by competing with endogenous FVIIa for binding to exposed TF. FVIIai inhibits the ability of proteolytically active FVIIa to form a competent FVIIa-TF complex and in this way inhibits initiation of coagulation. By genetically fusing TM domains to FVIIai, TM could be targeted to TF-rich prothrombotic surfaces.

The cDNA encoding human FVII has been isolated and sequenced (Hagen, H.S. *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(8):2412-2416, which is incorporated herein by reference). The human FVII cDNA can be made by standard recombinant DNA techniques starting from mRNA isolated from human liver. FVIIai can be made by mutating the active site serine by standard recombinant DNA techniques or by chemically treating catalytically active FVIIa with a peptidyl chloromethylketone, which irreversibly modifies and inhibits the active site.

TFPI targets and inhibits the FVIIa/TF complex in a FXa dependent fashion (Salemink, I. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274(40):28225-28232). TFPI first binds to FXa and then the TFPI-FXa complex binds to and inhibits the FVIIa/TF complex. By genetically fusing TM domains to TFPI, TM could be targeted to TF-rich prothrombotic surfaces. 22

The cDNA encoding human TFPI has been isolated and sequenced (Wun, T.C. *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263(13):6001-6004, which is incorporated herein by reference). The human TFPI cDNA can be made by standard recombinant DNA techniques starting from mRNA isolated from human liver.

The targeting protein of this invention (i.e, antibodies or other relevant proteins) can be expressed and purified by methods well known in the art. For example, antibodies and proteins can be affinity purified by passage over a column to which TF is bound. The bound antibodies or proteins can then be eluted from the column using a buffer with a high salt concentration.

In one preferred embodiment of this invention, the targeting protein is a TF-binding scFv antibody that inhibits activation of FX by the FVIIa/TF complex and does not compete with FVIIa binding. In order to produce the TF-binding scFv antibody, the human antibody library HuPhaBL3, which was displayed on filamentous phage, was selected against immobilized soluble TF. Antibodies from TF binding phage were overexpressed in *E. coli* and affinity purified using an e-tag column. The purified antibodies were further characterized using BIAcore, a sTF dependent factor VIIa assay (sTF/FVIIa assay), a FX activation assay, and the PT assay. The sequence of the TF-binding scFv antibody, designated scFv(TF)3e10, is shown in Example 1 and corresponds to SEQ ID NO:1. The isolation, production and characterization of the TF-binding scFv antibody are described in greater detail below.

Thrombomodulin:

The TM domain(s) portion of the fusion protein acts as a cofactor for thrombin catalyzed activation of protein C, which in turn degrades factors Va and VIIIa thereby preventing further thrombus formation. The domains of TM include e.g., the N-terminal hydrophobic region domain, the EGF123 domain, the interdomain loop between EGF3 and EGF4, the EGF456 domain, and the O-glycosylated Ser/Thr-rich region domain. The EGF456 domain, in particular, mediates thrombin binding and protein C activation (Kurosawa, S. *et al.* (1988), *supra*; and Zushi, M. *et al.* (1989) *supra*). In preferred embodiments of this invention, the TM domain(s)

portion of the fusion protein comprises the EGF456 domain alone or in combination with one or more of the other TM domains. In still more preferred embodiments of this invention, the EGF456 domain contains point mutations that render the protein more resistant to oxidative damage and proteases and/or increase its catalytic efficiency.

The full length DNA sequence encoding human TM facilitates the preparation of genes and is used as a starting point to construct DNA sequences encoding TM peptides and fusion proteins containing TM and fragments/peptides of TM.

The full-length gene for TM can be prepared by several methods. Human genomic libraries are commercially available. Oligonucleotide probes, specific to these genes, can be synthesized using the published gene sequence. Methods for screening genomic libraries with oligonucleotide probes are known. The publication of the gene sequence for TM demonstrates that there are no introns within the coding region. Thus, a genomic clone provides the necessary starting material to construct an expression plasmid for TM using known methods.

A TM encoding DNA fragment can be retrieved by taking advantage of restriction endonuclease sites that have been identified in regions which flank or are internal to the gene. (Jackman, R.W. *et al.* (1987), *supra*). Alternately, the full-length genes can also be obtained from a cDNA bank. For example, messenger RNA prepared from endothelial cells provides suitable starting material from the preparation of cDNA. Methods for making cDNA banks are well known (see e.g., Sambrook, J.F. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), which is herein incorporated by reference).

Fusion Protein:

The anticoagulant fusion protein of this invention comprises a targeting protein that binds to either TF or the FVIIa/TF complex, and which is operably linked to the TM EGF456 domain alone or in combination with at least one other TM domain selected from the group consisting of the N-terminal hydrophobic region domain, the EGF123 domain, the interdomain loop between EGF3 and EGF4, and the O-glycosylated Ser/Thr-rich domain, or analogs, fragments, derivatives or variants thereof. The fusion protein can comprise the targeting protein linked with the domains of TM in any combination.

In one particularly preferred embodiment, the fusion protein comprises an antibody that binds TF, operably linked to the TM EGF456 domain and the interdomain loop between EGF3 and EGF4 ("TMi456"), or analogs, fragments, derivatives or variants thereof. 

The fusion protein of the present invention includes, but is not limited to, constructs in which the C-terminal portion of a single chain antibody is fused to the N-terminal portion of an analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s), the C-terminal portion of an IgG antibody is fused to the N-terminal portion of an analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s), the C-terminal portion of a Fab antibody is fused to the N-terminal portion of an analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s), the N-terminal portion of a single chain antibody is fused to the C-terminal portion of an analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s), the N-terminal portion of an IgG antibody is fused to the C-terminal portion of an analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s), the N-terminal portion of a Fab antibody is fused to the C-terminal portion of an analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s), more than one single chain antibody is fused to both the N-terminal and the C-terminal portions of an analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s), more than one IgG antibody is fused to both the N-terminal and the C-terminal portions of an analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s), more than one Fab antibody is fused to both the N-terminal and the C-terminal portions of an analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s), more than one analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s) is fused to both the N-terminal and the C-terminal portions of a single chain antibody, more than one analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s) is fused to both the N-terminal and the C-terminal portions of an IgG antibody, more than one analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s) is fused to both the N-terminal and the C-terminal portions of a Fab antibody, one or more than one analog, fragment, derivative or variant of a TM domain(s) is fused to both the N-terminal and the C-terminal portions of a dimeric single chain antibody.

The fusion proteins of the present invention include the fusion proteins of Examples 2 (SEQ ID NO:2) and 3 (SEQ ID NO: 3), as well as those fusion proteins having insubstantial variations in sequence from them. An "insubstantial variation" would include any sequence, substitution, or deletion variant that maintains substantially at least one biological function of the polypeptides of this invention, preferably cofactor activity for thrombin-mediated protein C activation. These functional equivalents may preferably include fusion proteins which have at least about a 90% identity to the fusion proteins of SEQ ID NOs:2 or 3, and more preferably at

231

least a 95% identity to the fusion proteins of SEQ ID NOs:2 or 3, and still more preferably at least a 97% identity to the fusion proteins of SEQ ID NOs:2 or 3, and also include portions of such fusion proteins having substantially the same biological activity. However, any fusion protein having insubstantial variation in amino acid sequence from the fusion proteins of SEQ ID NOs:2 and 3 that demonstrates functional equivalency as described further herein is included in the description of the present invention.

In another embodiment, the fusion protein comprises an antibody that binds TF operably linked to TM domain EGF3, which is required to activate thrombin-activatable fibrinolysis activator (TAFI).

Analogs, Fragments, Derivatives and Variants:

An analog, fragment, derivative, or variant of the fusion proteins, as well as targeting proteins or TM domain(s), of the present invention may be: (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code; or (ii) one in which one or more of the amino acid residues includes a substituent group, or (iii) one in which the mature fusion protein is fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the fusion protein (for example, polyethylene glycol), or (iv) one in which additional amino acids are fused to the mature fusion protein, such as a leader or secretory sequence or a sequence which is employed for purification of the mature fusion protein, or (v) one in which the polypeptide sequence is fused with a larger polypeptide, i.e., human albumin, an antibody or Fc, for increased duration of effect. Such analogs, fragments, derivatives, and variants are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

Preferably, the derivatives of the present invention will contain conservative amino acid substitutions (defined further below) made at one or more predicted, preferably nonessential amino acid residues. A "nonessential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of a protein without altering the biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine,



arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Non-conservative substitutions would not be made for conserved amino acid residues or for amino acid residues residing within a conserved protein domain, unless the non-conservative substitutions are made to render the resulting fusion protein more resistant to oxidative damage and proteases and/or increase its catalytic efficiency. Fragments or biologically active portions include polypeptide fragments suitable for use as a medicament, as a research reagent, and the like. Fragments include peptides comprising amino acid sequences sufficiently similar to or derived from the amino acid sequences of a fusion protein of this invention and exhibiting at least one activity of that polypeptide, but which include fewer amino acids than the full-length polypeptides disclosed herein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the polypeptide. A biologically active portion of a polypeptide can be a peptide that is, for example, 5 or more amino acids in length. Such biologically active portions can be prepared synthetically or by recombinant techniques and can be evaluated for one or more of the functional activities of a polypeptide of this invention by means disclosed herein and/or well known in the art.

Moreover, preferred derivatives of the present invention include mature fusion proteins that have been fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the polypeptide and/or to reduce potential immunogenicity of the polypeptide (for example, polyethylene glycol, "PEG"). The PEG can be used to impart water solubility, size, slow rate of kidney clearance, and reduced immunogenicity to the fusion protein. See e.g., U.S. Patent 6,214,966. In the case of PEGylations, the fusion of the fusion protein to PEG can be accomplished by any means known to one skilled in the art. For example, PEGylation can be accomplished by first introducing a cysteine mutation into the fusion protein, followed by site-specific derivatization with PEG-maleimide. The cysteine can be added to the C-terminus of the peptides. See, e.g., Tsutsumi *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(15):8548-8553. Another modification which can be made to the fusion protein involves biotinylation. In certain instances, it may be useful to have the fusion protein biotinylated so that it can readily react with streptavidin. Methods for biotinylation of proteins are well known in the art. Additionally, chondroitin sulfate can be linked with the fusion protein.

mb

Variants of the fusion proteins, targeting proteins and TM domain(s) of this invention include polypeptides having an amino acid sequence sufficiently similar to the amino acid sequence of the original fusion proteins, targeting proteins and TM domain(s). The term "sufficiently similar" means a first amino acid sequence that contains a sufficient or minimum number of identical or equivalent amino acid residues relative to a second amino acid sequence such that the first and second amino acid sequences have a common structural domain and/or common functional activity. For example, amino acid sequences that contain a common structural domain that is at least about 45%, preferably about 75% through 98%, identical are defined herein as sufficiently similar. Preferably, variants will be sufficiently similar to the amino acid sequence of the preferred fusion proteins of this invention. Variants include variants of fusion proteins encoded by a polynucleotide that hybridizes to a polynucleotide of this invention or a complement thereof under stringent conditions. Such variants generally retain the functional activity of the fusion proteins of this invention. Libraries of fragments of the polynucleotides can be used to generate a variegated population of fragments for screening and subsequent selection. For example, a library of fragments can be generated by treating a double-stranded PCR fragment of a polynucleotide with a nuclease under conditions wherein nicking occurs only about once per molecule, denaturing the double-stranded DNA, renaturing the DNA to form double-stranded DNA which can include sense/antisense pairs from different nicked products, removing single-stranded portions from reformed duplexes by treatment with S1 nuclease, and ligating the resulting fragment library into an expression vector. By this method, one can derive an expression library that encodes N-terminal and internal fragments of various sizes of the fusion proteins of this invention.

Variants include fusion proteins, as well as targeting proteins and TM domain(s), that differ in amino acid sequence due to mutagenesis. Variants that have cofactor activity for thrombin-mediated protein C activation can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, for example truncation or point mutants, of the fusion proteins or TM domain(s) of this invention using the protein C activation assay described in Example 5. Variants that have TF- or FVIIa/TF complex-binding activity can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, for example truncation or point mutants, of the fusion proteins or targeting proteins of this invention using the sTF/FVIIa assay or FX activation assays of Example 5 described in Example 5. In addition, bioequivalent analogs of the fusion proteins may also be constructed by making various substitutions on residues or sequences in the TM domain(s) portion of the

fusion protein which can render the fusion protein more oxidation damage or protease resistant, see e.g., U.S. Patent 5,827,824, or increase the catalytic efficiency of the fusion protein, see e.g., Adler, M. *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270(40):23366-23372, and PCT patent application WO01/98352, published 27 December, 2001, all of which are fully incorporated herein by reference. 

In one embodiment, a variegated library of variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A variegated library of variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential variant amino acid sequences is expressible as individual polypeptides, or, alternately, as a set of larger fusion proteins (for example, for phage display) containing the set of sequences therein. There are a variety of methods that can be used to produce libraries of potential variants from a degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be performed in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic gene then ligated into an appropriate expression vector. Use of a degenerate set of genes allows for the provision, in one mixture, of all of the sequences encoding the desired set of potential variant sequences. Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are known in the art (see, e.g., Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1984a) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.* (1984b) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Several techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. Such techniques are adaptable for rapid screening of the gene libraries generated by the combinatorial mutagenesis of fusion proteins, as well as targeting proteins and TM domain(s), for cofactor activity for thrombin-mediated protein C activation or TF- or FVIIa/TF complex-binding activity. The most widely used techniques, which are amenable to high throughput analysis for screening large gene libraries typically include cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting library of vectors and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a technique that enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify the desired variants.

250

Producing fusion proteins:

The fusion protein of this invention is produced by fusing the targeting protein to, or otherwise binding it to, the TM domain(s) or analogs, fragments, derivatives or variants thereof by any method known to those skilled in the art. The two components may be chemically bonded together by any of a variety of well-known chemical procedures. For example, the linkage may be by way of heterobifunctional cross-linkers, e.g., SPDP, carbodiimide, glutaraldehyde, or the like.

In a more preferred embodiment, the targeting protein of this invention can be fused to the TM domain(s) by recombinant means such as through the use of recombinant DNA techniques to produce a nucleic acid which encodes both the targeting protein and the polypeptide encoding the TM domain(s) and expressing the DNA sequence in a host cell such as *E. coli* or a mammalian cell. The DNA encoding the fusion protein may be cloned in cDNA form or in genomic form by any cloning procedure known to those skilled in the art. See for example, Sambrook, J.F. *et al.* (1989) *supra*.

In the case where the targeting protein is an antibody, once a DNA sequence has been identified that encodes a Fv region which when expressed shows specific binding activity, fusion proteins comprising that Fv region may be prepared by methods known to one of skill in the art. Thus, for example, Chaudhary, V.K. *et al.* (1989) *Nature* 339(6223): 394-397; Batra, J.K. *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265(25):15198-15202; Batra, J.K. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(21):8545-8549; Chaudhary, V.K. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(3):1066-1070, all incorporated by reference, describe the preparation of various single chain antibody fusion proteins. The Fv region may be fused directly to the TM domain(s) or may be joined via a linker sequence. The linker sequence may be present simply to provide space between the targeting moiety and the TM domain(s) or to facilitate mobility between these regions to enable them to each attain their optimum conformation. The DNA sequence comprising the connector may also provide sequences (such as primer or restriction sites) to facilitate cloning or may preserve the reading frame between the sequence encoding the targeting moiety and the sequence encoding the TM domain(s). The design of such connector peptides will be well known to those of skill in the art.

In the present invention, linker sequences can be used for linking the targeting protein with the TM domain(s). In one preferred embodiment of the present invention, two linker sequences are used in constructing a fusion protein comprised of a single chain antibody and the TM EGF456 domain and the interdomain loop between EGF3 and EGF4 (TM1456). The first links the heavy and light domains of the single chain antibody. The first linker sequence is 5 amino acids in length. It will be apparent that other short linker sequences, from 0 to 10 amino acids may be used. The second linker in the present invention is a 15 amino acid linker that links the antibody to the TM domain(s). It will be apparent to those of skill in the art that many different linker sequences may be used and still result in a fusion protein which retains anticoagulant activity and the activation of protein C. Modifications of the existing linker will be aimed at maximizing the enhancement of protein C activation on TF-containing phospholipid surfaces.

In a preferred approach, the single chain antibody was prepared using a phage display library. In the first step of constructing a phage display library, the variable genes (V_H (from μM) V_K and V_L) were PCR cloned from pooled mRNA from human bone marrow, lymph node and spleen using a set of family specific primers. The resultant pCITE- V_H (3.8×10^9 members), pZ604- V_K (1.6×10^7) and pZ604- V_L (3.2×10^7) libraries represent a permanent and high diversity of V genes. The V_H genes were amplified from pCITE- V_H library. The V_K and V_L genes were PCR amplified from the pZ604- V_K and pZ604- V_L library with reverse J_H and linker sequence at the 5' end. The gel purified V_H , V_K , and V_L containing PCR products were then spliced together to make the scFv gene repertoire. The scFv gene repertoire was cloned to a phagemid vector pZ603, and the ligation product was electroporated into competent TG1 *E. coli* cells to generate the scFv phage display library, HuPhabL3, with 5.2×10^9 individual transformants (Kay, B.K. *et al.* (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego CA; Marks, J.D. *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222(3):581-597; Sheets, M.D. *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(11):6157-6162).

In a preferred embodiment of the present invention, a single chain antibody (scFv(TF)3e10) was prepared which has a single V_H/V_L binding site for TF. The amino acid sequence of scFv(TF)3e10 (SEQ ID NO:1), is depicted in Example 1.

In a preferred embodiment of the present invention, a PCR fragment containing the TMi456 sequence (with M388L and H381G mutations) flanked by NotI sites was subcloned into the NotI site of pZ612/3e10 (a bacterial expression vector for scFv(TF)3e10 based on pCANTAB5 from Pharmacia). Herein, point mutations in the TM portions of the fusion proteins of the invention are specified the single letter designation of the amino acid residue of native TM, followed by the amino acid position number in mature TM and the single letter designation of the amino acid mutation. For example, M388L indicates that the methionine at amino acid position 388 of mature TM has been changed to leucine. The NotI site is between the antibody sequence and the e-tag sequence. This generated a bacterial expression construct (pKM101) for a fusion protein comprised of the scFv(TF)3e10 – a 15 amino acid linker – TMi456, followed by the e-tag sequence. To generate a mammalian expression vector a PCR fragment was first generated from the pKM101 template. This fragment was designed for ligation into the StuI/MscI sites of the TM expression vector pTHR525. This generated a vector (pKM113) that had the Solulin signal sequence followed by the sequence for the mature fusion protein followed by the e-tag sequence. The vector contains the ampicillin resistance gene and the hygromycin and DHFR selection markers. The expression is driven by the MPSV LTR promoter. Site directed mutagenesis was performed on this vector to include the R456G and H457Q mutations which confer protease resistance to the TM portion. The resulting vector is referred to as pKM115. The pKM115 vector had a 15 amino acid linker separating the V_H and V_L domains and another 15 amino acid linker separating the V_L domain from the TMi456. The linker separating the V_H and V_L was decreased to 5 amino acids to drive the formation of a higher avidity dimer, referred to as pHM115.5. The fusion protein encoded by pHM115.5, scFv(TF)3e10-TMi456 (SEQ ID NO: 2), is depicted in Example 2. An additional vector, pKM125, was generated using standard recombinant DNA technology by deleting 3 amino acids (GAP) between the 5 amino acid linker separating the V_H and V_L domains and deleting the e-tag at the C-terminus of the fusion protein. The resulting fusion protein, scFv(TF)3e10-TMi456Δ (SEQ ID NO:3), is depicted in Example 3.

XO

Expression and Purification of Fusion Proteins:

There are several ways to express the recombinant fusion proteins *in vitro*, including *E. coli*, baculovirus, yeast mammalian cells or other expression systems. Methods for the expression of cloned genes in bacteria are well known. To obtain high level expression of a cloned gene in a prokaryotic system, it is essential to construct expression vectors which

contain, at the minimum, a strong promoter to direct mRNA transcription termination. Examples of regulatory regions suitable for this purpose are the promoter and operator region of the *E. coli* beta-glucosidase gene, the *E. coli* tryptophan biosynthetic pathway, or the leftward promoter from phage Lambda. The inclusion of selection markers in DNA vectors transformed in *E. coli* is useful. Examples of such markers include the genes specifying resistance to ampicillin, tetracycline, or chloramphenicol.

u

Of the higher eukaryotic cell systems useful for expression of the fusion proteins and analogs, thereof, there are numerous cell systems to select from. Illustrative examples of mammalian cell lines include but are not limited to RPMI 7932, VERO and HeLa cells, Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, WI38, BHK, COS-7, C127 or MDCK cell lines. A preferred mammalian cell lines is CHL-1. When CHL-1 is used hygromycin is included as a eukaryotic selection marker. CHL-1 cells are derived from RPMI 7032 melanoma cells, a readily available human cell line. The CHL-1 cell line has been deposited with ATCC according to conditions of the Budapest Treaty and has been assigned #CRL 9446, deposited Jun. 18, 1987. Cells suitable for use in this invention are commercially available from the ATCC. Illustrative cell lines include *Spodoptera frugiperda* and *Bombyx mori*.

The prokaryotic system, *E. coli*, is not able to do post-translational modification, such as glycosylation. In addition proteins with complex disulfide patterns are often misfolded when expressed in *E. coli*. For the fusion protein described herein there was a marked reduction in the thrombomodulin cofactor activity when expressed in *E. coli* although both activities were still present. With the prokaryotic system, the expressed protein is either present in the cell cytoplasm in an insoluble form so-called inclusion bodies, found in the soluble fraction after the cell has lysed, or is directed into the periplasm by addition of appropriate secretion signal sequences. If the expressed protein is in insoluble inclusion bodies, solubilization and subsequent refolding of the inclusion bodies is usually required.

Many prokaryotic expression vectors are known to those of skill in the art such as pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pKK233-2 (Clontech, Palo Alto, CA, USA), and pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, USA), which are commercially available.

Promoters commonly used in recombinant microbial expression systems include the beta-lactamase (penicillinase) and lactose promoter system (Chang, A.C. *et al.* (1978) *Nature*

275(5681):617-624; Goeddel, D.V. *et al.* (1979) *Nature* 281(5732):544-548), the tryptophan (trp) promoter system (Goeddel, D.V. *et al.* (1980) *Nucl. Acids Res.* 8(18):4057-4074) and tac promoter (Maniatis, T. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Another useful bacterial expression system employs the lambda phage pL promoter and clts857 thermoinducible repressor (Bernard, H.U. *et al.* (1979) *Gene* 5(1):59-76; Love, C.A. *et al.* (1996) *Gene* 176(1-2):49-53). Recombinant fusion proteins may also be expressed in yeast hosts such as *Saccharomyces cerevisiae*. It usually gives the ability to do various post-translational modifications. The expressed fusion protein can be secreted into the culture supernatant where not many other proteins reside, making purification easier. Yeast vectors for expression of the fusion proteins in this invention contain certain requisite features. The elements of the vector are generally derived from yeast and bacteria to permit propagation of the plasmid in both. The bacterial elements include an origin of replication and a selectable marker. The yeast elements include an origin of replication sequence (ARS), a selectable marker, a promoter, and a transcriptional terminator.

Suitable promoters in yeast vectors for expression include the promoters of TRP1 gene, the ADH1 or ADHII gene, acid phosphatase (PH03 or PH05) gene, isocytochrome gene, or the promoters involved with the glycolytic pathway, such as the promoter of enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH), 3-phosphoglycerate kinase (PGK), hexokinase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase and phosphoglucose isomerase (Hitzeman, R.A. *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255(24):12073-12080; Hess, B. *et al.* (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149-167; and Holland, M.J. and Holland, J.P. (1978) *Biochemistry* 17(23):4900-4907).

Commercially available yeast vectors include pYES2, pPIC9 (Invitrogen, San Diego, CA), Yepc-pADH2a, pYcDE-1 (Washington Research, Seattle, WA), pBC102-K22 (ATCC # 67255), and YpGX265GAL4 (ATCC # 67233). Mammalian cell lines including but not limited to COS-7, L cells, C127, 3T3, Chinese Hamster Ovary (CHO), HeLa, BHK, CHL-1, NSO, and HEK293 can be employed to express the recombinant fusion proteins in this invention. The recombinant proteins produced in mammalian cells are normally soluble and glycosylated and have authentic N-termini. Mammalian expression vectors may contain non-transcribed elements such as an origin of replication, promoter and enhancer, and 5' or 3' nontranslated sequences such as ribosome binding sites, a polyadenylation site, acceptor site and splice donor, and transcriptional termination sequences. Promoters for use in mammalian expression

vectors usually are for example viral promoters such as Polyoma, Adenovirus, HTLV, Simian Virus 40 (SV 40), and human cytomegalovirus (CMV).

43

Depending on the expression system and host selected, a homogeneous recombinant fusion protein can be obtained by using various combinations of conventional chromatography used for protein purification. These include: immunoaffinity chromatography, reverse phase chromatography, cation exchange chromatography, anion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, gel filtration chromatography, and HPLC. If the expression system secretes the fusion protein into the growth media, the protein can be purified directly from the media. If the fusion protein is not secreted, it is isolated from cell lysates. Cell disruption can be done by any conventional method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents.

In a preferred embodiment of this invention, the mammalian expression constructs were transfected into CHO DXB11 cells. Stable populations were selected using 400 µg/ml hygromycin B in HAMS/F12 medium. Expression levels were approximately 500 µg/L. To increase expression levels a population was selected using 100 nM methotrexate in alpha MEM medium. The approximate expression level of this population was 5 mg/L.

The fusion construct contains the e-tag sequence at the C-terminus of the protein. Anti-e-tag affinity columns were purchased from American/Pharmacia Biotech. Cell culture media was filtered through a 0.22 µm filter and loaded into 5 ml e-tag column at 2 ml/min. The column was washed with 0.2 M phosphate buffer 0.05% NaN₃, pH 7.0, and then collected into tubes containing 0.1 volume 1M Tris buffer, pH 8.2 to neutralize the elution buffer. Alternately, the filtered culture medium was loaded onto a protein A column. In this case, the column was washed with 50 mM citric acid, 300 mM NaCl, pH 6.5 and eluted with the same buffer at pH 3.0. In both cases, the purified samples were subsequently loaded onto a Sephadex 200 column to separate monomer from dimer forms of the fusion protein.

Pharmaceutical Compositions:

The invention also provides pharmaceutical compositions which can be administered to a patient to achieve a therapeutic effect. Pharmaceutical compositions of this invention can be

prepared for administration by combining fusion protein having the desired degree of purity and the pharmaceutically effective amount with physiologically acceptable carriers.

24

The fusion proteins of the present invention can be used in pharmaceutical compositions, for intravenous administration or subcutaneous administration or intrathecal administration. Thus, the above described fusion proteins preferably will be combined with an acceptable sterile pharmaceutical carrier, such as five percent dextrose, lactated Ringer's solution, normal saline, sterile water, or any other commercially prepared physiological buffer solution designed for intravenous infusion. It will be understood that the selection of the carrier solution and the dosage and administration of the composition will vary with the subject and the particular clinical setting, and will be governed by standard medical procedures.

In accordance with the methods of the present invention, these pharmaceutical compositions may be administered in amounts effective to inhibit the pathological consequences associated with excess thrombin generation in the subject.

Administration of the fusion protein may be by a bolus intravenous injection, by a constant intravenous infusion or by a combination of both routes. Alternatively, or in addition, the fusion protein mixed with appropriate excipients may be taken into the circulation from an intramuscular site. Systemic treatment with fusion protein can be monitored by determining the activated partial thromboplastin time (PT) on serial samples of blood taken from patient. The coagulation time observed in this assay is prolonged when a sufficient level of the fusion protein is achieved in the circulation.

The recombinant fusion proteins and pharmaceutical compositions of this invention are useful for parenteral, topical, intravenous, oral or local administration. The pharmaceutical compositions can be administered in a variety of unit dosage forms depending upon the method of administration. For example, unit dosage forms can be administered in the form including but not limited to tablets, capsules, powder, solutions, and emulsions.

The recombinant fusion proteins and pharmaceutical compositions of this invention are particularly useful for intravenous administration. The compositions for administration will commonly comprise a solution of the single chain antibody or a fusion protein comprising the single chain antibody dissolved in a pharmaceutically acceptable carrier, preferably in an

45

aqueous carrier. A variety of aqueous carriers can be used, e.g., buffered saline and the like. These solutions are sterile and generally free of undesirable matter. The compositions may be sterilized by conventional, well known sterilization techniques.

A typical pharmaceutical composition for intravenous administration can be readily determined by one of ordinary skill in the art. The amounts administered are clearly protein specific and depend on its potency and pharmacokinetic profile. Actual methods for preparing parenterally administrable compositions will be known or apparent to those skilled in the art and are described in more detail in such publications as *Remington's Pharmaceutical Science*, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa (1980).

The compositions containing the present fusion proteins or a cocktail thereof (i.e., with other proteins) can be administered as therapeutic treatments. In therapeutic applications, compositions are administered to a patient suffering from a bleeding disorder or disease in an amount sufficient to cure or at least partially arrest the bleeding. An amount adequate to accomplish this is defined as a "therapeutically effective amount". Amounts effective for this use will depend upon the severity of the disease and the general state of the patient's health.

Single or multiple administration of the compositions may be administered depending on the dosage and frequency as required and tolerated by the patient. In any event, the composition should provide a sufficient quantity of the proteins of this invention to effectively treat the patient.

The fusion proteins of the invention, or their pharmaceutically acceptable compositions, are administered in a therapeutically effective amount, which will vary depending upon a variety of factors including the activity of the specific fusion protein employed; the metabolic stability and length of action of the fusion protein; the age, body weight, general health, sex, and diet of the patient; the mode and time of administration; the rate of excretion; the drug combination; the severity of the particular disease-states; and the host undergoing therapy. Generally, a daily therapeutically effective amount is from about 0.14 mg to about 14.3 mg/kg of body weight per day of a fusion protein of the invention, or a pharmaceutically acceptable composition thereof; preferably, from about 0.7 mg to about 10 mg/kg of body weight per day; and most preferably, from about 1.4 mg to about 7.2 mg/kg of body weight per day. For example, for administration to a 70 kg person, the dosage range would be from about 10 mg to about 1.0 gram per day of a

N6

fusion protein of the invention, or a pharmaceutically acceptable composition thereof, preferably from about 50 mg to about 700 mg per day, and most preferably from about 100 mg to about 500 mg per day.

Gene Therapy:

A fusion protein of the invention may also be employed in accordance with the present invention by expression of such fusion protein *in vivo*, which is often referred to as "gene therapy". Thus, for example, cells may be engineered with a polynucleotide (DNA or RNA) encoding for the fusion protein *ex vivo*, the engineered cells are then provided to a patient to be treated with the fusion protein. Such methods are well-known in the art. For example, cells may be engineered by procedures known in the art by use of a retroviral particle containing RNA encoding for the fusion protein of the present invention.

Local delivery of the anticoagulant fusion proteins of the present invention using gene therapy may provide the therapeutic agent to the target area, the endothelial cells lining blood vessels.

Both *in vitro* and *in vivo* gene therapy methodologies are contemplated. Several methods for transferring potentially therapeutic genes to defined cell populations are known. See, e.g., Mulligan (1993) *Science* 260:926-931. These methods include:

- 1) Direct gene transfer. See, e.g., Wolff *et al.* (1990) *Science* 247: 1465-1468;
- 2) Liposome-mediated DNA transfer. See, e.g., Caplen *et al.* (1995) *Nature Med.* 3:39-46; Crystal (1995) *Nature Med.* 1:15-17; Gao and Huang (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179:280-285;
- 3) Retrovirus-mediated DNA transfer. See, e.g., Kay *et al.* (1993) *Science* 262:117-119; Anderson (1992) *Science* 256:808-813.
- 4) DNA Virus-mediated DNA transfer. Such DNA viruses include adenoviruses (preferably Ad2 or Ad5 based vectors), herpes viruses (preferably herpes simplex virus based vectors), and parvoviruses (preferably "defective" or non-autonomous parvovirus based vectors, more preferably adeno-associated virus based vectors, most preferably AAV-2 based vectors). See, e.g., Ali *et al.* (1994) *Gene Therapy* 1:367-384; U.S. Patent 4, 797,368, incorporated herein by reference, and U.S. Patent 5,139,941, incorporated herein by reference.

The choice of a particular vector system for transferring the gene of interest will depend on a variety of factors. One important factor is the nature of the target cell population.

Although retroviral vectors have been extensively studied and used in a number of gene therapy applications, these vectors are generally unsuited for infecting non-dividing cells. In addition, retroviruses have the potential for oncogenicity. However, recent developments in the field of lentiviral vectors may circumvent some of these limitations. See Naldini *et al.* (1996) *Science* 272:263-267.

Retroviruses from which the retroviral plasmid vectors hereinabove mentioned may be derived include, but are not limited to, Moloney Murine Leukemia Virus, spleen necrosis virus, retroviruses such as Rous Sarcoma Virus, Harvey Sarcoma Virus, avian leukosis virus, gibbon ape leukemia virus, human immunodeficiency virus, adenovirus, Myeloproliferative Sarcoma Virus, and mammary tumor virus. In one embodiment, the retroviral plasmid vector is derived from Moloney Murine Leukemia Virus.

Adenoviruses have the advantage that they have a broad host range, can infect quiescent or terminally differentiated cells, such as neurons or hepatocytes, and appear essentially non-oncogenic. See, e.g., Ali *et al.* (1994), *supra*, p. 367. Adenoviruses do not appear to integrate into the host genome. Because they exist extrachromosomally, the risk of insertional mutagenesis is greatly reduced. Ali *et al.* (1994), *supra*, p. 373.

Adeno-associated viruses exhibit similar advantages as adenoviral-based vectors. However, AAVs exhibit site-specific integration on human chromosome 19 (Ali *et al.* (1994), *supra*, p. 377).

In a preferred embodiment, the DNA encoding the fusion proteins of this invention is used in gene therapy for disorders including, but not limited to, deep vein thrombosis, disseminated intravascular coagulation, acute coronary syndrome or cancer with evidence of coagulopathy.

According to this embodiment, gene therapy with DNA encoding the fusion proteins of this invention is provided to a patient in need thereof, concurrent with, or immediately after diagnosis.

The skilled artisan will appreciate that any suitable gene therapy vector containing DNA encoding the fusion protein of the invention or DNA encoding analogs, fragments, derivatives or

48

variants of the fusion protein of the invention may be used in accordance with this embodiment. The techniques for constructing such a vector are known. See, e.g., Anderson, W.F. (1998) *Nature* 392:25-30; Verma I.M. and Somia, N. (1998) *Nature* 389:239-242. Introduction of the fusion protein DNA-containing vector to the target site may be accomplished using known techniques.

The gene therapy vector includes one or more promoters. Suitable promoters which may be employed include, but are not limited to, the retroviral LTR; the SV40 promoter; and the human cytomegalovirus (CVM) promoter described in Miller *et al.* (1989) *Biotechniques* 7(9):980-990, or any other promoter (e.g., cellular promoters such as eukaryotic cellular promoters including, but not limited to, the histone, pol III, and β -actin promoters). Other viral promoters which may be employed include, but are not limited to, adenovirus promoters, thymidine kinase (TK) promoters, and B19 parvovirus promoters. The selection of a suitable promoter will be apparent to those skilled in the art from the teachings contained herein.

The nucleic acid sequence encoding the fusion protein of the present invention is under the control of a suitable promoter. Suitable promoters which may be employed include, but are not limited to, adenoviral promoters, such as the adenoviral major late promoter; or heterologous promoters, such as the cytomegalovirus (CMV) promoter; the respiratory syncytial virus (RSV) promoter; inducible promoters, such as the MMT promoter, the metallothionein promoter; heat shock promoters; the albumin promoter; the ApoA1 promoter; human globin promoters; viral thymidine kinase promoters, such as the Herpes Simplex thymidine kinase promoter; retroviral LTRs (including the modified retroviral LTRs hereinabove described); the β -actin promoter; and human growth hormone promoter.

The retroviral plasmid vector is employed to transduce packaging cell lines to form producer cell lines. Examples of packaging cells which maybe transfected include, but are not limited to, the PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X; VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+#-86, GP+envAm12, and DAN cell lines as described in Miller (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14, which is incorporated herein by reference in its entirety. The vector may transduce the packaging cells through any means known in the art. Such means include, but are not limited to, electroporation, the use of liposomes, and CaPO_4 precipitation. In one alternative, the retroviral plasmid vector may be encapsulated into a liposome, or coupled to a lipid, and then

49

administered to a host. The producer cell line generates infectious retroviral vector particles which include the nucleic acid sequence(s) encoding the polypeptides. Such retroviral vector particles then may be employed, to transduce eukaryotic cells, either *in vitro* or *in vivo*. The transduced eukaryotic cells will express the nucleic acid sequence(s) encoding the polypeptide. Eukaryotic cells which may be transduced include, but are not limited to, embryonic stem cells, embryonic carcinoma cells, as well as hematopoietic stem cells, hepatocytes, fibroblasts, myoblasts, keratinocytes, endothelial cells, and bronchial epithelial cells.

A different approach to gene therapy is "transkaryotic therapy" wherein the patient's cells are treated *ex vivo* to induce the dormant chromosomal genes to produce the protein of interest after reintroduction to the patient. Transkaryotic therapy assumes the individual has a normal complement of genes necessary for activation. Transkaryotic therapy involves introducing a promoter or other exogenous regulatory sequence capable of activating the nascent genes, into the chromosomal DNA of the patients' cells *ex vivo*, culturing and selecting for active protein-producing cells, and then reintroducing the activated cells into the patient with the intent that they then become fully established. The "gene activated" cells then manufacture the protein of interest for some significant amount of time, perhaps for as long as the life of the patient. U.S. Patent Nos. 5,641,670 and 5,733,761 disclose in detail this concept, and are hereby incorporated by reference in their entirety.

Kits:

This invention further relates to kits for research or diagnostic purposes. Kits typically include one or more containers containing the single chain antibodies of the present invention. In a preferred embodiment, the kits comprise containers containing single chain antibodies in a form suitable for derivatizing with a second molecule, e.g., TM domain(s) or fragments thereof. In a more preferred embodiment the kits comprise containers containing the fusion proteins of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3.

In another embodiment, the kits may contain DNA sequences encoding the fusion proteins. Preferably the DNA sequences encoding these fusion proteins are provided in a plasmid suitable for transfection into and expression by a host cell. The plasmid may contain a promoter (often an inducible promoter) to regulate expression of the DNA in the host cell. The plasmid may also contain appropriate restriction sites to facilitate the insertion of other DNA sequences into the plasmid to produce various fusion proteins. The plasmids may also contain

numerous other elements to facilitate cloning and expression of the encoded proteins. Such elements are well known to those of skill in the art and include, for example, selectable markers, initiation codons, termination codons, and the like.

Therapeutic Indications:

Diseases in which thrombus formation play a significant etiological role include myocardial infarction, disseminated intravascular coagulation, deep vein thrombosis, pulmonary embolism, ischaemic stroke, septic shock, acute respiratory distress syndrome, unstable angina and other arterial and venous occlusive conditions. The fusion proteins of this invention are useful in all of these, as well as in other diseases in which thrombus formation is pathological. Other pathological conditions where the fusion protein of this invention may be useful include cancer with coagulopathy and inflammation. The compounds may also find use in skin and vein grafts and organ transplants. By useful it is meant that the compounds are useful for treatment, either to prevent disease or to prevent its progression to a more severe state. The compounds of this invention also provide a safe and effective anticoagulant, for example, in patients receiving bioprostheses such as heart valves. These compounds may replace heparin and warfarin in the treatment of, for example, pulmonary embolism or acute myocardial infarction. The fusion proteins of this invention may also find use in coating medical devices where coagulation is an issue of concern.

