

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-085990- -00010-0000

Fecha: 2013-06-28 10:33:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 14

Señor Superintendente

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Trámite : 011

Evento : 378

Actuación : 412

Referencia : Expediente No. 11085.990
Asunto : Solicitud de patente para **PREPARACIONES BASADAS EN FIBRÓGENO Y POLISACÁRIDOS SULFATADOS**
Solicitante : **BAXTER INTERNATIONAL INC. AND BAXTER HEALTHCARE S.A.**
Fecha de Solicitud : 11 de Julio de 2011

I. RECURSO VÍA GUBERNATIVA

Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad **BAXTER INTERNATIONAL INC. AND BAXTER HEALTHCARE S.A.** solicitante de la patente de la referencia, por el presente escrito atentamente manifiesto a usted que debidamente notificada de la Resolución No. 27329 de 10 de mayo de 2013, interpongo en su contra el recurso de **REPOSICIÓN**, para que sea revocada y en consecuencia se conceda totalmente el privilegio de patente de invención para **“PREPARACIONES BASADAS EN FIBRÓGENO Y POLISACÁRIDOS SULFATADOS”** a favor de **BAXTER INTERNATIONAL INC. AND BAXTER HEALTHCARE S.A.**

“EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS”

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel: (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

II. OPORTUNIDAD DE LA IMPUGNACIÓN

La Resolución No. **27329** del 10 de Mayo de 2013, fue notificada el veintiuno (21) de mayo de dos mil trece (2013), por lo que el término para interponer el recurso de reposición vence el veintiocho (28) de junio de dos mil trece (2013). En consecuencia, me encuentro dentro de la oportunidad legal.

III. LA DECISIÓN RECURRIDA

3.1 Mediante la Resolución objeto de la presente impugnación, el Superintendente de Industria y Comercio decidió:

3.1.1 Denegar la patente de invención para **“PREPARACIONES BASADAS EN FIBRÓGENO Y POLISACÁRIDOS SULFATADOS”**.

3.2 En la parte motiva de la providencia, se mencionaron, entre otros, los siguientes fundamentos:

3.2.1 Las características esenciales de la estructura de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, el cual da a conocer una composición que comprende fibrinógeno, un polisacárido sulfatado (sulfato de condroitina) y una solución de calcio (Pág. 24 ejemplo 10, Pág. 25 reivindicaciones 1, 6 a 7, 10, 53, 54).

3.2.2 Dichas composiciones pueden presentarse en forma de gel (Pág. 11 Párr. [0086]) y pueden ser administradas en un catéter de doble lumen. (Pág. 23, Párr. [0352]) usando el kit adecuado (Pág. 19. Párr. [0258] y [0259]).

3.2.3 En consecuencia, la reivindicación 1 no es nueva o carece de novedad, según lo divulgado en documento D1.

- 3.2.4 Las características esenciales del método de la reivindicación 2 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, el cual da a conocer un método para obtener una composición que comprende mezclar simultáneamente: fibrinógeno, un polisacárido sulfatado (sulfato de condroitina) y una solución de calcio (Pág. 24 ejemplo 10, Pág. 25 reivindicaciones 1, 6 a 7, 10, 53 a 54)
- 3.2.5 Dichas composiciones pueden presentarse en forma de gel (Pág. 11 Párr. [0086]) y pueden ser administradas en un catéter de doble lumen (Pág. 23, Párr. [0352]) usando el kit adecuado (Pág. 18, Párr. [0258] y [0259]).
- 3.2.6 En consecuencia, la reivindicación 2 no es nueva o carece de novedad, según lo divulgado en el documento D1.
- 3.2.7 Las reivindicaciones 3, 4 y 6 no presentan características adicionales que hagan nuevo el método de la reivindicación 2 por lo cual se considera tampoco cumplen con lo establecido en el mencionado artículo 16 de la Decisión 486.
- 3.2.8 Las características esenciales de la estructura de la reivindicación 5 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, el cual da a conocer un kit (Pág. 18 Párr. 0258] a [0266]) que comprende fibrinógeno, un polisacárido sulfatado (sulfato de condroitina) y una solución de calcio (Pág. 24 ejemplo 10, Pág. 25 reivindicaciones 1, 6 a 7, 10, 53 a 54).
- 3.2.9 Dicho Kit se utiliza para obtener una estructura en forma de gel (Pág. 11 Párr. [0086]) y puede ser administrado en un catéter de doble lumen (Pág. 23, Párr. [0352]).
- 3.2.10 En consecuencia, la reivindicación 5 no es nueva o carece de novedad, según lo divulgado en el documento D1.

