



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

04-118560

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

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 33/00

71. SOLICITANTE Schering Aktiengesellschaft

DOMICILIO Berlin, Alemania

74. APODERADO Guillermo Hallmann Restrepo

22. BOGOTÁ, D. C., 25 noviembre de 2004

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

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 **2.878.023** TP **5903**

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 (88)

Solicitud Internacional No. **PCT/US03/13522** Fecha **Abril 30 de 2003**

Publicación Internacional No. **WO 03/092602 A2** Fecha **Noviembre 13 de 2003**

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

⑦ Clasificación Internacional (51) A61K 38/00

⑧ PRIORIDAD:

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen
Estados Unidos

(32) Fecha
Mayo 1, 2002

(31) Numero de Solicitud
60/376,566

⑨ Comprobante de pago No. 04 - 94.215

Fecha **octubre 24, 2004**

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

Continuación nombre, dirección y domicilio de inventores:

<u>Nombre</u>	<u>Dirección</u>	<u>Domicilio</u>
MCLEAN Kirk	291 Capricorn Avenue,	Oakland, CA 94611 Estados Unidos

Otros anexos que se acompañan a la solicitud.

Copia formulario PCT/RO/101 correspondiente a la presentación de la solicitud internacional.

Copia formulario PCT/IB/304 correspondiente a la notificación relativa al envío o transmisión del documento de prioridad.

Copia formulario PCT/IB/301 correspondiente a la notificación de recibo de la copia de archivo copia del informe de búsqueda internacional.

Copia de la Enmienda del Listado de Secuencias bajo la Regla 5.2.



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

Berlín, 23 de Agosto de 1999

No. 05/99

El suscrito **ENCARGADO DE LAS FUNCIONES CONSULARES DEL CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN BERLIN**, República Federal de Alemania

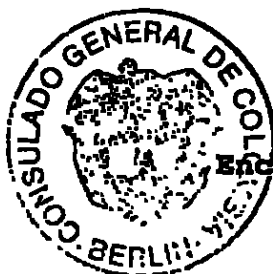
CERTIFICA:

1. Que el señor **GETFERDT**, quien autoriza el documento anterior, ejercía legalmente en la fecha allí indicada, las funciones del Presidente Encargado del Tribunal Regional de Berlín, y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.

2. Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía **SCHERING AG** domiciliada en Berlín, República Federal de Alemania, existe legalmente, y que actualmente ejerce su objeto social de acuerdo con las leyes del respectivo país.

3. Que los señores **UWE HARTMANN** y **WALTER KLOSE** quienes firmaron el poder que precede, están autorizados para representarla en este acto y otorgar el certificado.

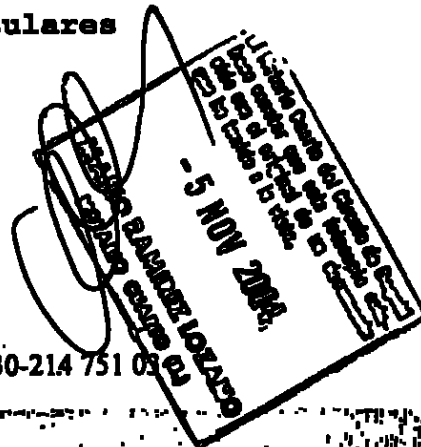
El Encargado de las Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.