Assays:

A number of laboratory assays for measuring the TM activity of a fusion protein of the invention are available. Protein C activity can be measured in the assay described by Salem, H.H. *et al.* (1984), *supra*, and Galvin, J.B. *et al.* (1987) *J. Biol. Chem.* 262(5):2199-2205. In brief, the assay consists of two steps. The first step is the incubation of the test fusion protein with thrombin and protein C under defined conditions. In the second step, the thrombin is inactivated with hirudin or antithrombin III and heparin, and the activity of the newly activated protein C is determined by the use of a chromogenic substrate, whereby the chromophore is released by the proteolytic activity of activated protein C. This assay is carried out with the purified reagents.

Alternately, the effect of a fusion protein can be measured using plasma clotting time assays such as the activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin clotting time (TCT)

and/or prothrombin time (PT). These assays distinguish between different mechanisms of coagulation inhibition, and involve the activation of protein C. Prolongation of the clotting time in any one of these assays demonstrates that the molecule can inhibit coagulation in plasma.

b1

The above assays are used to identify fusion proteins with TM activity which are able to bind thrombin and to activate protein C in both purified systems and in a plasma milieu. Further assays are then used to evaluate other activities of native TM such as inhibition of thrombin catalyzed formation of fibrin from fibrinogen (Jakubowski, H.V. *et al.* (1986) *J. Biol. Chem.* 261(8): 3876-3882), inhibition of thrombin activation of factor V (Esmon, C.T. *et al.* (1982). *J. Biol. Chem.* 257(14):7944-7947), accelerated inhibition of thrombin by antithrombin III and heparin cofactor II (Esmon, N.L. *et al.* (1983) *J. Biol. Chem.* 258(20):12238-12242), inhibition of thrombin activation of factor XIII (Polgar, J. *et al.* (1987) *Thromb. Haemost.* 58(1):140), inhibition of thrombin mediated inactivation of protein S (Thompson, E.A. and Salem, H.H. (1986) *J. Clin. Inv.* 78(1):13-17), and inhibition of thrombin mediated platelet activation and aggregation (Esmon, N.L. *et al.* (1983), *supra*).

The following assays, described in detail below in Example 5, are used to measure the *in vitro* potency of the fusion proteins of the invention: 1) protein C activation assay (chromogenic); 2) sTF/FVIIa activation assay; 3) Factor X activation assay; and 4) protein C activation assay (on TF-rich surface).

In carrying out the procedures of the present invention it is of course to be understood that reference to particular buffers, media, reagents, cells, culture conditions and the like are not intended to be limiting, but are to be read so as to include all related materials that one of ordinary skill in the art would recognize as being of interest or value in the particular context in which that discussion is presented. For example, it is often possible to substitute one buffer system or culture medium for another and still achieve similar, if not identical results. Those of skill in the art will have sufficient knowledge of such systems and methodologies so as to be able, without undue experimentation, to make such substitutions as will optimally serve their purposes in using the methods and procedures disclosed herein.

The present invention will now be further described by way of the following non-limiting examples. In applying the disclosure of the example, it should be kept clearly in mind that other

and different embodiments of the methods disclosed according to the present invention will no doubt suggest themselves to those of skill in the relevant art.

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding description, utilize the present invention to its fullest extent. The following preferred specific embodiments are, therefore, to be construed as merely illustrative, and not limitative of the remainder of the disclosure in any way whatsoever.

In the foregoing and in the following examples, all temperatures are set forth uncorrected in degrees Celsius and, all parts and percentages are by weight, unless otherwise indicated.

The entire disclosure(s) of all applications, patents and publications, cited above are hereby incorporated by reference.

The following examples are provided as a guide to assist in the practice of the invention, and are not intended as a limitation on the scope of the invention.

EXAMPLE 1

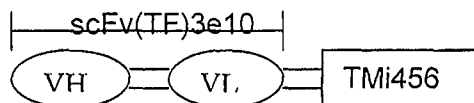
Single Chain Anti-TF Antibody Construct scFv(TF)3e10

(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P E M A Q
V N L R E S G G T L V Q P G G S L R L S C A A S
G F S F T D A W M S W V R Q A P G K E L E W V S
S I S G S G G S T Y Y A G S V K G R F T I S R D
N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
V L S L T D Y Y W Y G M D V W G Q G T L V T V
S A G G G G S G A P N F M L T Q P H S V S A S P
G K T V T I S C T R S S G S V A S Y Y V Q W Y Q
Q R P G S S P T T V I Y E D N H R P S G V P D R
F S G S I D T S S N S A S L T I S G L K T E D E
A D Y Y C Q S Y D S N N L V V F G G G T K L T V
L G A A A G A P V P Y P D P L E P R A A (264)

The single chain anti-TF antibody scFv(TF)3e10 (SEQ ID NO:1) consists of a signal peptide (-18 to -1), V_H domain (1 to 126), V_H-V_L linker (127 to 131), V_L domain (132 to 246), and e-tag sequence (247 to 264).

EXAMPLE 2

Fusion Protein Construct 1 – scFv(TF)3e10-TMi456



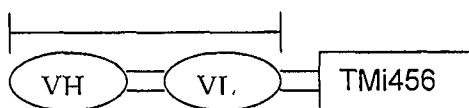
```
(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P E M A Q
V N L R E S G G T L V Q P G G S L R L S C A A S
G F S F T D A W M S W V R Q A P G K E L E W V S
S I S G S G G S T Y Y A G S V K G R F T I S R D
N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
V L S L T D Y Y W Y G M D V W G Q G T L V T V
S A G G G G S G A P N F M L T Q P H S V S A S P
G K T V T I S C T R S S G S V A S Y Y V Q W Y Q
Q R P G S S P T T V I Y E D N H R P S G V P D R
F S G S I D T S S N S A S L T I S G L K T E D E
A D Y Y C Q S Y D S N N L V V F G G G T K L T V
L G A A A G G G G S G G G G S G G G G S V E P V
D P C F R A N C E Y Q C Q P L N Q T S Y L C V C
A E G F A P I P H E P H R C Q M F C N Q T A C P
A D C D P N T Q A S C E C P E G Y I L D D G F I
C T D I D E C E N G G F C S G V C H N L P G T F
E C I C G P D S A L A G Q I G T D C A A A G A P
V P Y P D P L E P R A A (400)
```

The scFv(TF)3e10-TMi456 fusion protein (SEQ ID NO:2) consists of a signal peptide (-18 to -1), V_H domain (1 to 126), V_H-V_L linker (127 to 131), V_L domain (132 to 246), V_L-TM linker (247 to 264), TMi456 domain (265 to 382), and e-tag sequence (383 to 400). The H381G, M388L, R456G and H457Q mutations in TMi456 are underlined.

EXAMPLE 3

Fusion Protein Construct 2 - scFv(TF)3e10-TMi456Δ

64



```

(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P E M A Q
V N L R E S G G T L V Q P G G S L R L S C A A S
G F S F T D A W M S W V R Q A P G K E L E W V S
S I S G S G G S T Y Y A G S V K G R F T I S R D
N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
R V L S L T D Y Y W Y G M D V W G Q G T L V T V
S A G G G G S N F M L T Q P H S V S A S P G K T
V T I S C T R S S G S V A S Y Y V Q W Y Q Q R P
S S P T T V I Y E D N H R P S G V P D R F S G
S I D T S S N S A S L T I S G L K T E D E A D Y
Y C Q S Y D S N N L V V F G G G T K L T V L G A
A A G G G G S G G G G S G G G S V E P V D P C
F R A N C E Y Q C Q P L N Q T S Y L C V C A E G
F A P I P H E P H R C Q M F C N Q T A C P A D C
D P N T Q A S C E C P E G Y I L D D G F I C T D
I D E C E N G G F C S G V C H N L P G T F E C I
C G P D S A L A G Q I G T D C (379)

```

The scFv(TF)3e10-TMi456Δ fusion protein (SEQ ID NO:3) consists of a signal peptide (-18 to -1), V_H domain (1 to 126), V_H-V_L linker (127 to 131), V_L domain (132 to 243), V_L-TM linker (244 to 261), and TMi456 domain (262 to 379). The H381G, M388L, R456G and H457Q mutations in TMi456 are underlined.

EXAMPLE 4

Expression of the Fusion Protein in Bacterial/Mammalian Cells

Bacterial expression was possible, but it yielded a protein that had a much reduced TM cofactor activity. The fusion protein was expressed in CHO cells. The expression plasmid contains both the hygromycin B and DHFR selection markers. Original selection was done in 400 µg/ml hygromycin to select a population. The resulting population was then subjected to 100 nM methotrexate selection. During this selection, cells that have amplified copies of the region of DNA containing the selection marker, and target gene, are selected from amongst the population. The expression levels were increased from approximately 0.3 mg/L to about 6 mg/L as a result of this selection.

EXAMPLE 5

In Vitro Assays

1. Protein C Activation Assay (Chromogenic)

This assay was performed by mixing 20 µl each of the following proteins in a microtiter plate: TM sample (unknown or standard), thrombin (3nM), and protein C (1.5 µM). The assay diluent for each protein was 20 mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 2.5 mg/ml BSA, pH 7.4. The wells were incubated for 2 hours at 37°C after which protein C activation was terminated by the addition of 20 µl of hirudin (0.16 unit/µl 370 nM) in assay diluent and incubation for an additional 10 minutes.

The amount of activated protein C formed was detected by adding 100 µl of 1 mM S2266 (in assay diluent), and continuing to incubate the plate at 37°C. The absorbance at 405 nm in each well was read every 10 seconds for 30 minutes, using a Molecular Devices plate reader. The absorbance data was stored, and the change in absorbance per second (slope) in each well was calculated. The change absorbance per second is proportional to pmol/ml of activated protein C.

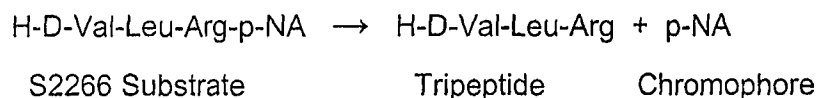
This ratio was determined empirically using varying concentrations of totally activated protein C. Samples containing 100% activated protein C were generated by mixing protein C at 0 to 1.5 µM with 60 nM rabbit TM and 30 nM thrombin, incubating for 0 to 4 hours, adding hirudin and measuring S2266 activity as above. Conditions under which 100% of the protein C was activated were defined as those in which the S2266 activity (A405/sec) reached plateau.

A unit of activity is defined as 1 pmole of activated protein C generated per ml/min under the reagent conditions defined above. Alternatively, activity values are reported in comparison to native detergent solubilized rabbit TM.

26

2. sTF/FVIIa Activation Assay

The principle of this assay is depicted below. The tripeptide p-nitroanilide amide bond of the substrate is hydrolyzed by the sTF/FVIIa complex. The liberated chromophore product, p-nitroanilide, is monitored at 405 nm and the concentration of product formed per unit time is calculated using a molar extinction coefficient of $9920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. IC_{50} values (C) are determined by fitting the initial rates into the 4 parameter equation: $Y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$



Reagents and solutions:

1. Assay buffer: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5mM CaCl_2 , 0.1% BSA, pH7.5
2. Human FVIIa (HCVIIA-0060, Haematologic Technologies Inc.): 10 x working solution- prepare 20 nM solution in assay buffer prior to use.
3. Soluble TF (Berlex): 10 x working solution- prepare 30 nM solution in assay buffer prior to use.
4. Chromogenic substrate S2266 (Kabi Pharmacia Hepar Inc.): Stock solution: 10 mM in H_2O , stored at 4 C. 2.5 x working solution- prepare 2.5 mM solution in assay buffer prior to use.
5. Antibody: Prepare 2.5x dilutions in assay buffer prior to use.

Assay Conditions:

Assays are performed in a 96-well microtiter plate at room temperature. The final concentrations of the components are as follows:

sTF	3 nM
Antibody	vary from 1000 to 0.625 nM
FVIIa	2 nM
S2266	1 mM

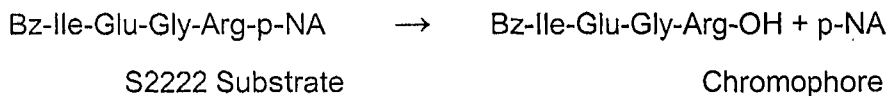
Assay Procedure:

1. Pipette 0.1 ml of 2.5x AB (or buffer control) into each well.

2. Add 0.025 ml 10x sTF and incubate 10 min at room temperature with mild shaking.
3. Add 0.025 ml 10x FVIIa, incubate 10 min at room temperature with mild shaking.
4. Add 0.1 ml 2.5x S2266 substrate, immediately transfer the plate into a plate reader and measure enzyme kinetics at 405 nm at 10 seconds interval for 15 min.

3. Factor X Activation Assay:

The principle of this assay is depicted below. FVIIa is incubated with recombinant human TF vesicles to form a protease complex capable of activating the substrate, FX. This complex is formed in the presence (or absence) of different concentrations of antibody, then the substrate FX is introduced and the reaction is allowed to proceed to form the product, active protease FXa, which is capable of hydrolyzing the p-nitroanilide amide bond of the chromogenic substrate S2222. The liberated chromophore product, p-nitroanilide, is monitored at 405 nm and the concentration of product formed per unit time is calculated using a molar extinction coefficient of $9920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. IC_{50} values (C) are determined by fitting the initial rates into the 4-parameter equation: $Y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$



Reagents and solutions:

1. Assay buffer: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5mM CaCl_2 , 0.1% BSA, pH7.5
2. Human FVIIa (HCVIIA-0031, Haematologic Technologies Inc.): 4 x working solution- prepare 100 pM solution in assay buffer prior to use.
3. Recombinant Human TF (reconstituted in our lab from Innovin, Dade): working solution- prepare 1:480 dilution in assay buffer prior to use.
4. Factor X (HCX-0060, Haematologic Technologies Inc.): 4 x working solution- prepare 1000 nM solution in assay buffer prior to use.
5. Chromogenic substrate S2222 (Kabi Pharmacia Hepar Inc.):
 Stock solution: 6 mM in H_2O , stored at 4 C.
 Working solution- prepare 0.78 mM solution in 3.57 mM EDTA (to stop the reaction), 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5 prior to use.
6. Antibody:
 Prepare 4x dilutions in assay buffer prior to use.

60

Assay Conditions:

Assays are performed in a 96-well microtiter plate at room temperature. The final concentrations of the components are as follows:

rTF vesicles	¼ of 1:480 dilution
Antibody	vary from 1000 to 0.625 nM
FVIIa	25 pM
FX	250 nM
S2222	0.546 mM

Assay Procedure:

1. Pipette 0.015 ml of 4xAB (or buffer control) into each well.
2. Add 0.015 ml 4x rTF vesicles.
3. Add 0.015 ml 4x FVIIa, incubate 10 min at room temperature with mild shaking.
4. Add 0.015 ml 4x FX, incubate 5 min at room temperature with mild shaking.
5. Add 0.14 ml S2222 substrate, immediately transfer the plate into a plate reader and measure enzyme kinetics at 405 nm at 10 seconds interval for 15 minutes.

4. Protein C Activation Assay (on TF-rich Surface)

This assay is performed as for the chromogenic protein C activation assay listed above with the exception that in this assay human TF-containing PC/PS vesicles are added to the fusion protein, or control TM, before adding the thrombin and protein C.

EXAMPLE 6**Characteristics of the Anti-TF Antibodies**

Seven different TF-binding antibodies were isolated from a fully human single chain antibody phage display library. The affinities of the sTF binding antibodies, measured using the 3IAcore, were between 35 and 470 nM. The sTF/VIIa assay was used to determine if the antibodies would block the formation of an active VIIa/TF complex. In the sTF/VIIa assay, binding of VIIa to sTF accelerates the rate of cleavage against the chromogenic peptide substrate S2266 by >20-fold. Antibodies that inhibit binding of FVIIa to TF block this acceleration. From among seven different antibodies isolated, only one of them, scFv(TF)3e10,

59

did not inhibit the sTF/FVIIa assay. This antibody increased the affinity of FVIIa for sTF, decreasing the K_D 5-fold (Figure 1). The K_D of the scFv(TF)3e10 antibody for sTF, measured using the sTF/FVIIa assay, was 65.4 nM (Figure 2). Microcalorimetry was used to compare the affinity of scFv(TF)3e10 for TF as compared to the FVIIa/TF complex. These experiments revealed that the antibody has a 20-fold higher affinity for the TF/FVIIa complex as compared to free sTF (33 nM vs. 600 nM, Figure 3). The antibodies were compared using the FX activation assay, which consists of full length TF in phospholipid vesicles, FVIIa and FX. The amount of FXa generated is determined using the chromogenic substrate S2765. Although the scFv(TF)3e10 antibody did not have the highest affinity as measured by BIAcore and it increased the affinity of FVIIa for sTF, it was the only antibody in the group that inhibited FX activation and prolonged the clotting time in the PT assay. The IC_{50} of the scFv(TF)3e10 (dimer) antibody for inhibition in the FX activation assay was 0.44 nM (Figure 4) and a two-fold extension of PT occurred at 417 nM (Figure 5).

The scFv(TF)3e10 antibody was identified on the basis of binding to recombinant human soluble TF. The sequence homology of TF between the human and murine or human and rabbit is 58% and 71%, respectively. The antibody binds to a unique epitope on human TF that interferes with activation of FX by the FVIIa/TF complex. Physiologically, the antibody has an advantage over antibodies that compete with FVII or FVIIa binding to TF. The K_D of both FVII and FVIIa in human plasma is 10 nM, or between 100- and 1000-fold greater than the K_D . The off-rate for the high affinity complex will be slow (70 to 700 seconds, assuming $k_{on} = 10^8 M^{-1} sec^{-1}$). In contrast, the K_m of FX for the VIIa/TF complex is between 0.200 to 4 μM and the concentration of FX in human plasma is 130 nM (between 0.03- and 0.65-fold K_D). The primary function of the FVIIa/TF complex in coagulation is to convert FX to FXa.

EXAMPLE 7

***In vitro* Characteristics of the Fusion Protein scFv(TF)3e10-TMi456**

The characteristics of a fusion protein of the invention, scFv(TF)3e10-TMi456, was assessed in a variety of *in vitro* assays. The fusion protein, scFv(TF)3e10-TMi456, retained the ability of inhibit FX activation by the FVIIa/TF complex ($IC_{50} = 0.5$ nM, data not shown) and acted as a cofactor for the thrombin catalyzed activation of protein C (chromogenic assay, Figure 6). No significant difference in TM cofactor activity was observed between the fusion protein and Tmi456 alone in the absence of TF-containing phospholipid vesicles. In contrast,

60

the TM cofactor activity of the fusion protein, but not TMi456, was enhanced >5-fold in the presence of TF-containing phospholipid vesicles (Figure 7). The *in vitro* potency of the fusion protein, scFv(TF)3e10-TMi456, against TF-induced coagulation (PT assay, extrinsic coagulation pathway) was 6-fold better than the scFv(TF)3e10 antibody and 17-fold better than TMi456 alone (Figure 5). In contrast, the *in vitro* potency of the fusion protein against the intrinsic and common coagulation pathways was not significantly affected (APTT and TCT assays, data not shown). Therefore, the dose of fusion protein that caused a two-fold extension in the PT had only a modest effect on the APTT, whereas TMi456, at an equivalent dose in the PT, caused a 4-fold enhancement in the APTT (Figure 8). This *in vitro* profile is consistent with that expected for TF/FVIIa-directed anticoagulants that are known to have superior efficacy to bleeding ratios in animal models of thrombosis. In agreement with the plasma-based coagulation assays, the fusion protein scFv(TF)3e10-TMi456 was more potent in a TF-induced whole blood coagulation assay (Thromboelastograph, TEG) than either scFv(TF)3e10 or Tmi456 alone (Figure 9). In addition, the fusion protein scFv(TF)3e10-TMi456 had a more predictable dose response in the TF-induced whole blood coagulation assay than low molecular weight heparin (LMWH, Figure 10). In summary, the above data demonstrate that the fusion proteins of the invention are potent and selective anticoagulants *in vitro*.

EXAMPLE 8

In vivo Rat Thromboembolism Model

The TF antibody portion of the fusion protein scFv(TF)3e10-TMi456, is specific for primate TF. A thromboembolism model triggered by human TF (thromboplastin reagent containing human recombinant TF, Ortho) was developed in conscious male Sprague-Dawley rats (350 – 400 g, n > 7/group). In this model of disseminated intravascular coagulation (DIC), TF, via thromboplastin injection, induces pulmonary fibrin deposition, respiratory failure, and death. Equimolar doses of scFv(TF)3e10-TMi456 or scFv(TF)3e10, or vehicle were injected into the tail vein followed, 15 min later, by a bolus injection of thromboplastin (0.5 ml/kg). In the vehicle treated group, this dose of TF resulted in 60% lethality (LD₆₀), usually within 5 min after thromboplastin injection. The rats were scored according to the following morbidity-mortality scoring system: 0 = unaffected; 1 = mild respiratory distress (recover within 30 min); 2 = severe respiratory distress (moribund, recovery required more than 60 min); and 3 = death. The average score was used for comparing the efficacy of the 4 different treatment groups. The

results using this *in vivo* assay are depicted in Figure 11. The fusion protein of the invention was able to inhibit death and respiratory distress in this assay.

61

The preceding examples can be repeated with similar success by substituting the generically or specifically described reactants and/or operating conditions of this invention for those used in the preceding examples.

While the invention has been illustrated with respect to the production of certain fusion protein constructs, it is apparent that variations and modifications of the invention can be made without departing from the spirit or scope of the invention.

* * * * *

6

62

What is claimed is:

1. An anticoagulant fusion protein, comprising a targeting protein that interacts with tissue factor (TF) or the factor VIIa/TF (FVIIa/TF) complex, which is operably linked to the thrombomodulin (TM) EGF456 domain or analogs, fragments, derivatives or variants thereof, alone or in combination with at least one additional TM domain selected from the group consisting of the interdomain loop between EGF3 and EGF4, the EGF123 domain, the O-linked glycosylation domain, and the N-terminal hydrophobic region domain, or analogs, fragments, derivatives or variants thereof.
2. The fusion protein of Claim 1, wherein the TM domain comprises the interdomain loop between EGF3 and EGF 4.
3. The fusion protein of Claim 2, wherein said EGF456 domain contains point mutations that render said fusion protein more resistant to oxidative damage or protease activity or increase the catalytic efficiency of said fusion protein.
4. The fusion protein of Claim 3, wherein said EGF456 domain contains at least one point mutation selected from the group consisting of H381G, M388L, R456G and H457Q.
5. The fusion protein of Claim 4, wherein said EGF456 domain consists of point mutations at H381G, M388L, R456G and H457Q.
6. The fusion protein of Claim 1, wherein said targeting protein is an antibody that binds TF.
7. The fusion protein of Claim 6, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
8. The fusion protein of Claim 7, wherein said monoclonal antibody binds to the FVIIa/TF complex with greater affinity than to TF alone.
9. The fusion protein of Claim 8, wherein said monoclonal antibody is a single chain antibody, a Fab dimer antibody or an IgG antibody.

10. The fusion protein of Claim 9, wherein said monoclonal antibody is a single chain antibody.
11. The fusion protein of Claim 7, wherein said monoclonal antibody is operably linked to more than one TM domain.
12. The fusion protein of Claim 7, wherein said monoclonal antibody neutralizes TF.
13. The fusion protein of Claim 1, wherein said fusion protein is glycosylated.
14. The fusion protein of Claim 1, wherein said fusion protein is modified by the addition of polyethylene glycol.
15. The fusion protein of Claim 1, wherein said fusion protein is biotinylated for binding streptavidin.
16. The fusion protein of Claim 1, wherein said targeting protein is FVIIai.
17. The fusion protein of Claim 1, wherein said targeting protein is TFPI.
18. A pharmaceutical composition, comprising the fusion protein of Claim 1, which composition comprises a pharmaceutically acceptable excipient and a therapeutically effective amount of said fusion protein.
19. A method for protecting against thrombus formation, comprising administering a therapeutically effective amount of the fusion protein of Claim 1, wherein said fusion protein inhibits the generation of thrombin without directly affecting other coagulation parameters such as the activation and aggregation of platelets.
20. The method of Claim 19, wherein said method is to protect against thrombus formation in ischaemic stroke, thrombotic complications following angioplasty, or microvascular surgery.
21. A method for preventing and treating deep vein thrombosis (DVT), disseminated intravascular coagulation (DIC), acute coronary syndrome, or cancer with evidence of
- 

coagulopathy in a patient, comprising administering a therapeutically effective amount of the fusion protein of Claim 1 to said patient.

64

22. A method for regulating the inflammatory response in a patient, comprising administering a therapeutically effective amount of the fusion protein of Claim 1 to said patient.

23. The method of Claim 22, wherein said inflammatory response is selected from the group consisting of sepsis, skin and vein grafts, and organ transplants.

24. The fusion protein of Claim 1, wherein said fusion protein can be used to form a non-thrombogenic coating on the surface of a medical device, wherein said medical device comes in contact with blood.

25. A kit, comprising the fusion protein of Claim 1.

26. A kit, comprising DNA sequences encoding the fusion protein components of Claim 1.

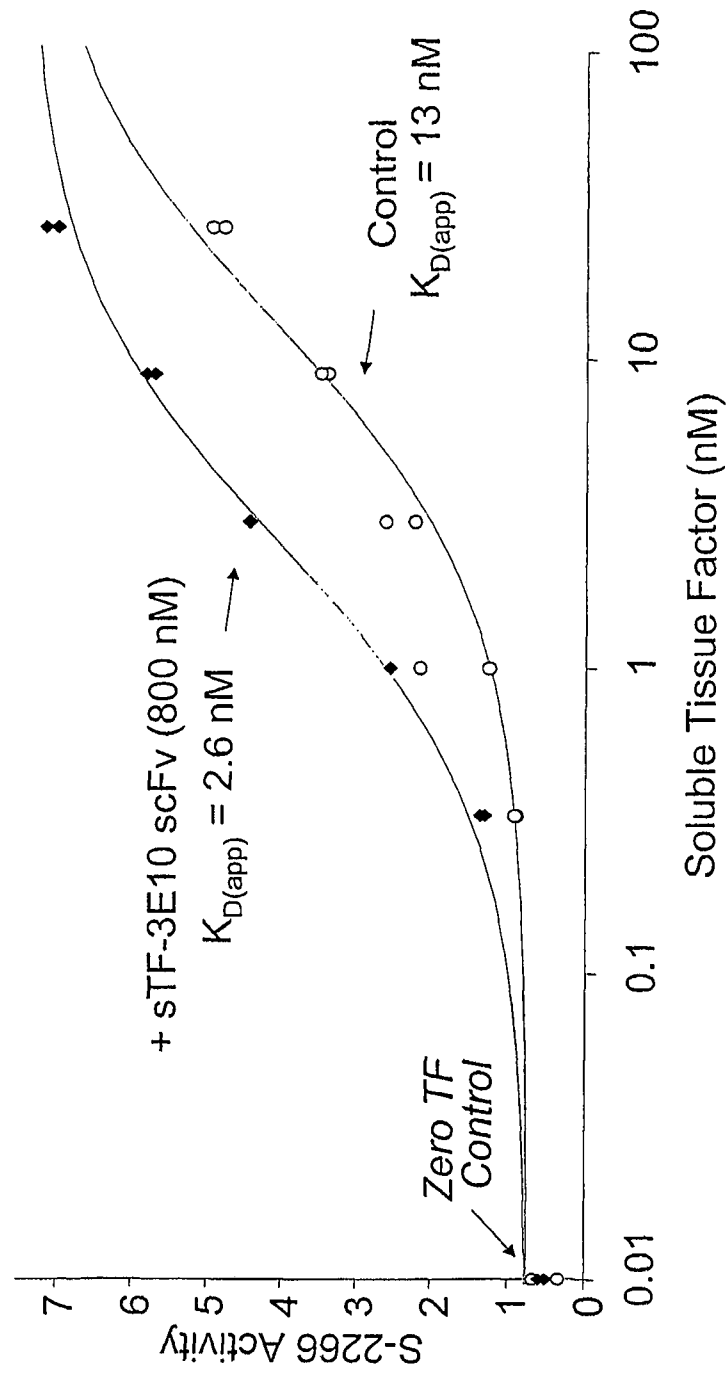
27. A gene therapy composition, comprising the DNA encoding the fusion protein consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3, in combination with a therapeutically effective amount of a gene therapy vector.

28. An anticoagulant fusion protein, comprising a targeting protein that interacts with TF or the FVIIa/TF complex, wherein said targeting protein is a single chain antibody that binds TF, which is operably linked to the TM EGF456 domain and the interdomain loop between EGF3 and EGF4, wherein said EGF456 domain consists of point mutations at H381G, M388L, R456G and H457Q.

The fusion protein of Claim 28, wherein said fusion protein comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3.

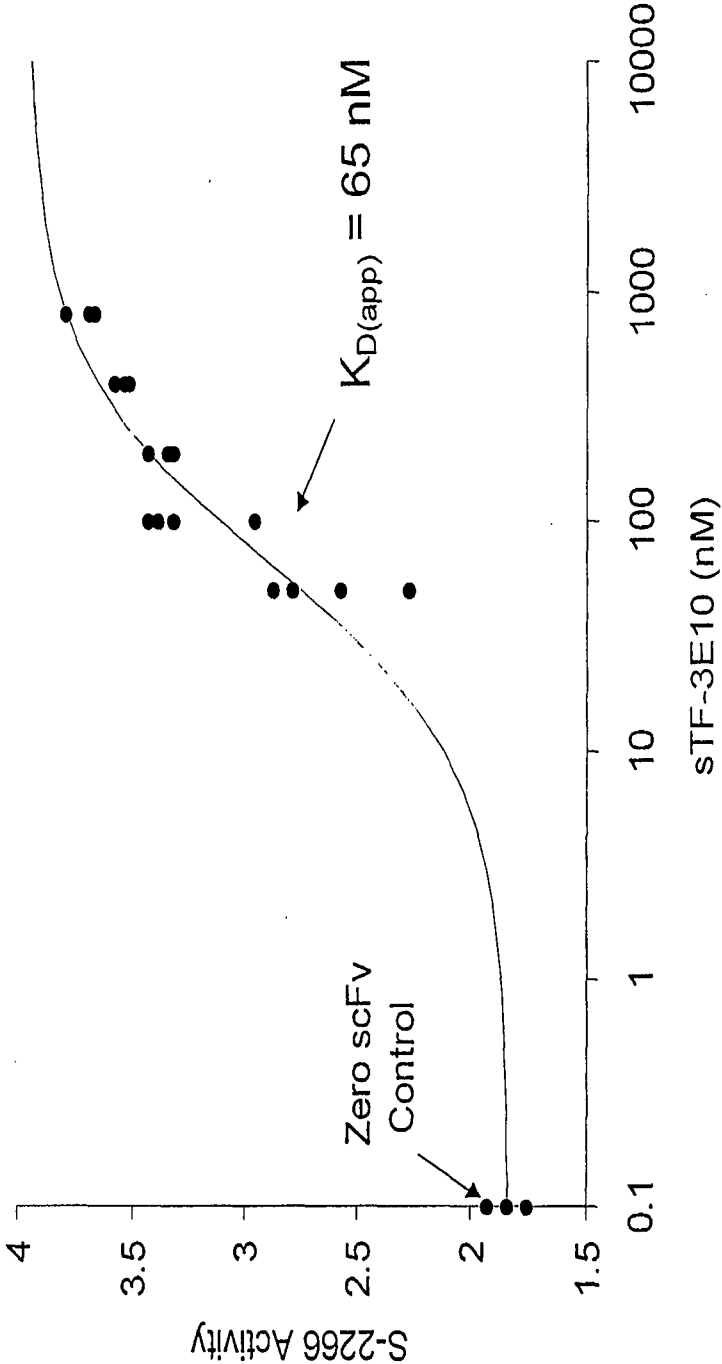
65

Figure 1



66

Figure 2



67

Figure 3

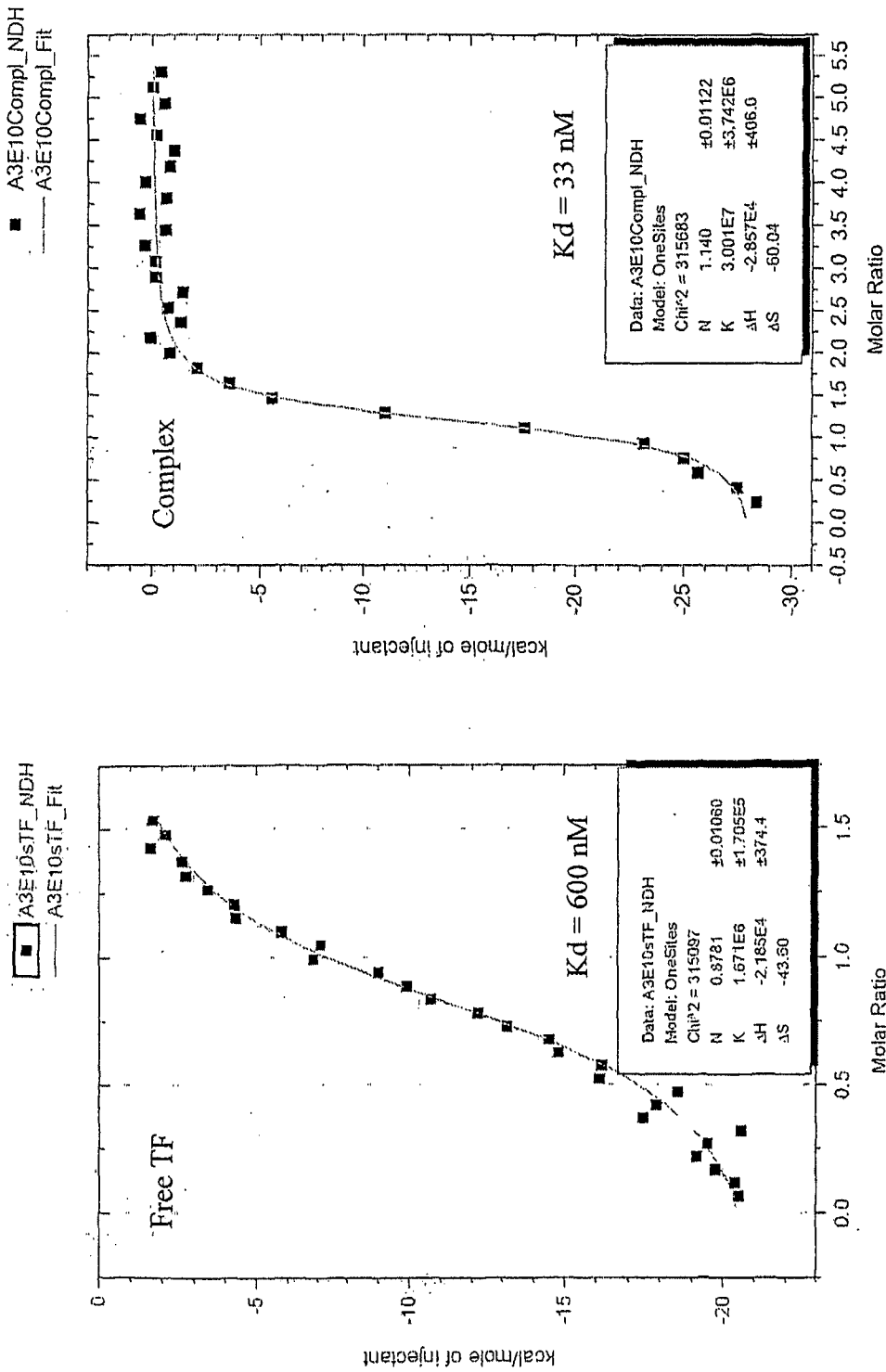
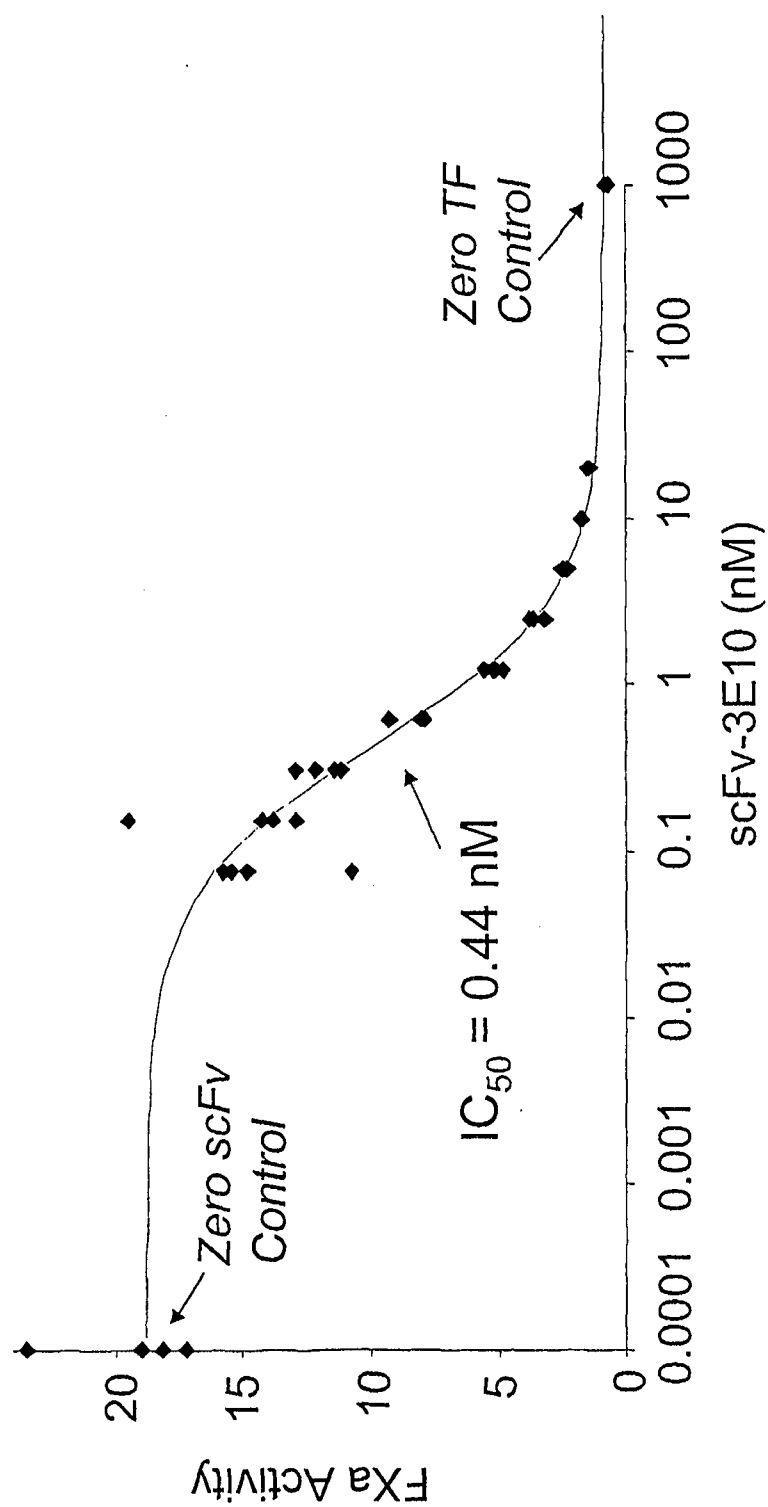
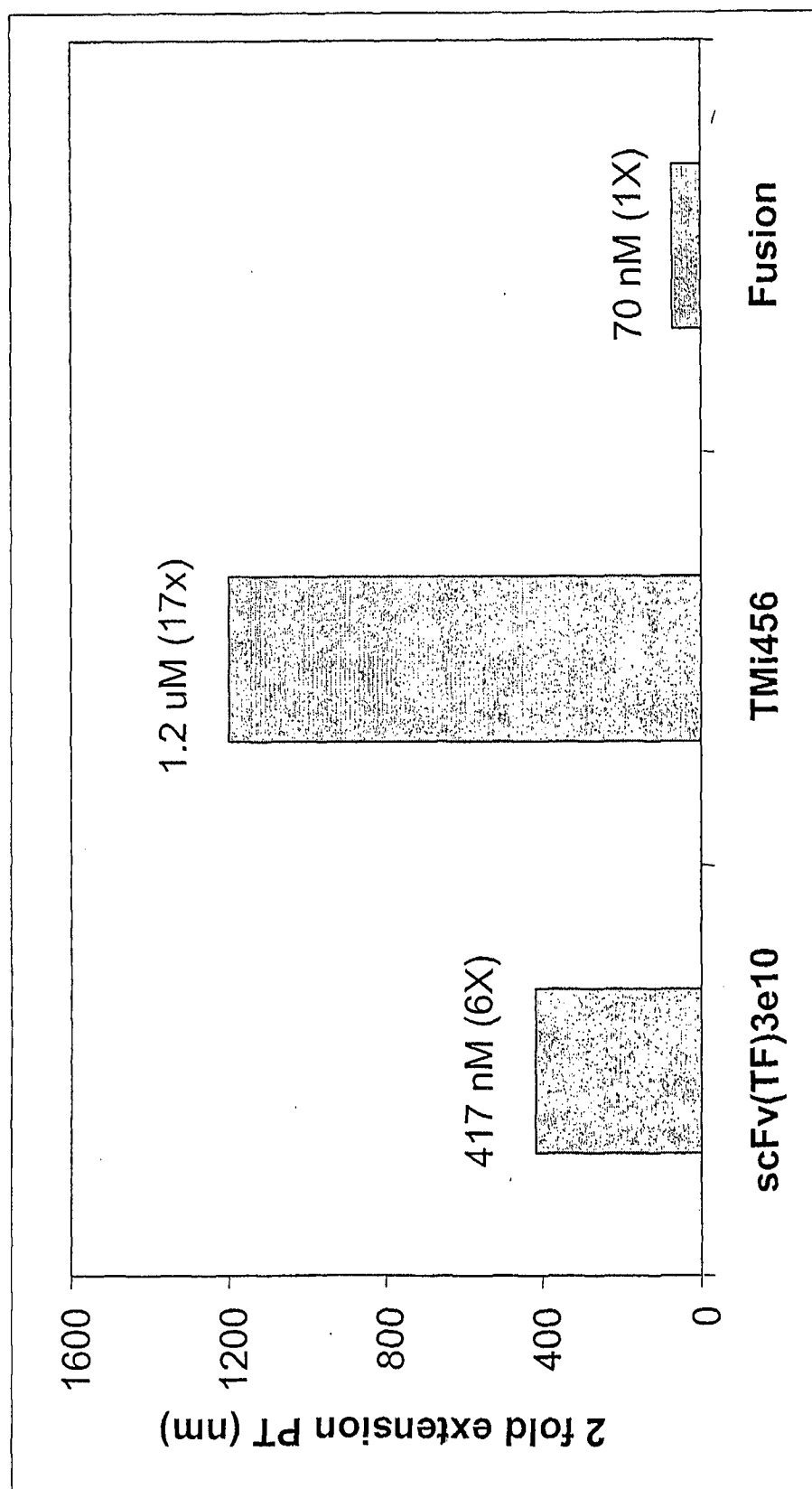