- 3.2.11 Por su parte, la reivindicación dependiente 6 no menciona alguna característica que haga nuevo el kit de la reivindicación 5, por lo tanto, tampoco cumple con lo establecido en el mencionado artículo 16 de la Decisión 486.
- 3.2.12 Es oportuno aclarar que, contrario a lo afirmado por la solicitante, la presente solicitud no divulga que la polimerización de la fibrina en ausencia de trombina resulte en una estructura similar a coágulo que contenga fibrinógeno sin polimerizar, así como no demuestra que la adición de trombina resulte en una estructura tipo coágulo que no contenga fibrinógeno sin polimerizar, la solicitante tampoco demuestra un efecto técnico asociado a la presencia o ausencia del fibrinógeno sin polimerizar, ni si dicha estructura presenta alguna ventaja frente a los hidrogeles obtenidos en el documento D1, por el contrario la descripción de la presente solicitud se encuentra dirigida a la obtención de estructuras tipo coágulo que están formadas por fibrina (Figs. 33 y 34) y que son idénticas a las divulgadas en el documento D1. Por otra parte, el solicitante asegura que el documento D1 divulga que la ultraestructura fibrilar de un coágulo de fibrina es "fibroso" o "material de forma de papel", sin embargo dicho documento no divulga dicha información, por el contrario da a conocer que la composición conformada por fibrinógeno y un polisacárido sulfatado presenta una estructura de gel (Pág. 11 Párr. [0086]) Por otro lado, si bien D1 no hace referencia a la estructura tridimensional del hidrogel obtenido, describe claramente la metodología por la cual es obtenido dicho hidrogel (Pág. 24 ejemplo 10, Pág. 25 reivindicaciones 1, 6 a 7, 10, 53 a 54) que es idéntica a la metodología descrita por la reivindicación 2 de la presente solicitud, teniendo en cuenta que una estructura tipo coágulo puede considerarse un hidrogel, es de esperar que el hidrogel obtenido en el documento D1 sea idéntico al reclamado por la solicitante.

IV. OBJETO DEL RECURSO

De acuerdo con los argumentos que expongo a continuación, solicito atentamente a su Despacho lo siguiente:

1. Revocar la Resolución No. **27329** del 21 de mayo de 2013 en su artículo primero.
2. Conceder el privilegio total de patente de invención para **“PREPARACIONES BASADAS EN FIBRÓGENO Y POLISACÁRIDOS SULFATADOS”** a favor de **BAXTER INTERNATIONAL INC. AND BAXTER HEALTHCARE S.A.**

V. FUNDAMENTOS DEL RECURSO

Respetuosamente me permito disentir de lo expuesto por ese Despacho en la Resolución objeto del presente recurso, ya que la conclusión de que la invención carece de novedad frente al documento D1 no corresponde a los hechos del caso.

5.1 La presente solicitud sí es novedosa

Con el fin de demostrar que la presente solicitud cumple con el requerimiento de novedad, se pone de presente lo siguiente:

El artículo 16 de la Decisión 486 señala lo siguiente:

Artículo 16.- *Una invención se considerará nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica. El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente o, en su caso, de la prioridad reconocida. Sólo para el efecto de la determinación de la novedad, también se considerará dentro del estado de la técnica, el contenido de una solicitud de patente en trámite ante la oficina nacional competente, cuya fecha de presentación o de prioridad fuese anterior a la fecha de presentación o de prioridad de la solicitud de patente que se estuviese examinando, siempre que dicho contenido esté incluido en la solicitud de fecha anterior cuando ella se publique o hubiese transcurrido el plazo previsto en el artículo 40.*

Consecuentemente, una invención se considerará novedosa cuando no halla ningún documento o divulgación que anticipe todas y cada una de las características esenciales de la misma.

A este respecto, manifestamos nuestro desacuerdo con el análisis llevado a cabo por el Examinador y con las conclusiones del mismo y solicitamos atentamente la reconsideración de las razones por las cuales se decidió negar la patente con base en la siguiente información:

La Oficina Nacional de Patentes ha decidido negar la solicitud de patente para la estructura tipo coágulo de fibrina de la reivindicación 1 así como el método para obtener una estructura tipo coágulo de fibrina de la reivindicación 2, y el kit de la reivindicación 5, al igual que sus respectivas reivindicaciones dependientes, ya que carecen de novedad de acuerdo a las enseñanzas del documento citado.

En primer lugar, es evidente que la Oficina de Patentes se encuentra en un error al hacer esta objeción dado que la preparación revelada en las características técnicas esenciales del documento D1 contiene fibrinógeno sólo inicialmente; cuando el fibrinógeno se mezcla con trombina, se transforma en fibrina gracias a la acción de la trombina. De manera que la preparación final revelada en D1 no contiene fibrinógeno, sino únicamente fibrina, a diferencia de la preparación revelada en la reivindicación 1 que sí tiene en su composición final fibrinógeno. La conversión total del fibrinógeno en fibrina como resultado de la adición de trombina hace parte del conocimiento de una persona medianamente versada en el tema. (Ver anexo 1)

En segundo lugar, lo mencionado anteriormente quiere decir que en el paso de mezclado revelado en el documento D1, el fibrinógeno reacciona inmediatamente con la trombina, convirtiéndose en fibrina. Esto implica una diferencia en los métodos, ya que en el método de la reivindicación 2, en el paso de mezclado (c), no ocurre la transición de fibrinógeno a fibrina (no hay trombina), como sí sucede en el método de D1 donde se lleva a cabo la mezcla en presencia de trombina.