Figure 4



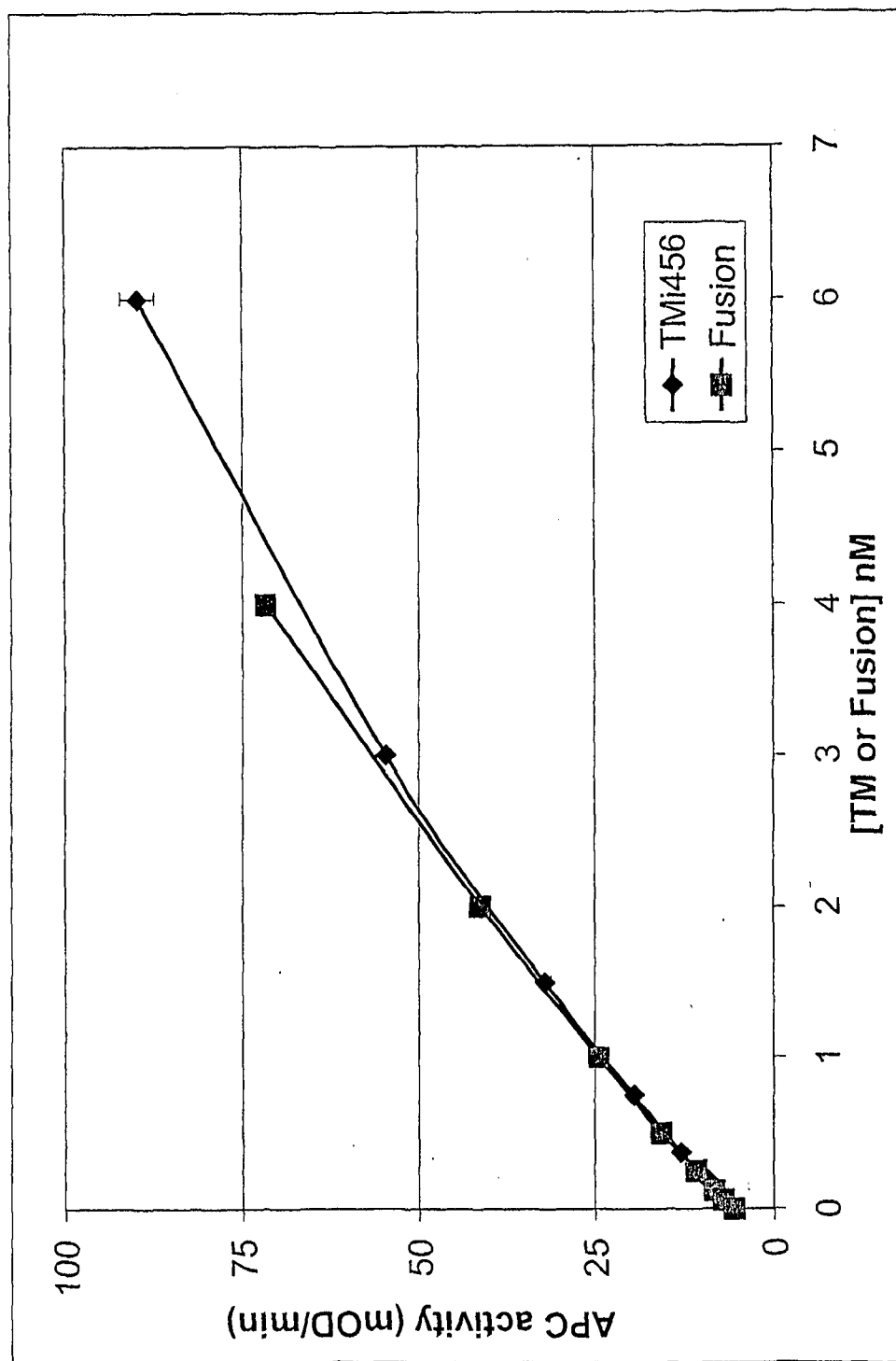
60

Figure 5



69

Figure 6



70

71

Figure 7

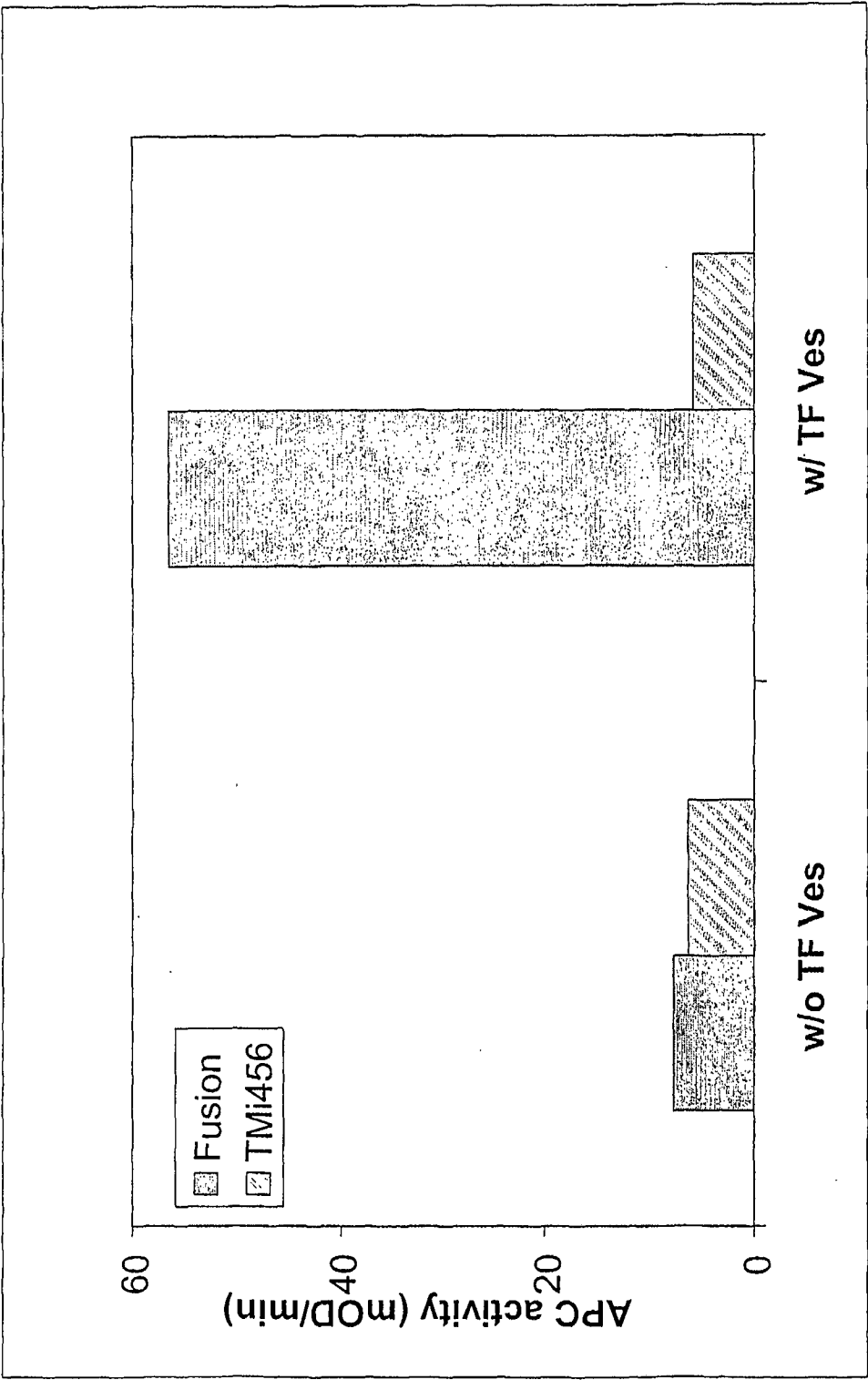
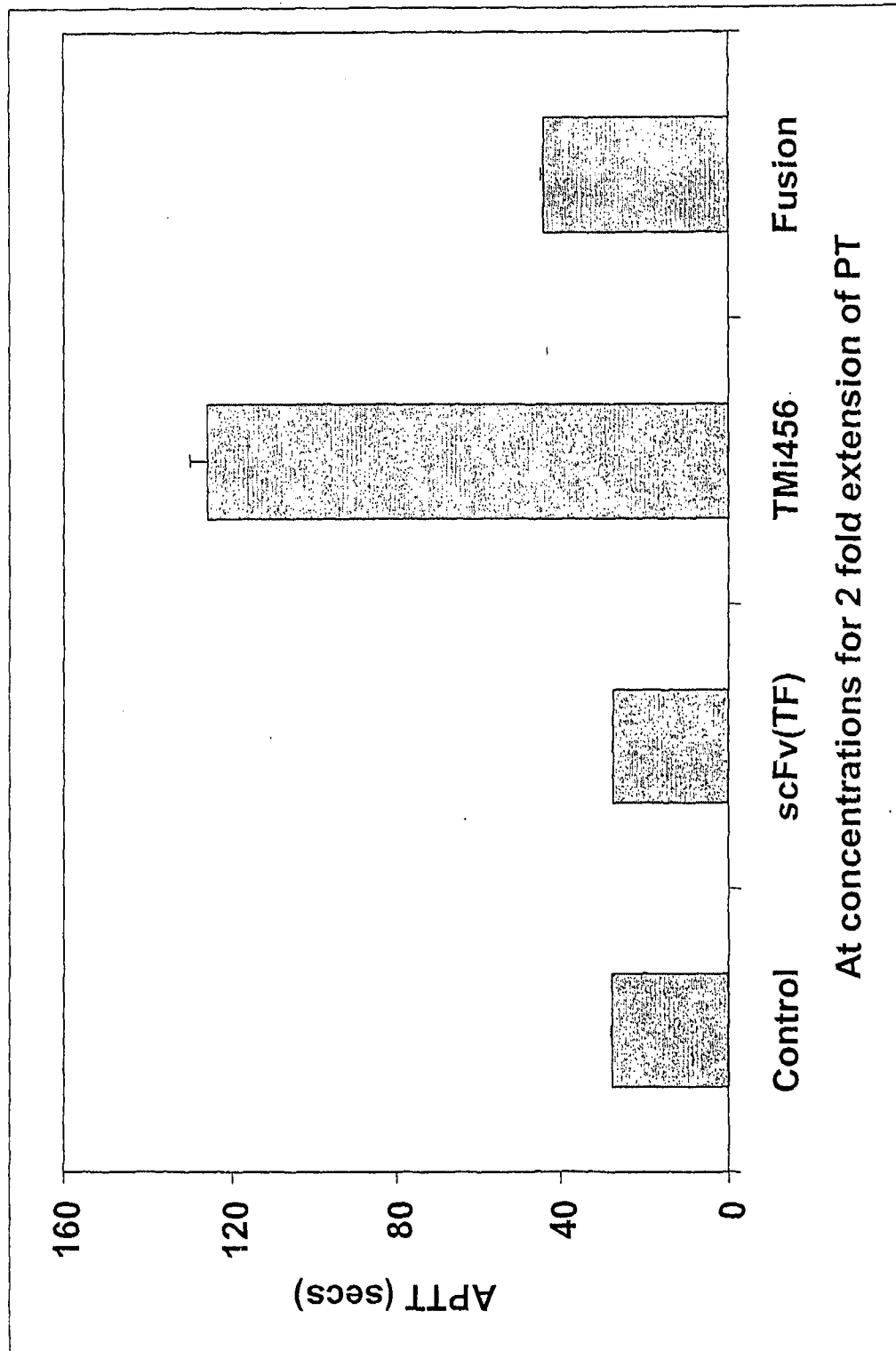


Figure 8



72

73

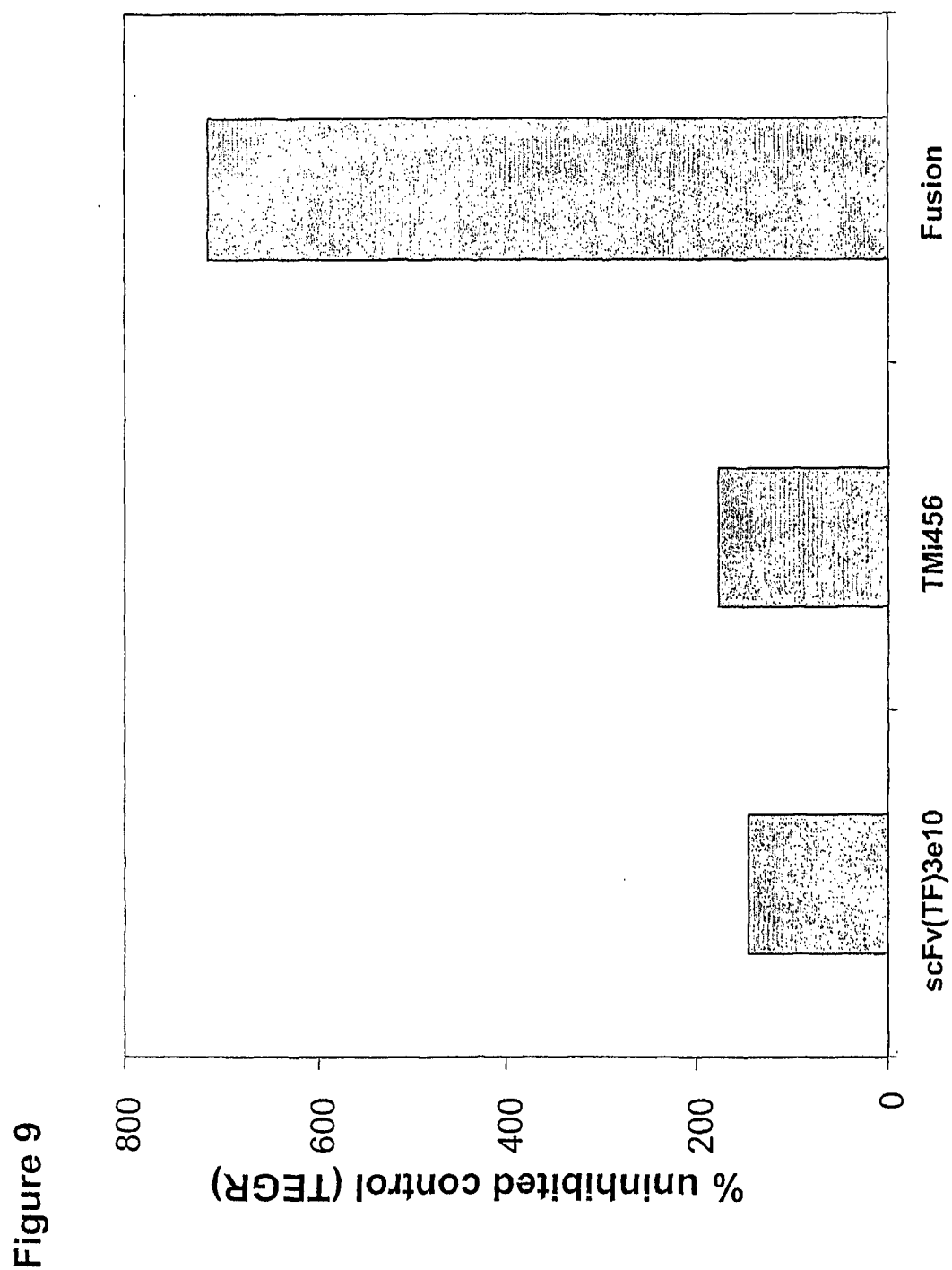
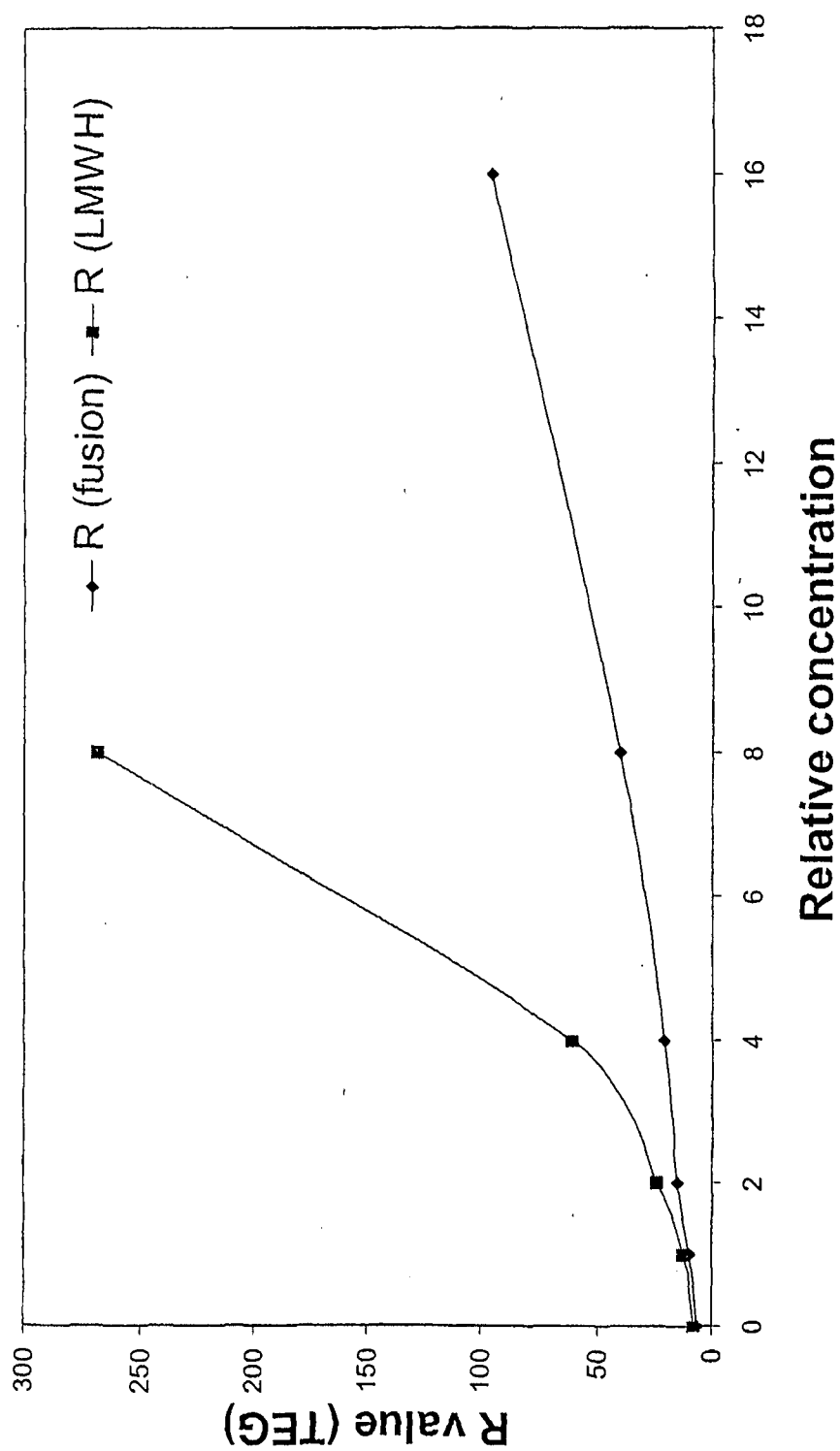


Figure 10



74

75

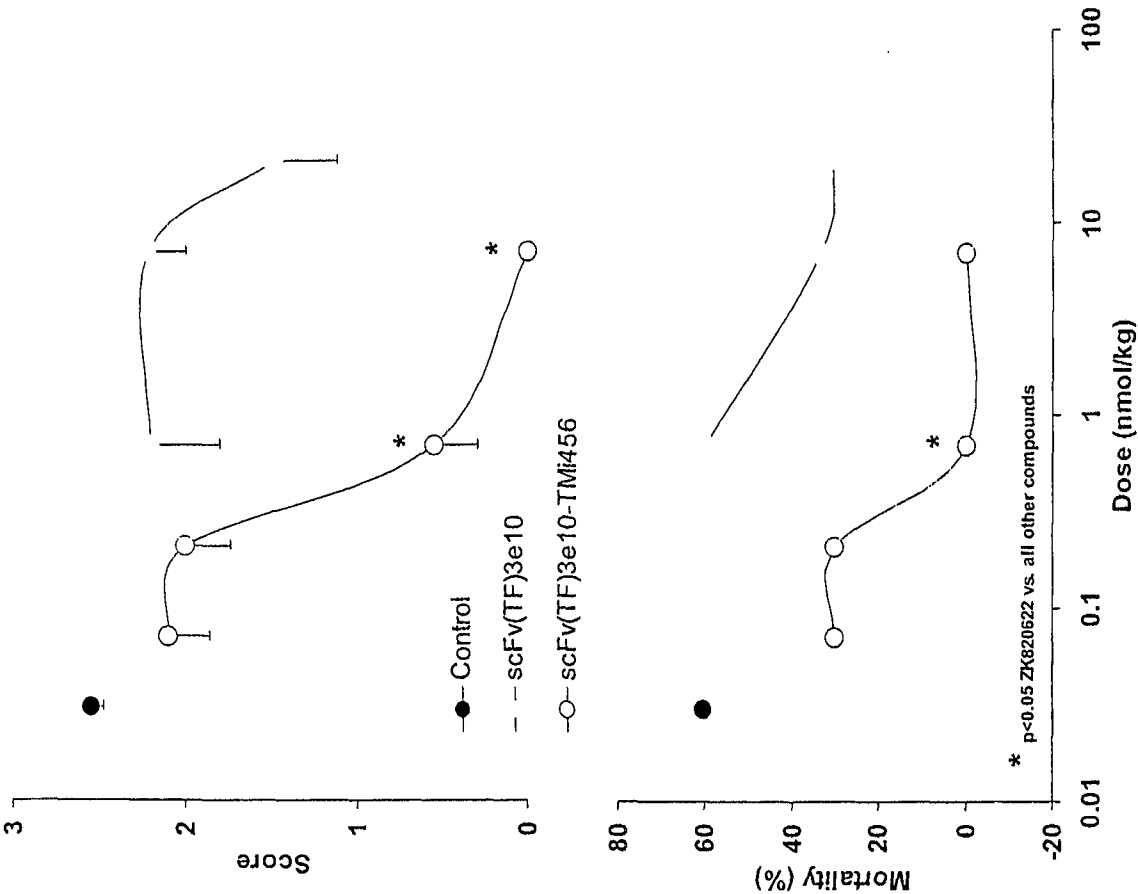


Figure 11

SEQUENCE LISTING

<110> Light, David
McLean, Kirk

<120> A Targeted Soluble Tissue Factor Antibody Thrombomodulin
Fusion Protein as an Anticoagulant

<130> 52295AUSM1

<150> US 60/376,566

<151> 2002-05-01

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 1

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His
145 150 155 160

Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg
165 170 175

Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg
180 185 190

Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro
195 200 205

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn
210 215 220

Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro
260 265 270

Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Ala Ala
275 280

<210> 2
<211> 418
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 2
Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

3/5

Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
 115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His
 145 150 155 160

Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg
 165 170 175

Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg
 180 185 190

Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro
 195 200 205

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn
 210 215 220

Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp
 225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly
 245 250 255

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser
 260 265 270

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Pro Val Asp Pro
 275 280 285

Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 290 295 300

Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
 305 310 315 320

Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
 325 330 335

Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
 340 345 350

78

Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
 355 360 365
 Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
 370 375 380
 Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Gly Gln Ile Gly Thr Asp Cys
 385 390 395 400
 Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg
 405 410 415

Ala Ala

<210> 3
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 3

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

5/5

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Phe	Met	Leu	Thr	Gln	Pro	His	Ser	Val	Ser	
145					150					155					160	
Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Thr	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Arg	Ser	Ser	Gly	
				165					170					175		
Ser	Val	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Val	Gln	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Ser	
			180					185					190			
Ser	Pro	Thr	Thr	Val	Ile	Tyr	Glu	Asp	Asn	His	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	
		195					200					205				
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Ser	
	210						215					220				
Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	
225					230					235					240	
Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Asn	Asn	Leu	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	
				245					250					255		
Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
			260					265					270			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Glu	Pro	Val	Asp	Pro	Cys	Phe	Arg	
		275					280					285				
Ala	Asn	Cys	Glu	Tyr	Gln	Cys	Gln	Pro	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Tyr	Leu	
	290					295					300					
Cys	Val	Cys	Ala	Glu	Gly	Phe	Ala	Pro	Ile	Pro	His	Glu	Pro	His	Arg	
305					310					315					320	
Cys	Gln	Met	Phe	Cys	Asn	Gln	Thr	Ala	Cys	Pro	Ala	Asp	Cys	Asp	Pro	
				325					330					335		
Asn	Thr	Gln	Ala	Ser	Cys	Glu	Cys	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ile	Leu	Asp	Asp	
			340					345					350			
Gly	Phe	Ile	Cys	Thr	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Glu	Asn	Gly	Gly	Phe	Cys	
		355					360					365				
Ser	Gly	Val	Cys	His	Asn	Leu	Pro	Gly	Thr	Phe	Glu	Cys	Ile	Cys	Gly	
	370					375					380					
Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Ala	Gly	Gln	Ile	Gly	Thr	Asp	Cys				
385					390						395					

80

SEQUENCE LISTING

<110> Light, David
McLean, Kirk

<120> A Targeted Soluble Tissue Factor Antibody Thrombomodulin
Fusion Protein as an Anticoagulant

<130> 52295AUSM1

<150> US 60/376,566

<151> 2002-05-01

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 1

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

82

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His
145 150 155 160

Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg
165 170 175

Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg
180 185 190

Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro
195 200 205

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn
210 215 220

Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro
260 265 270

Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Ala Ala
275 280

<210> 2
<211> 418
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 2
Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

3/5

Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
 115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His
 145 150 155 160

Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg
 165 170 175

Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg
 180 185 190

Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro
 195 200 205

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn
 210 215 220

Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp
 225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly
 245 250 255

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser
 260 265 270

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Pro Val Asp Pro
 275 280 285

Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 290 295 300

Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
 305 310 315 320

Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
 325 330 335

Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
 340 345 350

Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
 355 360 365

Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
 370 375 380

Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Gly Gln Ile Gly Thr Asp Cys
 385 390 395 400

Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg
 405 410 415

Ala Ala

<210> 3

<211> 397

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 3

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
 1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
 20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
 115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140

GA

5/5

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Phe	Met	Leu	Thr	Gln	Pro	His	Ser	Val	Ser	
145					150					155					160	
Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Thr	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Arg	Ser	Ser	Gly	
				165					170					175		
Ser	Val	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Val	Gln	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Ser	
			180					185					190			
Ser	Pro	Thr	Thr	Val	Ile	Tyr	Glu	Asp	Asn	His	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	
		195					200					205				
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Ser	
	210					215						220				
Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	
225					230					235					240	
Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Asn	Asn	Leu	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	
				245					250					255		
Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
			260					265					270			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Glu	Pro	Val	Asp	Pro	Cys	Phe	Arg	
		275					280					285				
Ala	Asn	Cys	Glu	Tyr	Gln	Cys	Gln	Pro	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Tyr	Leu	
	290					295					300					
Cys	Val	Cys	Ala	Glu	Gly	Phe	Ala	Pro	Ile	Pro	His	Glu	Pro	His	Arg	
305					310					315					320	
Cys	Gln	Met	Phe	Cys	Asn	Gln	Thr	Ala	Cys	Pro	Ala	Asp	Cys	Asp	Pro	
				325					330					335		
Asn	Thr	Gln	Ala	Ser	Cys	Glu	Cys	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ile	Leu	Asp	Asp	
			340					345					350			
Gly	Phe	Ile	Cys	Thr	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Glu	Asn	Gly	Gly	Phe	Cys	
		355					360					365				
Ser	Gly	Val	Cys	His	Asn	Leu	Pro	Gly	Thr	Phe	Glu	Cys	Ile	Cys	Gly	
	370					375					380					
Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Ala	Gly	Gln	Ile	Gly	Thr	Asp	Cys				
385					390						395					

86

NUEVAS PROTEINAS DE FUSION CON TROMBOMODULINA DIRIGIDAS CONTRA FACTORES TISULARES COMO ANTICOAGULANTES

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Para lograr una hemostasia normal es esencial mantener un equilibrio apropiado entre la actividad procoagulante y anticoagulante dentro de los vasos sanguíneos (Davie, E.W. et al. (1991) *Biochemistry*, 30(43): 10363-10370). Una perturbación de dicho equilibrio en el sentido de aumentar la coagulación produce la trombosis, que puede ser causante de un ataque cardíaco, un accidente cerebrovascular, embolia pulmonar y trombosis venosa. Por ello persiste la necesidad de contar con anticoagulantes más eficaces y seguros para el tratamiento de determinados trastornos trombóticos.

El factor tisular ("TF") es una glucoproteína transmembrana que opera como principal iniciador de la cascada de la coagulación (Nemerson, Y. (1995) *Thromb. Haemost.* 74(1): 180-184). Bajo condiciones fisiológicas normales el TF activo no está en contacto con la sangre. Durante una lesión vascular, la exposición del TF a la sangre y el colágeno subendotelial conducen a la activación de las plaquetas y de los factores de coagulación y posteriormente a la formación de un coágulo hemostático. Una inducción inapropiada de la expresión del TF en diversos estados clínicos puede conducir a una trombosis potencialmente mortal y/o puede contribuir en complicaciones patológicas. Se cree que la exposición al TF después de la ruptura de la placa es el hecho responsable de la oclusión trombótica que conduce a infarto de miocardio agudo y apoplejía. En estos estados, las vías de señalamiento proinflamatorias activadas por los factores de coagulación también contribuyen en la formación de edemas y en un mayor tamaño de infarto. Las lesiones vasculares asociadas con una angioplas-

87

tia conducen a la sensibilización del TF sobre las SMC que se cree que inducen las vías de señalamiento celulares asociadas con la restenosis. La sobreexpresión del TF en distintos tipos de cáncer y en las sepsis gram-negativas conduce a una trombosis potencialmente mortal y a la activación de las vías inflamatorias.

El complejo del factor VIIa y el TF ("FVIIa")/TF está comprometido en el mecanismo patogénico de diversas enfermedades trombóticas y el nivel de TF en circulación constituye un factor de riesgo para algunos pacientes. Los factores FVIIa y TF cumplen funciones únicas en las lesiones vasculares, particularmente en el mantenimiento de la hemostasia y el inicio de las trombosis. El TF se expresa habitualmente en la capa adventicia, pero en las enfermedades vasculares está sensibilizado y se expresa de forma inapropiada en las capas media y neoíntima. En las placas ateroscleróticas está incrementada la expresión del TF y están separadas de la sangre por una delgada capa fibrosa que se puede romper por exposición al TF. Las intervenciones quirúrgicas, tal como una angioplastia con balón, implantación de Stents o endoarterectomía lesionan la pared de los vasos y exponen el TF subyacente. En la placa aterosclerótica, de paredes delgadas, rica en lípidos, la ruptura espontánea o erosión endotelial conducen a la exposición del TF y a la trombosis, dando como resultado una angina inestable e infarto de miocardio. El TF puede circular en las micropartículas derivadas de células y los niveles de TF en circulación están elevados en la angina inestable lo cual sugiere que este TF en circulación puede contribuir en la formación de trombos (Soejima, H. et al. (1999) *Circulation* 99(22): 2908-2913). A menudo se ha asocia-

88

do al cáncer con un estado hipercoagulable atribuido a una sobreexpresión del TF sobre las células tumorales. Esto predispone al paciente a trombosis venosa profunda, embolia pulmonar y un bajo grado de coagulación intravascular diseminada ("DIC"). La DIC da como resultado la deposición de fibrina microvascular que contribuye a una insuficiencia de múltiples órganos. Los resultados de los modelos de lesiones arteriales agudas de trombosis indican que los inhibidores del complejo FVIIa/TF basados en proteínas, tal como el inhibidor de la vía del factor tisular ("TFPI") y del sitio activo del factor VIIa ("FVIIai"), constituyen antitrombóticos eficaces con menos hemorragia en comparación con los inhibidores de trombina y factor Xa ("FXa"). Además, la inhibición del complejo FVIIa/TF es superior a otros anticoagulantes (por ejemplo, heparina, inhibidores de FXa) en cuanto a la prevención del aumento del espesor de la neointima y la estenosis vascular después de una lesión por balón (Jang, Y. et al. (1995) *Circulation* 92(10): 3041-3050).

La trombomodulina ("TM") es una glucoproteína transmembrana que presenta propiedades anticoagulantes y que se expresa predominantemente en la superficie luminal de las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos (Esmon, N.L. et al. (1982) *J. Biol. Chem.* 257(2): 859-864; Salem, H.H. et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 259(19): 12246-12251). La TM madura, de longitud completa es una proteína modular de 557 residuos de aminoácidos compuesta de 5 dominios estructurales: una región hidrofóbica N-terminal, (residuos 1-226); una región rica en cisteína (residuos 226-462); una región rica en Ser/Thr, O-glicosilada (residuos 463-497); una región transmembrana hidrofóbica (residuos 498-521); y una cola ci-

84

topoplasmática C-terminal (residuos 522-557).

La región rica en cisteína incluye seis estructuras homólogas repetidas del precursor del factor de crecimiento epidérmico ("EGF"), denominados dominios EGF, de homología con EGF o de tipo EGF. La región rica en cisteína se puede dividir además en 3 dominios: las repeticiones de tipo EGF 1, 2 y 3 ("EGF123", residuos 226-344), el bucle interdominio entre EGF3 y EGF4 (residuos 345-349) y los dominios tipo EGF 4, 5 y 6 ("EGF456", residuos 350-462). La función del EGF456 consiste en la activación de la unión de trombina y la proteína C. Un estudio ha sugerido que la quinta y sexta repetición de tipo EGF ("EGF5", residuos 390-407, y "EGF6", residuos 427-462, respectivamente) tienen la capacidad de ligar trombina (Kurosawa, S. et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263(13): 5993-5996); otro sugiere que es suficiente el dominio EGF456 para actuar como cofactor en la actividad de activación de la proteína C mediada por trombina (Zushi, M. et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264(18): 10351-10353). El dominio rico en Ser/Thr aumenta la unión de trombina mediada por EGF456. La tercera repetición de tipo EGF ("EGF3", residuos 311-344) es necesaria para la activación del inhibidor de fibrinólisis activada por trombina ("TAFI"). Se han descrito varias mutaciones puntuales en EGF3 que interfieren con la activación de TAFI (Wang, W. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275(30): 22942-22947). El complejo trombina/TM convierte la proteína C en la proteína C activada ("APC"), que a su vez degrada los factores Va y VIIIa, impidiendo de esa manera la generación adicional de trombina. Por ello, la TM funciona como un interruptor molecular que convierte trombina en un anticoagulante a partir de un procoagulante.

90

La K_m de la proteína C para el complejo trombina/TM está reducida 10 veces cuando la TM está ubicada sobre la superficie de una membrana (Esmon, C.T. (1995) *FASEB J.* 9(10): 946-955). La concentración de proteína C en sangre ($0,065 \mu M$) se encuentra significativamente por debajo del valor informado de K_m ($5 \mu M$) para el complejo TM/trombina soluble, estableciendo entonces que la TM sobre la superficie de membrana procoagulante dará como resultado un aumento local marcado en la velocidad de generación de proteína C.

La TM inhibe la trombosis por un mecanismo diferente de la heparina o derivados de la misma. La heparina es un cofactor para la antitrombina III e inhibe tanto el FXa como la trombina a través de mecanismos dependientes de antitrombina III. La trombina unida a trombos está protegida de la acción de la antitrombina III, que limita la eficacia antitrombótica de la heparina o heparina de bajo peso molecular ("LMWH") sobre los coágulos preexistentes. Esto explica la falla de la heparina o LMWH para inhibir el crecimiento de trombos desencadenado por la trombina unida a coágulos o protrombinasa en los estudios en primates no humanos. Por el contrario, la TM recombinante atenúa la generación de trombina inducida por coágulos y la formación de fibrina de una manera dependiente de la dosis (Mohri, M. et al. (1998) *Thromb. Haemost.* 80(6): 925-929). El efecto inhibidor de la TM es eliminado por los anticuerpos anti-proteína C. La inhibición de la actividad procoagulante unida a coágulos es clínicamente importante porque la actividad procoagulante unida a coágulos da como resultado un crecimiento más rápido de los coágulos y en última instancia una oclusión vascular o complicaciones tromboembólicas. La inhibición del crecimiento de trombos permite

91

que los sistemas fibrinolíticos endógenos eliminen los coágulos con mayor rapidez y por completo. Además, también se espera que la TM sea más eficaz que la heparina en aquellas condiciones patológicas donde la antitrombina plasmática es eliminada, tal como DIC. Si bien sólo la TM y la heparina inhiben el consumo de plaquetas y fibrinógeno en el DIC experimental, solamente la TM era eficaz cuando se eliminaban los niveles de antitrombina III.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevas proteínas de fusión que actúan como anticoagulantes y comprenden una proteína direccionadora, que interactúa con el factor tisular ("TF") o bien con el complejo del factor VIIa/factor tisular ("FVIIa/TF"), están ligadas operativamente al dominio EGF456 de trombosmodulina ("TM") sólo o están combinadas con al menos un dominio adicional seleccionado del grupo formado por el dominio hidrofóbico de la región N-terminal, el dominio EGF123, el bucle de interdominio entre EGF3 y EGF4 y el dominio rico en Ser/Thr O-glicosilado, o análogos, fragmentos, derivados o variantes de los mismos.

La proteína de fusión anticoagulante de esta invención busca y se une a la TF o el complejo de FVIIa/TF en el sitio de una lesión, localizando la TM hacia el sitio de la lesión, y evitando de esa manera la formación de trombos, con lo cual funciona de una manera más eficaz como anticoagulante en comparación ya sea con un anticuerpo anti-TF soluble o con TM soluble o fragmentos de TM. La proteína de fusión es más eficaz que la heparina de bajo peso molecular ("LMWH") en el tratamiento de algunas enfermedades, incluyendo, por ejemplo, sepsis, coagulación intravascular diseminada, apoplejía is-

92

quémica, trombosis venosa profunda, síndromes coronarios agudos, complicaciones trombóticas después de una angioplastia y coagulopatías en los estados avanzados de cáncer. Además, la proteína de fusión es de utilidad en la cirugía microvascular, injertos de piel y venas y en los trasplantes de órganos.

En otro aspecto, la invención provee composiciones farmacéuticas que incluyen las proteínas de fusión de la invención.

En otro aspecto, la invención provee un método para proteger a un paciente contra la formación de trombos que comprende la administración de una cantidad eficaz para uso terapéutico de la proteína de fusión a dicho paciente, y que permite entonces inhibir la generación de trombina sin afectar directamente otros parámetros de coagulación, tal como la activación y agregación de plaquetas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para prevenir y tratar la trombosis venosa profunda ("DVT") o la coagulación intravascular diseminada ("DIC") o el síndrome coronario agudo o cáncer con evidencia de coagulopatías en un paciente, que comprende la administración de una cantidad eficaz para uso terapéutico de la proteína de fusión a dicho paciente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para regular la respuesta inflamatoria en un paciente que comprende administrar una cantidad eficaz para uso terapéutico de la proteína de fusión a dicho paciente.

En aún otro aspecto, la proteína de fusión de la invención se puede utilizar para formar un recubrimiento no trombogénico sobre la superficie de dispositivos médicos que to-

CP3

man contacto con sangre.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un conjunto de elementos [kit] que comprende una proteína de fusión que contiene una proteína direccionadora, que se une al TF o al complejo de FVIIa/TF, y a los dominios de la TM. Como alternativa, el conjunto de elementos puede comprender secuencias de ADN que codifican componentes de la proteína de fusión.

También se describen métodos para fabricar las proteínas de fusión de la invención, tanto recombinantes como de síntesis.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. La unión de scFv(TF)3e10 a STF incrementa la afinidad aparente de STF por el FVIIa. El ensayo de activación de STF/FVIIa se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 5 con el título "Ensayo de activación de STF/FVIIa" usando FVIIa 2 nM en presencia y ausencia de scFv(TF)3e10 800 nM. En el ensayo se obtuvo el título de STF y se determinó la velocidad de clivaje del sustrato cromogénico (S-2266). Se calculó el valor de K_D aparente para STF usando un ajuste de 4 parámetros estándar.

Figura 2. Medición de la afinidad de unión de scFv(TF)3e10 por STF. El ensayo de STF/FVIIa se describe en el Ejemplo 5 con el título "Ensayo de activación de STF/FVIIa" usando STF 3 nM y FVIIa 2 nM. La concentración de STF utilizada se encontraba por debajo del valor de la K_D para la unión a FVIIa. La unión del anticuerpo scFv(TF)3e10 redujo la K_D de STF para la unión a FVIIa, lo cual conduce a una mayor formación del complejo STF/FVIIa y, por ello, la velocidad de clivaje del sustrato cromogénico S2266. Se agre-

99

gó ScFv(TF)3e10 a concentraciones crecientes y la mayor velocidad de reacción se utilizó para determinar el valor de la K_D aparente del anticuerpo para sTF usando un ajuste de 4 parámetros estándar.

Figura 3. El análisis de microcalorimetría muestra que scFv(TF)3e10 tiene una afinidad 20 veces mayor por el complejo sTF/FVIIa que por sTF solamente. La calorimetría isotérmica de titulación se llevó a cabo usando un instrumento VP-ITC MicroCal. El complejo sTF/FVIIa se obtuvo por adición de un exceso molar de 2,3 de FVIIai al sTF. Se usó cromatografía de exclusión por tamaño para verificar que el sTF se había consumido por completo en la formación del complejo. Para la determinación de la afinidad del anticuerpo por el complejo, se agregó complejo sTF/VIIa 1,2 μM en la celda del microcalorímetro y anticuerpo scFv(TF)3e10 65 μM a la jeringa. Para la determinación de la afinidad del anticuerpo por el sTF solamente, se agregó sTF 10 μM a la celda y scFv(TF)3e10 141 μM a la jeringa. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el software MicroCal Origin. Los datos se ajustaron para un solo sitio de unión.

Figura 4. Se observó que el scFv(TF)3e10 inhibe el ensayo de activación del FX de una manera dependiente de la dosis. Los detalles de este ensayo se describen en el Ejemplo 5 con el título "Ensayo de activación del Factor X". La IC_{50} representa la dosis necesaria para lograr un 50% de inhibición máxima.

Figura 5. La proteína de fusión inhibe de una forma más potente la coagulación que el anticuerpo contra TF o TMi456 solamente. Se llevó a cabo un ensayo de tiempo de protrombina (PT) con el fin de comparar la proteína de fusión con el an-

95
ticuerpo contra TF o TMi456 solamente. Se agregó un volumen apropiado de inhibidor concentrado, ya sea anticuerpo contra TF (scFv(TF)3e10), TMi456 o fusión (scFv(TF)3e10-TMi456), a 100 μ l de tromboplastina humana recombinante (Orto-recombiplastina). Aproximadamente 2 minutos después se agregaron 100 μ l de plasma humano reconstituido. El tiempo de coagulación se determinó con un coagulómetro Haemoliance. Se generaron curvas de dosis-respuesta para cada inhibidor y luego se utilizó análisis de regresión para calcular la concentración (en nM) necesaria para una extensión al doble del tiempo de coagulación.

Figura 6. La proteína de fusión retiene la actividad completa como cofactor para la activación de la proteína C. El ensayo descrito en el Ejemplo 5 con el título "Ensayo de activación de la Proteína C (cromogénico)" contenía 20 μ l de muestra de TM, ya sea TMi456, que contiene los dominios EGF 4-6 y el bucle de interdominio entre EGF3 y EGF4 o la fusión (scFv(TF)3e10-TMi456), 20 μ l de proteína C 1,5 μ M y 20 μ l de alfa-trombina 3 nM. Se dejó que la activación avanzara durante 1 hora. La fase de activación se detuvo mediante la adición de 20 μ l de hirudina 0,16 μ /ml. Después se agregaron 100 μ l de S2266 1 mM y se determinó el valor de A405 cada 10 segundos durante 30 minutos. La velocidad de reacción depende de la cantidad de proteína C activada que se ha generado. Los datos se expresan en mOD/min.

Figura 7. La velocidad de activación de la proteína C por la proteína de fusión aumenta en las superficies de fosfolípidos que contienen TF. La velocidad de activación de la proteína C por la TMi456 no es afectada por la adición de vesículas con TF. El ensayo que se describe en el Ejemplo 5 con

96

el título "Ensayo de activación de la Proteína C (sobre superficies ricas en TF)" contenía 20 μ l de muestra de TM, ya sea TMi456 o una fusión (scFv(TF)3e10-TMi456), 20 μ l de proteína C 1,5 μ M, 20 μ l de alfa-trombina 3 nM y 20 μ l de solución amortiguadora o vesículas de TF (Innovina, TF humana recombinante, 4X, la concentración normal para PT). Se dejó que la activación avanzara durante 1 hora. La fase de activación se detuvo por adición de 20 μ l de hirudina 0,16 μ /ml. Después se agregaron 100 μ l de S2266 1 mM y se determinó el valor de A405 cada 10 segundos durante 30 minutos. La velocidad de reacción depende de la cantidad de proteína C activada que se ha generado. Los datos se expresan en mOD/min.

Figura 8. La proteína de fusión muestra una mayor especificidad por una coagulación inducida por TF que la TMi456. El ensayo de tiempo de tromboplastina activada parcial (APTT) es sensible a los inhibidores de las vías de coagulación intrínsecas y centrales. La coagulación que se produce en este ensayo es independiente del TF. Los inhibidores, ya sea anticuerpo contra TF (scFv(TF)3e10), TMi456 o la fusión (scFv(TF)3e10-TMi456), se diluyeron en 50 μ l de plasma humano reconstituido hasta una concentración final que permitió obtener una prolongación al doble en el ensayo PT. El coagulómetro agregó entonces 50 μ l de reactivo de APTT (Alexin HS) y 50 μ l de reactivo de CaCl_2 (0,02 mol/l) y se determinó el tiempo de coagulación en segundos.

Figura 9. La proteína de fusión inhibe de forma más potente la coagulación de sangre completa inducida por TF que cualquiera de sus componentes solamente. La coagulación de la sangre completa se analizó usando como analizador un Tromboelastógrafo (TEG) Haemoscope. A la sangre completa con citra-

97

to, se agregó una concentración 120 nM de anticuerpo contra TF (scFv(TF)3e10), TMi456 o la fusión (scFv(TF)3e10-TMi456) junto con 10 μ l de reactivo de tromboplastina (dilución 1:64) y 20 μ l de CaCl_2 0,2 M. Se obtuvo el valor R (tiempo hasta la formación inicial de fibrina) para cada muestra. Este valor se convirtió luego en un valor R % no inhibido.

Figura 10. La proteína de fusión muestra una dosis-respuesta más predecible que LMWH en un ensayo de coagulación de sangre completa (TEG). A sangre completa con citrato, se agregaron concentraciones crecientes (15 nM iniciales y aumentado en incrementos de 2X) de la fusión (scFv(TF)3e10-TMi456) o concentraciones crecientes (0,15 μ /ml iniciales y aumentado en 2X) de enoxaparina (LMWH), junto con 10 μ l de un reactivo de tromboplastina (dilución 1:64) y 20 μ l de CaCl_2 0,2 M. Se obtuvo el valor R (tiempo hasta la formación inicial de fibrina) para cada muestra y luego se graficó en función de la concentración relativa (definida la concentración más baja en 1 (para cada valor R similar), luego aumentada a concentraciones crecientes 2X).

Figura 11. La proteína de fusión scFV(TF)3e10-TMi456 es eficaz en un modelo *in vivo* de coagulación intravascular diseminada ("DIC"). Se evaluó el anticuerpo contra TF (scFV(TF)3e10) y la fusión (scFV(TF)3e10-TMi456) en el modelo de tromboembolia en rata que se describe en el Ejemplo 8 para (A) mortalidad porcentual y (B) calificación de morbilidad-mortalidad. (A) En el grupo tratado con vehículo, la dosis de TF usada dio como resultado un 60% de letalidad (LD_{60}). El scFv(TF)3e10-TMi456 a razón de 0,7 nmol/kg impidió la muerte por completo. Por el contrario, el scFv(TF)3e10 a razón de 0,7 nmol/kg no tuvo efecto sobre la muerte. El scFv(TF)3e10-

98

TMi456 era más eficaz que una dosis 10 veces mayor de scFv(TF)3e10. (B) En el grupo tratado con vehículo, la dosis *in vivo* de TF dio como resultado una calificación promedio de morbilidad-mortalidad de 2,6, basado en el siguiente sistema de puntaje: 0 = no afectado; 1 = dificultad respiratoria leve (recuperación dentro de los 30 min); 2 = dificultad respiratoria severa (moribundo, la recuperación requirió más de 60 min); y 3 = muerte. El scFv(TF)3e10-TMi456 impidió de una manera dependiente de la dosis la muerte inducida por el TF y la dificultad respiratoria con un valor de ED₅₀ de 0,46 nmol/kg (0,019 mg/kg). El scFv(TF)3e10-TMi456 a razón de 7,0 nmol/kg impidió por completo tanto la muerte como la dificultad respiratoria, y a 0,7 nmol/kg impidió por completo la muerte y redujo significativamente la dificultad respiratoria. Por el contrario, el scFv(TF)3e10 a razón de 0,7 nmol/kg no tuvo efecto sobre la muerte y poco o ningún efecto sobre la dificultad respiratoria. El scFv(TF)3e10-TMi456 era más eficaz que una dosis 10 veces más alta de scFv(TF)3e10.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La proteína de fusión anticoagulante de la presente invención comprende una proteína direccionadora que interactúa ya sea con el factor tisular ("TF") o el complejo de factor VIIa/factor tisular ("FVIIa/TF"), está ligada operativamente al dominio EGF456 de la trombomodulina ("TM") solamente o está combinada con al menos un dominio adicional seleccionado del grupo formado por el dominio hidrofóbico de la región N-terminal, el dominio EGF123, el bucle de interdominio entre EGF3 y EGF4 y el dominio rico en Ser/Thr O-glicosilado o análogos, fragmentos, derivados o variantes de las mismas.

Definiciones:

99

En la descripción de la presente invención, se utilizarán los siguientes términos como se definen a continuación.

Las "proteínas o los polipéptidos recombinantes" se refieren a proteínas o polipéptidos producidos mediante técnicas de ADN recombinante, es decir, producidos a partir de células, microbianas o de mamífero, transformadas con una construcción de ADN exógeno que codifica el polipéptido deseado. Las proteínas o los polipéptidos expresados en la mayoría de los cultivos bacterianos estarán libres de glucano. Las proteínas o los polipéptidos expresados en levadura pueden contener un patrón de glucosilación diferente del expresado en células de mamífero.

Las proteínas o los polipéptidos "nativos" se refieren a proteínas o polipéptidos recuperados a partir de una fuente natural. El término "TM nativa" incluye la TM natural y fragmentos de la misma.

Una "secuencia de codificación" de ADN es una secuencia de ADN que se transcribe en ARNm y que se traduce en un polipéptido en una célula huésped cuando se encuentra bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación están determinados por un codón de inicio en el extremo N-terminal 5' y un codón de terminación de la traducción en el extremo C-terminal 3'. La secuencia de codificación puede incluir secuencias procariontes, ADNc de ARNm eucarionte, secuencias de ADN genómico de ADN eucarionte y secuencias de ADN sintético. La secuencia de terminación de la transcripción se ubica habitualmente 3' con respecto a la secuencia de codificación.

Una "proteína de fusión" es una proteína resultante de la expresión de al menos dos secuencias de codificación hete-

100

rólogas ligadas operativamente entre sí. La proteína de fusión de esta invención comprende una proteína direccionadora que interactúa ya sea con el TF o el complejo de FVIIa/TF, está ligada operativamente al dominio EGF456 de la trombomodulina ("TM") solamente o está combinada con al menos un dominio adicional de la TM seleccionado del grupo formado por el dominio hidrofóbico de la región N-terminal, el dominio EGF123, el bucle de interdominio entre EGF3 y EGF4 y el dominio rico en Ser/Thr O-glicosilado o análogos, fragmentos, derivados o variantes de las mismas.

Una "proteína direccionadora" es una proteína que se une o que interactúa con otra proteína o complejo de proteínas. La proteína direccionadora de esta invención es una proteína que se une o que interactúa con el TF o con el complejo de FVIIa/TF. Por ejemplo, un anticuerpo anti-TF o anti-complejo de FVIIa/TF, es una proteína direccionadora de esta invención. Otros dos ejemplos de proteínas direccionadoras comprenden el factor VIIa de sitio activo inhibido ("FVIIai"), que se puede unir al TF para formar un complejo de FVIIai/TF inactivo, y el inhibidor de la vía del factor tisular ("TFPI"), que se puede unir e inactivar el complejo de FVIIa/TF.

Una "secuencia de nucleótidos" es un heteropolímero de desoxirribonucleótidos (bases de adenina, guanina, timina o citosina). Las secuencias de ADN que codifican las proteínas de fusión de esta invención se pueden ensamblar a partir de fragmentos de ADN derivados de ADNc sintético y ligadores cortos de oligonucleótidos para proveer un gen sintético que se puede expresar en un vector de expresión recombinante. Al describir la estructura de moléculas particulares de ADN de

cadena doble, las secuencias se describirán de acuerdo con la convención normal de solamente mencionar la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcripta de ADNc. 101

Un "vector de expresión recombinante" es una construcción de ADN replicable usada ya sea para amplificar o para expresar un ADN que codifica las proteínas de fusión de la presente invención. Un vector de expresión contiene secuencias de ADN control y una secuencia de codificación. Las secuencias de ADN control incluyen secuencias promotoras, sitios de unión a ribosomas, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, potenciadores y dominios reguladores 5'. Los sistemas de expresión recombinantes definidos aquí expresarán las proteínas de fusión una vez inducidos los elementos reguladores.

Las "células huésped transformadas" se refieren a células que han sido transformadas y transfectadas con ADN exógeno. El ADN exógeno puede estar integrado, o no, (ligado covalentemente) al ADN cromosómico que conforma el genoma de la célula. En procariontes y levaduras, por ejemplo, el ADN exógeno se puede mantener sobre un elemento episómico, tal como un plásmido, o se puede integrar de forma estable en el ADN cromosómico. Con respecto a las células eucariontes, una célula transformada de manera estable es aquella en la cual el ADN exógeno está integrado en la replicación del cromosoma. Esta estabilidad queda demostrada por la capacidad de las líneas o clones de células eucariontes para producir una población de células hija que contienen al ADN exógeno

La "trombomodulina (TM)" se refiere a una glucoproteína de la superficie de células endoteliales que forma un comple-

f02

jo de gran afinidad con la trombina. Se han aislado y secuenciado los genes que codifican la TM nativa (tanto la forma genómica y como el ADNc) de bovinos y seres humanos (Jackman, R.W. et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 83(23): 8834-8838 y Jackman, R.W. et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 84(18): 6425-6429, incorporadas en este documento a modo de referencia). Las secuencias de TM bovina, humana y de ratón presentan un alto grado de homología entre sí. El ADNc de la TM humana codifica una proteína de 60,3 kDa de 575 aminoácidos, incluyendo una secuencia señal de aproximadamente 18 aminoácidos, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N°: 5.827.824.

Cuando la trombina se une a la TM se puede observar un incremento de mil o más en la velocidad de activación de la proteína C que forma la enzima anticoagulante conocida como proteína C activada. Además, cuando la trombina se une a la TM, la trombina ya no funciona como una enzima procoagulante. Específicamente, la formación de fibrina catalizada por trombina, la activación del factor V y la activación de plaquetas están inhibidas todas en presencia de TM. Por consiguiente, la TM convierte trombina en un anticoagulante fisiológico.

Un "dominio de trombomodulina (TM)" se refiere a una secuencia discreta de aminoácidos que se puede asociar con una función o característica particular de la TM, tal como la característica de la unidad estructural terciaria. El gen de la TM de longitud completa codifica un precursor o un polipéptido que contiene los siguientes dominios: los aminoácidos -18--1 constituyen una secuencia señal; los aminoácidos 1-226 comprenden la región hidrofóbica N-terminal; los aminoácidos 227-462 comprenden la región rica en cisteína; que

103

consiste de 6 repeticiones de tipo EGF en tándem unidos por pequeños péptidos o bucles interdominio; los aminoácidos 463-497 constituyen una región rica en Ser/Thr O-glicosilada; los aminoácidos 498-521 constituyen una región transmembrana hidrofóbica; y los aminoácidos 522-557 constituyen la cola citoplasmática C-terminal. La región rica en cisteína se puede dividir además en 3 dominios: los aminoácidos 226-344 constituyen el EGF123, que consta de las repeticiones de tipo EGF 1, 2 y 3 (residuos 226-344); los aminoácidos 345-349 constituyen el bucle de interdominio entre EGF3 y EGF4; y los aminoácidos 350-462 constituyen el EGF456, que consta de los dominios de tipo EGF 4, 5 y 6. Véase, por ejemplo, Yost, C.S. et al. (1983) *Cell* 34(3): 759-766; Wen, D.Z. et al. (1987) *Biochemistry* 26(14): 4350-4357; y Wang, W. et al. (2000), *supra*, cuyos contenidos se incorporan en este documento a modo de referencia.

Los términos "análogo", "fragmento", "derivado" y "variante", cuando se refieren a las proteínas de fusión de esta invención, así como las proteínas direccionadoras y el o los dominios de la TM, se refieren a análogos, fragmentos, derivados y variantes de las proteínas de fusión, proteínas direccionadoras y dominio(s) de TM que retienen sustancialmente la misma función o actividad biológica, como se describirá más adelante.

Un "análogo" incluye un pro-polipéptido que incluye en el mismo la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de esta invención. La proteína de fusión activa de esta invención puede ser clivada de los aminoácidos adicionales que completan la molécula de pro-proteína de fusión mediante procesos naturales, *in vivo*, o mediante procedimientos bien co-

nocidos en el arte tal como por clivaje enzimático o químico. Por ejemplo, la TM nativa se expresa naturalmente como un pro-polipéptido de 575 aminoácidos que luego es procesado *in vivo* liberando el polipéptido maduro activo de 557 aminoácidos.

Un "fragmento" es una porción de la proteína de fusión, de la proteína direccionadora o de uno o varios dominios de TM que retiene sustancialmente una actividad funcional similar, tal como se muestra en los ensayos *in vitro* que se describen más adelante en este documento.

Un "derivado" incluye todas las modificaciones de la proteína de fusión que permiten preservar sustancialmente las funciones que aquí se describen e incluyen una función de estructura y ayudante adicional, por ejemplo, proteínas de fusión tratadas con PEG que poseen una mayor vida media, proteínas de fusión O-glicosiladas modificadas por la adición de sulfato de condroitina y proteínas de fusión biotiniladas, como se describirá más adelante.

Los términos, "actividad funcional sustancialmente similar" y "sustancialmente la misma función biológica o actividad" significan cada uno que un polipéptido posee un grado de actividad biológica que comprende entre aproximadamente un 30% y 100% o más de la actividad biológica demostrada por el polipéptido con el cual está siendo comparado cuando la actividad biológica de cada polipéptido se determina con el mismo procedimiento o ensayo. Por ejemplo, la proteína de fusión o uno o varios dominios de TM que poseen una actividad funcional sustancialmente similar a la proteína de fusión del Ejemplo 2 (SEQ ID N°: 2) es aquella que, cuando se evalúa en el ensayo de activación de la proteína C (cromogénico) que se

describe en el Ejemplo 5, demuestra acumulación de la proteína C activada. Una proteína direccionadora que posee una actividad funcional sustancialmente similar para el anticuerpo anti-TF del Ejemplo 1 (SEQ ID N°: 1) es aquella que, cuando se evalúa en el ensayo de sTF/FVIIa o los ensayos de activación del FX que se describen en el Ejemplo 5, demuestra capacidad para unirse o para neutralizar el TF o el complejo de FVIIa/TF.

La "similitud" entre dos polipéptidos se determina por comparación de la secuencia de aminoácidos y los sustitutos de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Dichas sustituciones conservadoras incluyen los que se describieron previamente en *The Atlas of Protein Sequence and Structure* 5 de Dayhoff (1978) y de Argos (1989) *EMBO J.* 8: 779-785. Por ejemplo, los aminoácidos que pertenecen a uno de los siguientes grupos representan cambios conservadores:

-Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr:

-Cys, Ser, Tyr, Thr;

-Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe;

-Lys, Arg, His;

-Phe, Tyr, Trp, His; y

-Asp, Glu.

Todos los demás términos técnicos usados aquí tienen el mismo significado que el uso común entre los especialistas en el arte al cual pertenece la presente invención.

Proteína direccionadora:

La proteína direccionadora de esta invención es una proteína que tiene la capacidad para unirse específicamente a una molécula de interés particular preseleccionada, por ejem-

106
plo, el TF o el complejo de FVIIa/TF, y luego sirve para dirigir la proteína de fusión hacia una célula o tejido que lleva dicha molécula de interés preseleccionada.

En una realización de esta invención, la proteína direccionadora es un anticuerpo que se puede unir y neutralizar el TF o el complejo de FVIIa/TF. Un "anticuerpo" incluye aquí moléculas de inmunoglobulina ("Ig") intactas, así como fragmentos de las mismas, tal como Fab, F(ab')₂ y Fv, que tienen la capacidad de unirse a un epítopo del TF o del complejo de FVIIa/TF. Típicamente, se requieren al menos 6, 8, 10 ó 12 aminoácidos contiguos para formar un epítopo. Sin embargo, los epítopos que comprenden aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo al menos 15, 25 ó 50 aminoácidos.

Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente al TF o al complejo de FVIIa/TF provee una señal de detección al menos 5, 10 ó 20 veces mayor que la señal de detección provista con otras proteínas cuando se usa en un ensayo inmunoquímico. Preferentemente, los anticuerpos que se unen específicamente al TF o al complejo de FVIIa/TF no detectan otras proteínas en los ensayos inmunoquímicos y pueden causar la inmunoprecipitación del TF o del complejo de FVIIa/TF de una solución.

El TF o el complejo de FVIIa/TF se puede usar para inmunizar un mamífero, tal como ratones, ratas, conejo, cobayos, monos o seres humanos, para producir anticuerpos policlonales. Si se deseara, el TF o el complejo de FVIIa/TF se puede conjugar con una proteína vehículo, tal como albúmina de suero bovino, tiroglobulina y hemocianina de lapa. Dependiendo de la especie del huésped, se pueden usar diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes

107
incluyen, por ejemplo, adyuvante de Freund, geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio) y sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleaginosas, hemocianina de lapa y dinitrofenol). Entre los adyuvantes usados en seres humanos, son de especial utilidad: BCG (*bacilos Calmette-Guerin*) y *Cornybacterium parvum*.

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al TF o al complejo de FVIIa/TF se pueden preparar usando cualquier técnica que provee la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridomas, la técnica de hibridomas de células B humanas y la técnica de hibridomas del EBV (Kohler et al. (1985) *Nature* 256: 495-497; Kozbor et al. (1985) *J. Immunol. Methods* 81: 31-42; Cote et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80: 2026-2030; y Cote et al. (1984) *Mol. Cell Biol.* 62: 109-120).

Además de las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", se puede usar el procesamiento de genes de anticuerpos de ratón para genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con una especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas (Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81: 6851-6855; Neuberger et al. (1984) *Nature* 312: 604-608; Takeda et al. (1985) *Nature* 314: 452-454). Los anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos también pueden ser "humanizados" para impedir que un paciente genere una respuesta inmune contra el anticuerpo cuando se usa en aplicaciones terapéuticas. Dichos anticuerpos pueden ser suficientemente similares en cuanto a secuencia a los anticuerpos humanos como para ser usados directa-

mente en la proteína de fusión o bien, puede ser necesario efectuar una alteración de unos pocos residuos clave. Las diferencias en cuanto a secuencia entre los anticuerpos de roedores y las secuencias humanas pueden ser minimizadas por sustitución de los residuos que difieren de los de las secuencias humanas mediante mutagénesis dirigida al sitio de residuos individuales o por injerto de regiones enteras determinantes de la complementariedad. Como alternativa, es posible producir anticuerpos humanizados usando métodos recombinantes, como se describe en GB2188638B. Los anticuerpos que se unen específicamente al TF o al complejo de FVIIa/TF pueden contener sitios de unión a antígenos que están parcial o completamente humanizados, como se describe en la Patente de los Estados Unidos N°: 5.565.332.

Como alternativa, es posible adaptar las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena simples usando métodos conocidos en el arte para producir los anticuerpos de cadena simple que se unen específicamente al TF o al complejo de FVIIa/TF. Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de distinta composición idiotípica, pueden ser generados por combinación o entremezclado de cadenas a partir de bibliotecas de Ig combinatorias y aleatorias (Burton (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88: 11120-11123).

Los anticuerpos de cadena simple también se pueden construir usando un método de amplificación de ADN, tal como PCR, usando ADNc de hibridomas como templado (Thirion et al. (1996) *Eur. J. Cancer Prev.* 5: 507-511). Los anticuerpos de cadena simple pueden ser mono o bi-específicas y pueden ser bivalentes o tetravalentes. La construcción de anticuerpos de cadena simple tetravalentes, bi-específicas se describe, por

ejemplo, en Coloma y Morrison (1997) *Natl. Biotechnol.* 15: 159-163. La construcción de anticuerpos de cadena simple bi-valentes, bi-específicos se describe en Mallendar y Voss (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 199-216. 109

La secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de cadena simple se puede construir usando síntesis de nucleótidos manual o automática, luego se puede clonar en una construcción de expresión usando métodos de ADN recombinante estándar e introducir en una célula para expresar la secuencia de codificación. Como alternativa, los anticuerpos de cadena simple se pueden producir directamente usando, por ejemplo, la tecnología de expresión en fagos filamentosos (Verhaar et al. (1995) *Int. J. Cancer* 61: 497-501; y Nicholls et al. (1993) *J. Immunol. Meth.* 165: 81-91).

Los anticuerpos que se unen específicamente al TF o al complejo de FVIIa/TF también se pueden producir por inducción *in vivo* de la producción en una población de linfocitos o mediante el rastreo y examen de bibliotecas de Ig o paneles de reactivos de unión altamente específicos como se describe en la literatura. (Orlandi et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86: 3833-3837; Winter et al. (1991) *Nature* 349: 293-299).

En otra realización de esta invención, la proteína direccionadora es una porción direccionadora distinta de un anticuerpo que se puede unir y neutralizar el TF. Dos ejemplos de ellas son el factor FVIIa (FVIIai) de sitio activo inhibido y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI).

Tanto el FVIIa como el FVIIai forman un complejo de gran afinidad con el TF (Sorenson, B.B. y Rao, L.V. (1998) *Blood Coagul. Fibrinolysis* 9 (Supl. 1): S67-71). El FVIIai es un

anticoagulante que neutraliza el TF que actúa por competencia con el FVIIa endógeno por la unión al TF expuesto. El FVIIai inhibe la capacidad del FVIIa proteolíticamente activo para formar un complejo de FVIIa-TF competente y de esta manera inhibe el inicio de la coagulación. Al fusionar genéticamente los dominios de la TM con el FVIIai, la TM podrá ser dirigida a superficies protrombóticas ricas en TF. 110

Se ha aislado y secuenciado el ADNc que codifica el FVII human (Hagen, H.S. et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 83(8): 2412-2416, cuyo contenido se incorpora en este documento a modo de referencia). El ADNc del FVII humano se puede obtener utilizando técnicas de ADN recombinante estándar a partir de ARNm aislado de hígado humano. El FVIIai se puede obtener por mutación de la serina del sitio activo mediante técnicas de ADN recombinante estándar o mediante tratamiento químico del FVIIa catalíticamente activo con una peptidil clorometilcetona, que modifica e inhibe de forma irreversible el sitio activo.

El TFPI busca e inhibe el complejo de FVIIa/TF de una manera dependiente del FXa (Salemink, I. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(40): 28225-28232). El TFPI se une primero al FXa y luego el complejo de TFPI-FXa se une e inhibe el complejo de FVIIa/TF. Al fusionar genéticamente los dominios de la TM al TFPI, se podría dirigir la TM hacia superficies protrombóticas ricas en TF.

Se ha aislado y secuenciado el ADNc que codifica el TFPI humano (Wun, T.C. et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263(13): 6001-6004, incorporada en este documento a modo de referencia). El ADNc del TFPI humano se puede obtener mediante técnicas de ADN recombinante estándar a partir de ARNm aislado de hígado

humano.

La proteína direccionadora de esta invención (es decir, anticuerpos u otras proteínas relevantes) se pueden expresar y purificar mediante métodos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, los anticuerpos y las proteínas se pueden purificar por afinidad por pasaje a través de una columna a la cual se ha ligado TF. Los anticuerpos o proteínas unidos se pueden eluir después de la columna usando una solución amortiguadora con una concentración de sales alta. 111

En una realización preferida de esta invención, la proteína direccionadora es un anticuerpo scFv de unión a TF que inhibe la activación de FX por el complejo de FVIIa/TF y no compite por la unión con FVIIa. Con el fin de producir el anticuerpo scFv de unión al TF, se seleccionó la biblioteca de anticuerpos humanos HuPhaBL3, que se expresó en un fago filamentoso, contra el TF soluble inmovilizado. Los anticuerpos del fago de unión a TF se sobreexpresaron en *E. coli* y luego se purificaron por afinidad usando una columna con marca de epítopo. Los anticuerpos purificados fueron caracterizados también usando BIAcore, un ensayo con el factor VIIa dependiente del STF (ensayo STF/FVIIa), un ensayo de activación del FX y el ensayo PT. La secuencia del anticuerpo scFv de unión al TF, denominado scFv(TF)3e10, se muestra en el Ejemplo 1 y corresponde a la SEQ ID N°: 1. Los procedimientos de aislamiento, producción y caracterización del anticuerpo scFv de unión al TF se describen con mayor detalle más adelante.

Trombomodulina:

La porción del o de los dominios de la TM de la proteína de fusión actúa como cofactor para la activación de la proteína C catalizada por trombina, que a su vez degrada los

factores Va y VIIa impidiendo de esa manera la formación de trombos. Los dominios de la TM incluyen, por ejemplo, el dominio hidrofóbico de la región N-terminal, el dominio EGF123, el bucle de interdominio entre EGF3 y EGF4, el dominio EGF456 y el dominio de la región rica en Ser/Thr O-glicosilada. El dominio EGF456 interviene, en particular, en la unión a trombina y la activación de la proteína C (Kurosawa, S. et al. (1988), *supra*; y Zushi, M. et al. (1989) *supra*). En realizaciones preferidas de esta invención, la porción del o de los dominios de TM de la proteína de fusión comprende solamente el dominio EGF456 o está combinada con uno o varios de los demás dominios de TM. En realizaciones aún más preferidas de esta invención, el dominio EGF456 contiene mutaciones puntuales que vuelven más resistente a la proteína a los daños oxidativos y a las proteasas y/o incrementan su eficacia catalítica.

La secuencia de ADN de longitud completa que codifica la TM human facilita la preparación de genes y se usa como punto de partida para la construcción de secuencias de ADN codificadora de péptidos y proteínas de fusión de TM que contienen TM y fragmentos/péptidos de TM.

El gen de longitud completa de TM se puede preparar utilizando diversos métodos. Las bibliotecas genómicas humanas se encuentran disponibles comercialmente. Se pueden sintetizar sondas de oligonucleótidos, específicas para estos genes, usando la secuencia genética publicada. Los métodos para examinar bibliotecas genómicas con sondas de oligonucleótidos son bien conocidos. La publicación de la secuencia genética para TM demuestra que no hay intrones dentro de la región de codificación. Por consiguiente, un clon genómico provee el

material inicial necesario para construir un plásmido de expresión para TM usando métodos conocidos.

El fragmento de ADN que codifica TM se puede recuperar aprovechando los sitios de endonucleasas de restricción identificados en las regiones que flanquean o que son internos para el gen. (Jackman, R.W. et al. (1987), *supra*). Como alternativa, los genes de longitud completa también se pueden obtener a partir de un banco de ADNc. Por ejemplo, el ARN mensajero preparado a partir de células endoteliales provee un material inicial adecuado obtenido con la preparación de ADNc. Los métodos para obtener bancos de ADNc son bien conocidos (véase por ejemplo, Sambrook, J.F. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), cuyo contenido se incorpora en este documento a modo de referencia).

Proteína de fusión:

La proteína de fusión anticoagulante de esta invención comprende una proteína direccionadora que se une ya sea al TF o al complejo de FVIIa/TF, y está ligada operativamente al dominio EGF456 de TM solamente o está combinada con al menos un dominio adicional de TM seleccionado del grupo formado por el dominio hidrofóbico de la región N-terminal, el dominio EGF123, el bucle de interdominio entre EGF3 y EGF4 y el dominio rico en Ser/Thr O-glicosilado o análogos, fragmentos, derivados o variantes de las mismas. La proteína de fusión puede comprender una proteína direccionadora ligada con los dominios de TM en cualquier combinación.

En una realización particularmente preferida, la proteína de fusión comprende un anticuerpo que se une al TF, ligada operativamente al dominio EGF456 de la TM y el bucle de in-

terdominio entre EGF3 y EGF4 ("TMi456"), o análogos, fragmentos, derivados o variantes de la misma.

La proteína de fusión de la presente invención incluye, por ejemplo, construcciones en las cuales la porción C-terminal de un anticuerpo de cadena simple está fusionada a la porción N-terminal de un análogo, fragmento, derivado o variante de uno o varios dominios de TM, la porción C-terminal de un anticuerpo de IgG está fusionado a la porción N-terminal de un análogo, fragmento, derivado o variante de uno o varios dominios de TM, la porción C-terminal de un anticuerpo Fab está fusionado a la porción N-terminal de un análogo, fragmento, derivado o variante de uno o varios dominios de TM, la porción N-terminal de un anticuerpo de cadena simple está fusionado a la porción C-terminal de un análogo, fragmento, derivado o variante de uno o varios dominios de TM, la porción N-terminal de un anticuerpo de IgG está fusionado a la porción C-terminal de un análogo, fragmento, derivado o variante de uno o varios dominios de TM, la porción N-terminal de un anticuerpo Fab está fusionado a la porción C-terminal de un análogo, fragmento, derivado o variante de uno o varios dominios de TM, más de un anticuerpo de cadena simple está fusionado a ambas porciones N-terminal y C-terminal de un análogo, fragmento, derivado o variante de uno o varios dominios de TM, más de un anticuerpo de IgG está fusionado a ambas porciones N-terminal y C-terminal de un análogo, fragmento, derivado o variante de uno o varios dominios de TM, más de un anticuerpo Fab está fusionado a ambas porciones N-terminal y C-terminal de un análogo, fragmento, derivado o variante de uno o varios dominios de TM, más de un análogo, fragmento, derivado o variante de uno o varios dominios de TM

está fusionado a ambas porciones N-terminal y C-terminal de un anticuerpo de cadena simple, más de un análogo, fragmento, derivado o variante de uno o varios dominios de TM está fusionado a ambas porciones N-terminal y C-terminal de un anticuerpo de IgG, más de un análogo, fragmento, derivado o variante de uno o varios dominios de TM está fusionado a ambas porciones N-terminal y C-terminal de un anticuerpo Fab, uno o varios análogos, fragmentos, derivados o variantes de uno o varios dominios de TM están fusionados a ambas porciones N-terminal y C-terminal de un anticuerpo 'dimérico de cadena simple.