En tercer lugar, se debe resaltar que el producto final obtenido mediante los procesos es diferente. Mientras que en D1 se obtiene un coágulo de fibrina, el proceso revelado en la reivindicación 2 genera una estructura tipo coágulo de fibrina, que aunque

también es un producto tridimensional con una estructura de gel, se diferencia significativamente del coágulo de fibrina, ya que contiene fibrinógeno y no fibrina. Además, mientras el fibrinógeno es una proteína soluble, la fibrina es sólida ("coágulo de fibrina"), porque las moléculas de fibrina se disponen en una estrecha red tridimensional.

En cuanto a la ventaja que tiene la estructura tipo coágulo de fibrina con respecto a los hidrogeles obtenidos en D1, el solicitante ya enunció previamente en la solicitud que dichas estructuras son menos propensas a fibrinólisis y son más estables y más duraderas.

Hay que resaltar que el kit propuesto en la solicitud, a diferencia del kit enunciado en D1, no consta de trombina, por lo que es un error concluir que los kits son iguales y que el kit de la reivindicación 5 carece de novedad.

Por todo lo anterior, consideramos que la presente solicitud cumple a cabalidad con los requerimientos de patentabilidad exigidos por la legislación actual. En dado caso de que el Examinador establezca que la invención es novedosa e inventiva, se solicita amablemente el otorgamiento inmediato de los privilegios de patente solicitados; en caso de que se reconozca la novedad pero no así el nivel inventivo, se solicita se emita una nueva Acción Oficial explicando las razones para su objeción, según los lineamientos del debido proceso dado que las objeciones de nivel inventivo no han sido previamente informadas al solicitante.

Atentamente solicitamos en consideración lo siguiente:

VI. PETICIÓN

6.1 Que al considerar las razones precedentes se revoque la decisión contenida en la Resolución No. **27329** del 10 de Mayo de 2013, en cuanto resuelve negar el privilegio de patente de invención.

6.2 Que se otorgue el privilegio total de patente de invención para la invención titulada
“PREPARACIONES BASADAS EN FIBRÓGENO Y POLISACÁRIDOS SULFATADOS”
a favor de **BAXTER INTERNATIONAL INC. AND BAXTER HEALTHCARE S.A.**

VII. NOMBRE Y DIRECCIÓN

El nombre y la dirección del solicitante recurrente son los siguientes:

BAXTER INTERNATIONAL INC.

One Baxter Parkway, Deerfield
Illinois 60015
Estados Unidos de América

Y

BAXTER HEALTHCARE S.A.

Thurgauerstrasse 130, CH-8152
Glattpark (Opfikon)
Suiza

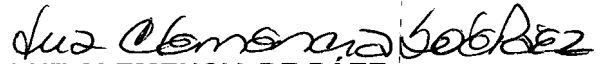
VIII. ANEXOS

1. Libro de texto. Voet, D., Voet, J. Biochemistry (Second edition). Capítulo 34, páginas
1198-1201

IX. NOTIFICACIONES

Atentamente manifiesto a usted que recibiré notificaciones en la Secretaría de su Despacho o en mi oficina de abogada situada en la Carrera 4ª. No. 72-35, piso 4º, de esta ciudad de Bogotá, D.C.