Las proteínas de fusión de la presente invención incluyen las proteínas de fusión de los Ejemplos 2 (SEQ ID N°: 2) y 3 (SEQ ID N°: 3), así como aquellas proteínas de fusión que poseen variaciones no significativas en cuanto a secuencia de las mismas. Una "variación no significativa" incluiría cualquier variante de la secuencia de sustitución o supresión que permita conservar sustancialmente al menos una función biológica de los polipéptidos de esta invención, preferentemente la actividad como cofactor para la activación de la proteína C mediada por trombina. Estos equivalentes funcionales pueden incluir preferentemente proteínas de fusión que presentan al menos un 90% de identidad aproximadamente con las proteínas de fusión de las SEQ ID N°: 2 ó 3, y más preferentemente al menos un 95% de identidad con las proteínas de fusión de las SEQ ID N°: 2 ó 3 y más preferentemente aún al menos un 97% de identidad con las proteínas de fusión de las SEQ ID N°: 2 ó 3, y también incluyen porciones de dichas proteínas de fusión que poseen sustancialmente la misma actividad biológica. Sin embargo, cualquier proteína de fusión que presentan una va-

riación no significativa en cuanto a secuencia de aminoácidos de las proteínas de fusión de las SEQ ID N°: 2 y 3 que demuestran una equivalencia funcional, como se describirá más adelante con mayor detalle, está incluida en la descripción de la presente invención.

En otra realización, la proteína de fusión comprende un anticuerpo que se une al TF ligada operativamente al dominio EGF3 de la TM, que es necesario para activar el activador de fibrinólisis que puede ser activado por trombina (TAFI).

Análogos, fragmentos, derivados y variantes:

Un análogo, fragmento, derivado o variante de las proteínas de fusión, así como las proteínas direccionadoras o el o los dominios de TM, de la presente invención puede ser: (i) uno en el cual uno o varios de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede estar codificado, o no, por el código genético; o (ii) uno en el cual uno o varios de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, o (iii) uno en el cual la proteína de fusión madura está fusionada con otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la vida media de la proteína de fusión (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el cual hay aminoácidos adicionales fusionados a la proteína de fusión madura, tal como una secuencia directriz o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación de la proteína de fusión madura, o (v) uno en la cual la secuencia de polipéptidos está fusionada con un polipéptido mayor, es decir, albúmina humana, un anticuerpo o Fc, para lograr una mayor duración del efecto. Dichos análogos, fragmentos, deriva-

dos y variantes se consideran dentro del alcance para los especialistas en el arte a partir de la presente descripción.

Preferentemente, los derivados de la presente invención van a contener sustituciones de aminoácidos conservadores (definidos más adelante) efectuadas en uno o varios residuos de aminoácidos predichos, preferentemente no esenciales. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser alterado en la secuencia de tipo salvaje de una proteína sin alterar la actividad biológica, en tanto se requiere de un residuo de aminoácido "esencial" para la actividad biológica. Una "sustitución de aminoácidos conservadores" es aquella en la cual el residuo de aminoácido es reemplazado por un residuo de aminoácido que posee una cadena lateral similar. En el arte se han definido familias de residuos de aminoácidos que poseen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales acídicas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales ramificadas en posición beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Las sustituciones no conservadoras no se harán para residuos de aminoácidos conservados o para residuos de aminoácidos ubicados dentro de un dominio conservado de una proteína, a menos que las sustituciones no conservadoras se efectúen para que la proteína de fusión resultante sea más resistente a los

daños oxidativos y proteasas y/o para incrementar su eficacia catalítica. Los fragmentos o porciones biológicamente activas incluyen fragmentos de polipéptidos adecuados para su uso como medicamentos, como un reactivo de investigación y semejantes. Los fragmentos incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente similares o derivados de las secuencias de aminoácidos de una proteína de fusión de esta invención y que presentan al menos una actividad de dicho polipéptido, pero que incluyen menos aminoácidos que los polipéptidos de longitud completa descritos aquí. Típicamente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad del polipéptido. Una porción biológicamente activa de un polipéptido puede ser un péptido que tiene, por ejemplo, 5 o más aminoácidos de longitud. Dichas porciones biológicamente activas se pueden preparar mediante síntesis o con técnicas recombinantes y pueden ser evaluadas por una o varias actividades funcionales de un polipéptido de esta invención de la manera que se describe aquí y/o que es bien conocida en el arte.

Más aún, los derivados preferidos de la presente invención incluyen proteínas de fusión maduras que se han fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la vida media del polipéptido y/o para reducir la inmunogenicidad potencial del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol, "PEG"). El PEG se puede usar para impartir solubilidad en agua, mayor tamaño, disminuir la velocidad de depuración en riñones y reducir la inmunogenicidad a la proteína de fusión. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N°: 6.214.966. En el caso de tratamientos con PEG, la fusión de la proteína de fusión a PEG se puede llevar a cabo utili-

zando cualquier medio conocido por el especialista en el arte. Por ejemplo, el tratamiento con PEG se puede llevar a cabo introduciendo primero una mutación de cisteína en la proteína de fusión, seguido de una derivatización específica del sitio con PEG-maleimida. La cisteína se puede agregar al extremo C-terminal de los péptidos. Véase, por ejemplo, Tsutsumi et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97(15): 8548-8553. Otra modificación que se puede efectuar en la proteína de fusión comprende una biotinilación. En algunas instancias, puede ser de utilidad la proteína de fusión biotinilada para que pueda reaccionar rápidamente con estreptavidina. Los métodos de biotinilación de proteínas son bien conocidos en el arte. Además, se puede ligar sulfato de condroitina a la proteína de fusión.

Las variantes de las proteínas de fusión, de las proteínas direccionadoras y de uno o varios dominios de la TM de esta invención incluyen polipéptidos que poseen una secuencia de aminoácidos suficientemente similar a la secuencia de aminoácidos de las proteínas de fusión, las proteínas direccionadoras y los dominios de TM originales. El término "suficientemente similar" significa que hay una primera secuencia de aminoácidos que contiene una cantidad suficiente o mínima de residuos de aminoácidos idénticos o equivalentes con relación a una segunda secuencia de aminoácidos de modo que dichas primera y segunda secuencias de aminoácidos poseen un dominio estructural común y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que contienen un dominio estructural común que es al menos un 45% aproximadamente, preferentemente un 75% a 98% aproximadamente, idéntico se define aquí como suficientemente similar. Preferentemente,

las variantes serán suficientemente similares a la secuencia de aminoácidos de las proteínas de fusión preferidas de esta invención. Las variantes incluyen variantes de proteínas de fusión codificadas por un polinucleótido que se hibridiza con un polinucleótido de esta invención o un complemento del mismo bajo condiciones severas. Dichas variantes retienen en general la actividad funcional de las proteínas de fusión de esta invención. Se pueden usar bibliotecas de fragmentos de los polinucleótidos para generar una población variegada de fragmentos para el rastreo y subsiguiente selección. Por ejemplo, se puede generar una biblioteca de fragmentos mediante tratamiento de un fragmento de PCR de cadena doble de un polinucleótido con una nucleasa bajo condiciones donde el corte "nicking" solamente se produce una vez por molécula, desnaturalización del ADN de cadena doble, renaturalización del ADN para formar ADN de cadena doble que puede incluir pares orientados en el sentido del marco de lectura/antisentido de diferentes productos recortados, eliminación de porciones de cadena simple a partir de duplas reformadas mediante tratamiento con la nucleasa S1 y ligación la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Utilizando este método, es posible derivar una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales e internos de distintos tamaños de las proteínas de fusión de esta invención.

Las variantes incluyen proteínas de fusión, así como proteínas direccionadoras y uno o varios dominios de TM, que difieren en cuanto a secuencia de aminoácidos debido a una mutagénesis. Las variantes que presentan actividad de cofactor para la activación de la proteína C mediada por trombina pueden ser identificadas por rastreo y examen de bibliotecas

combinatorias de mutantes, por ejemplo mutantes de truncamiento o puntuales, de las proteínas de fusión o el/los dominios de TM de esta invención usando el ensayo de activación de proteína C que se describe en el Ejemplo 5. Las variantes que poseen actividad de unión al TF o al complejo de FVIIa/TF se pueden identificar mediante examen y rastreo de bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo mutantes de truncamiento o puntuales, de las proteínas de fusión o de las proteínas direccionadoras de esta invención usando el ensayo con sTF/FVIIa o los ensayos de activación con FX del Ejemplo 5 descritos en el Ejemplo 5. Además, los análogos bioequivalentes de las proteínas de fusión también se pueden construir efectuando numerosas sustituciones en residuos o secuencias en la porción del/de los dominios de TM de la proteína de fusión que pueden volver más resistente a la proteína de fusión frente a los daños por oxidación o a proteasas, véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N°: 5.827.824, o incrementar la eficacia catalítica de la proteína de fusión, véase por ejemplo, Adler, M. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270(40): 23366-23372, y la Solicitud de Patente PCT WO01/98352, publicada el 27 de diciembre, 2001, cuyos contenidos se incorporan por completo en este documento a modo de referencia.

En una realización, se genera una biblioteca variegada de variantes por mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico y está codificada por una biblioteca de genes variegados. La biblioteca variegada de variantes se puede producir, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en las secuencias de genes de modo tal que se obtiene un conjunto degenerado de variantes poten-

ciales de secuencias de aminoácidos que se puedan expresar como polipéptidos individuales o, como alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para expresión en fagos) que contienen el conjunto de secuencias. Existen numerosos métodos que se pueden utilizar para producir bibliotecas de variantes potenciales a partir de secuencias de oligonucleótidos degenerados. La síntesis química de una secuencia genética degenerada se puede llevar a cabo con un sintetizador automático de ADN y el gen sintético se puede ligar luego en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto de genes degenerados permite proveer, en una mezcla, todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de variantes potenciales de las secuencias. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Narang (1983) *Tetrahedron* 39: 3; Itakura et al. (1984a) *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura et al. (1984b) *Science* 198: 1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11: 477).

En el arte se conocen numerosas técnicas para examinar productos de genes de bibliotecas combinatorias obtenidas mediante mutaciones puntuales o truncamientos y para rastrear y examinar bibliotecas de ADNc por productos genéticos que poseen una propiedad seleccionada. Dichas técnicas pueden ser adaptadas para efectuar un examen rápido de las bibliotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de proteínas de fusión, así como de proteínas direccionadoras y uno o varios dominios de TM, por la actividad de cofactor para la activación de la proteína C mediada por trombina o la actividad de unión al TF o al complejo FVIIa/TF. Las técnicas de mayor uso, que son propicias para un análisis de alto rendi-

miento para examinar grandes bibliotecas de genes incluyen típicamente la clonación de la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, transformación de las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y expresión de los genes combinatorios bajo condiciones en las cuales la detección de la actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. La mutagénesis de ensamblaje recursiva (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, se puede usar en combinación con los ensayos de rastreo y examen para identificar las variantes deseadas.

Producción de las proteínas de fusión:

La proteína de fusión de esta invención es producida por fusión de la proteína direccional, o la unión a la misma, uno o varios dominios de TM o análogos, fragmentos, derivados o variantes de las mismas utilizando cualquier método conocido por los especialistas en el arte. Los dos componentes se pueden unir químicamente utilizando los diversos procedimientos químicos que son bien conocidos. Por ejemplo, la unión se puede efectuar utilizando ligadores de entrecruzamiento heterobifuncionales, por ejemplo, SPDP, carbodiimida, glutaraldehído o semejantes.

En una realización más preferida, la proteína direccional de esta invención se puede fusionar a uno o varios dominios TM por medios recombinantes, tal como con el uso de técnicas de ADN recombinante para producir un ácido nucleico que codifica tanto la proteína direccional como el polipéptido que codifica el o los dominios de TM y expresar la secuencia de ADN en una célula huésped, tal como *E. coli* o una célula de mamífero. El ADN que codifica la proteína de

fusión se puede clonar en la forma genómica o de ADNc utilizando cualquier procedimiento de clonación conocido por los especialistas en el arte. Véase por ejemplo, Sambrook, J.F. et al. (1989) *supra*.

En el caso que la proteína direccional es un anticuerpo, una vez identificada la secuencia de ADN que codifica una región Fv que al expresarse presenta una actividad de unión específica, es posible preparar las proteínas de fusión que comprenden dicha región de Fv mediante métodos conocidos por el especialista en el arte. Así, por ejemplo, Chaudhary, V.K. et al. (1989) *Nature* 339(6223): 394-397; Batra, J.K. et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265(25): 15198-15202; Batra, J.K. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86(21): 8545-8549; Chaudhary, V.K. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87(3): 1066-1070, todas incorporadas a modo de referencia, describen la preparación de diversos anticuerpo de cadena simple contra proteínas de fusión. La región Fv se puede fusionar directamente a uno o varios dominios de TM o se pueden unir mediante una secuencia ligadora. La secuencia ligadora puede estar presente simplemente para proveer espacio entre el grupo direccional y el o los dominios de TM o para facilitar la movilidad entre estas regiones a fin de permitir que alcancen su conformación óptima. La secuencia de ADN que comprende el conector también puede proveer secuencias (tal como sitios de restricción o cebadores) para facilitar la clonación o pueden conservar el marco de lectura entre la secuencia que codifica la porción direccional y la secuencia que codifica el o los dominios de TM. El diseño de dichos péptidos conectores es bien conocido para el especialista en el arte.

En la presente invención, las secuencias ligadoras se pueden usar para ligar la proteína direccionadora con el o los dominios de TM. En una realización preferida de la presente invención, se usan dos secuencias ligadoras en la construcción de una proteína de fusión compuesta por un anticuerpo de cadena simple y el dominio EGF456 de la TM y el bucle de interdominio entre EGF3 y EGF4 (TMi456). La primera une los dominios pesado y liviano del anticuerpo de cadena simple. La primera secuencia ligadora es de 5 aminoácidos de longitud. Se considera que se pueden emplear otras secuencias ligadoras cortas, que comprenden entre 0 y 10 aminoácidos. El segundo ligador de la presente invención es un ligador de 15 aminoácidos que une el anticuerpo a uno o varios dominios de TM. Será evidente para el especialista en el arte que se pueden utilizar muchas secuencias ligadoras diferentes y aún obtener como resultado una proteína de fusión que retiene la actividad anticoagulante y la activación de proteína C. Las modificaciones del ligador existente apuntan a maximizar el aumento de activación de la proteína C sobre superficies de fosfolípidos que contienen al TF.

En un enfoque preferido, el anticuerpo de cadena simple se preparó usando una biblioteca de expresión en fagos. En el primer paso de la construcción de la biblioteca de expresión en fagos, los genes variables (V_H (de la IgM) V_D y V_L) fueron clonados por PCR a partir de ARNm agrupado de médula ósea, nódulo linfático y bazo humanos usando un conjunto de cebadores específicos de la familia. Las bibliotecas resultantes pCITE- V_D ($3,8 \times 10^9$ miembros), pZ604- V_D ($1,6 \times 10^7$) y pZ604- V_L ($3,2 \times 10^7$) representan la diversidad permanente y alta de genes V. Los genes V_D fueron amplificados a partir de la bi-

biblioteca pCITE-V_H. Los genes V_H y V_L fueron amplificados por PCR a partir de las bibliotecas pZ604-V_H y pZ604-V_L con una secuencia ligadora J_H en el extremo 5'. A continuación, los genes V_H, V_H y V_L purificados sobre gel que contienen los productos de la PCR fueron procesados juntos para obtener el repertorio de genes scFv. El repertorio de genes scFV se clonó en el vector Phagemid pZ603 y el producto de la ligación fue sometido a electroporación en células TG1 competentes de *E. coli* para generar la biblioteca scFV de expresión en fagos, HuPhabL3, con $5,2 \times 10^9$ transformantes individuales (Kay, B.K. et al. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego CA; Marks, J.D. et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222(3): 581-597; Sheets, M.D. et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95(11): 6157-6162).

En una realización preferida de la presente invención, se preparó un anticuerpo de cadena simple (scFv(TF)3e10) que posee un solo sitio de unión V_H/V_L para el TF. La secuencia de aminoácidos de scFv(TF)3e10 (SEQ ID N°: 1) se muestra en el Ejemplo 1.

En una realización preferida de la presente invención, se subclonó el fragmento de PCR, que contiene la secuencia TMi456 (con las mutaciones M388L y H381G) flanqueada por sitios NotI, en el sitio NotI del pZ612/3e10 (un vector de expresión bacteriano para scFv(TF)3e10 basado en el pCANTAB5 de Pharmacia). En este caso, las mutaciones puntuales en las porciones de TM de las proteínas de fusión de la invención están especificadas con la denominación de una sola letra para el residuo de aminoácido de la TM nativa, seguido del número de la posición del aminoácido en la TM madura y la denominación de una sola letra de la mutación del aminoácido. Por

ejemplo, M388L indica que la metionina en la posición de aminoácido 388 de la TM madura ha sido cambiado por leucina. El sitio NotI se encuentra entre la secuencia del anticuerpo y la secuencia de la marca del epítopo. Esto generó una construcción de expresión en bacterias (pKM101) para una proteína de fusión compuesta por scFV(TF)3e10 - un ligador de 15 aminoácidos - TMi456, seguido de la secuencia de la marca del epítopo. Para generar un vector de expresión de mamífero se generó primero un fragmento de PCR a partir del templado del pKM101. Este fragmento fue diseñado para su ligación en los sitios StuI/MscI del vector de expresión de TM, pTHR525. Esto generó el vector (pKM113) que contenía la secuencia señal de Solulin seguido de la secuencia de la proteína de fusión madura seguido a su vez de la secuencia de la marca del epítopo. El vector contiene el gen de resistencia a ampicilina y los marcadores de selección de higromicina y DHFR. La expresión está dirigida por el promotor MPSV LTR. Se realizó una mutagénesis dirigida al sitio en este vector para incluir las mutaciones R456G y H457Q que confieren resistencia a proteasas a la porción de TM. El vector resultante se denominó pKM115. El vector pKM115 contenía un ligador de 15 aminoácidos que separaba los dominios V_D y V_L y otro ligador de 15 aminoácidos que separaba el dominio V_L del TMi456. El ligador que separa los dominios V_D y V_L se disminuyó a 5 aminoácidos para dirigir la formación de un dímero de mayor avidéz, denominado pHM115.5. La proteína de fusión codificada por el pHM115.5, scFv(TF)3e10-TMi456 (SEQ ID N°: 2), se describe en el Ejemplo 2. Se generó un vector adicional, el pKM125, usando tecnología de ADN recombinante estándar por supresión de 3 aminoácidos (GAP) entre el ligador de 5 aminoácidos que sepa-

ra los dominios V_H y V_L y supresión de la marca del epítopo en el extremo C-terminal de la proteína de fusión. La proteína de fusión resultante, scFv(TF)3e10-TMi456Δ (SEQ ID N°: 3), se describe en el Ejemplo 3.

Expresión y purificación de las proteínas de fusión:

Existen numerosas formas de expresión de las proteínas de fusión recombinantes *in vitro*, incluyendo en *E. coli*, baculovirus, levadura, células de mamífero u otros sistemas de expresión. Los métodos de expresión de los genes clonados en bacterias son bien conocidos. A fin de obtener un alto nivel de expresión de un gen clonado en un sistema procarionte, resulta esencial construir vectores de expresión que contengan, como mínimo, un promotor fuerte para dirigir la terminación de la transcripción del ARNm. Los ejemplos de regiones reguladoras adecuadas para tal fin son la región promotora y operadora del gen de beta-glucosidasa de *E. coli*, la vía de biosíntesis de triptofano de *E. coli* o el promotor izquierdo del Fago Lambda. Es de utilidad la inclusión de marcadores de selección en los vectores de ADN transformados en *E. coli*. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen los genes que especifican resistencia a ampicilina, tetraciclina o cloranfenicol.

Entre los sistemas de células eucariontes superiores que son de utilidad para la expresión de las proteínas de fusión y análogos de las mismas, existen numerosos sistemas de células para elegir. Los ejemplos ilustrativos de líneas celulares de mamífero incluyen, por ejemplo, las células RPMI 7932, VERO y HeLa, las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), las líneas celulares WI38, BHK, COS-7, C127 o MDCK. La línea celular de mamífero preferida es CHL-1. Cuando se usa CHL-1 se incluye higromicina como marcador de selección euca-

riente. Las células CHL-1 derivan de las células de melanoma RPMI 7032, una línea de células humanas fácilmente disponible. La línea de células CHL-1 está depositada con ATCC de acuerdo con las condiciones del Tratado de Budapest y recibió el número CRL 9446, depositada el 18 de junio, 1987. Las células adecuadas para su uso en esta invención se encuentran disponibles comercialmente de ATCC. Las líneas celulares ilustrativas incluyen las de *Spodoptera frugiperda* y *Bombyx mori*.

Con el sistema procarionte, *E. coli*, no es posible efectuar una modificación de post-traduccion, tal como glucosilación. Además, las proteínas con patrones disulfuro complejos a menudo sufren plegamientos erróneos cuando se expresan en *E. coli*. Para la proteína de fusión que se describe aquí se observó una reducción marcada en la actividad de cofactor de trombomodulina cuando se expresaba en *E. coli* aunque aún se conservaban ambas actividades. Con el sistema procarionte, la proteína expresada está presente en el citoplasma celular en una forma insoluble denominada cuerpo de inclusión, presente en la fracción soluble después de lisar las células o bien, es dirigida hacia el periplasma por adición de secuencias de señal de secreción apropiadas. Si la proteína expresada se encuentra en cuerpos de inclusión insolubles, habitualmente se requiere de la solubilización y subsiguiente replegamiento de los cuerpos de inclusión.

Existen muchos vectores de expresión procariontes que son conocidos por los especialistas en el arte, tal como pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pKK233-2 (Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU.) y pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, EE.UU.), todos disponibles comercialmente.

Los promotores utilizados comúnmente en los sistemas de expresión recombinantes microbianos incluyen el sistema de la beta-lactamasa (penicilinas) y el sistema promotor de lactosa (Chang, A.C. et al. (1978) *Nature* 275(5681): 617-624; Goeddel, D.V. et al. (1979) *Nature* 281(5732): 544-548), el sistema promotor de triptofano (trp) (Goeddel, D.V. et al. (1980) *Nucl. Acids Res.* 8(18): 4057-4074) y el promotor tac (Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Otro sistema de expresión bacteriano que es de utilidad emplea el promotor pL del fago lambda y el represor termoinducible cIts857 (Bernard, H.U. et al. (1979) *Gene* 5(1): 59-76; Love, C.A. et al. (1996) *Gene* 176(1-2): 49-53). Las proteínas de fusión recombinantes también se pueden expresar en huéspedes de levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae*. Habitualmente permite efectuar diversas modificaciones de post-traduccion. La proteína de fusión expresada puede ser secretada hacia el sobrenadante del cultivo donde no hay muchas otras proteínas, lo cual facilita la purificación. Los vectores para la expresión en levadura de las proteínas de fusión en esta invención presentan determinadas características necesarias. Los elementos del vector derivan generalmente de levaduras y bacterias a fin de permitir la propagación del plásmido en ambos. Los elementos bacterianos incluyen un origen de replicación y un marcador seleccionable. Los elementos de levadura incluyen una secuencia de origen de replicación (ARS), un marcador seleccionable, un promotor y un terminador de la transcripción.

Los promotores adecuados en los vectores para expresión en levadura incluyen los promotores del gen TRP1, del gen ADH1 o ADHII, del gen de la fosfatasa ácida (PH03 o PH05), el

130

gen del isocitocromo o los promotores comprometidos con la vía glucolítica, tal como el promotor de enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), hexoquinasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa y fosfoglucosa isomerasa (Hitzeman, R.A. et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255(24): 12073-12080; Hess, B. et al. (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7: 149-167; y Holland, M.J. y Holland, J.P. (1978) *Biochemistry* 17(23): 4900-4907).

Los vectores para levadura disponibles comercialmente incluyen pYES2, pPIC9 (Invitrogen, San Diego, CA), Yepc-pADH2a, pYcDE-1 (Washington Research, Seattle, WA), pBC102-K22 (ATCC N° 67255) e YpGX265GAL4 (ATCC N° 67233). Las líneas celulares de mamífero incluyen por ejemplo células COS-7, células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, BHK, CHL-1, NSO y HEK293 que se pueden emplear para expresar las proteínas de fusión recombinantes en esta invención. Las proteínas recombinantes producidas en células de mamífero habitualmente son solubles y glicosiladas y poseen extremos N-terminales auténticos. Los vectores de expresión de mamífero pueden contener elementos no transcriptos, tal como un origen de replicación, un promotor y un potenciador y secuencias no traducidas 5' o 3', tal como sitios de unión a ribosomas, sitios de poliadenilación, sitios aceptores y un donante de procesamiento y secuencias de terminación de la transcripción. Los promotores que se pueden utilizar en los vectores de expresión de mamífero son habitualmente, por ejemplo, promotores virales, tal como de poliovirus, adenovirus, HTLV, virus 40 simio (SV 40) y citomegalovirus humano (CMV).

Según el sistema de expresión y el huésped seleccionados, se puede obtener una proteína de fusión recombinante

homogénea utilizando diversas combinaciones de técnicas de cromatografía convencionales usados para la purificación de proteínas. Estas incluyen: cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de fase reversa, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía con interacción hidrofóbica, cromatografía con filtración sobre gel y HPLC. Si el sistema de expresión secreta la proteína de fusión hacia el medio de cultivo, la proteína se puede purificar directamente a partir del medio. Si la proteína de fusión no es secretada, se lo puede aislar a partir de lisados celulares. La ruptura celular se puede efectuar utilizando cualquier método convencional, incluyendo ciclos de congelamiento-descongelamiento, sonicación, ruptura mecánica o uso de agentes de lisis de células.

En una realización preferida de esta invención, las construcciones de expresión de mamífero fueron transfectadas en células CHO DXB11. Se seleccionaron poblaciones estables usando higromicina B 400 µg/ml en el medio HAMS/F12. Los niveles de expresión fueron de aproximadamente 500 µg/l. Para incrementar los niveles de expresión se seleccionó una población usando metotrexato 100 nM en medio alfa MEM. El nivel de expresión aproximado de esta población era de 5 mg/l.

La construcción de fusión contiene la secuencia de la marca de epítopo en el extremo C-terminal de la proteína. Las columnas de afinidad anti-marca del epítopo se adquirieron de American/Pharmacia Biotech. El medio de cultivo celular se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se cargaron 5 ml en una columna con la marca del epítopo a razón de 2 ml/min. La columna se lavó con solución amortiguadora de fosfato 0,2 M NaH₂PO₄, 0,05%, pH 7,0, y luego se recolectó en tubos que conte-

nían 0,1 volúmenes de solución amortiguadora Tris 1M, pH 8,2 para neutralizar la solución amortiguadora de elución. Como alternativa, el medio de cultivo filtrado se cargó en una columna de proteína A. En este caso, la columna se lavó con ácido cítrico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 6,5 y se eluyó con la misma solución amortiguadora a pH 3,0. En ambos casos, las muestras purificadas se cargaron después en una columna Sephadex 200 para separar las formas monoméricas de las diméricas de la proteína de fusión.

Composiciones farmacéuticas:

La invención también provee composiciones farmacéuticas que pueden ser administradas a un paciente con el fin de lograr un efecto terapéutico. las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden preparar para la administración combinando una proteína de fusión que posee el grado de pureza deseado con una cantidad eficaz para uso farmacéutico de vehículos aceptables para uso fisiológico.

Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden emplear en composiciones farmacéuticas, para una administración intravenosa o una administración subcutánea o una administración intratecal. Así, las proteínas de fusión descritas se combinarán preferentemente con un vehículo estéril aceptable para uso farmacéutico, tal como dextrosa al cinco por ciento, solución de Ringer con lactato, salina normal, agua estéril o cualquier otra solución amortiguadora fisiológica preparado comercialmente diseñado para una infusión intravenosa. Se debe tener en cuenta que la selección de la solución del vehículo y la dosificación y administración de la composición varía con el sujeto y el estado clínico particular y está sujeta a los procedimientos médicos estándar.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, estas composiciones farmacéuticas pueden ser administradas en cantidades eficaces para inhibir las consecuencias patológicas asociadas con una generación excesiva de trombina en el sujeto.

La administración de la proteína de fusión puede ser por inyección intravenosa de un bolo, por infusión intravenosa constante o por una combinación de ambas rutas. Como alternativa, o además, la proteína de fusión se mezcla con los excipientes apropiados para su incorporación en la circulación desde un sitio intramuscular. El tratamiento sistémico con la proteína de fusión puede ser monitoreada con la determinación del tiempo de tromboplastina activada parcial (PT) en una serie de muestras de sangre extraídas del paciente. El tiempo de coagulación observado en este ensayo está prolongado cuando se logra un nivel suficiente de la proteína de fusión en la circulación general.

Las proteínas de fusión recombinantes y las composiciones farmacéuticas de esta invención son de utilidad para la administración por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral o local. Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas en diversas formas de dosificación unitaria según el método de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitaria pueden ser administradas en formas que incluyen, por ejemplo, tabletas, cápsulas, polvo, soluciones y emulsiones.

Las proteínas de fusión recombinantes y las composiciones farmacéuticas de esta invención son de particular utilidad para una administración por vía intravenosa. Las composiciones que serán administradas comprenden habitualmente una

solución del anticuerpo de cadena simple o de una proteína de fusión que comprende el anticuerpo de cadena simple disuelto en un vehículo aceptable para uso farmacéutico, preferentemente en un vehículo acuoso. Se pueden emplear diversos vehículos acuosos, por ejemplo, solución amortiguadora salina y semejantes. Estas soluciones son estériles y en general están libres de materiales no deseados. Las composiciones pueden ser esterilizadas utilizando las técnicas de esterilización convencionales que son bien conocidas.

La composición farmacéutica típica para una administración intravenosa puede ser determinada fácilmente por el especialista en el arte. Las cantidades administradas son claramente específicas de la proteína y dependen de su potencia y perfil farmacocinético. Los métodos actuales para preparar composiciones de administración parenteral son conocidos o habituales para el especialista en el arte y se describen con mayor detalle en publicaciones tales como *Remington's Pharmaceutical Science*, 15^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa (1980).

Las composiciones que contienen las proteínas de fusión de la invención o un cóctel de las mismas (es decir, una mezcla con otras proteínas) se pueden administrar como tratamientos terapéuticos. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que sufre de una enfermedad o trastorno hemorrágico en una cantidad suficiente como para curar o al menos detener parcialmente la hemorragia. La cantidad adecuada para lograrlo se define como una "cantidad eficaz para uso terapéutico". Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la severidad de la enfermedad y el estado general de salud del paciente.

La administración simple o múltiple de las composiciones dependerá de la dosificación y frecuencia requeridas y toleradas por el paciente. En cualquier caso, la composición deberá proveer una cantidad suficiente de las proteínas de esta invención con el fin de tratar eficazmente al paciente.

Las proteínas de fusión de la invención, o las composiciones aceptables para uso farmacéutico de las mismas, se administran en una cantidad eficaz para uso terapéutico, que varía según numerosos factores incluyendo la actividad de la proteína de fusión específica empleada; la estabilidad metabólica y extensión de la acción de la proteína de fusión; la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta del paciente; el modo y tiempo de administración; la velocidad de excreción; la combinación de fármacos; la severidad del estado de enfermedad particular; y del huésped bajo terapia. En general, una cantidad eficaz para uso terapéutico diaria comprende entre aproximadamente 0,14 mg y 14,3 mg/kg de peso corporal por día de una proteína de fusión de la invención, o una composición aceptable para uso farmacéutico de la misma; preferentemente, entre aproximadamente 0,7 mg y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día; y más preferentemente, entre aproximadamente 1,4 mg y aproximadamente 7,2 mg/kg de peso corporal por día. Por ejemplo, para la administración a una persona de 70 kg, el rango de dosificación comprendería entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 1,0 gramo por día de una proteína de fusión de la invención, o una composición aceptable para uso farmacéutico de la misma, preferentemente entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 700 mg por día y más preferentemente entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg por día.

Terapia genética:

La proteína de fusión de la invención también se puede emplear de acuerdo con la invención por expresión de dicha proteína de fusión *in vivo*, a menudo denominada "terapia genética". Así, por ejemplo, se pueden manipular células con un polinucleótido (ADN o ARN) que codifica la proteína de fusión *ex vivo*, a continuación se proveen al paciente a tratar las células manipuladas que contienen la proteína de fusión. Dichos métodos son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, las células se pueden manipular mediante procedimientos conocidos en el arte que comprenden el uso de una partícula retroviral que contiene un ARN codificador de la proteína de fusión de la presente invención.

La distribución local de las proteínas de fusión anti-coagulantes de la presente invención mediante terapia genética permite administrar el agente terapéutico en el área de interés, es decir las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos.

Se contemplan metodologías de terapia genética tanto *in vitro* como *in vivo*. Se conocen diversos métodos para transferir genes potencialmente terapéuticos a poblaciones de células definidas. Véase, por ejemplo, Mulligan (1993) *Science* 260: 926-931. Estos métodos incluyen:

1) Transferencia directa de genes. Véase, por ejemplo, Wolff et al. (1990) *Science* 247: 1465-1468;

2) Transferencia de ADN mediada por liposomas. Véase, por ejemplo, Caplen et al. (1995) *Nature Med.* 3: 39-46; Crystal (1995) *Nature Med.* 1: 15-17; Gao y Huang (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179: 280-285;

3) Transferencia de ADN mediada por retrovirus. Véase,

por ejemplo, Kay et al. (1993) *Science* 262: 117-119; Anderson (1992) *Science* 256: 808-813.

4) Transferencia de ADN mediada por virus. Dichos virus a ADN incluyen adenovirus (preferentemente vectores basados en Ad2 o Ad5), virus *Herpes* (preferentemente vectores basados en el virus *Herpes simplex*) y parvovirus (preferentemente vectores basados en parvovirus "defectuosos" o no autónomos, más preferentemente vectores basados en virus adeno-asociados, más preferentemente aún vectores basados en AAV-2). Véase, por ejemplo, Ali et al. (1994) *Gene Therapy* 1: 367-384; Patente de los Estados Unidos N°: 4.797.368, cuyo contenido se incorpora en este documento a modo de referencia, y Patente de los Estados Unidos N°: 5.139.941, cuyo contenido se incorpora en este documento a modo de referencia.

La elección de un sistema de vectores particular para transferir el gen de interés dependerá de diversos factores. Un factor importante es la naturaleza de la población de células de interés. Aunque se han estudiado y utilizado extensamente los vectores retrovirales en numerosas aplicaciones de terapia genética, en general, estos vectores no son adecuados para infectar células que no están en división. Además, los retrovirus adolecen de una potencial oncogenicidad. Sin embargo, desarrollos recientes en el campo de los vectores lentivirales permiten evitar algunas de estas limitaciones. Véase Naldini et al. (1996) *Science* 272: 263-267.

Los retrovirus a partir de los cuales pueden derivar los vectores de plásmidos retrovirales mencionados previamente incluyen, por ejemplo, el virus de leucemia de murinos de Moloney, el virus de necrosis del bazo, retrovirus tales como el virus del sarcoma de Rous, el virus del sarcoma de Harvey,

el virus de leucosis de aves, el virus de leucemia de monos gibones, el virus de inmunodeficiencia humana, adenovirus, el virus del sarcoma mieloproliferativo y virus de tumor de mamaríferos. En una realización, el vector de un plásmido retroviral deriva del virus de leucemia de murinos de Moloney.

Los adenovirus tienen la ventaja que presentan un amplio rango de huéspedes, pueden infectar células quiescentes o diferenciadas terminalmente, tal como neuronas o hepatocitos, y son esencialmente no oncogénicas. Véase, por ejemplo, Ali et al. (1994), *supra*, pág. 367. Los adenovirus no parecen integrarse en el genoma huésped. Dado que se ubican fuera de los cromosomas, se reduce mucho el riesgo de mutagénesis por inserción. Ali et al. (1994), *supra*, pág. 373.

Los virus adeno-asociados presentan ventajas similares a los vectores basados en adenovirus. Sin embargo, los AAV presentan una integración específica del sitio en el cromosoma humano 19 (Ali et al. (1994), *supra*, pág. 377).

En una realización preferida, el ADN que codifica las proteínas de fusión de esta invención se usa en terapias genéticas para trastornos que incluyen, por ejemplo, trombosis venosa profunda, coagulación intravascular diseminada, síndrome coronario agudo o cáncer con evidencia de coagulopatías.

De acuerdo con esta realización, se provee una terapia genética con el ADN que codifica las proteínas de fusión de esta invención a un paciente que lo necesita, de forma concurrente o inmediatamente después del diagnóstico.

El especialista comprenderá que de acuerdo con esta realización se puede utilizar cualquier vector de terapia genética adecuado que contenga el ADN codificador de la proteína

de fusión de la invención o el ADN codificador de análogos, fragmentos, derivados o variantes de la proteína de fusión de la invención. Las técnicas para construir dicho vector son conocidas. Véase, por ejemplo, Anderson, W.F. (1998) *Nature* 392: 25-30; Verma I.M. y Somia, N. (1998) *Nature* 389: 239-242. La introducción del vector que contiene el ADN de la proteína de fusión en el sitio de interés se puede llevar a cabo utilizando técnicas conocidas.

El vector de la terapia genética incluye uno o varios promotores. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, por ejemplo, el promotor retroviral LTR; el promotor SV40; y el promotor del citomegalovirus humano (CVM) descrito en Miller et al. (1989) *Biotechniques* 7(9): 980-990, o cualquier otro promotor (por ejemplo, promotores celulares tal como promotores de células eucariontes incluyendo, por ejemplo, los promotores de histona, pol III y β -actina). Otros promotores virales que se pueden emplear incluyen, por ejemplo, promotores de adenovirus, promotores de la timidina quinasa (TK) y promotores del parvovirus B19. La selección del promotor adecuado será evidente para el especialista en el arte a partir de las descripciones contenidas en este documento.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la presente invención se encuentra bajo el control de un promotor adecuado. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, por ejemplo, promotores adenovirales, tal como el promotor tardío mayor adenoviral; o promotores heterólogos, tal como el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor del virus sincicial respiratorio (RSV); promotores inducibles, tal como el promotor MMT, el promotor

ME

de metalotioneína; los promotores de shock de calor; el promotor de albúmina; el promotor de ApoA1; los promotores de globina humana; promotores de timidina quinasa virales, tal como el promotor de la timidina quinasa de *Herpes simplex*; los LTR retroviral (incluyendo los LTR retrovirales modificados descritos previamente); el promotor de β -actina; y el promotor de la hormona de crecimiento humana.