Señor Superintendente,


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

COLO-13936-0841-033-4

 GCH\DGA\ID-245195\WPC13936

No. M-2013-245195\GCH

BIOCHEMISTRY

SECOND
EDITION

DONALD VOET
JUDITH G. VOET

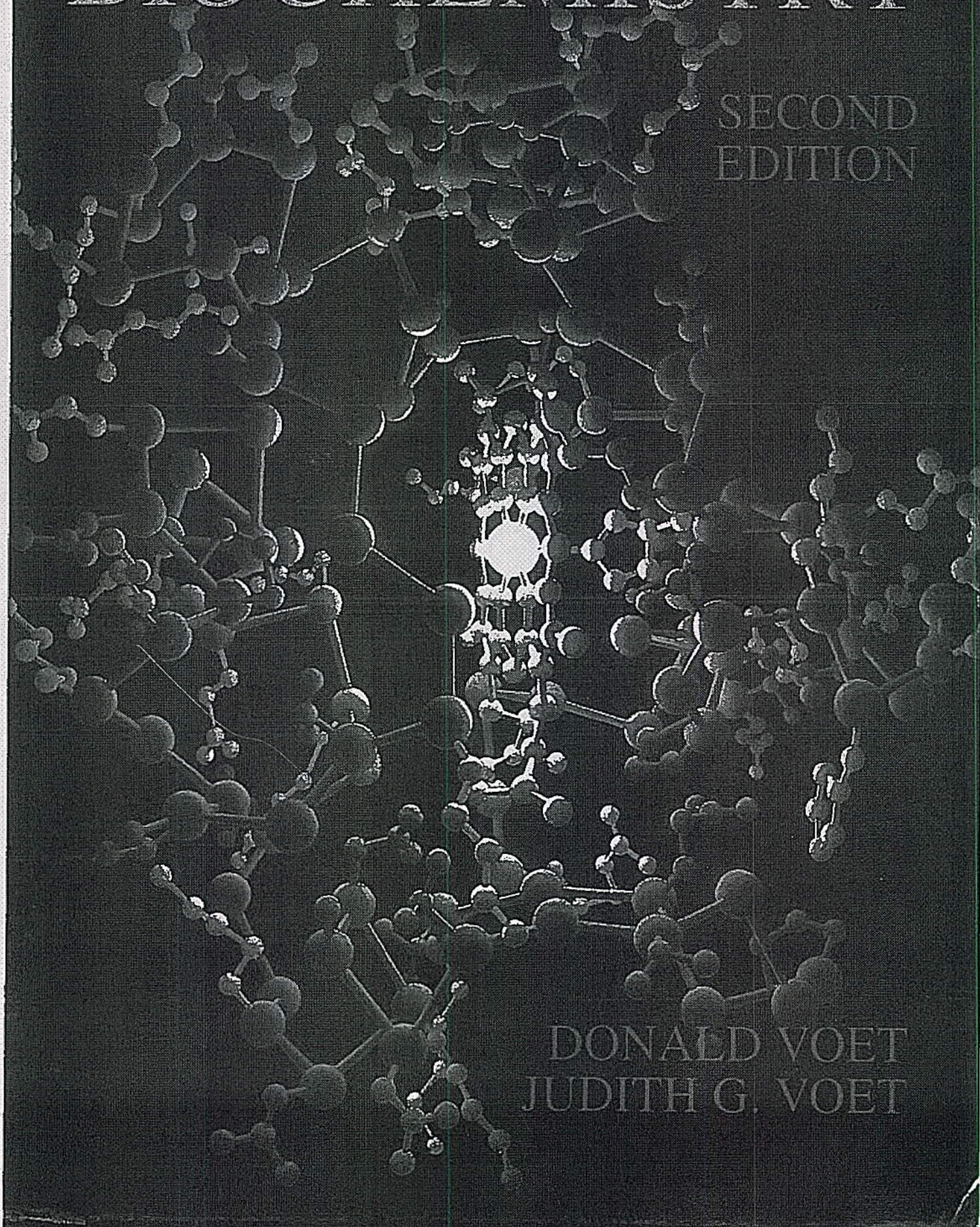


TABLE 34-1. HUMAN BLOOD COAGULATION FACTORS

Factor Number	Common Name	Molecular Mass (kD)
I	Fibrinogen	330
II	Prothrombin	66
III	Tissue factor <i>or</i> thromboplastin	30
IV	Ca ²⁺	
V ^a	Proaccelerin	249
VII	Proconvertin	46
VIII	Antihemophilic factor	265
IX	Christmas factor	47
X	Stuart factor	50
XI	Plasma thromboplastin antecedent (PTA)	136
XII	Hageman factor	67
XIII	Fibrin-stabilizing factor (FSF)	301
	Prekallikrein	69
	High molecular weight kininogen (HMK)	70

^a Factor V_a was once called factor VI; consequently there is no factor VI.
 Source: Halkier, T., *Mechanisms in Blood Coagulation, Fibrinolysis, and Blood Coagulation*, pp. 4–5, Cambridge University Press (1991).

many of its components are listed in Table 34-1. All but two of these factors are designated by both a roman numeral and a common name, although, unfortunately, the order of the roman numerals has historical rather than mechanistic significance. Seven of the clotting factors are zymogens (inactive forms) of serine proteases that are proteolytically activated by serine proteases further up the cascade. Other clotting proteins, termed accessory factors, which are also activated by these serine proteases, enhance the rate of activation of some of the zymogens. In both cases, the active form of a factor is designated by the subscript *a*.

The blood clotting system, which occurs in recognizable form in all vertebrates, contains a number of homologous serine proteases and therefore appears to have arisen through a series of gene duplications. The C-terminal ~250 residues of these proteases, which comprise their catalytically active domains, are also homologous to the pancreatic serine proteases trypsin, chymotrypsin, and elastase (Section 14-3). Like these digestive enzymes, the blood clotting proteases are activated by proteolytic cleavages that precede their C-terminal segments (Section 14-3E). However, the clotting proteases differ from the digestive enzymes in that the zymogen-to-protease conversion only takes place in the presence of Ca²⁺ and on an appropriate phospholipid membrane (see below); the resulting N-terminal fragments are quite large (150–582 residues) and, with the exception of prothrombin (Section 34-1B), are linked to their C-terminal segments via disulfide bonds so that these segments do not separate upon activation. These N-terminal segments are thought to be responsible, at least in part, for the exquisite specificities of the proteolytic blood clotting factors:

Their substrates are limited, as we shall see, to the few inactive factors they function to activate.

In what follows, we describe the mechanism of blood clotting in humans from the bottom up, that is, starting with the formation of the clot itself and working backwards through the sequence of activation steps leading to this process.

A. Fibrinogen and Its Conversion to Fibrin

Blood clots consist of arrays of cross-linked **fibrin** that form an insoluble fibrous network (Fig. 34-2). Fibrin is made from the soluble plasma protein **fibrinogen** (factor I) through a proteolytic reaction catalyzed by the serine protease **thrombin**. Fibrinogen comprises 2 to 3% of plasma protein. A molecule of fibrinogen consists of three pairs of nonidentical but homologous polypeptide chains, A α (610 residues), B β (461 residues) and γ (411 residues), and two pairs of N-linked oligosaccharides of ~2.5 kD each. Here A and B represent the 16- and 14-residue N-terminal fibrinopeptides that thrombin cleaves from fibrinogen, so a fibrin monomer is designated $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. The reaction forming a blood clot from fibrinogen may therefore be represented

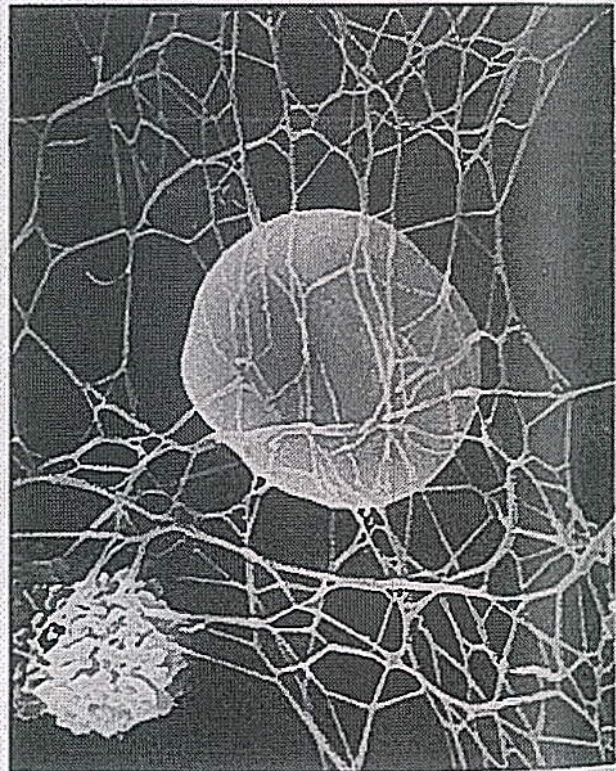
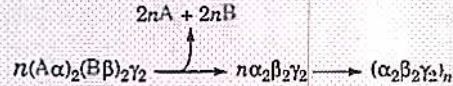


FIGURE 34-2. Scanning electron micrograph of a blood clot showing a red cell enmeshed in a fibrin network. [Manfred Kaga/Peter Arnold Inc.]

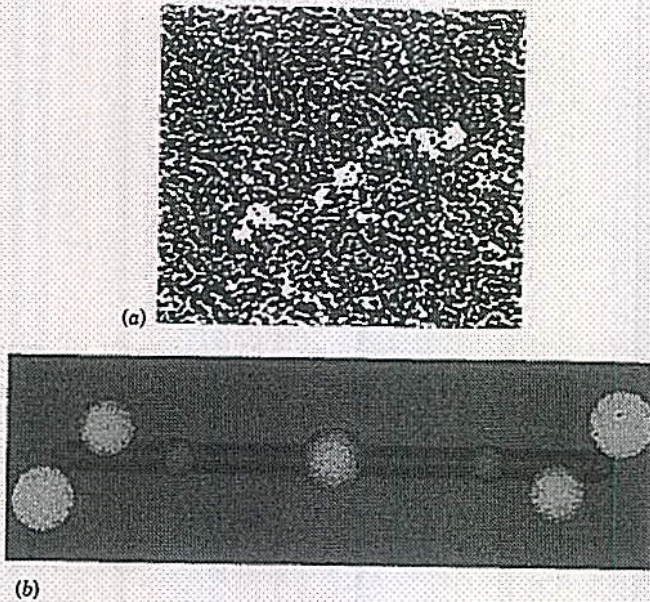


FIGURE 34-3. Fibrinogen. (a) An electron micrograph. (b) A 30-Å resolution model viewed along the molecule's twofold rotation axis. The light colored balls represent protuberances that are seen in combined electron microscopic and low resolution X-ray diffraction studies of fibrinogen. [Courtesy of John Weisel, University of Pennsylvania, and Carolyn Cohen, Brandeis University.]

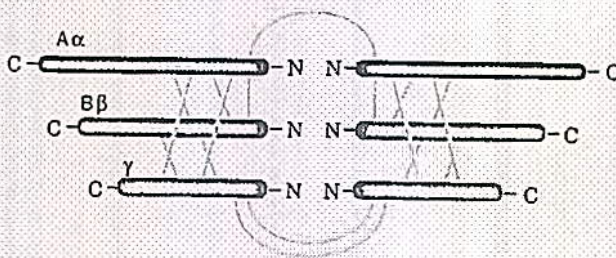


FIGURE 34-4. A schematic diagram of the structure of fibrinogen, $(A\alpha)_2(B\beta)_2\gamma_2$, in which the interchain disulfide bonds are represented by yellow lines.