El vector plásmido retroviral se emplea para transducir líneas celulares empaquetadores con el fin de formar líneas celulares productoras. Los ejemplos de células empaquetadoras que pueden ser transfectadas incluyen, por ejemplo, las líneas celulares PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X; VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+N^o-86, GP+envAm12 y DAN descritas en Miller (1990) *Human Gene Therapy* 1: 5-14, cuyo contenido se incorpora por completo en este documento a modo de referencia. El vector puede transducir las células empaquetadoras mediante cualquier medio conocido en el arte. Dichos medios incluyen, por ejemplo, electroporación, el uso de liposomas y precipitación por CaPO₄. Como alternativa, el vector plásmido retroviral se puede encapsular en una liposoma, o se puede acoplar a un lípido, y luego puede ser administrado al huésped. La línea de células productoras genera partículas infecciosas del vector retroviral que incluyen la o las secuencias de ácido nucleico codificadoras de los polipéptidos. Dichas partículas del vector retroviral se pueden emplear entonces para transducir células eucariontes, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las células eucariontes transducidas expresarán la o las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido. Las células eucariontes que pueden ser transducidas incluyen, por ejemplo, células madre embrionarias, células de carcinoma

embrionarias, así como células madre hematopoyéticas, hepatocitos, fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células endoteliales y células epiteliales bronquiales.

Un enfoque diferente de la terapia genética es la "terapia transcariótica", en la cual las células del paciente son tratadas ex vivo para inducir los genes cromosómicos latentes a fin de producir la proteína de interés después de introducir las nuevamente en el paciente. La terapia transcariótica supone que el individuo posee un complemento normal de los genes necesarios para la activación. La terapia transcariótica comprende la introducción de un promotor, u otra secuencia reguladora exógena capaz de activar los genes nacientes, en el ADN cromosómico de las células del paciente ex vivo, el cultivo y la selección de células activas productoras de proteínas y la reintroducción de las células activadas en el paciente con el propósito de establecerlos por completo. Las células "activadas por genes" fabrican entonces la proteína de interés por algún tiempo significativo, tal vez durante toda la vida del paciente. En las Patentes de los Estados Unidos N°: 5.641.670 y 5.733.761 se describe detalladamente este concepto, y los contenidos de las mismas se incorporan por completo en este documento a modo de referencia.

Conjuntos de elementos:

Esta invención se relaciona además con conjuntos de elementos para fines de diagnóstico o de investigación. Los conjuntos de elementos incluyen típicamente uno o varios contenedores que contienen los anticuerpos de cadena simple de la presente invención. En una realización preferida, los conjuntos de elementos comprenden contenedores que contienen anticuerpos de cadena simple en una forma adecuada para una deri-

vatización con una segunda molécula, por ejemplo, uno o varios dominios de TM o fragmentos de los mismos. En una realización más preferida, los conjuntos de elementos comprenden contenedores que contienen las proteínas de fusión de la SEQ ID N°: 2 o de la SEQ ID N°: 3.

En otra realización, los conjuntos de elementos pueden contener las secuencias de ADN que codifican las proteínas de fusión. Preferentemente las secuencias de ADN que codifican estas proteínas de fusión se proveen en un plásmido adecuado para la transfección y expresión en una célula huésped. El plásmido puede contener un promotor (a menudo un promotor inducible) para regular la expresión del ADN en la célula huésped. El plásmido también puede contener sitios de restricción apropiados para facilitar la inserción de otras secuencias de ADN en el plásmido con el fin de producir numerosas proteínas de fusión. Los plásmidos también pueden contener numerosos elementos adicionales para facilitar la clonación y expresión de las proteínas codificadas. Dichos elementos son bien conocidos por los especialistas en el arte e incluyen, por ejemplo, marcadores seleccionables, codones de inicio, codones de terminación y semejantes.

Indicaciones terapéuticas:

Las enfermedades en las cuales la formación de trombos cumplen una función etiológica significativa incluyen infarto de miocardio, coagulación intravascular diseminada, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, apoplejía isquémica, shock séptico, síndrome de dificultad respiratoria aguda, angina inestable y otras afecciones oclusivas arteriales y venosas. Las proteínas de fusión de esta invención son de utilidad en todos estos casos, así como en otras enfermedades en las cua-

les la formación de trombos es patológica. Otras afecciones patológicas donde la proteína de fusión de esta invención puede ser de utilidad incluyen cáncer con coagulopatías e inflamación. Los compuestos también pueden ser útiles en los injertos de piel y venas y en los trasplantes de órganos. El término "de utilidad" significa que los compuestos son de utilidad en el tratamiento, ya sea para prevenir una enfermedad o para impedir el avance de la misma a un estado más severo. Los compuestos de esta invención también proveen un anticoagulante seguro y eficaz, por ejemplo, en pacientes que reciben bioprótesis, tal como válvulas cardíacas. Estos compuestos pueden reemplazar la heparina y warfarina en el tratamiento de, por ejemplo, embolia pulmonar o infarto de miocardio agudo. Las proteínas de fusión de esta invención también son útiles en el recubrimiento de los dispositivos médicos donde la coagulación constituye un factor de cuidado.

Ensayos:

Existen numerosos de ensayos de laboratorio para medir la actividad de la TM de una proteína de fusión de la invención. La actividad de la proteína C se puede medir con el ensayo descrito por Salem, H.H. et al. (1984), *supra*, y Galvin, J.B. et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262(5): 2199-2205. Brevemente, el ensayo consiste de dos pasos. El primer paso comprende la incubación de la proteína de fusión de prueba con trombina y proteína C bajo condiciones definidas. En el segundo paso, la trombina es inactivada con hirudina o anti-trombina III y heparina, y luego se determina la actividad de la proteína C recién activada mediante el uso de un sustrato cromogénico, por el cual es liberado un cromóforo por la actividad proteolítica de la proteína C activada. Este ensayo

se lleva a cabo con los reactivos purificados.

Como alternativa, el efecto de la proteína de fusión se puede medir usando ensayos de tiempo de coagulación en plasma, tal como el tiempo de tromboplastina activada parcial (APTT), el tiempo de coagulación de trombina (TCT) y/o el tiempo de protrombina (PT). Estos ensayos permiten distinguir los diferentes mecanismos de inhibición de la coagulación y comprenden la activación de la proteína C. La prolongación del tiempo de coagulación en cualquiera de estos ensayos demuestra que la molécula puede inhibir la coagulación en plasma.

Los ensayos mencionados se usan para identificar las proteínas de fusión con actividad TM que se pueden unir a la trombina y para activar la proteína C, tanto en sistemas purificados como en el entorno plasmático. Luego se emplean otros ensayos para evaluar otras actividades de la TM nativa, tal como la inhibición de formación de fibrina catalizada por trombina a partir de fibrinógeno (Jakubowski, H.V. et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261(8): 3876-3882), la inhibición de la activación por trombina del factor V (Esmon, C.T. et al. (1982). *J. Biol. Chem.* 257(14): 7944-7947), la inhibición acelerada de la trombina por la antitrombina III y el cofactor de heparina II (Esmon, N.L. et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 258(20): 12238-12242), inhibición de activación por trombina del factor XIII (Polgar, J. et al. (1987) *Thromb. Haemost.* 58(1): 140), la inhibición de la inactivación mediada por trombina de la proteína S (Thompson, E.A. y Salem, H.H. (1986) *J. Clin. Inv.* 78(1): 13-17) y la inhibición de la activación y agregación de plaquetas mediada por trombina (Esmon, N.L. et al. (1983), *supra*).

Se utilizan los siguientes ensayos, que se describen con mayor detalle en el Ejemplo 5, para medir la potencia *in vitro* de las proteínas de fusión de la invención: 1) ensayo de activación de la proteína C (cromogénico); 2) ensayo de activación de STF/FVIIa; 3) ensayo de activación del factor X; y 4) ensayo de activación de la proteína C (sobre una superficie rica en TF).

Al llevar a cabo los procedimientos de la presente invención por supuesto se considera que la referencia a soluciones amortiguadoras, medios, reactivos, células, condiciones de cultivo particulares y semejantes no pretenden ser limitantes, sino que se debe considerar que incluyen todos los materiales relacionados que el especialista en el arte tendría en cuenta como de interés o valor en el contexto particular en el cual dicha descripción se presenta. Por ejemplo, a menudo es posible sustituir un sistema de soluciones amortiguadoras o medios de cultivo por otro y aún obtener resultados similares, cuando no idénticas. Los especialistas en el arte tienen un conocimiento suficiente de dichos sistemas y metodologías como para poder, sin experimentos innecesarios, efectuar dichas sustituciones que servirán a su propósito de manera óptima con los métodos y procedimientos que se describen aquí.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. Al aplicar la descripción del ejemplo, se debe tener en cuenta que sin lugar a dudas habrá otras realizaciones diferentes de los métodos descriptos acordes con la presente invención que serán evidentes para el especialista en el arte relevante.

Sin una elaboración adicional, se considera que el espe-

cialista en el arte puede utilizar la presente invención en su concepción más completa, teniendo en cuenta la descripción precedente. Las siguientes realizaciones específicas preferidas se deben considerar entonces como meramente ilustrativas y no constituyen limitaciones del resto de la descripción en modo alguno.

En la descripción anterior y en los siguientes ejemplos, todas las temperaturas están expresadas en grados Celsius sin corregir y todas las partes y porcentajes son en peso, a menos que se indique lo contrario.

Todas las descripciones de las solicitudes, patentes y publicaciones citadas previamente se incorporan en este documento a modo de referencia.

Los siguientes ejemplos se proveen a modo de guía para asistir en la práctica de la invención y no constituyen limitaciones del alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Construcción del anticuerpo de cadena simple anti-TF scFv (TF) 3e10

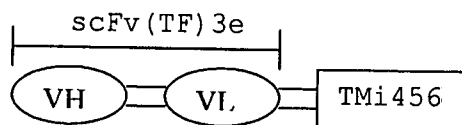
```
(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P E
M A Q V N L R E S G G T L V Q P G G S L R
L S C A A S G F S F T D A W M S W V R Q A
P G K E L E W V S S I S G S G G S T Y Y A
G S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q
M N S L R A E D T A V Y Y C A R V L S L T
D Y Y W Y G M D V W G Q G T L V T V S A G
G G G S G A P N F M L T Q P H S V S A S P
G K T V T I S C T R S S G S V A S Y Y V Q
W Y Q Q R P G S S P T T V I Y E D N H R P
S G V P D R F S G S I D T S S N S A S L T
```

I S G L K T E D E A D Y Y C Q S Y D S N N
 L V V F G G G T K L T V L G A A A G A P V
 P Y P D P L E P R A A (264)

El anticuerpo de cadena simple anti-TF, scFv(TF)3e10 (SEQ ID N°: 1), consiste de un péptido señal (-18 a -1), un dominio V_H (1 a 126), un ligador de V_H-V_L (127 a 131), un dominio V_L (132 a 246) y una secuencia de la marca del epítopo (247 a 264).

EJEMPLO 2

Construcción 1 de la proteína de fusión - scFv(TF)3e10-TMi456

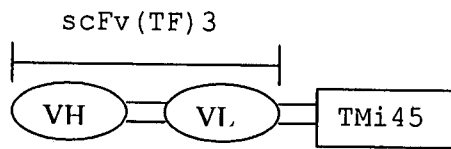


(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P E
 M A Q V N L R E S G G T L V Q P G G S L R
 L S C A A S G F S F T D A W M S W V R Q A
 P G K E L E W V S S I S G S G G S T Y Y A
 G S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q
 M N S L R A E D T A V Y Y C A R V L S L T
 D Y Y W Y G M D V W G Q G T L V T V S A G
 G G G S G A P N F M L T Q P H S V S A S P
 G K T V T I S C T R S S G S V A S Y Y V Q
 W Y Q Q R P G S S P T T V I Y E D N H R P
 S G V P D R F S G S I D T S S N S A S L T
 I S G L K T E D E A D Y Y C Q S Y D S N N
 L V V F G G G T K L T V L G A A A G G G G
 S G G G G S G G G G S V E P V D P C F R A
 N C E Y Q C Q P L N Q T S Y L C V C A E G
 F A P I P G E P H R C Q L F C N Q T A C P A
 D C D P N T Q A S C E C P E G Y I L D D G
 F I C T D I D E C E N G G F C S G V C H N
 L P G T F E C I C G P D S A L A G Q I G T
 D C A A A G A P V P Y P D P L E P R A A
 (400)

La proteína de fusión scFv(TF)3e10-TMi456 (SEQ ID N°: 2) consiste de un péptido señal (-18 a -1), un dominio V_H (1 a 126), un ligador V_H-V_L (127 a 131), un dominio V_L (132 a 246), un ligador V_L-TM (247 a 264), un dominio TMi456 (265 a 382) y una secuencia de marca del epítopo (383 a 400). Las mutaciones H381G, M388L, R456G y H457Q en TMi456 están subrayadas.

EJEMPLO 3

Construcción 2 de la proteína de fusión - scFv(TF)3e10-TMi456



```
(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P E
M A Q V N L R E S G G T L V Q P G G S L R
L S C A A S G F S F T D A W M S W V R Q A
P G K E L E W V S S I S G S G G S T Y Y A
G S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q
M N S L R A E D T A V Y Y C A R V L S L T
D Y Y W Y G M D V W G Q G T L V T V S A G
G G G S N F M L T Q P H S V S A S P G K T
V T I S C T R S S G S V A S Y Y V Q W Y Q
Q R P G S S P T T V I Y E D N H R P S G V
P D R F S G S I D T S S N S A S L T I S G
L K T E D E A D Y Y C Q S Y D S N N L V V
F G G G T K L T V L G A A A G G G G S G G
G G S G G G G S V E P V D P C F R A N C E
Y Q C Q P L N Q T S Y L C V C A E G F A P
I P G E P H R C Q L F C N Q T A C P A D C
D P N T Q A S C E C P E G Y I L D D G F I
C T D I D E C E N G G F C S G V C H N L P
G T F E C I C G P D S A L A G Q I G T D C
(379)
```

La proteína de fusión scFv(TF)3e10-TMi456 (SEQ ID N°: 3) consiste de un péptido señal (-18 a -1), un dominio V_H (1 a 126), un ligador V_H-V_L (127 a 131), un dominio V_L (132 a 243),

un ligador V_L-TM (244 a 261) y un dominio TMi456 (262 a 379). Las mutaciones H381G, M388L, R456G y H457Q en TMi456 están subrayadas.

EJEMPLO 4

Expresión de la proteína de fusión en células bacterianas/de mamífero

La expresión en bacterias era posible, pero la proteína obtenida presentaba una actividad como cofactor de TM muy reducida. La proteína de fusión se expresó en células CHO. El plásmido de expresión contiene ambos marcadores de selección de higromicina B y DHFR. La selección original se llevó a cabo en higromicina 400 µg/ml para seleccionar una población. La población resultante fue sometida luego a selección con metotrexato 100 nM. Durante este procedimiento, se seleccionaron las células que contenían copias amplificadas de la región del ADN que contenía el marcador de selección, y un gen de interés, de dicha población. Los niveles de expresión habían aumentado desde aproximadamente 0,3 mg/l hasta aproximadamente 6 mg/l como resultado de esta selección.

EJEMPLO 5

Ensayos *in vitro*

1. Ensayo de activación de la proteína C (cromogénico)

Este ensayo se llevó a cabo mezclando 20 µl de cada una de las siguientes proteínas en una placa para microtitulación: muestra de TM (desconocida o estándar), trombina (3 nM) y proteína C (1,5 µM). El diluyente de ensayo para cada proteína era Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,1 M, CaCl₂ 2,5 mM, BSA 2,5 mg/ml, pH 7,4. Las cavidades se incubaron durante 2 horas a 37 °C después de lo cual se terminó la activación de la proteína C por adición de 20 µl de hirudina (0,16 unidades/µl

370 nM) en diluyente de ensayo e incubación durante otros 10 minutos. 160

La cantidad de proteína C activada formada se detectó por adición de 100 μ l de S2266 1 mM (en diluyente de ensayo) y luego se continuó incubando la placa a 37 °C. La absorbancia a 405 nm se leyó para cada cavidad cada 10 segundos durante 30 minutos, usando un lector de placas de Molecular Devices. Los datos de absorbancia se guardaron y se calculó el cambio en la absorbancia por segundo (pendiente) para cada cavidad. El cambio de absorbancia por segundo es proporcional a pmol/ml de proteína C activada.

Esta relación se determinó empíricamente usando concentraciones variables de proteína C totalmente activada. Las muestras que contenían proteína C 100% activada fueron generadas mediante mezclado de proteína C a concentraciones de 0 a 1,5 μ M con TM de conejo 60 nM y trombina 30 nM, incubación durante 0 a 4 horas, adición de hirudina y medición de la actividad de S2266 igual que antes. Las condiciones bajo las cuales el 100% de la proteína C estaba activada se definieron como aquellas donde la actividad S2266 (A405/seg) alcanzaba un valor constante.

Una unidad de actividad se define como 1 pmol de proteína C activada generada por ml/min bajo las condiciones de reacción definidas previamente. Como alternativa, los valores de actividad se informan como una comparación con los valores para TM de conejo nativa solubilizada en detergente.

2. Ensayo de activación de sTF/FVIIa

A continuación se describe el principio de este ensayo. El enlace p-nitroanilida amida del tripéptido del sustrato es hidrolizado por el complejo sTF/FVIIa. El producto cromóforo

liberado, la p-nitroanilida, es monitoreada a 405 nm y la concentración de producto formado por unidad de tiempo se calcula usando un coeficiente de extinción molar de $9920 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Los valores de IC_{50} (C) se determinan ajustando las velocidades iniciales en la siguiente ecuación de 4 parámetros:

$$Y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$$

H-D-Val-Leu-Arg-p-NA $\rightarrow$ H-D-Val-Leu-Arg + p-NA

Sustrato S2266

Tripéptido

Cromóforo

Reactivos y soluciones:

1. Solución amortiguadora de ensayo: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 5 mM, BSA 0,1%, pH 7,5
2. FVIIa humano (HCVIIA-0060, Haematologic Technologies Inc.): solución de trabajo 10x: preparar una solución 20 nM en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.
3. TF soluble (Berlex): solución de trabajo 10 x: preparar una solución 30 nM en solución amortiguadora ensayo antes del uso.
4. Sustrato cromogénico S2266 (Kabi Pharmacia Hepar Inc.): solución madre: 10 mM en H_2O , guardar a 4 °C. Solución de trabajo 2,5 x: preparar una solución 2,5 mM en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.
5. Anticuerpo: Preparar diluciones 2,5x en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.

Condiciones de ensayo:

Los ensayos se llevan a cabo en una placa para microtitulación de 96 cavidades a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los componentes son:

STF 3 nM

Anticuerpo varía entre 1000 y

	0,625 nM
FVIIa	2 nM
S2266	1 mM

Procedimiento de ensayo:

1. Pipetear 0,1 ml de AB 2,5x (o solución amortiguadora control) en cada cavidad.
2. Agregar 0,025 ml de sTF 10x e incubar durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave.
3. Agregar 0,025 ml de FVIIa 10x, incubar durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave.
4. Agregar 0,1 ml de sustrato S2266 2,5x, transferir inmediatamente la placa a un lector de placas y medir las cinéticas enzimáticas a 405 nm con intervalos de 10 segundos durante 15 min.

3. Ensayo de activación del factor X:

A continuación se describe el principio de este ensayo. El FVIIa se incuba con vesículas de TF recombinantes humanas para formar un complejo de proteasas capaz de activar el sustrato, FX. Este complejo se forma en presencia (o ausencia) de diferentes concentraciones de anticuerpo, luego se introduce el sustrato FX y se permite que la reacción avance para formar el producto, la proteasa FXa activa, capaz de hidrolizar el enlace p-nitroanilida amida del sustrato cromogénico S2222. El producto cromóforo liberado, p-nitroanilida, se monitorea a 405 nm y luego se calcula la concentración de producto formado por unidad de tiempo usando un coeficiente de extinción molar de $9920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los valores de IC_{50} (C) se determinan ajustando las velocidades iniciales en la siguiente ecuación de 4 parámetros: $Y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$



Sustrato S2222

Cromóforo

Reactivos y soluciones:

1. Solución amortiguadora de ensayo: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, BSA 0,1%, pH 7,5 .
2. FVIIa humano (HCVIIA-0031, Haematologic Technologies Inc.): solución de trabajo 4 x: preparar una solución 100 pM en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.
3. TF recombinante humano (reconstituido en los laboratorios de los autores a partir de Innovin, Dade): solución de trabajo: preparar una dilución 1: 480 en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.
4. Factor X (HCX-0060, Haematologic Technologies Inc.): solución de trabajo 4 x: preparar una solución 1000 nM en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.
5. Sustrato cromogénico S2222 (Kabi Pharmacia Hepar Inc.):

Solución madre: 6 mM en H₂O, guardar a 4 °C.

Solución de trabajo: preparar una solución 0,78 mM en EDTA 3,57 mM (para detener la reacción), NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, antes del uso.

6. Anticuerpo:

Preparar diluciones 4x en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.

Condiciones de ensayo:

Los ensayos se llevan a cabo en una placa para microtitulación de 96 cavidades a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los componentes son:

Vesículas de rTF	¼ de una dilución 1: 480
Anticuerpo	Varía entre 1000 y 0,625 nM
FVIIa	25 pM
FX	250 nM
S2222	0,546 mM

Procedimiento del ensayo:

1. Pipetear 0,015 ml de AB 4x (o solución amortiguadora control) en cada cavidad.
2. Agregar 0,015 ml de vesículas de rTF 4x.
3. Agregar 0,015 ml de FVIIa 4x, incubar durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave.
4. Agregar 0,015 ml de FX 4x, incubar durante 5 min a temperatura ambiente con agitación suave.
5. Agregar 0,14 ml de sustrato S2222, transferir la placa inmediatamente a un lector de placas y medir las cinéticas enzimáticas a 405 nm con intervalos de 10 segundos durante 15 minutos.

4. Ensayo de activación de la proteína C (sobre una superficie rica en TF)

Este ensayo se lleva a cabo igual que para el ensayo de activación cromogénico de la proteína C descrito previamente con la excepción en este ensayo se agregan vesículas PC/PS que contienen TF humano a la proteína de fusión, o TM control, antes de agregar la trombina y la proteína C.

EJEMPLO 6

Características de los anticuerpos anti-TF

Se aislaron siete anticuerpos diferentes de unión al TF a partir de una biblioteca de expresión en fagos de anticuer-

pos de cadena simple completamente humanos. Las afinidades de los anticuerpos de unión sTF, medidas usando BIAcore, comprendieron entre 35 y 470 nM. El ensayo de sTF/VIIa se usó para determinar si los anticuerpos podían bloquear la formación de un complejo VIIa/TF activo. En el ensayo de sTF/VIIa, la unión de VIIa al sTF acelera la velocidad de clivaje contra el sustrato de péptidos cromogénicos S2266 en >20 veces. Los anticuerpos que inhiben la unión de FVIIa al TF bloquean esta aceleración. Entre los siete anticuerpos diferentes que se aislaron, solamente uno de ellos, el scFv(TF)3e10, no inhibía el ensayo sTF/VIIa. Este anticuerpo incrementó la afinidad del FVIIa por el sTF, disminuyendo 5 veces el valor de la K_D (Figura 1). La K_D del anticuerpo scFv(TF)3e10 para el sTF, medido usando el ensayo sTF/FVIIa, era de 65,4 nM (Figura 2). Se usó microcalorimetría para comparar la afinidad de scFv(TF)3e10 por el TF en comparación con el complejo de FVIIa/TF. Estos experimentos revelaron que el anticuerpo tiene una afinidad 20 veces mayor por el complejo TF/FVIIa en comparación con el sTF libre (33 nM vs. 600 nM, Figura 3). Los anticuerpos se compararon usando el ensayo de activación del FX, que consiste de TF de longitud completa en vesículas de fosfolípidos, FVIIa y FX. La cantidad de FXa generada se determina usando el sustrato cromogénico S2765. Aunque el anticuerpo scFv(TF)3e10 no presentaba la mayor afinidad medida con el BIAcore e incrementó la afinidad del FVIIa por el sTF, era el único anticuerpo del grupo que inhibía la activación del FX y prolongaba el tiempo de coagulación en el ensayo de PT. El valor de IC_{50} del anticuerpo scFv(TF)3e10 (dímero) para la inhibición en el ensayo de activación del FX era de 0,44 nM (Figura 4) y se observó una prolongación del doble del PT

a los 417 nM (Figura 5).

El anticuerpo scFv(TF)3e10 se identificó sobre la base de la unión al TF recombinante humano soluble. La homología de secuencia del TF entre humanos y murinos o humanos y conejos es del 58% y 71%, respectivamente. El anticuerpo se une a un epítopo único sobre el TF humano que interfiere con la activación del FX por el complejo de FVIIa/TF. Fisiológicamente, el anticuerpo presenta una ventaja con respecto a los anticuerpos que compiten por la unión al FVII o FVIIa con el TF. El valor de la K_D de ambos FVII y FVIIa en plasma humano es de 10 nM, o entre 100 y 1000 veces mayor que K_D . La velocidad de disociación para el complejo de gran afinidad será lento (70 a 700 segundos, suponiendo $k_{on} = 10^8 M^{-1} seg^{-1}$). Por el contrario, la K_m del FX por el complejo de VIIa/TF comprende un valor entre 0,200 y 4 μM y la concentración de FX en el plasma humano es de 130 nM (entre 0,03- y 0,65 veces la K_D). La función primaria del complejo de FVIIa/TF en la coagulación es la conversión del FX en el FXa.

EJEMPLO 7

Características *in vitro* de la proteína de fusión scFv(TF)3e10-TMi456

Se evaluaron las características de la proteína de fusión de la invención, scFv(TF)3e10-TMi456, en diversos ensayos *in vitro*. La proteína de fusión, scFv(TF)3e10-TMi456, retenía la capacidad para inhibir la activación del FX por el complejo de FVIIa/TF ($IC_{50} = 0,5$ nM, no se muestran los datos) y actuaba como cofactor para la activación de la proteína C catalizada por trombina (ensayo cromogénico, Figura 6). No se observaron diferencias significativas en la actividad de cofactor del TM entre la proteína de fusión y Tmi456 sólo en

ausencia de vesículas de fosfolípidos que contienen TF. Por el contrario, la actividad de cofactor de TM de la proteína de fusión, pero no de Tmi456, aumentaba >5 veces en presencia de vesículas de fosfolípidos que contienen TF (Figura 7). La potencia *in vitro* de la proteína de fusión, scFv(TF)3e10-Tmi456, contra la coagulación inducida por TF (ensayo PT, vía de coagulación extrínseca) era 6 veces mayor que con el anticuerpo scFv(TF)3e10 y 17 veces mayor que con Tmi456 solamente (Figura 5). Por el contrario, la potencia *in vitro* de la proteína de fusión contra las vías intrínsecas y comunes no era afectada significativamente (ensayos de APTT y TCT, no se muestran los datos). Por consiguiente, la dosis de proteína de fusión que causó una prolongación del doble en el PT solamente tenía un efecto moderado sobre el APTT, en tanto Tmi456, a una dosis equivalente en la PT, causó un aumento de 4 veces en el APTT (Figura 8). Este perfil *in vitro* es coherente con el esperado para los anticoagulantes dirigidos a TF/FVIIa que son conocidos por tener una eficacia superior a las relaciones de hemorragia en modelos de trombosis en animales. De acuerdo con los ensayos de coagulación basados en plasma, la proteína de fusión scFv(TF)3e10-Tmi456 era más potente en un ensayo de coagulación inducida por TF en sangre completa (Tromboelastógrafo, TEG) que el scFv(TF)3e10 o el Tmi456 solos (Figura 9). Además, la proteína de fusión scFv(TF)3e10-Tmi456 presentaba una dosis-respuesta más predecible en el ensayo de coagulación inducida por TF en sangre completa que la heparina de bajo peso molecular (LMWH, Figura 10). En resumen, los datos anteriores demuestran que las proteínas de fusión de la invención son anticoagulantes potentes y selectivos *in vitro*.

EJEMPLO 8**Modelo de tromboembolia in vivo en rata**

La porción de anticuerpo contra TF de la proteína de fusión scFv(TF)3e10-TMi456, es específica para el TF de primates. Se desarrolló un modelo de tromboembolia desencadenado por el TF humano (reactivo de tromboplastina que contiene el TF recombinante humano, Orto) en ratas Sprague-Dawley macho concientes (350 - 400 g, $n > 7$ /grupo). En este modelo de coagulación intravascular diseminada (DIC), el TF, por medio de una inyección de tromboplastina, induce deposición de fibrina pulmonar, insuficiencia respiratoria y muerte. Se inyectaron dosis equimolares de scFv(TF)3e10-TMi456 o scFv(TF)3e10 o vehículo en la vena de la cola seguido, 15 min después, de una inyección de bolo de tromboplastina (0,5 ml/kg). En el grupo tratado con vehículo, esta dosis de TF da como resultado un 60% de letalidad (LD_{60}), habitualmente dentro de los 5 min después de la inyección de tromboplastina. Las ratas fueron calificadas de acuerdo con el siguiente sistema de puntaje de morbilidad-mortalidad: 0 = no afectado; 1 = dificultad respiratoria leve (recuperación dentro de los 30 min); 2 = dificultad respiratoria severa (moribunda, la recuperación requirió más de 60 min); y 3 = muerte. La calificación promedio se usó para comparar la eficacia de los 4 grupos de tratamiento diferentes. Los resultados con este ensayo *in vivo* se muestran en la Figura 11. La proteína de fusión de la invención pudo inhibir o impedir la muerte y la dificultad respiratoria en este ensayo.

Los ejemplos anteriores se pueden repetir con éxito similar sustituyendo los reactivos y/o condiciones de operación de esta invención descriptos genérica o específicamente uti-

lizados en los ejemplos precedentes.

En tanto la invención se ha ilustrado con respecto a la producción de determinadas construcciones de proteínas de fusión, resultará evidente que es posible efectuar variaciones y modificaciones de la invención sin apartarse del espíritu o alcance de la invención.

100

REIVINDICACIONES:

1. Un anticuerpo anticoagulante, CARACTERIZADO PORQUE se une al complejo del factor VIIa/factor tisular (FVIIa/TF) con mayor afinidad que al factor tisular (TF) solo.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicho anticuerpo se une al complejo FVIIa/TF con al menos 2 veces mayor afinidad que al TF solo al ser medido en un ensayo de microcalorimetría.
3. El anticuerpo de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE dicho anticuerpo se une al complejo FVIIa/TF con al menos 5 veces mayor afinidad que al TF.
4. El anticuerpo de la reivindicación 3, CARACTERIZADO PORQUE dicho anticuerpo se une al complejo FVIIa/TF con al menos 10 veces mayor afinidad que al TF.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5, CARACTERIZADO PORQUE dicho anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo dimérico Fab o un anticuerpo contra IgG.
7. El anticuerpo de la reivindicación 6, CARACTERIZADO PORQUE dicho anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple.
8. El anticuerpo de la reivindicación 7, CARACTERIZADO

161

PORQUE dicho anticuerpo no compite por la unión de TF con uno o más de los factores de coagulación seleccionados del grupo que consiste de factor VII (FVII), factor IX (FIX), y factor X (FX).

9. El anticuerpo de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE dicho factores de coagulación son FVII y FX.

10. El anticuerpo de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicho anticuerpo está glicosilada.

11. El anticuerpo de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicho anticuerpo ha sido modificado por la adición de polietilenglicol.

12. El anticuerpo de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicho anticuerpo está biotinilado para su unión a estreptavidina.

13. Una composición farmacéutica, donde comprende el anticuerpo de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha composición comprende un excipiente aceptable para uso farmacéutico y una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo.

14. Un método de protección contra la formación de trombos, CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración de una cantidad eficaz para uso terapéutico del anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo inhibe la generación de trombina sin afectar directamente otros parámetros de coa-

162

gulación, tal como la activación y agregación de plaquetas.

15. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE dicho método consiste en ofrecer protección contra la formación de trombos en la apoplejía isquémica, las complicaciones trombóticas después de una angioplastia o una cirugía microvascular.

16. Un método para prevenir y tratar la trombosis venosa profunda (DVT), la coagulación intravascular diseminada (DIC), el síndrome coronario agudo o cáncer con evidencia de coagulopatías en un paciente, que comprende la administración de una cantidad eficaz para uso terapéutico del anticuerpo de la reivindicación 1 a dicho paciente.

17. Un método para regular la respuesta inflamatoria en un paciente, CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración de una cantidad eficaz para uso terapéutico del anticuerpo de la reivindicación 1 a dicho paciente.

18. El método de la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha respuesta inflamatoria se selecciona del grupo formado por sepsis, injertos de piel y venas y transplantes de órganos.

19. El anticuerpo de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicho anticuerpo se puede usar para formar un recubrimiento no-trombogénico sobre la superficie de un dispositivo médico, donde dicho dispositivo médico toma contacto con la sangre.

163

20. Un kit, CARACTERIZADO PORQUE comprende el anticuerpo de la reivindicación 1.

21. Un kit, CARACTERIZADO PORQUE comprende secuencias de ADN que codifican el anticuerpo de la reivindicación 1.

22. Una composición de terapia genética, CARACTERIZADA PORQUE comprende la secuencia polinucleotídica SEQ ID N°: 2 o SEQ ID N°: 4, que codifica el anticuerpo que consiste de la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 1 o SEQ ID N°: 3, en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector de terapia genética.

23. Un anticuerpo anticoagulante, CARACTERIZADO PORQUE dicho anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple que se une al complejo FVIIa/TF con mayor afinidad que al TF solo, y donde dicho anticuerpo no compite por la unión de TF con FVII y FX.

24. El anticuerpo de la reivindicación 23, CARACTERIZADO PORQUE dicho anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 1 o SEQ ID N°: 3.

25. Una secuencia polinucleotídica que codifica para el anticuerpo de la reivindicación 23, CARACTERIZADA PORQUE dicha secuencia polinucleotídica comprende la secuencia polinucleotídica SEQ ID N°: 2 o SEQ ID N°: 4.

169

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Light, David
McLean, Kirk

<120> Nuevas proteínas de fusión con trombomodulina dirigidos contra factores tisulares como anticoagulantes

<130> BERLX 282WO

<140> PCT/US03/13522

<141> 2003-04-30

<150> 60/376.566

<151> 2002-05-01

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 282

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Proteína de fusión sintética

<400> 1

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His
145 150 155 160

Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg
165 170 175

Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg
180 185 190

Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro

165

195	200	205
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn		
210	215	220
Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp		
225	230	235
Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly		
245	250	255
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro		
260	265	270
Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Ala Ala		
275	280	

<210> 2
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Proteína de fusión sintética

<400> 2
 Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
 1 5 10 15
 Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
 115 120 125
 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His
 145 150 155 160
 Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg
 165 170 175
 Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg
 180 185 190
 Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro
 195 200 205

166

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

<210> 3

<211> 397

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Proteína de fusión sintética

<400> 3

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
 1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
 20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
 115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser
 145 150 155 160

Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly
 165 170 175

Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser
 180 185 190

Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro Ser Gly Val
 195 200 205

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn Ser Ala Ser
 210 215 220

Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 225 230 235 240

Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg
 275 280 285

Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu
 290 295 300

Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro Gly Glu Pro His Arg
 305 310 315 320

Cys Gln Leu Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys Asp Pro
 325 330 335

Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp
 340 345 350

Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys
 355 360 365

Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys Ile Cys Gly
 370 375 380

Pro Asp Ser Ala Leu Ala Gly Gln Ile Gly Thr Asp Cys
 385 390 395

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



168

(43) International Publication Date
13 November 2003 (13.11.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/092602 A3

(51) International Patent Classification⁷: **A61K 38/19**,
C07K 14/52

(21) International Application Number:
PCT/US2003/013522

(22) International Filing Date: 30 April 2003 (30.04.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/376,566 1 May 2002 (01.05.2002) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT** [DE/DE]; D-13342 Berlin (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **LIGHT, David** [US/US]; 614 South Freemont Street, San Mateo, CA 94402 (US). **MCLEAN, Kirk** [US/US]; 291 Capricorn Avenue, Oakland, CA 94611 (US).

(74) Agents: **ZELANO, Anthony, J. et al.**; Millen, White, Zelan & Branigan, P.C., Arlington Courthouse Plaza I, Suite 1400, 2200 Clarendon Boulevard, Arlington, VA 22201 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
26 August 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NOVEL TISSUE FACTOR TARGETED THROMBOMODULIN FUSION PROTEINS AS ANTICOAGULANTS

(57) Abstract: This invention relates to novel fusion proteins which are comprised of a targeting protein that binds tissue factor (TF), which is operably linked to the thrombomodulin (TM) EGF456 domain alone or in combination with at least one other TM domain selected from the group consisting of the N-terminal hydrophobic region domain, the EGF123 domain, the interdomain loop between EGF3 and EGF4, and the O-glycosylated Ser/Thr-rich domain, or analogs, fragments, derivatives or variants thereof. The fusion protein binds at the site of injury and prevents the initiation of thrombosis. The fusion protein can be used to treat a variety of thrombotic conditions including but not limited to deep vein thrombosis, disseminated intravascular coagulation, and acute coronary syndrome.



WO 2003/092602 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/13522

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 38/19; C07K 14/52

US CL : 424/192.1; 514/8; 530/350

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/192.1; 514/8; 530/350

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
noneElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,874,407 A (KELLEY ET AL.) 23 February 1999, see entire document.	1-29
Y	US 5,298,599 A (REZAIE ET AL.) 29 March 1994, see entire document.	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

19 October 2003 (19.10.2003)

Date of mailing of the international search report

16 JUL 2004

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Philip Gambel

Telephone No. 703-308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/15522

170

Continuation of B. **FIELDS SEARCHED** Item 3:

DIALOG, BIOSIS, CA, EMBASE, MEDLINE, WEST

search terms: tissue factor, thrombomodulin, fusion protein, antibod\$, single chain, 3e10, thrombus, coagulation, cancer, graft?,
transplant?, light, mclean

United States Patent [19]

[11] Patent Number: 5,874,407

Kelley et al.

[45] **Date of Patent:** Feb. 23, 1999

[54] FACTOR VILA INHIBITORS

- [75] Inventors: **Robert F. Kelley**, San Bruno; **Robert A. Lazarus**, Millbrae; **Geoffrey F. Lee**, Pacifica, all of Calif.
- [73] Assignee: **Genentech, Inc.**, South San Francisco, Calif.
- [21] Appl. No.: **932,589**
- [22] Filed: **Sep. 17, 1997**

Related U.S. Application Data

- [62] Division of Ser. No. 566,800, Dec. 4, 1995, abandoned.
- [51] **Int. Cl.**⁶ **A61K 38/00**; C12P 21/06;
C12P 21/04
- [52] **U.S. Cl.** **514/12**; 435/69.1; 435/69.2;
435/69.7
- [58] **Field of Search** 435/69.1, 69.7,
435/69.2; 514/12, 822

[56] **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

- | | | | |
|-----------|--------|-----------------------|----------|
| 5,312,736 | 5/1994 | Rasmussen et al. | 435/69.2 |
| 5,346,991 | 9/1994 | Roy et al. | 530/350 |
| 5,416,093 | 5/1995 | Shuman | 514/307 |
| 5,434,073 | 7/1995 | Dawson et al. | 435/216 |

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

- | | | |
|-------------|---------|--------------------|
| 439442 | 7/1991 | European Pat. Off. |
| WO 91/02750 | 3/1991 | WIPO |
| WO 91/02753 | 3/1991 | WIPO |
| WO 93/14119 | 7/1993 | WIPO |
| WO 94/01461 | 1/1994 | WIPO |
| WO 94/12637 | 6/1994 | WIPO |
| WO 94/27631 | 12/1994 | WIPO |
| WO 94/28017 | 12/1994 | WIPO |
| WO 95/23860 | 9/1995 | WIPO |

OTHER PUBLICATIONS

- Altman et al., "Intracellular expression of BPTI fusion proteins and single column cleavage/affinity purification by chymotrypsin" *Protein Eng.* 4:593-600 (1991).
- Auerswald et al., "Expression, Isolation and Characterization of Recombinant [Arg¹⁵, Glu⁵²] Aprotinin" *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369:27-35 (1988).
- Bach, Ronald R., "Initiation of Coagulation by Tissue Factor" *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 23(4):339-368 (1988).
- Badimon et al., "Hirudin and Other Thrombin Inhibitors; Experimental Results and Potential Clinical Applications" *TCM* 1(6):261-267 (1991).
- Beckmann, J. et al., "Preparation of chemically 'mutated' aprotinin homologues by semisynthesis" *European Journal of Biochemistry* 176:675-682 (1988).
- Bode, W. et al., "Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases" *European Journal of Biochemistry* 204:433-451 (1992).
- Bonc, R.C., "Modulators of Coagulation: A Critical Appraisal of Their Role In Sepsis" *Arch Intern Med* 152:1381-1389 (1992).

- Bromberg et al., "Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8205-8209 (1995).
- Broze, Jr. et al., "The Lipoprotein-Associated Coagulation Inhibitor That Inhibits the Factor VII-Tissue Factor Complex Also Inhibits Factor Xa: Insight Into Its Possible Mechanism of Action" *Blood* 71(2):335-343 (Feb. 1988).
- Broze, Jr. et al., "Regulation of Coagulation by a Multivalent Kunitz-Type Inhibitor" *Biochemistry* 29(33):7539-7546 (1990).
- Broze, Jr., et al., "Inhibition of Factor VIIa/Tissue Factor by Antithrombin III and Tissue Factor Pathway Inhibitor" *Blood* 82:1679-1680 (1993).
- Broze, Jr., George J., "The Role of Tissue Factor Pathway Inhibitor in a Revised Coagulation Cascade" *Sem. in Hematology* 29(3):159-169 (1992).
- Carson et al., "The role of tissue factor in the production of thrombin" *Blood. Coag. Fibrinol.* 4:281-292 (1993).
- Castro et al., "Does the Kunitz domain from the Alzheimer's amyloid Beta protein precursor inhibit a kallikrein responsible for post-translational processing of nerve growth factor precursor?" *FEBS* 08591 267(2):207-212 (1990).
- Chabbat et al., "Aprotinin Is A competitive Inhibitor of The Factor VIIa-Tissue Factor Complex" *Thrombosis Research* 71:205-215 (1993).
- Chu. et al., "Mosaic structure of globular domains in the human type VI collagen α 3 chain: similarity to von Willibrand Factor, fibronectin, actin, salivary proteins and aprotinin type protease inhibitors" *EMBO Journal* 9(3):385-393 (1990).
- Colman, R.W., "The Role of Plasma Proteases In Septic Shock" *The New England J. of Med.* 320(18):1207-1209 (1989).
- Creasey et al., "Tissue Factor Pathway Inhibitor Reduces Mortality from *Escherichia coli* Septic Shock" *J. Clin. Invest.* 91:2850-2860 (1993).
- Creighton et al., "Biosynthesis, Processing, and Evolution of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor" *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 52:511-519 (1987).
- Davie et al., "The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation" *Biochemistry* 30(43):10363-10370 (1991).
- Dennis et al., "Kunitz Domain Inhibitors of Tissue Factor—Factor VIIa; I. Potent Inhibitors Selected from Libraries by Phage Display" *Journal of Biological Chemistry* 269(35):22129-22136 (1994).

(List continued on next page.)

Primary Examiner—Robert A. Wax
Assistant Examiner—Elizabeth Slobodyansky
Attorney, Agent, or Firm—Jeffrey S. Kubinec

[57] **ABSTRACT**

The invention provides compositions having a Factor VIIa active site inhibitor domain and a tissue factor domain for the inhibition of FVIIa. The invention also provides pharmaceutical compositions comprising the novel compositions as well as their use in diagnostic, therapeutic, and prophylactic methods.

1

FACTOR VIIA INHIBITORS

This is a divisional application of U.S. Ser. No. 08/566, 800, filed Dec. 4, 1995 abandoned.

BACKGROUND OF THE INVENTION

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to novel compositions which bind to and inhibit an activity associated with plasma Factor VII/Factor VIIa. Specifically, the invention provides molecules having a Factor VIIa active site inhibitor domain and a tissue factor domain. According to a preferred aspect, the two domains of the hybrid molecule of the present invention are linked via flexible peptide linker domain. The invention also relates to pharmaceutical compositions comprising the novel compositions as well as their use in diagnostic, therapeutic, and prophylactic methods.

DESCRIPTION OF RELATED DISCLOSURES

Factor VIIa (FVIIa) is a two-chain, 50 kilodalton (kDa), vitamin K-dependent, plasma serine protease which participates in the complex regulation of in vivo hemostasis. Factor VIIa is generated by proteolysis of a single peptide bond from its single chain zymogen, Factor VII, which is present at approximately 0.5 μ g/ml in plasma. The conversion of zymogen Factor VII into the activated two-chain molecule occurs by cleavage of an internal peptide bond. In human Factor VII, the cleavage site is at Arg152-Ile153 (Hagen et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:2412-2416; Thim et al., (1988) Biochem. 27:7785-7793). In the presence of calcium ions, Factor VIIa binds with high affinity to tissue factor (TF), an integral membrane protein. TF is a cofactor for Factor VIIa, enhancing the proteolytic activation of its substrates Factors VII (FVII), Factor IX (FIX) and Factor X (FX).

TF is a 263 amino acid residue glycoprotein composed of a 219 residue extracellular domain, a single transmembrane domain, and a short cytoplasmic domain (Morrissey, J. H., et al., (1987) 50:129). The TF extracellular domain is composed of two fibronectin type III domains of about 105 amino acids each. The binding of FVIIa is mediated entirely by the TF extracellular domain (Muller et al., (1994) Biochem. 33:10864-10870; Gibbs et al., (1994) Biochem. 33:14003-14010; Ruf et al., (1994) Biochem. 33:1565-1572). The structure of the TF extracellular domain has recently been determined by x-ray crystallography (Harlos et al., (1994) Nature 370:662-666; Muller et al., (1994) Biochemistry 33:10864).

The TF extracellular domain has also been extensively characterized by alanine scanning mutagenesis (Kelley et al., (1995) Biochemistry, 34:10383-10392; Gibbs et al., (1994) supra; Ruf et al., (1994) supra). Residues in the area of amino acids 16-26 and 129-147 contribute to the binding of FVIIa as well as the coagulant function of the molecule. Residues Lys20, Trp45, Asp58, Tyr94, and Phe140 make a large contribution (1 kcal/mol) to the free energy (Δ G) of binding to FVIIa (Kelley et al., (1995) supra).

Residues in the area of amino acids 157-168 contribute to the procoagulant function of TF-FVIIa (Kelley et al., (1995) supra; Ruf et al., (1992) J. Biol. Chem. 267:22206-22210) but are not important for FVII/FVIIa binding. It has been shown that lysine residues 165 and 166 are important to TF cofactor function but do not participate in FVIIa complex formation (Roy et al., (1991) J. Biol. Chem. 266:22063; Ruf

2

et al., (1992) J. Biol. Chem. 267:6375). Alanine substitution of these lysine residues results in a decreased rate of FX activation catalyzed by the TF-FVIIa complex (Ruf et al., (1992) supra). Lysine residues 165 and 166 are located on the C-terminal fibronectin type III domain of TF on the opposite surface of the molecule from residues found to be important for FVIIa binding on the basis of mutagenesis results (Kelley et al., (1995) supra). A set of residues, Trp158, Lys159, Ser163, Gly164, Lys165, Lys166, and Tyr185 play a role in the coagulant function of soluble TF but do not participate in FVIIa binding (Kelley et al., (1995) supra).

TF is expressed constitutively on cells separated from plasma by the vascular endothelium (Carson, S. D. and J. P. Brozna, (1993) Blood Coag. Fibrinol. 4:281-292). Its expression on endothelial cells and monocytes is induced by exposure to inflammatory cytokines or bacterial lipopolysaccharides (Drake et al., (1989) J. Cell Biol. 109:389). Upon tissue injury, the exposed extracellular domain of TF forms a high affinity, calcium dependent complex with FVII. Once bound to TF, FVII can be activated by peptide bond cleavage to yield serine protease FVIIa. The enzyme that catalyzes this step in vivo has not been elucidated, but in vitro FXa, thrombin, TF-FVIIa and FIXa can catalyze this cleavage (Davie, et al., (1991) 30:10363-10370). FVIIa has only weak activity upon its physiological substrates FX and FIX whereas the TF-FVIIa complex rapidly activates FX and FIX.

The TF-FVIIa complex constitutes the primary initiator of the extrinsic pathway of blood coagulation (Carson, S. D. and Brozna, J. P., (1993) Blood Coag. Fibrinol. 4:281-292; Davie, E. W. et al., (1991) Biochemistry 30:10363-10370; Rapaport, S. I. and L. V. M. Rao, (1992) Arterioscler. Thromb. 12:1111-1121). The complex initiates the extrinsic pathway by activation of FX to Factor Xa (FXa), FIX to Factor IXa (FIXa), and additional FVII to FVIIa. The action of TF-FVIIa leads ultimately to the conversion of prothrombin to thrombin, which carries out many biological functions (Badimon, L. et al., (1991) Trends Cardiovasc. Med. 1:261-267). Among the most important functions of thrombin is the conversion of fibrinogen to fibrin, which polymerizes to form a clot. The TF-FVIIa complex also participates as a secondary factor in extending the physiological effects of the contact activation system.

The involvement of this plasma protease system has been suggested to play a significant role in a variety of clinical manifestations including arterial and venous thrombosis, septic shock, adult respiratory distress syndrome (ARDS), disseminated intravascular coagulation (DIC) and various other disease states (Haskel, E. J. et al., (1991) Circulation 84:821-827; Holst, J. et al., (1993) Haemostasis 23 (suppl. 1):112-117; Creasey, A. A. et al., (1993) J. Clin. Invest. 91:2850-2860; see also, Colman R. W. (1989) N. Engl. J. Med 320:1207-1209; Bone, R. C. (1992) Arch. Intern. Med. 152:1381-1389). Overexpression and/or aberrant utilization of TF has been linked to the pathophysiology of both thrombosis and sepsis (Taylor et al., (1991) Circ. Shock 33:127; Warr et al., (1990), Blood 75:1481; Pawashe et al., (1994) Circ. Res. 74:56). TF is expressed on cells found in the atherosclerotic plaque (Wilcox et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:2839). Additionally, TF has been implicated in tumor metastasis (Bromberg et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 92:8205).

The presence in serum of an endogenous inhibitor of TF-FVIIa has long been recognized (Schneider, C. L., (1946) Am. J. Physiol. 149:123). Following initiation of the coagulation cascade, TF-FVIIa is regulated by tissue factor

(International Publication No WO 94/28017). These molecules inactivate the cofactor activity of tissue factor in the TF-FVIIa complex but do not alter the ability of the molecule to complex FVIIa.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides compositions which inhibit a TF-FVIIa mediated or associated process such as the catalytic conversion of FVII to FVIIa, FIX to FIXa, or FX to FXa and thereby block initial events of the extrinsic pathway of blood coagulation. In addition, the compositions of the present invention are capable of neutralizing the thrombotic effects of endogenous tissue factor by competing with endogenous tissue factor for binding to FVII or FVIIa. Advantageously, the compositions allow for a potent inhibition of the TF-FVIIa complex providing, in preferred embodiments, for low dose pharmaceutical formulations. The compositions of the present invention are useful in therapeutic and prophylactic methods for inhibiting TF-FVIIa mediated or associated processes.

The compositions of the present invention comprise a FVIIa active site inhibitor domain and a TF domain. According to a preferred aspect of the present invention, the TF domain competes with endogenous TF for binding to FVII/FVIIa but has a decreased ability to act as a cofactor for the conversion of FVII to FVIIa, FIX to FIXa or FX to FXa. The FVIIa active site inhibitor domain of the compositions of the present invention binds to the serine protease active site of FVIIa and prevents catalytic activation of its zymogen substrates. In a preferred embodiment the active site inhibitor domain of the composition of the present invention is a reversible active site serine protease inhibitor molecule.

According to certain preferred aspects of the present invention the compositions further comprise a linker domain located between the FVIIa active site inhibitor domain and the TF domain. The linker domain is preferably a hydrophilic flexible domain comprising a $-(\text{Gly})_4\text{-Ser-}$ linker module.

In one embodiment, the composition of the present invention is a polypeptide and the invention encompasses a composition of matter comprising an isolated nucleic acid, preferably DNA, encoding the polypeptide of the invention. According to this aspect, the invention further comprises an expression control sequence operably linked to the DNA molecule, an expression vector, preferably a plasmid, comprising the DNA molecule, where the control sequence is recognized by a host cell transformed with the vector, and a host cell transformed with the vector.

The composition of the present invention may be made by a process which includes the steps of isolating or synthesizing nucleic acid sequences encoding any of the amino acid sequences of the invention, ligating the nucleic acid sequence into a suitable expression vector capable of expressing the nucleic acid sequence in a suitable host, transforming the host with the expression vector into which the nucleic acid sequence has been ligated, and culturing the host under conditions suitable for expression of the nucleic acid sequence, whereby the protein encoded by the selected nucleic acid sequence is expressed by the host. Preferably, the polypeptide is then recovered from the host cell culture. In this process, the ligating step may further contemplate ligating the nucleic acid into a suitable expression vector such that the nucleic acid is operably linked to a suitable secretory signal, whereby the amino acid sequence is secreted by the host. The secretory signal may be selected from the group consisting of the leader sequence, for

example, of stII, lamB, herpes gD, lpp, alkaline phosphatase, invertase, and alpha factor and is preferably stII.

The present invention further extends to therapeutic applications for the compositions described herein. Thus the invention includes a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable excipient and the composition of the invention. Pharmaceutical compositions comprising these molecules can be used in the treatment or prophylaxis of thrombotic or coagulopathic related diseases or disorders including vascular diseases and inflammatory responses. These applications include, for example, a method of treating a mammal for which inhibiting TF-FVIIa is indicated comprising administering a pharmaceutically effective amount of the pharmaceutical composition to the mammal. Such indications include; deep venous thrombosis, arterial thrombosis, post surgical thrombosis, coronary artery bypass graft (CABG), percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA), stroke, tumor metastasis, inflammation, septic shock, hypotension, ARDS, and DIC. The compositions of the present invention may also be used as an adjunct in thrombolytic therapy.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 depicts a schematic outline of selected enzymes and mediators that modulate the coagulation, contact, fibrinolytic, inflammatory, and complement pathways. Activation of these pathways can lead to the clinical states indicated.

FIG. 2 depicts a model of an exemplary composition. The composition comprises a fusion protein having a TF domain, an active site inhibitor domain (APPI), and a linker domain. The structure of TF determined at 2.4 Å resolution (Muller et al., (1994) supra) was used for the TF portion of the molecule. The Kunitz-type domain is based upon the structure determined for APPI (Hynes et al., (1990) supra). A 22 residue polypeptide linker was modeled in extended conformation to connect the C-Terminus of the Kunitz-domain to the N-terminus of TF. The distance between these termini is about 60 Å. The C-terminus of TF is at the bottom of the molecule.

FIG. 3 depicts a schematic diagram of the construction of the fusion gene for the bacterial expression of a representative hybrid protein composition. Only the fusion gene and promoter regions of the plasmid are shown. The fusion genes were constructed by ligating the Pst/BamHI fragment encoding the TF71-C Kunitz-type domain with pZTFAA and oligonucleotides prepared by chemical synthesis.

FIG. 4 depicts a rendering of a representative polyacrylamide gel showing samples obtained from the various purification steps for a representative hybrid molecule including freeze-thawing, then osmotically shocking, cells to obtain a periplasmic shockate (lane 1), immunoaffinity chromatography using D3 monoclonal anti-tissue factor antibody to isolate TF-containing proteins (lane 2), followed by size exclusion chromatography to remove high molecular weight species (lane 3).

FIG. 5 depicts the effect of fusion proteins with 1 to 6 linker modules (KDTF1—KDTF6) on TF-FVIIa-dependant FX activation. Fusion protein inhibition of TF-FVIIa interactions was quantified in a FX activation assay. The assay was performed by incubating 100 pM FVIIa with 1 nM inhibitor in TBS, pH 7.5, containing 5 mM CaCl_2 for 1 hr, then adding 1/20th volume of a solution containing 10 nM membrane-bound TF. After further incubation for 1 hr, FX was added to 190 nM. At appropriate times, aliquots were removed and the reaction quenched with an equal volume of

50 mM EDTA. Activated FXa in quenched samples was then quantified using SPECTROZYME™-FXa as chromogenic substrate.

FIG. 6 depicts the inhibition of TF-FVIIa by a representative hybrid molecule KDTE5 (▼), a soluble K165A, K166A TF mutant (hTFAA) (■), and TF7I-C, a Kunitz-type serine protease inhibitor (●) for TF-FVIIa. Values were determined in a modified FX activation assay, performed with 2-fold more concentrated FVIIa and membrane-TF, and with varying inhibitor concentrations. K_i^* determinations were made by fitting the fractional rate vs. inhibitor concentration data to equation 1 (infra).

FIG. 7 depicts the effects of TF-FVIIa inhibitors on the clotting time determined in a prothrombin (PT) time assay. Coagulation was initiated by mixing citrated human plasma containing inhibitor with an equal volume of a solution containing membrane-bound TF (mTF) and CaCl_2 . Fold-prolongation of clotting time was defined as the clotting time in the presence of inhibitor divided by the clotting time in its absence (PBS control). This latter time was 53.2 ± 2.7 seconds. Data are shown for KDTE5 (▼), TF7I-C (●), hTFAA (■), and an equimolar mixture of TF7I-C and hTFAA (▼).

FIG. 8 depicts the effects of TF-FVIIa inhibitors on the clotting time determined in an activated partial thromboplastin time (APTT) assay. The sample (citrated human plasma and inhibitor) and activator (Instrumentation Laboratories Cephalin+Activator APTT Reagent) were incubated together for 70 seconds at 37°C ., then CaCl_2 was added and the clotting time was determined. Fold prolongation of clotting time was defined as the clotting time in the presence of the indicated concentration of inhibitor divided by the clotting time in the absence of inhibitor. This latter time was 63.7 ± 9.0 seconds. Data are shown for KDTE5 (▼), TF7I-C (●), hTFAA (■), and equimolar mixture of TF7I-C and hTFAA (▲).

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

Definitions

Abbreviations used throughout the description include: FIXa for Factor IXa; FXIa for Factor XIa; FXa for Factor Xa; TF for tissue factor; FVII for zymogen factor VII; FVIIa for Factor VIIa; TF-FVIIa for tissue factor-Factor VIIa complex; FVII/FVIIa for FVII and/or FVIIa; BPTI for basic pancreatic trypsin inhibitor; APPI for the Kunitz protease inhibitor domain of Alzheimer's amyloid β -protein precursor inhibitor (Hynes et al., (1990) supra); $-(\text{Gly})_4\text{-Ser}$., and G_4S for a 5 amino acid polypeptide having the amino acid sequence Gly-Gly-Gly-Gly-Ser SEQ ID NO. 58; TFPI for tissue factor pathway inhibitor; K_i^* for apparent equilibrium dissociation constant; PT for prothrombin time; APTT for activated partial thromboplastin time.

A TF-FVIIa mediated or associated process or event, or equivalently, an activity associated with plasma FVIIa, according to the present invention is any event which requires the presence of TF-FVIIa. The general mechanism of blood clot formation is reviewed by Ganong, in Review of Medical Physiology, 13th ed., Lange, Los Altos Calif., pp411-414 (1987). Coagulation requires the confluence of two processes, the production of thrombin which induces platelet aggregation and the formation of fibrin which renders the platelet plug stable. As outlined in FIG. 1, the process comprises several stages each requiring the presence of discrete proenzymes and procofactors. The process ends in fibrin crosslinking and thrombus formation. Fibrinogen is converted to fibrin by the action of thrombin. Thrombin, in turn, is formed by the proteolytic cleavage of prothrombin.

This proteolysis is effected by FXa which binds to the surface of activated platelets and in the presence of FVa and calcium, cleaves prothrombin. TF-FVIIa is required for the proteolytic activation of FX by the extrinsic pathway of coagulation. Therefore, a process mediated by or associated with TF-FVIIa, or an activity associated with FVIIa includes any step in the coagulation cascade from the formation of the TF-FVII complex to the formation of a fibrin platelet clot and which initially requires the presence TF-FVIIa.

For example, the TF-FVIIa complex initiates the extrinsic pathway by activation of FX to FXa, FIX to FIXa, and additional FVII to FVIIa. TF-FVIIa mediated or associated process, or FVIIa activity, can be conveniently measured employing standard assays such as those described in Roy, S., (1991) J. Biol. Chem. 266:4665-4668, and O'Brien, D., et al., (1988) J. Clin. Invest. 82:206-212 for the conversion of Factor X to Factor Xa in the presence of Factor VII and other necessary reagents.

A TF-FVIIa related disease or disorder is meant to include chronic thromboembolic diseases or disorders associated with fibrin formation including vascular disorders such as deep venous thrombosis, arterial thrombosis, stroke, tumor metastasis, thrombolysis, arteriosclerosis and restenosis following angioplasty, acute and chronic indications such as inflammation, septic shock, septicemia, hypotension, adult respiratory distress syndrome (ARDS), disseminated intravascular coagulopathy (DIC) and other diseases. The TF-FVIIa related disorder is not limited to in vivo coagulopathic disorders such as those named above but includes ex vivo TF-FVIIa related processes such as coagulation that may result from the extracorporeal circulation of blood, including blood removed in-line from a patient in such processes as dialysis procedures, blood filtration, or blood bypass during surgery.

The terms "tissue factor protein" and "wild type tissue factor" are used to refer to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a naturally occurring mammalian tissue factor or a recombinant tissue factor having an amino acid sequence of a naturally occurring tissue factor which is capable of inducing blood coagulation through its interaction with plasma FVII/FVIIa. Naturally occurring TF includes human species as well as other animal species such as rabbit, rat, porcine, non human primate, equine, murine, and ovine tissue factor. The amino acid sequence of the mammalian tissue factor proteins are generally known or obtainable through conventional techniques. The human sequence as well as the number given to the amino acids are those described by Morrissey, J. H., et al., (1987) 50:129.

"hTFAA" and "K165A:K166AsTF" refer to a soluble tissue factor protein variant having the amino acid sequence of human TF as described above from amino acid 1 to amino acid 219 and wherein the naturally occurring Lys amino acids at positions 165 and 166 are replaced with Ala residues.

By "substitution" of any amino acid is meant that an amino acid of the wild-type tissue factor has been replaced by chemical or enzymatic or other appropriate means with a moiety other than a wild-type amino acid.

The terms "Kunitz-type serine protease inhibitor domain," "Kunitz-type domain," "Kunitz domain," "KD" and the like are used interchangeably herein to refer to an approximately 58 amino acid residue polypeptide characterized by a conservation of cysteine residues with the serine protease inhibitor BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor; Creighton and Charles, (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52:511-519) first isolated in crystalline form in 1936 (Kunitz, M., and Northop, J. H., (1936) J. Gen.

Physiol. 19:991-1007). Kunitz domains share cysteine residue placement, tertiary folding, and structural characteristics. A family of proteins has been identified containing one, two or three Kunitz domains. The family includes; LACI (lipoprotein-associated coagulation inhibitor, also TFPI; Broze, Jr. G. J., et al., (1990) *Biochemistry* 29:7539-7546); APPI (Alzheimer's amyloid β -protein precursor; Hynes, T. R., (1990) *Biochemistry* 29:10018-10022); the α -3 chain of human type VI collagen (see WO 93/14119) and inter- α -trypsin inhibitor (Hochstrasser, K. E., (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366:473).

Kunitz domains contain six specifically spaced cysteines that are present naturally in disulfide bonds (Bode, W., and Huber, R., (1992) *Eur. J. Biochem.* 204:433-451). The three disulfide bridges stabilize the protein and are partially responsible for the overall 3-dimensional folding characteristic of a Kunitz domain. In the 58 residue Kunitz type serine protease BPTI and APPI, cysteines are present at residues 5, 14, 30, 38, 51, and 55. The removal of a one disulfide bridge, however is not accompanied by a large structural change (Eigenbrot, C., et al., (1990) *Protein Eng.* 3:591-598).

The crystal structure of Kunitz domain type serine protease inhibitors has been determined for BPTI and APPI (Hynes, T. R., et al., (1990) *Biochem.*, 29:10018-10022). A central anti-parallel three-stranded β -sheet and a C-terminal α -helix form the core of the domain (Bode, W., and Huber, R., supra). The segments of the core domain form the supporting scaffold for the exposed primary binding loop of the properly folded protein (the "primary binding loop" as defined herein)(Bode, W., and Huber, R., supra). A secondary binding loop participates along with the primary binding loop to define the interface between the Kunitz domain and the cognate protease target (Rühlman, A., et al., (1973) *J. Mol. Biol.* 77:417-436).

The "primary binding loop" of a Kunitz domain is designated by P_5 - P_4 - P_3 - P_2 - P_1 - P_1' - P_2' - P_3' - P_4' (residues 11-19 APPI). The term " P_1 " is used herein to refer to the position preceding the scissile peptide bond of the serine protease inhibitors as previously defined. Similarly, the term " P_1' " is used to refer to the position following the scissile peptide bond of the inhibitor. Increasing numbers refer to the next consecutive position preceding (e.g., P_2 and P_3) and following (e.g., P_2' and P_3') the scissile bond. The residue numbering corresponds to that of BPTI such that residue 15 is at the P_1 position.

The term "active site" and the like when used herein with reference to FVIIa refer to the catalytic and zymogen substrate binding site, including the " S_1 " site of FVIIa as that term is defined by Schechter, I., and Berger, A., (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27:157-162.

The term "amino acid" within the scope of the present invention is meant to refer to naturally occurring L alpha amino acids or residues. The commonly used one and three letter abbreviations for amino acids are used herein (Lehninger, A. L., *Biochemistry*, 2d ed., pp. 71-92, (1975), Worth Publishers, New York).

Modes for Carrying out the Invention

The hybrid molecules of the present invention comprise at least two distinct domains. Each molecule of the present invention contains a Factor VIIa active site inhibitor domain which binds to the active site of FVII/FVIIa and a tissue factor domain which binds to FVII/FVIIa through protein-protein interactions at the cofactor binding site. According to the present invention the active site inhibitor domain is linked to the N-terminus of the tissue factor domain, preferably via a flexible amino acid linker domain.

1. Tissue Factor Domain

The tissue factor domain of the compositions of the present invention is a tissue factor protein variant which by virtue of, for example, an amino acid substitution, insertion, or deletion in the amino acid sequence of a mammalian tissue factor protein, or by virtue of glycosylation variation including deglycosylated or unglycosylated tissue factor molecules, is capable of neutralizing the ability of tissue factor to induce blood coagulation while retaining at least its ability to bind to Factor VII/VIIa. In a particular embodiment, the TF domain in complex with FVIIa has a decreased ability to catalyze the conversion of substrate Factor X to Factor Xa product. Thus, the tissue factor domain of the present invention is believed to, without limitation, compete with wild-type tissue factor for the cofactor binding site of Factor VII/VIIa, thereby neutralizing or preventing wild type tissue factor from acting as a cofactor in the coagulation cascade.

The tissue factor domain of the present invention is capable of inhibiting or neutralizing any available tissue factor protein from inducing blood coagulation through the extrinsic coagulation pathway (see, Bach, R., (1988) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23:339-368). As will be appreciated by the skilled artisan the term "neutralize" is a relative term. Thus the term "neutralize" when used to describe the biological activity of the tissue factor domain of the present invention means a tissue factor protein variant that when added in a 10-fold molar excess to wild-type tissue factor in a standard chromogenic assay (see, Roy, S., (1991) *J. Biol. Chem.* 266:4665-4668, and O'Brien, D., et al., (1988) *J. Clin. Invest.* 82:206-212) produces at least a 50% inhibition of the conversion of Factor X to Factor Xa in the presence of Factor VII and other necessary reagents. Preferably the tissue factor domain will produce at least a 50% inhibition at a 5-fold molar excess and more preferably at least a 50% inhibition at a 2-fold molar excess. In a more preferred embodiment the tissue factor domain of the present invention will produce at least a 50% inhibition of the conversion of Factor X to Factor Xa when present in a 1:1 stoichiometric ratio with wild type tissue factor protein. According to the present invention, TF domains include but are not limited to full length, phospholipid associated tissue factor domains having both a transmembrane domain and a cytoplasmic domain as well as TF domains wherein all or a portion of the transmembrane and/or cytoplasmic domain of wild type tissue factor have been deleted. Accordingly, in determining the biological activity of a TF domain of the present invention in a chromogenic assay as described, the wild-type tissue factor corresponds in type to the particular TF domain being tested. Therefore a full length TF domain comprising all or a portion of the transmembrane domain of wild-type tissue factor and associated with a phospholipid is tested in a biological assay with wild type TF of the corresponding type comprising all or a portion of the transmembrane domain in a similar phospholipid environment. Likewise, a soluble TF domain wherein the transmembrane and cytoplasmic domain have been deleted is assayed with a wild-type TF domain wherein the transmembrane and cytoplasmic domain have been deleted.

It is a characteristic of the TF domain of the present invention that the protein bind FVII/FVIIa. Accordingly, the TF domain of the present invention shares those residues with wild type TF protein that are necessary for the binding of TF to FVII/FVIIa. By "bind to FVII/FVIIa" is meant that the TF domain of the present invention has the ability to bind to FVII/FVIIa to a degree that TF domain can compete for binding with wild type TF at physiological concentrations.

Preferred among the TF domains are those that have a KD for FVII/FVIIa of about between 10.0 picomolar (pM) and about 1 micromolar (μ M) in a standard binding assay such as that described by Kelley et al., (1995) supra. More preferably the TF domain has a KD for FVII/FVIIa of about between 10 pM and 10 nanomolar (nM) and most preferably about between 10 pM and 1 nM.

The skilled artisan will recognize those residues in TF that contribute to the FVIIa binding (Kelley et al. (1995) supra; Gibbs et al., (1994) supra; Ruf et al., (1994) Biochemistry, 33, 1565-1572; Schullek et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:19399-19403; Muller et al., (1994) 33:10864-10869). According to the present invention, the TF domain shares at least those residues with wild type TF which are required for FVIIa/FVII binding, as described. Preferably, the tissue factor domain will share at least about 80% sequence homology and more preferably between about 85%-95% sequence homology with wild-type tissue factor protein.

TF domains include but are not limited to full length, membrane bound or phospholipid associated tissue factor domains having both a transmembrane domain and a cytoplasmic domain. The TF domain also includes tissue factor domains wherein all or a portion of the transmembrane and/or cytoplasmic domain of wild type tissue factor have been deleted. Accordingly, the tissue factor domain of the molecule can be formulated as soluble protein having the carboxyl-terminal membrane anchor portion and cytoplasmic portion removed. Alternatively, a TF protein can be prepared as an integral membrane protein having a membrane anchor. The tissue factor domain having a complete membrane anchor domain is provided in association with phospholipid compositions such as liposome formulations.

Preferred among the TF domains of the present invention are those TF domains wherein all or a portion of the transmembrane and cytoplasmic domains of wild type tissue factor have been deleted. According to this aspect of the present invention, the TF domain comprises at least a portion of the N-terminal fibronectin type III domain of wild type tissue factor. Preferably, the TF domain comprises at least amino acids 1-102 of wild type tissue factor. More preferably the TF domain of the present invention comprises both fibronectin type III domains of wild type tissue factor. Preferably, according to this aspect of the present invention, at least amino acids 1-219 of wild type TF are present.

The TF domain of the present invention comprises a polypeptide which retains its ability to bind FVII/FVIIa and which is further capable of neutralizing the procoagulant activity of wild type tissue factor as described above. By way of illustration, substitution, insertion or deletions of particular amino acids along the length of wild type TF produce TF variants with reduced ability to act as a cofactor for FVIIa. The skilled artisan will recognize those residues of wild type TF which contribute to the procoagulant function of TF. For example, residues in the area of amino acids 157-168 contribute to the procoagulant function of TF-FVIIa (Kelley et al., (1995) supra; Ruf et al., (1992) supra) but are not important for FVII/FVIIa binding. According to the present invention any or all of these amino acids are selectively substituted or deleted to provide a TF domain that binds to FVII/FVIIa but is capable of neutralizing the procoagulant activity of wild type tissue factor.

In a preferred embodiment, any or all of residues Trp158, Lys159, Ser163, Gly164, Lys165, Lys166, and Tyr185 of wild type tissue factor are selectively substituted or deleted to provide a TF domain of the present invention. Preferred substitutions are described in U.S. Pat. No. 5,346,991 and include substitution with an amino acid other than one

bearing a substantially positively charged side chain at physiological pH. Exemplary substitutions include any or all of Trp158Phe, Lys159Ala, Ser163Ala, Lys165Ala, Lys166Ala, and Tyr185Ala. In a most preferred aspect of the present invention, lysine residues 165 and 166 which are important to TF cofactor function but do not interfere with FVIIa complex formation (Roy et al., (1991) J. Biol. Chem. 266:22063; Ruf et al., (1992) J. Biol. Chem. 267:6375) are selectively substituted. Therefore, according to a preferred aspect of the present invention at least residues 165 and 166 of wild type tissue factor are selectively substituted to result in a molecule which retains its ability to bind FVII/FVIIa but has a reduced ability to act as a cofactor as described.

In a particular aspect, alanine substitution of these residues is preferred although any substitution which results in a decreased rate of FX activation catalyzed by the TF-FVIIa complex (Ruf et al., (1992) supra) is appropriate. Lysine residues 165 and 166 are located on the C-terminal fibronectin type III domain of TF on the opposite surface of the molecule from residues found to be important for FVIIa binding on the basis of mutagenesis results (Kelley et al., (1995) supra).

Preferred tissue factor domains of the present invention are those described in U.S. Pat. No. 5,346,991, entitled "Tissue Factor Mutants Useful for the Treatment of Myocardial Infarction and Coagulopathic Disorders" the disclosure of which is specifically incorporated herein by reference. This patent describes the generation of tissue factor variants that are capable of inhibiting the ability of endogenous tissue factor to induce coagulation. These variants have either or both of the positively charged amino acid residues 165 and 166 substituted with an α -amino acid other than one bearing a substantially positively charged side chain at physiological pH. The variants include human tissue factor molecules as described above having the cytoplasmic portion of wild type tissue factor, residues 244-263, removed, as well as the transmembrane region at residues 220-243. Any of the tissue factor variants may appropriately form the TF domain of the present invention. International Publication No. WO 94/28017 also describes TF variants that are able to bind FVII/FVIIa and have a reduced procoagulant cofactor activity. Most preferred among the molecules described therein are a tissue factor protein having an amino acid sequence homologous to a wild type tissue factor protein and wherein at least one amino acid associated with TF cofactor function is selectively substituted, deleted or replaced to result in a molecule which retains its ability to bind FVII/FVIIa but which has reduced ability to act as a cofactor as described above.

2. Active Site Domain

According to the present invention the "active site inhibitor domain" of the compositions may be selected from any one of several groups of Factor VIIa active site directed inhibitors. Such active site inhibitors are broadly categorized for the purpose of the present invention into i) active site inhibitors which reversibly bind the active site of FVIIa and are cleavable by Factor VIIa, ii) active site inhibitors which reversibly bind to the active site of Factor VIIa but cannot be cleaved, and iii) active site inhibitor molecules which irreversibly bind to the active site of Factor VIIa. For a review of inhibitors of serine proteinases see, *Proteinase Inhibitors* (Research Monographs in Cell and Tissue Physiology; v. 12) Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York (1990).

According to the first group, active site inhibitor domains which reversibly bind to and are cleavable by the active site of Factor VIIa, the Kunitz and Kazal type serine protease

inhibitors are preferred with the Kunitz type being most preferred. Reversible active site inhibitor domains bind to the active site of Factor VIIa through non-covalent interactions such as ionic bonds, hydrophobic interactions or hydrogen bonding. Kunitz domains are recognized by the skilled artisan to be slow tight binding reversible inhibitors of serine proteases.

Kunitz domain active site inhibitor domains of the present invention include any of the known mammalian Kunitz type domains and especially the Kunitz domain APPI (from human Alzheimer's disease amyloid β -protein precursor; Castro, M. et al. (1990) FEBS Lett. 267:207-212) residues 1-58; TFPI-KD1 (residues 22-79), TFPI-KD2 (residues 93-150), and TFPI-KD3 (residues 185-242) of human TFPI (tissue factor protein inhibitor or LACI, Broze Jr., G. J. et al., (1990) Biochemistry 29:7539-7546); ITI-KD1 and ITI-KD2, (residues 22-79 and 78-135) of human inter- α -trypsin inhibitor, respectively (Vetr, H. et al., (1989) FEBS Lett. 245:137-140); Collagen α 3 (VI) (residues 2899-2956) Collagen alpha 3 (VI) chain precursor (Chu, M. L. (1990) et al. EMBO J. 9:385-393); HKIB9 (7-60) Human Kunitz-type protease inhibitor, HKIB9 (Norris, K., in Genbank Database (Dec. 31, 1993, Release 39.0), submitted Jan. 19, 1994); BPTI (1-58), Aprotinin, bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Creighton T. E. and Charles, I. G., (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52:511-519).

Preferred among the Kunitz-type serine proteases are those molecules which bind FVIIa active site with sufficient affinity to reversibly inhibit the molecule. By this is meant that the Kunitz-type domain is able to bind to and inhibit the catalytic activity of FVIIa as measured by routine assays such as those described (below). Such molecules have an apparent dissociation constant (K_i^*) with respect to TF-FVIIa of less than about 100 nM, more preferably the molecules have an apparent dissociation constant of less than about 10 nM. Most preferred among the Kunitz type domains are those that have a K_i^* of less than about 5 nM for TF-Factor VIIa.

Apparent equilibrium dissociation constants (K_i^*) are determined using methods described for tight-binding inhibitors (Bieth, J., (1974) Proteinase Inhibitors 463-469; Williams, J. W. and Morrison, J. F., (1979) Methods Enzymol 63:437-467), assuming enzyme and inhibitor form a reversible complex with a 1:1 stoichiometry as has been observed for the interaction of Kunitz-type domain with the FVIIa serine protease (Bode, W. and R. Huber, (1992) Eur. J. Biochem. 204:433-451; Laskowski, M., Jr. and I. Kato, (1980) Annu. Rev. Biochem. 49:593-626). The data are fit by nonlinear regression analysis to Equation 1:

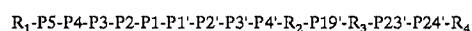
$$V_i/V_o = 1 - \frac{[E_o] + [I_o] + K_i^* - \sqrt{([E_o] + [I_o] + K_i^*)^2 - (4 \cdot [E_o] \cdot [I_o])}}{2 \cdot [E_o]} \quad (1)$$

where V_i/V_o is the fractional activity (steady-state inhibited rate divided by the uninhibited rate), $[E_o]$ is the total FVIIa concentration and $[I_o]$ is the total inhibitor concentration.