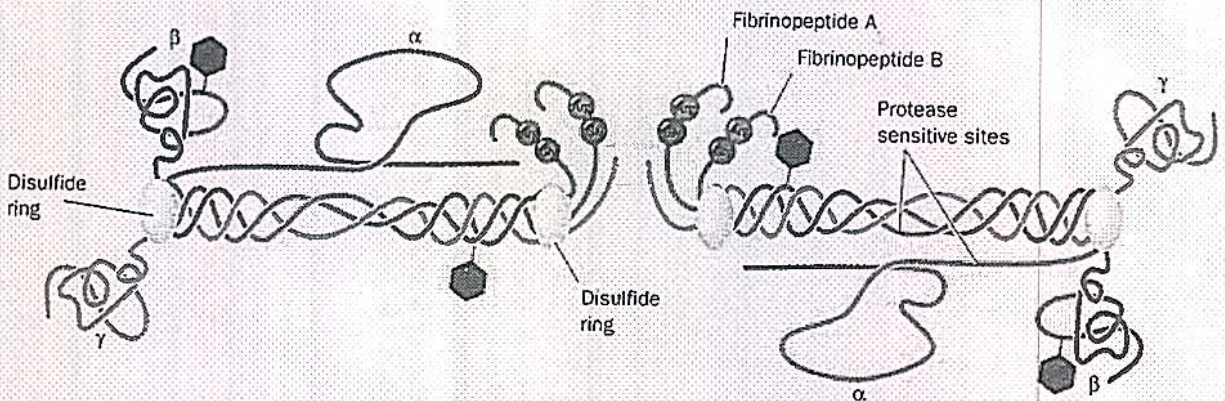


FIGURE 34-5. The proposed structure of fibrinogen based on low-resolution structural studies, primary structure determinations, and chain-folding predictions. The so-called disulfide rings are regions containing three disulfide bonds cyclically linking homologous segments of the α , β , and γ

Combined electron microscopic and low-resolution X-ray crystallographic studies indicate that fibrinogen is a twofold symmetric elongated molecule, ~ 450 Å in length, that has two nodules at each end and one in the middle (Fig. 34-3). Its 6 polypeptide chains are joined by 17 disulfide bonds, 7 within each half of the dimer and 3 linking these two protomers (Fig. 34-4). Structural indications together with sequence-based conformation predictions suggest that the central region of each protomer consists mainly of a three-stranded coiled coil of α helices in which the α , β , and γ chains each contribute a strand (Fig. 34-5). The peripheral nodules diagrammed in Fig. 34-3 are formed by the C-terminal domains of the β and γ chains. The C-terminal segment of the α chain apparently lacks a definite conformation and is therefore not represented in Fig. 34-3.

How does fibrin polymerize to form a clot? Thrombin specifically cleaves the Arg—X peptide bond (where X is Gly in most species) joining each fibrinopeptide to fibrin. Fibrin then spontaneously aggregates to form fibers that electron micrographs indicate have a banded structure that repeats every 225 Å (Fig. 34-6). This repeat distance is exactly half the 450-Å length of a fibrin monomer, suggesting that fibrin monomers associate as a half-staggered array (Fig. 34-7). But why do fibrin monomers aggregate while fibrinogen, which has an all but identical structure, remains in solution? The main reason is that the loss of the fibrinopeptides exposes otherwise masked sites that mediate intermolecular association (Fig. 34-7). In addition, fibrinogen aggregation is inhibited by charge—charge repulsions: The fibrinopeptides are highly anionic, so much so that fibrinogen's central region, where the fibrinopeptides reside, has a charge of -8 , whereas that of fibrin is $+5$. Fibrinogen's end segments each have a similar charge of -4 but maintain that charge in fibrin. The repulsions between fibrinogen's like-charged segments helps prevent this protein from ag-

chains. N-linked polysaccharides are represented by filled hexagons. The Arg—Gly bonds that are cleaved by thrombin in fibrin activation are indicated. [After the cover illustration, *Annu. N.Y. Acad. Sci.* 408 (1983).]

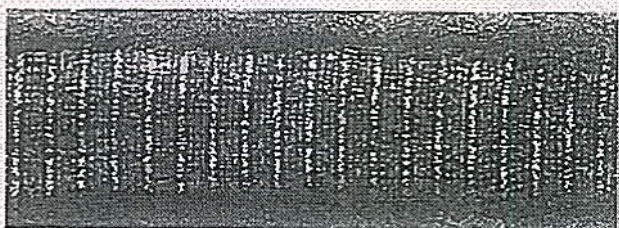


FIGURE 34-6. An electron micrograph of a fibrin fiber. The striations repeat every 225 Å, exactly half the length of a fibrin molecule. [Courtesy of John Weisel, University of Pennsylvania, and Carolyn Cohen, Brandeis University.]

gregating, whereas the attractions between fibrin's central and end segments promotes its specific association.

The diameters of fibrin fibers, which are fairly uniform (maximally ~50 nm), are important determinants of a clot's physical properties. What controls this fiber diameter? John Weisel and Lee Makowski have shown through electron microscopy studies that fibrin fibers are uniformly twisted. Consequently, the in-register molecules near the periphery of a twisted fiber must traverse a longer path than molecules near the fiber's center. The degree to which a molecule can stretch therefore limits the diameter of the fiber. Molecules add to the outside of a growing fiber until the energy to stretch an added molecule exceeds its energy of binding. A similar mechanism may limit the diameters of

other biological fibers such as those of collagen (Section 7-2C).