By way of example and not limitation, preferred Kunitz type domains have a 58 amino acid backbone structure, with amino acids 11-19 corresponding to primary binding loop which fits into the active site of the serine protease. Kunitz-type domains having a particular amino acid sequence within the primary binding loop demonstrate preferred inhibition as defined above. Exemplary Kunitz domains showing the preferred inhibition of factor VIIa as described above are Kunitz type domains with a Pro at position P5, a Gly at position P4, a Pro, Val, Leu, or Trp at position P3, a Cys at position P2, an Arg, Lys, or Met at position P1, an Ala at position P1', a Leu, Met or Ile at position P2', a Met, Ile, Leu

or Tyr at position P3', and Leu, Lys or Arg at position P4'. Kunitz type domains also preferred according to the present invention also feature Phe, Val, Ile, Trp, or Tyr at position 34 (P19') a Cys at position 38 (P23') and a His, Tyr, or Gly at position 39 (P24').

Exemplary Kunitz type active site inhibitor domains are also described in International Publication No. WO 95/23860 and are represented by structural formula I:



According to this formula, when P5-P4', P19', P23', and P24' are selected as described above, R_1 is selected from APPI amino acids 1-10, VREVCSEAE (SEQ ID NO: 1); TFPI-KD1 amino acids 22-31, MHSFCAFKAD (SEQ ID NO: 2); TFPI-KD2 amino acids 93-102, KPDFCFLEED (SEQ ID NO: 3); TFPI-KD3 amino acids 185-194, GPSWCILTPAD (SEQ ID NO: 4); ITI-KD1 amino acids 22-31, KEDSCQLGYS (SEQ ID NO: 5); ITI-KD2 amino acids 78-87, TVAACNLPIV (SEQ ID NO: 6); HKIB9 amino acids 1-10, LPNVCAFPME (SEQ ID NO: 7); and BPTI amino acids 1-10, RPDFCLEPPY (SEQ ID NO: 8).

R_2 is selected from APPI amino acids 20-33, RWYFDVTEGKCAPF (SEQ ID NO: 9); TFPI-KD1 amino acids 41-54, RFFNFIFTRQCEEF (SEQ ID NO: 10); TFPI-KD2 amino acids 112-125, RYFYNNQT-KQCERF (SEQ ID NO: 11); TFPI-KD3 amino acids 204-217, RFYNSVIGKCRPF (SEQ ID NO: 12); ITI-KD1 amino acids 41-54, RYFYNGTSMACETF (SEQ ID NO: 13); ITI-KD2 amino acids 97-110, LWAFDAVKGKCVLF (SEQ ID NO: 14); Collagen α 3(VI) amino acids 2918-2931, KWYYDPNTKSCARF (SEQ ID NO: 15); HK1B9 amino acids 20-33, RWFFNFETGECELF (SEQ ID NO: 16); and BPTI amino acids 20-33, RYFYNAKAGLCQTF (SEQ ID NO: 17).

R_3 is selected from the group YGG and YSG.

R_4 is selected from the group APPI amino acids 40-58 (Met52Ala), GNRNNFDTEEYCAAVCGSA (SEQ ID NO: 18); APPI amino acids 40-58, GNRNNFDTEEY-CAVAVCGSA (SEQ ID NO: 19); TFPI-KD1 amino acids 61-79, GNQNRFSLEECKKMCTRD (SEQ ID NO: 20); TFPI-KD2 amino acids 132-150, GNMNN-FETLEECKNICEDG (SEQ ID NO: 21); TFPI-KD3 amino acids 224-242, GNENNF'TSKQECLRACKKG (SEQ ID NO: 22); ITI-KD1 amino acids 61-79, GNGNNFVTEKECLQTCRTV (SEQ ID NO: 23); ITI-KD2 amino acids 117-135, GNGNKFYSEKECREY-CGVP (SEQ ID NO: 24); Collagen α 3(VI) amino acids 2938-2956, GNENKFGSQKECEKVCAPV (SEQ ID NO: 25); HK1B9 amino acids 40-58, GNSN-NFLRKEKCEKCKFT (SEQ ID NO: 26); and BPTI amino acids 40-58, AKRNNFKSAEDCMRTCCGA (SEQ ID NO: 27);

In a preferred Kunitz type active site inhibitor domain R_1 has the sequence VREVCSEAE (SEQ ID NO: 1) R_2 has the sequence RWYFDVTEGKCAPF (SEQ ID NO: 9) R_3 has the sequence YGG; and R_4 has the sequence: GNRNNFDTEEYCAAVCGSA (SEQ ID NO: 18) or GNRNNFDTEEYCAVAVCGSA (SEQ ID NO: 19).

Therefore, preferred Kunitz type active site inhibitor domains include:

I-18 R_1 PGVCRALILR₂FR₃CGR₄ (SEQ ID NO: 28)

I-49 R_1 PGWCRALILR₂FR₃CGR₄ (SEQ ID NO: 29)

I-14 R_1 PGFCRALILR₂FR₃CGR₄ (SEQ ID NO: 30)

I-16 R_1 GGWCRALILR₂FR₃CGR₄ (SEQ ID NO: 31)

where R_4 is the sequence identified by SEQ ID NO: 19, and

II-4 R₁PGPCRAMISR₂FR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 32)
 II-3 R₁PGWCRAMISR₂IR₃CGR₄ (SEQ ID NO: 33)
 II-6 R₁PGPCKAMISR₂IR₃CWR₄ (SEQ ID NO: 34)
 III-27 R₁TGPCRALISR₂WR₃CGR₄ (SEQ ID NO: 35)
 III-30 R₁TGPCRALISR₂YR₃CGR₄ (SEQ ID NO: 36)
 TF7I-VY R₁PGVCRALILR₂FR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 37)
 TF7I-LY R₁PGLCPALILR₂FR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 38)
 TF7I-WY R₁PGWCRALILR₂FR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 39)
 TF7I-PG R₁PGPCRALILR₂FR₃CGR₄ (SEQ ID NO: 40)
 IV-47C R₁PGPCRAMMKR₂IR₃CHR₄ (SEQ ID NO: 41)
 IV-54C R₁PGPCRALMKR₂VR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 42)
 IV-31B R₁PGPCRALMKR₂VR₃CFR₄ (SEQ ID NO: 43)
 IV-49C R₁PGPCRAMMKR₂IR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 44)
 IV-50C R₁PGPCRAMYKR₂IR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 45)
 IV-57C R₁PGVCRAMMKR₂IR₃CGR₄ (SEQ ID NO: 46)
 IV-51C R₁PGPCKALMKR₂YR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 47)
 IV-35B R₁PGPCKALMKR₂IR₃CHR₄ (SEQ ID NO: 48)
 IV-58C R₁PGPCKALMKR₂YR₃CHR₄ (SEQ ID NO: 49)
 IV-48C R₁PGPCKALMKR₂WR₃CWR₄ (SEQ ID NO: 50)
 IV-46C R₁PGPCKAMIKR₂LR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 51)
 IV-55C R₁PGPCKALMKR₂FR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 52)
 IV-32B R₁PGPCKALMKR₂YR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 53)
 IV-36B R₁PGPCKALMKR₂VR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 54)
 IV-40B R₁PGACKAMYKR₂IR₃CGR₄ (SEQ ID NO: 55)
 53b R₁PGPGRALILR₂FR₃AYR₄ (SEQ ID NO: 56), and
 TF7I-C R₁PGPCRALILR₂FR₃CYR₄ (SEQ ID NO: 57)
 where R₄ has the sequence identified by SEQ ID NO: 18.

It will be appreciated by the skilled artisan that with a Kunitz type active site inhibitor domain all or a portion of the Kunitz type domain may be used as the active site inhibitor domain according to the present invention. Any portion of the Kunitz domain which binds with sufficient affinity to reversibly inhibit FVIIa will be sufficient as Factor VIIa active site domain. Such molecules generally comprise at least the P₁ and P₁' residues of the Kunitz domain and preferably the primary binding loop of the Kunitz domain P₅ through P₄'.

The active site inhibitor moiety of the present invention may also be an irreversible FVIIa serine protease inhibitor. Such irreversible active site inhibitor domains generally form covalent bonds with the Factor VIIa active site. Such irreversible inhibitors include general serine protease inhibitors such as peptide chloromethylketones (see, Williams et al., (1989) J. Biol. Chem. 264:7536-7540) or peptidyl chloromethanes; azapeptides; acylating agents such as various guanidinobenzoate derivatives and the 3-alkoxy-4-chloroisocoumarins; sulphonyl fluorides such as phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), diisopropyl fluorophosphate (DFP), tosylpropylchloromethyl ketone (TPCK) and tosylsilylchloromethylketone (TLCK); nitrophenylsulphonates and related compounds; heterocyclic protease inhibitors such as isocoumarins, and coumarins.

3. Linker

According to the present invention, the tissue factor domain is linked, preferably via its N-terminus to the FVII/FVIIa active site inhibitor domain of the hybrid molecule via a flexible linker domain. The linker component of the hybrid molecule of the invention does not necessarily participate in the binding of the molecule to FVII/FVIIa. Therefore, according to the present invention, the linker domain, is any group of molecules that provides a spatial bridge between the FVII/FVIIa active site inhibitor domain and the tissue factor domain of the molecule.

The linker domain can be of variable length and makeup, however, according to the present invention, it is the length of the linker domain and not its structure that is important. The linker domain preferably allows for the active site

domain of the hybrid molecule to fit into the serine protease active-site groove of FVII/FVIIa while allowing the tissue factor domain of the molecule to bind to the TF binding site on the FVII/FVIIa molecule. Therefore, the length of the linker domain is dependent upon the character of the two "functional" domains of the hybrid molecule.

One skilled in the art will recognize that various combinations of atoms provide for variable length molecules based upon known distances between various bonds (Morrison, and Boyd, Organic Chemistry, 3rd Ed, Allyn and Bacon, Inc., Boston, Mass. (1977)). For example, the linker domain may be a polypeptide of variable length. The amino acid composition of the polypeptide determines the character and length of the linker. In a preferred embodiment, the linker molecule comprises a flexible, hydrophilic polypeptide chain. Exemplary, linker domains comprises one or more [(Gly)₄-Ser] units.

In a preferred aspect, the active site inhibitor domain is a Kunitz type serine protease inhibitor, the TF domain is hTFAA and the linker domain is a polypeptide comprising between 5 and about 35 amino acids and spanning a distance of greater than about 30 Å. More preferably, the linker comprises between about 20 and about 30 amino acids and spans a distance of greater than about 60 Å. Most preferably the linker comprises about a 22 to 27 amino acid polypeptide and is comprised of about 4 to 5 [(Gly)₄-Ser] units.

4. Synthesis

The hybrid molecules of the present invention may be synthesized by various techniques which are well known in the art. These include recombinant DNA techniques, solid phase synthesis, solution phase synthesis, organic chemical synthetic techniques or a combination of these techniques. The choice of synthesis will depend upon the particular molecule to be generated. For example, in one embodiment the hybrid molecule of the present invention is not entirely "protein" in nature and is synthesized by a combination of recombinant techniques and solution phase techniques.

For example, for the synthesis of hybrid molecules of the present invention which contain both amino acid or protein portions and non-protein portions the molecule is generally obtained by synthesizing the protein portion of the molecule by recombinant techniques as described below followed by coupling the non protein portion of the molecule to the protein portion via solid phase or solution phase methods.

For the coupling of protein and non protein portions of the molecule, chemical coupling is preferred. According to this procedure, traditional crosslinking agents are employed such as molecules having one or more reactive groups that can react with more than one sites on the protein and non-protein molecules. Biocompatible crosslinkers are preferred having the characteristics of being non-carcinogenic, nontoxic, and substantially nonimmunogenic in vivo. Typically the cross linker will covalently bond with an amino group or a sulphydryl group on the protein portion of the molecule and a hydroxyl, amino, aldehyde or carboxylic acid group of the non-protein portion of the molecule. Methods of crosslinking molecules are reviewed by Means and Feaney (1990) Bioconjugate Chemistry, 1:2-12.

Various techniques are available which may be employed to produce DNA, which can encode proteins for the recombinant synthesis of hybrid proteins of the invention. For instance, it is possible to derive DNA based on naturally occurring DNA sequences that encode for changes in an amino acid sequence of the resultant protein. These mutant DNA can be linked together and used to obtain the hybrid molecules of the present invention. These techniques contemplate, in simplified form, obtaining a gene encoding

a tissue factor domain and a gene encoding an active site inhibitor domain such as a Kunitz type domain of structural formula I; modifying the genes by recombinant techniques such as those discussed below; inserting the genes into an appropriate expression vector separated by a gene encoding a linker module of various lengths; inserting the vector into an appropriate host cell; culturing the host cell to cause expression of the hybrid molecule; and purifying the molecule produced thereby.

Somewhat more particularly, a DNA sequence encoding the bifunctional molecule of the present invention is obtained by synthetic construction of the DNA sequence (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1989).

By way of example, expression vectors encoding wild type tissue factor can be obtained and subject to site specific mutagenesis (Kunkel et al., (1991) Methods Enzymol. 204:125-139; Carter, P., et al., (1986) Nucl. Acids. Res. 13:4331; Zoller, M. J. et al., (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487), cassette mutagenesis (Wells, J. A., et al., (1985) Gene 34:315), or restriction selection mutagenesis (Wells, J. A., et al., (1986) Philos. Trans. R. Soc. London Ser A 317, 415) to obtain the tissue factor domain of the molecule. The mutant DNA can then be used by insertion into expression vectors containing DNA encoding an active site inhibitor domain. A DNA sequence encoding a linker domain of varying length such as one or more [(Gly)₄-Ser] units can then be inserted into the same expression vector.

Oligonucleotide-mediated mutagenesis is a preferred method for preparing the DNA encoding the tissue factor variants and the Kunitz type active site inhibitor domains of the present invention. This technique is well known in the art as described by Adelman et al., (1983) DNA, 2:183. Briefly, the native or unaltered DNA of a wild type tissue factor or Kunitz type domain, for instance APPI, is altered by hybridizing an oligonucleotide encoding the desired mutation to a DNA template, where the template is the single-stranded form of a plasmid or bacteriophage containing the unaltered or native DNA sequence.

The DNA encoding variants are then inserted into an appropriate plasmid or vector separated by DNA sequence encoding a linker domain. The vector is used to transform a host cell. In general, plasmid vectors containing replication and control sequences which are derived from species compatible with the host cell are used in connection with those hosts. The vector ordinarily carries a replication site, as well as sequences which encode proteins that are capable of providing phenotypic selection in transformed cells.

For example, *E. coli* may be transformed using pBR322, a plasmid derived from an *E. coli* species (Mandel, M. et al., (1970) J. Mol. Biol. 53:154). Plasmid pBR322 contains genes for ampicillin and tetracycline resistance, and thus provides easy means for selection. Other vectors include different features such as different promoters, which are often important in expression. For example, plasmids pKK223-3, pDR720, and pPL-lambda represent expression vectors with the tac, trp, or P_L promoters that are currently available (Pharmacia Biotechnology).

Other preferred vectors can be constructed using standard techniques by combining the relevant traits of the vectors described herein. Relevant traits of the vector include the promoter, the ribosome binding site, the variant gene or gene fusion, the signal sequence, the antibiotic resistance markers, the copy number, and the appropriate origins of replication.

In *E. coli*, Kunitz domains have been expressed as intact secreted proteins (Castro, M. et al., (1990) FEBS Lett.

267:207-212), intracellularly expressed proteins (Altman, J. D. et al., (1991) Protein Eng. 4:593-600), or as fusion proteins (Sinha, S. et al., (1991) J. Biol. Chem. 266:21011-21013; Lauritzen, C. et al., (1991) Prot. Express. Purif. 2:372-378; Auerswald, E. A. et al., (1988) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369:27-35).

The host cell may be prokaryotic or eukaryotic. Prokaryotes are preferred for cloning and expressing DNA sequences to produce parent polypeptides, segment substituted polypeptides, residue-substituted polypeptides and polypeptide variants. For example, *E. coli* K12 strain 294 (ATCC No. 31446) may be used as *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC No. 31537), and *E. coli* c600 and c600hfl, *E. coli* W3110 (F⁻, gamma⁻, prototrophic/ATCC No. 27325), bacilli such as *Bacillus subtilis*, and other enterobacteriaceae such as *Salmonella typhimurium* or *Serratia marcescens*, and various pseudomonas species. The preferred prokaryote is *E. coli* W3110 (ATCC 27325). When expressed by prokaryotes the polypeptides typically contain an N-terminal methionine or a formyl methionine and are not glycosylated. These examples are, of course, intended to be illustrative rather than limiting.

In addition to prokaryotes, eukaryotic organisms, such as yeast cultures, or cells derived from multicellular organisms may be used. In principle, any such cell culture is workable. However, interest has been greatest in vertebrate cells, and propagation of vertebrate cells in culture (tissue culture) has become a reproducible procedure (*Tissue Culture*, Academic Press, Kruse and Patterson, eds. [1973]). Examples of such useful host cell lines are VERO and HeLa cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines, W138, 293, BHK, COS-7 and MDCK cell lines. Yeast expression systems have been used to make Kunitz domains (Wagner, S. L. et al., (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 186:1138-1145; Vedvick, T. et al., (1991) J. Indust. Microbiol. 7:197-202). In particular the yeast *Pichia pastoris* has been used successfully using the *Saccharomyces cerevisiae* α mating factor prepro signal sequence and the *P. pastoris* alcohol oxidase AOX1 promoter and terminator sequences. Other yeast expression vectors and hosts commonly used to express heterologous proteins are also contemplated.

5. Compositions

The hybrid molecule of the present invention comprising a TF domain and a FVIIa active site domain is typically provided in a compositional form that is suitable for its intended use. The hybrid molecule of the present invention comprising a TF domain can be prepared in the soluble form such as the hTFAA form described herein. According to this aspect of the invention the tissue factor domain of the molecule is prepared without a membrane anchor. Alternatively, the tissue factor domain can be prepared as a full-length membrane-associated form, with the membrane anchor present.

The hybrid molecule of the present invention may also comprise a TF domain comprising all or a portion of the transmembrane domain of wild type tissue factor. It is preferred, according to the present invention, that bifunctional molecules comprising a TF domain containing a membrane anchor domain be formulated in a composition comprising a mild detergent or phospholipid (PL). Although the composition of the present invention comprising a full-length TF domain including a membrane anchor or transmembrane domain retain their biological activity they are preferably formulated in a phospholipid composition. International Publication No. WO 94/28017 describes the preparation of phospholipid compositions comprising a TF domain that are appropriate for the compositions of the present invention.

Preferred compositions described in WO 94/28017 and suitable for the pharmaceutical compositions of the present invention are phospholipid compositions which afford maximum stability and biological activity for the composition. Such phospholipid compositions are preferably formulated to form liposome compositions, as are generally well known in the art. As described, suitable phospholipids for use in the liposome compositions of the present invention include those which contain fatty acids having twelve to twenty carbon atoms; said fatty acids may be either saturated or unsaturated. Preferred phospholipids for use according to the present invention include phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) and phosphatidylserine (PS). These phospholipids may come from any natural source and the phospholipids, as such, may be comprised of molecules with differing fatty acids. Phospholipid mixtures comprising phospholipids from different sources may be used. For example, PC, PG and PE may be obtained from egg yolk; PS may be obtained from animal brain and spinal chord. These phospholipids may come from synthetic sources as well. The phospholipids are conveniently combined in the appropriate ratios to provide the phospholipid mixture for use in preparing the composition of the present invention. The preparation of liposomes is generally well known and has been previously described. Exemplary methods for preparation of liposomes includes reverse loading of liposomes (see U.S. Pat. No. 5,104,661), or in the manner described for the incorporation of amphotericin B into lipid vesicles. (See, e.g., Lopez-Berenstein et al., (1985) *J. Infect. Dis.*, 151:704-710; Lopez-Berenstein, (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31:675-678; Lopez-Berenstein et al., (1984) *J. Infect. Dis.*, 150:278-283; and Mehta et al., (1984) *Biochem. Biophys. Acta*, 770:230-234). Liposomes with enhanced circulation time may also be prepared as described in U.S. Pat. No. 5,013,556.

Thus, in one embodiment, the present invention contemplates the preparation of the hybrid molecules in the form of liposomes having TF domain portion of the molecule associated with the lipid bilayer of the liposomes, such that the TF membrane anchor domain is inserted through the lipid bilayer.

Other suitable compositions of the present invention comprise any of the above noted compositions with a pharmaceutically acceptable carrier, the nature of the carrier differing with the mode of administration, for example, in oral administration, usually using a solid carrier and in I.V. administration, a liquid salt solution carrier.

The compositions of the present invention include pharmaceutically acceptable components that are compatible with the subject and the protein of the invention. These generally include suspensions, solutions and elixirs, and most especially biological buffers, such as phosphate buffered saline, saline, Dulbecco's Media, and the like. Aerosols may also be used, or carriers such as starches, sugars, microcrystalline cellulose, diluents, granulating agents, lubricants, binders, disintegrating agents, and the like (in the case of oral solid preparations, such as powders, capsules, and tablets).

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable" generally means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans.

The formulation of choice can be accomplished using a variety of the aforementioned buffers, or even excipients including, for example, pharmaceutical grades of mannitol,

lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin cellulose, magnesium carbonate, and the like. "PEGylation" of the compositions may be achieved using techniques known to the art (see for example International Patent Publication No. W092/16555, U.S. Pat. No. 5,122,614 to Enzon, and International Patent Publication No. WO 92/00748). Oral compositions may be taken in the form of solutions, suspensions, tablets, pills, capsules, sustained release formulations, or powders.

6. Therapeutic methods

The bifunctional molecules of the present invention can be used therapeutically to prevent the biological activity of the TF-FVIIa complex. The inhibition of TF-FVIIa is desirable in indications where the reduction of TF-FVIIa dependent coagulation is implicated. These situations include but are not limited to the prevention of arterial rethrombosis in combination with thrombolytic therapy. It has been suggested that the TF-FVIIa plays a significant role in a variety of clinical states including deep venous thrombosis, arterial thrombosis, stroke, DIC, septic shock, cardiopulmonary bypass surgery, adult respiratory distress syndrome, hereditary angioedema. Inhibitors of TF-FVIIa may therefore play important roles in the regulation of inflammatory and/or thrombotic disorders.

Thus the present invention encompasses a method for preventing TF-FVIIa mediated event in a human comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the hybrid molecule of the present invention. A therapeutically effective amount of the hybrid molecule of the present invention is predetermined to achieve the desired effect. The amount to be employed therapeutically will vary depending upon therapeutic objectives, the routes of administration and the condition being treated. Accordingly, the dosages to be administered are sufficient to bind to available FVII/FVIIa and form an inactive complex leading to decreased coagulation in the subject being treated.

The therapeutic effectiveness is measured by an improvement in one or more symptoms associated with the TF-FVIIa dependant coagulation. Such therapeutically effective dosages can be determined by the skilled artisan and will vary depending upon the age condition, sex and condition of the subject being treated. Suitable dosage ranges for systemic administration are typically between about 1 $\mu\text{g/kg}$ to up to 100 mg/kg or more and depend upon the route of administration. According to the present invention a preferred therapeutic dosage is between about 1 $\mu\text{g/kg}$ body weight and about 5 mg/kg body weight. For example, suitable regimens include intravenous injection or infusion sufficient to maintain concentration in the blood in the ranges specified for the therapy contemplated.

Pharmaceutical compositions which comprise the polypeptides of the invention may be administered in any suitable manner, including parental, topical, oral or local (such as aerosol or transdermal) or any combination thereof. Suitable regimens also include an initial administration by intravenous bolus injection followed by repeated doses at one or more intervals.

Where the composition of the invention is being administered in combination with a thrombolytic agent, for example, for the prevention of reformation of an occluding thrombus in the course of thrombolytic therapy, a therapeutically effective dosage of the thrombolytic is between about 80 and 100% of the conventional dosage range. The conventional dosage range of a thrombolytic agent is the daily dosage used in therapy and is readily available to the treating physician. (Physicians Desk Reference 1994, 50th Edition,

-continued

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:58:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 5 amino acids
(B) TYPE: Amino Acid
(D) TOPOLOGY: Linear

(x i) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:58:

G l y G l y G l y G l y S e r
1 5

What is claimed is:

1. A method for inhibiting human tissue factor-Factor VIIa (TF-FVIIa) procoagulant activity in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable excipient and a fusion protein comprising:

- a) a Factor VIIa ("FVIIa") active site inhibitor domain;
b) a linker domain; and
c) a tissue factor ("TF") domain to the mammal.

2. The method of claim 1 further comprising administering the composition in combination with a thrombolytic agent.

15

3. The method of claim 1 further comprising administering the composition in combination with an anticoagulant.

4. A method of treating a mammal for which inhibiting Factor VIIa is indicated comprising administering a pharmaceutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable excipient and a fusion protein comprising:

- a) a Factor VIIa ("FVIIa") active site inhibitor domain;
b) a linker domain; and
c) a tissue factor ("TF") domain to the mammal.

* * * * *

Edward R. Barnhart, publisher). The typical dosage range will depend upon the thrombolytic being employed and include for tissue plasminogen activator (t-PA), 0.5 to about 5 mg/kg body weight; streptokinase, 140,000 to 2,500,000 units per patient; urokinase, 500,000 to 6,250,000 units per patient; and anisolated streptokinase plasminogen activator complex (ASPAC), 0.1 to about 10 units/kg body weight.

The term combination as used herein includes a single dosage form containing at least the molecule of the present invention and at least one thrombolytic agent. The term is also meant to include multiple dosage forms wherein the molecule of the present invention is administered separately but concurrently by two separate administration, such as in sequential administration. These combinations and compositions work to dissolve or prevent the formation of an occluding thrombus resulting in dissolution of the occluding thrombus.

According to a further aspect of the invention the hybrid molecule may be employed in preventing ex vivo coagulation such as that encountered in the extracorporeal perfusion of blood through for example artificial valves, prothesis, stents or catheters. According to this aspect of the invention the extracorporeal device may be coated with the compositions of the invention resulting a lower risk of clot formation due to extrinsic pathway activation.

The following examples are offered by way of illustration and not by way of limitation. The disclosures of all citations in the specification are expressly incorporated herein by reference.

EXAMPLES

Materials

Human Factor VIIa, Factor X, Factor Xa, were purchased from Haematologic Technologies Inc. (Essex Jct., Vt.). Membrane tissue factor (mTF) was prepared by sonication of a human embryonic kidney cell line (293) expressing recombinant, full length (residues 1-263) human TF (Paborsky, L. R. et al., (1990) Protein Engineering 3:547-553). Bovine trypsin, 4-methylumbelliferyl p-guanidinobenzoate and CHAPS were purchased from Sigma Chemicals, Inc. Bovine serum albumin (BSA), Fraction V was obtained from Calbiochem (La Jolla, Calif.). N^α-Benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide was purchased from Bachem California (Torrance, Calif.). Human plasmin, S-2302, S-2251 and S-2366 were purchased from Kabi Vitrum (Sweden) and SPECTROZYME™ FXa was purchased from American Diagnostica (Greenwich, Conn.) and CHROMOZYME™ t-PA was from Boehringer Mannheim. All other reagents were of the highest grade commercially available.

Example 1

Construction and Expression of Fusion Proteins

Plasmids encoding tissue factor-Kunitz domain fusion proteins were constructed from the plasmid pZTFAA (Kelley, R. F. et al., (1995) Biochemistry 34:10383-10392) designed for expression of hTFAA by secretion from *E. coli*. As shown in FIG. 3, the expression unit of pZTFAA has the stII signal sequence joined to the N-terminus of hTFAA and transcription is driven by the alkaline phosphatase promoter (phoA). pZTFAA also has elements necessary for replication of the plasmid in single or double stranded form. The coding sequence for the TF71-C Kunitz domain was excised from the plasmid pA4G32-TF71-C (Dennis, M. S. & Lazarus, R. A. J. Biol. Chem. (1994) 269:22129-22136) by restriction enzyme digest with PstI and BamHI. For construction of genes encoding fusion proteins with the Kunitz domain joined to the C-terminus of hTFAA, a SacII restriction

enzyme site was introduced into pZTFAA by oligonucleotide-directed mutagenesis (Kunkel, T. A. et al., Methods in Enzymology, (1987) 154:367-382). The resulting plasmid was digested with SacII and SphI, and then ligated with the PstI/BamHI fragment of the Kunitz domain and two oligonucleotide linkers prepared by chemical synthesis. One linker has SacII/PstI cohesive ends and encodes a single copy of the G₄S module and was designed to fuse hTFAA in the correct reading frame with the N-terminus of the Kunitz domain. The second linker has BamHI/SphI cohesive ends and supplies the stop codon of the construct. For construction of fusion protein genes having a Kunitz domain attached to the N-terminus of hTFAA, pZTFAA was cleaved with NsiI which cuts the DNA at the junction between the stII and hTFAA segments. The NsiI cut plasmid was ligated with the PstI/BamHI Kunitz domain fragment and two oligonucleotide linkers prepared by chemical synthesis. One linker had NsiI/PstI cohesive ends thus joining the Kunitz domain in frame with the stII signal sequence. The second linker has BamHI/NsiI cohesive ends, encodes a single G₄S module, and joins the Kunitz domain in frame with the N-terminus of hTFAA. The stop codon is derived from pZTFAA. Fusion genes having multiple copies of the G₄S module were constructed by inserting chemically synthesized oligonucleotides encoding the (G₄S)_n unit between the appropriate restriction enzyme sites in TFKD1 or KDTF1. For TFKD1, the SacII/PstI sites were used, and for KDTF1, the BamHI/NsiI sites were used. All fusion genes were confirmed by dideoxynucleotide sequencing (Sanger, F. et al., PNAS (USA) (1977) 74:5463-5467).

Phagemids encoding the fusion proteins were transformed into *E. coli* strain 33B6, a derivative of *E. coli* W3110, for expression. Overnight saturated cultures were used to inoculate (1%) 10 L of media in a fermentation tank. Fermentation was performed as described previously (Carter, P. et al., Bio/Technology, (1992) 10:163-167) except that the temperature was 30° C. rather than 37° C. Fusion proteins were secreted into the periplasm by virtue of the stII signal sequence. Cells were harvested by centrifugation 32 hours after inoculation and stored frozen at -20° C.

Example 2

Purification of Fusion Proteins

Fusion proteins were extracted from *E. coli* cell paste and purified by immunoaffinity chromatography on an anti-TF monoclonal antibody (D3) column (Paborsky, L. R. et al., Biochemistry (1989) 28:8072-8077) as described for mutants of soluble tissue factor (Kelley, R. F. et al., (1995) Biochemistry 34:10383-10392). In some cases, a final size exclusion chromatography step, using a Superdex 75 (Pharmacia) column equilibrated with phosphate-buffered saline, was incorporated to purify fusion protein monomers from higher mass oligomers. The course of the fusion protein purification was followed by SDS-PAGE as shown in FIG. 4. This procedure yielded highly purified fusion protein. Each purified sample was submitted for analysis on a Sciex API 3 mass spectrometer equipped with an articulated electrospray source to verify that protein mass was consistent with the desired molecular composition. Multiply charged ions of horse myoglobin (MW=16,951 Da) were used for instrument calibration. Results of the analysis by mass spectrometry are shown in Table I and indicate that the fusion proteins have the expected molecular composition. Concentrations of the purified fusion proteins were determined by three methods (Table I): 1) Detection of hTFAA with the D3 antibody, 2) determination of Kunitz domain by titration of trypsin, and 3) absorbance measurements to determine total protein concentration. All three methods

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
 Bogotá, D.C.,

Abogado
J. IAN RAISBECK
 (Apoderado)

ASUNTO	Radicación	04-118560A
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	
	Folios	04 - 12570

Patente de Invención ☒ Patente de Modelo de Utilidad ☐

Vía Nacional ☐

Vía PCT (fase nacional) ☒ Cap. I ☐ Cap. II ☒

No. Sol. Internacional PCT/US03/13522
 Fecha de Presentación Internal. 30 de Abril de 2003

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción: Folios: 56 a 159 como se radicó inicialmente

Reivindicaciones: Folios: 160 a 163 como se radicó inicialmente

Secuencias: Folios: 164 a 167 como se radicó inicialmente

Prioridad: Folio: 1
 Fecha: 01/05/2002
 País: US
 Número: 60/376.566

179

2. Objeto de la invención

- Título de la solicitud (folio 1): "Nuevas proteínas de fusión con trombomodulina dirigidas contra factores titulares como anticoagulantes"
- La presente solicitud se refiere a nuevas proteínas de fusión que actúan como anticoagulantes y comprenden una proteína direccionadora que interactúa con el factor tisular (TF) o bien con el complejo del factor VIIa/factor tisular (FVIIa/TF).
- El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de proporcionar anticoagulantes más eficaces y seguros para el tratamiento de determinados trastornos trombóticos.
- Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona una proteína de fusión anticoagulante, la cual comprende un anticuerpo de cadena simple que interactúa con el factor tisular (TF) o el complejo de factor VIIa/TF, ligada operativamente al dominio EFG456 de la trombomodulina y el bucle de interdominio entre EGF3 y EGF4.
- La Clasificación Internacional de Patentes (IPC) es A61K 39/295.

3. De la solicitud de Patente

Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio de la solicitud en estudio presenta los siguientes defectos:

- El capítulo reivindicatorio en general carece de concisión, y claridad por cuanto que se caracteriza el anticuerpo anticoagulante por su resultado a obtener. Las cláusulas 1 y dependientes reivindican un anticuerpo caracterizado por su mecanismo de unión al complejo del factor tisular VIIa/TF, y además por una característica que depende de sus propiedades esenciales como el que posea mayor afinidad que el factor tisular TF solo. Sin embargo, estas características no se encuentran definidas correctamente como por ejemplo su estructura secuencial. La reivindicación independiente 23 presenta igualmente la misma objeción.
- Las reivindicaciones 14 a 19 no cumplen los requisitos de patentabilidad como se observará en el numeral 4 y 5.
- Las reivindicaciones 22, 24 y 25 comprenden en esencia la misma materia reivindicada en la solicitud original con número de radicación 04-118560, por lo que no se entiende las diferencias que presenta la divisional presentada con la original.

Por lo anterior, el capítulo reivindicatorio NO cumple con el requisito de definición, claridad, concisión o sustento por la descripción de acuerdo al art. 30 de la Decisión 486 y/o art. 22 Tratado PCT.

180

4. Excepción a la patentabilidad (artículo 20 D486 literal a)-d))

El literal c del artículo 20 de la decisión 486 establece que “no serán patentables:

- c) las plantas, los animales los procedimientos esencialmente biológicos para la producción de plantas o animales q no sean procedimientos no biológicos o microbiológicos”.*
- d) Los métodos terapéuticos o quirúrgicos para el tratamiento humano o animal, así como los métodos de diagnóstico aplicados a los seres humanos o a animales”.*

- Las reivindicaciones 14 a 18 obedecen a un metodo de protección contra la formación de trombos, lo cual se define como un método de tratamiento que no es patentable a la luz de literal d del artículo 20 de la decisión 486.

De lo anterior la(s) reivindicaciones 14 a 18 no pueden ser consideradas patentables.

5. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (artículos 14 y 21 D 486)

- La reivindicación 19 obedece al uso que se le da al anticuerpo de la reivindicación 1.

Por dicha razón, las reivindicaciones analizadas no se pueden considerar invenciones y que por lo tanto no pueden obtener patente.

6. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:

Fecha de presentación de la solicitud prioritaria: 01 de Mayo de 2002

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud encontrándose los siguientes documentos más relevantes:

Nº	Documento	Título	Fecha de patente
D1	US 5874407	Factor VIIA inhibitors	23/02/1999

7. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

Novedad

- La solicitud en estudio divulga en su reivindicación principal un anticuerpo anticoagulante, caracterizado porque se une al complejo del factor VIIa/factor tisular (FVIIa/TF) con mayor afinidad que al factor tisular (TF) solo.

181

D1 enseña (folios: 171 a 177) anticuerpos y proteínas de fusión que contienen inhibidores del dominio del sitio activo del factor VIIa/factor tisular (ver resumen). A pesar de las objeciones planteadas por claridad de la solicitud, el capítulo reivindicatorio se encuentra anticipado por el documento del estado de la técnica D1 por tanto que las características esenciales de la solicitud, las composiciones farmacéuticas y las proteínas de fusión reivindicadas ya eran conocidas (capítulo reivindicatorio de D1, columna 53 y 54). Igualmente el mecanismo para obtener dichos compuestos era conocido.

De esta forma se establece que las reivindicaciones 1 a 21 y 23 no cumplen con el requisito de Novedad.

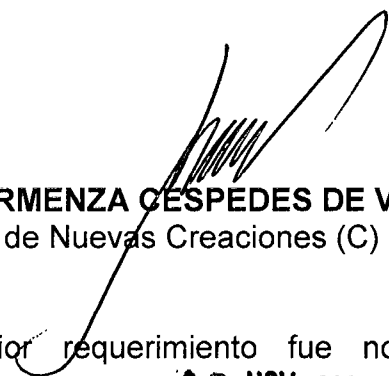
8. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

Nº	Documento Nº	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	US 5874407	1 – 21, 23	Novedad

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de 60 días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única Nº 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha
_____ **13 NOV. 2009**

CONCEPTO TÉCNICO No. 3555	EXAMINADOR TÉCNICO Código No. 202089
-------------------------------------	--

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

① SOLICITUD DE :

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

② SOLICITANTE (71)	Nombre: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT Dirección: Müllerstrasse 178, D-13342 Berlin, Alemania Nacionalidad o Domicilio: Berlin, Alemania Lugar de Constitución: Alemania Teléfono: Fax: E-mail:	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
--------------------	--	---

③ REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO Dirección Cra. 11ª No. 94-76 – Of. 308 Teléfono: 6161948 Fax: 6163976 E-mail:	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☒ Cual _____ Número <u>2.878.023</u> TP <u>5903</u>
-----------------------------	--	---

④ INVENTOR (ES) (72)	Nombre: LIGHT David Dirección 614 South Freemont Street, Nacionalidad o Domicilio: San Mateo, California 94402 Estados Unidos de América
----------------------	---

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US03/13522 Fecha Abril 30 de 2003

Publicación Internacional No. WO 03/092602 A2 Fecha Noviembre 13 de 2003

⑥ Título (54) NUEVAS PROTEINAS DE FUSION CON TROMBOMODULINA DIRIGIDAS CONTRA FACTORES TISULARES COMO ANTICOAGULANTES.

⑦ Clasificación Internacional (51) A61K 38/00

⑧ PRIORIDAD:	(33) País de Origen <u>Estados Unidos</u>	(32) Fecha <u>Mayo 1, 2002</u>	(31) Numero de Solicitud <u>60/376,566</u>
SI ☒ NO ☐			

⑨ Comprobante de pago No. 04 - 91,215 Fecha Noviembre 24, 2004