Fibrin-Stabilizing Factor Cross-Links Fibrin Clots

The above "soft clot," as this name implies, is rather fragile. It is rapidly converted to a more stable "hard clot," however, by the covalent cross-linking of neighboring fibrin molecules in a reaction catalyzed by **fibrin-stabilizing factor (FSF or XIII_a)**. This transamidase initially joins the C-terminal segments of adjacent γ chains by forming isopeptide bonds between the side chains of a Gln residue on one γ chain and a Lys residue on another (Fig. 34-8). Two such symmetrically equivalent bonds are rapidly formed between each neighboring pair of γ chains (Fig. 34-7). The α chains are similarly cross-linked to one another but at a slower rate. The physiological importance of fibrin cross-linking is demonstrated by the observation that individuals deficient in FSF have a pronounced tendency to bleed.

FSF is present in both platelets and plasma. Platelet FSF consists of two 75-kD α chains, whereas plasma FSF additionally has two 88-kD β chains. Both species of FSF occur as zymogens that undergo thrombin-catalyzed cleavage of a specific Arg—Gly bond near the N-terminus of each α chain with the consequent release of a 37-residue propeptide. This treatment activates platelet FSF, designated α_2 , but plasma FSF, $\alpha_2\beta_2$, remains inactive until its β chains dissociate, a process that is triggered by the binding of Ca^{2+} to the α' subunits. We shall see below that Ca^{2+} is an essential factor in most stages of the blood clotting cascade. The β

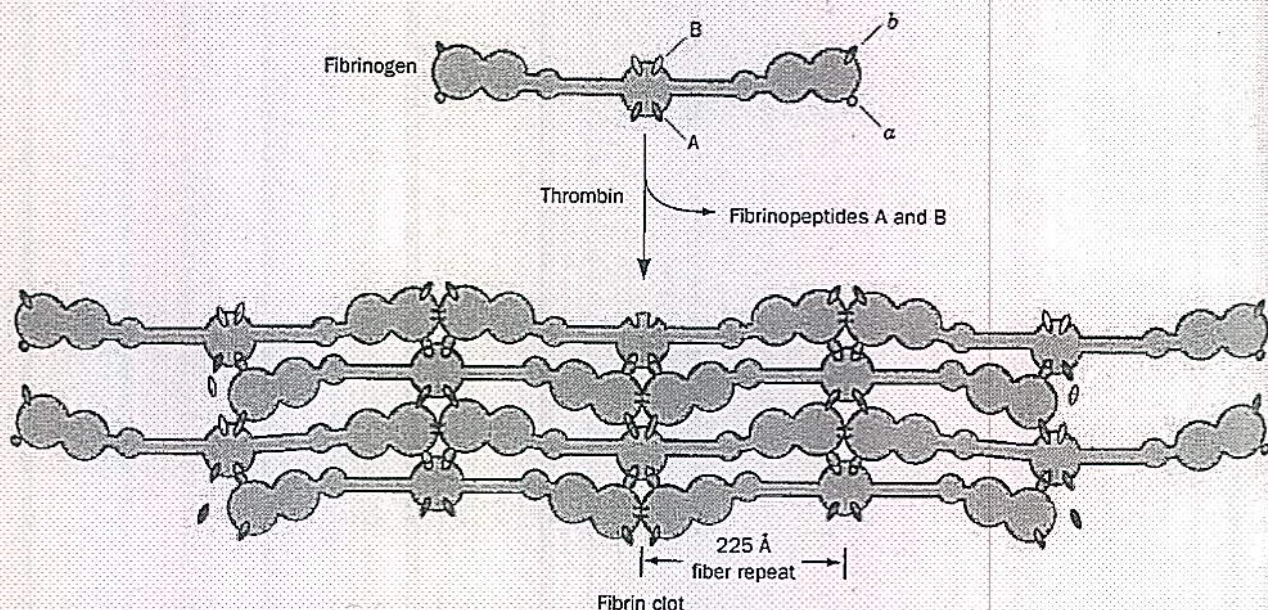


FIGURE 34-7. A model of the conversion of fibrinogen to a fibrin blood clot showing the half-staggered arrangement of its fibrin monomers. In "soft" clots, the fibrin monomers associate only by noncovalent interactions between knobs a and b that protrude from fibrin's γ chain and their complementary binding sites that are exposed by the excision of fibrinopeptides A and

B. In "hard" clots, however, fibrin monomers are also covalently cross-linked by isopeptide bonds between the C-terminal segments of the γ chains in neighboring molecules (red lines) as well as between the protruding segments of α chains (not shown). [After Weisel, J.W., *Biophys. J.* 50, 1080 (1986).]

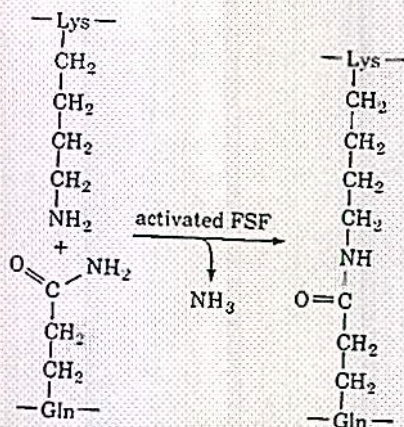


FIGURE 34-8. The transamidation reaction forming the isopeptide bonds cross-linking fibrin monomers in "hard" clots as catalyzed by activated fibrin-stabilizing factor (FSF, XIII_a).

subunits are thought to prolong the survival of plasma FSF in the circulation.

B. Thrombin Activation and the Function of Vitamin K

Thrombin is a serine protease that consists of two disulfide-linked polypeptide chains: in humans, a 36-residue A chain and a 259-residue B chain. The thrombin B chain is homologous to trypsin and has similar specificity but is far more selective: It cleaves only certain Arg—X and, less frequently, Lys—X bonds with a clear preference for a Pro preceding the Arg or Lys.

Human thrombin is synthesized as a 579-residue zymogen, **prothrombin (II)**, which is activated by two proteolytic cleavages catalyzed by activated **Stuart factor (X_a)**, the product of the preceding step of the clotting cascade. The cleavage of prothrombin's Arg 271—Thr 272 and Arg 320—Ile 321 bonds releases its N-terminal propeptide and separates the A and B chains (Fig. 34-9). The latter cleavage, which yields active enzyme, results in the formation of an ion pair between Ile 321 and Asp 524, much like that formed between chymotrypsinogen's homologous

Ile 16 and Asp 194 in the activation of this zymogen (Section 14-3E). Thrombin then autolytically cleaves its Arg 285—Thr 286 bond, thereby trimming away the N-terminal 13 residues of the A chain to yield **α-thrombin**, hereinafter referred to as simply thrombin (recall that chymotrypsin also undergoes an autolytic cleavage that does not affect its catalytic activity; Section 14-3E).

Prothrombin's propeptide consists of three domains (Fig. 34-9; left): an N-terminal 40-residue **Gla domain** (so named for reasons indicated below) followed by two 40% identical ~115-residue **kringle domains**. Kringles are crosslinked by three characteristically located disulfide bonds that gives these triple-looped sequence motifs a folded appearance as drawn in Fig. 34-9 reminiscent of a Scandinavian pastry of the same name. Gla domains and kringles occur in several of the proteins involved in the formation and the breakdown of blood clots.

Vitamin K Is an Essential Cofactor in the Synthesis of γ-Carboxyglutamate

Prothrombin, as well as the homologous factors VII, IX, and X, is synthesized in the liver in a process that requires an adequate dietary intake of **vitamin K** (Fig. 34-10; K for the Danish koagulation). Lack of vitamin K or the presence of a competitive inhibitor such as dicoumarol (which was discovered in spoiled sweet clover because it causes fatal hemorrhaging in cattle) or **warfarin** (a rat poison) causes the production of an abnormal prothrombin that is activated by factor X_a at only 1 to 2% of the normal rate. This observation was, at first, quite puzzling because normal and abnormal prothrombins seemed to have identical amino acid compositions. NMR studies eventually established, however, that normal prothrombin contains **γ-carboxyglutamate (Gla)** residues,

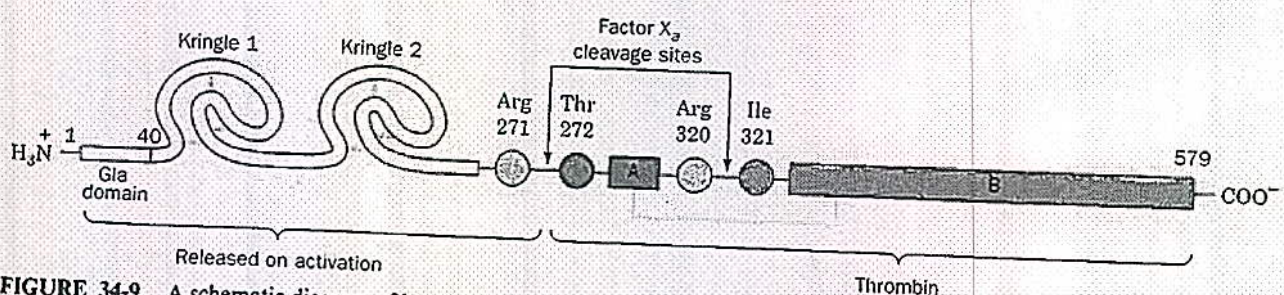
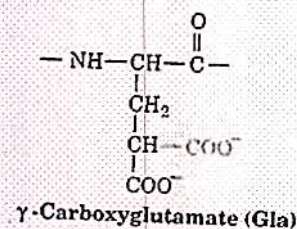


FIGURE 34-9. A schematic diagram of human prothrombin showing the two peptide bonds that are cleaved by factor X_a to form thrombin. The N-terminal propeptide, which consists of a Gla domain and two tandem kringle domains, is released in

this activation process, whereas thrombin's A and B peptides remain linked by one of the protein's several disulfide bonds (yellow lines). Thrombin then autolytically excises the A peptide's N-terminal 13 residues.