GERMAN NEIRA

Encargado de las Funciones
Consulares

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE
Y DERECHOS CONSULARES
(103.00 US\$)



Tauentzienstr. 15, 10789 Berlin
TEL 030-214 751 63 - 030-214 751 64 - FAX 030-214 751 03

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

322052 *Naiza*
Camila
COMUNIDAD DE SEÑORÍA
DE RELACIONES EXTERIORES

SECRETARÍA DE RELACIONES
EXTERIORES DEL EXTERIO

1999 OCT 14 P 12:47
DEPARTAMENTO DE RELACIONES
EXTERIORES DEL EXTERIO

RECEIVED
- 5 NOV 2004
FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION
U.S. DEPARTMENT OF JUSTICE
WASHINGTON, D.C. 20535

51542 Colombia

PARA PATENTES, MARCAS Y LICENCIAS FARMACEUTICAS
FOR PATENTS, TRADE MARKS AND PHARMACEUTICAL LICENSES

The undersigned

acting on behalf of and representing

Company's
Name

domiciled in

Company's
Domicile

hereby appoint/s

Leave blank

domiciled in Bogotá, Republic of Colombia.

as our true and legal attorneys with the necessary powers; 1) to apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining letter patents, industrial designs and models, trademark registrations, registration of commercial names as well as their assignments, extensions, renewals and changes of name; 2) to prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3) intervene as plaintiffs or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public offices or authority in any judicial, administrative or police action, such as: actions dealing with commercial names; oppositions against trademark registrations; caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and exploitations of licenses; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages; claims or remarks on patent applications, industrial designs and models; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measures or appeals related to industrial property matters.

To this effect, I (we) hereby authorize him (them) to file applications, make descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and fees as provided by law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the above mentioned purposes and take all measures he (they) may deem convenient to protect my (our) interests, with all other necessary 'legal' faculties, and I (we) hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to my (our) benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on my (our) behalf any actions, as well as the faculty of receiving, deleting, transacting, compromising, substituting and revoking substitutions, taking notifications and appointing judicial or extrajudicial attorneys.

Signed in

On this day of

19

SCHERING AKTIENGESellschaft
ppa

Signature(s)
Firma(s)

Yo(nuestros)

Dr. Uwe Hartmann y Dr. Walter Klose

obrando a nombre y representación de

SCHERING AKTIENGESellschaft

con domicilio en

Müllerstr. 178

D-13353 Berlin / Germany

nombre(s) a

GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO y/o
LUIS PATIÑO LEYVA

domiciliado(s) en Bogotá, República de Colombia, en

Cra. 11A No. 94-76 - Of. 308

apoderados verdaderos y legales con poder especial amplio y suficiente: 1) Para recibir de las oficinas y autoridades colombianas, administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, de dibujos y modelos industriales, registro de marcas, depósito de nombres comerciales y enseñes, así como sus traslados, prórrogas, renovaciones y cambios de nombre; 2) elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clases; 3) intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas del nombre comercial, oposición al registro de marcas; acciones de caducidad y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos u observaciones a solicitudes de patentes, modelos y dibujos industriales; en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad industrial.

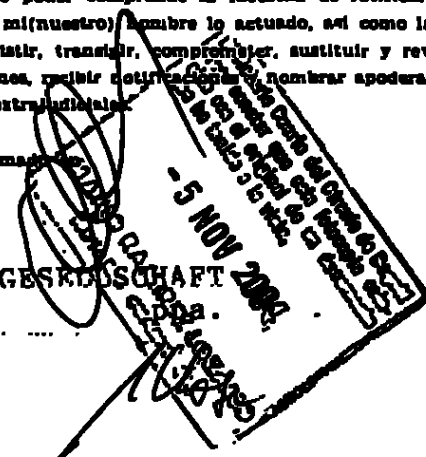
A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistír a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las demás facultades necesarias, y por este documento desde ahora declaro(amos) válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en mi (nuestro) beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi(nuestro) nombre lo actuado, así como la facultad de desistír, transigir, comprometer, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones, nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firma(s)

el

de 19



CONSULAR CERTIFICATION

COMPANIES

The undersigned Consul certifies: that the preceding signature(s) reading

is (are) authentic; that the signer(s) at present fills (fill) the position of

Corporation
Company's

of

that he (they) is (are) empowered to grant this power; and that said company exists and is organized in

in accordance with the laws of

All the foregoing facts are known to the Consul due to his having examined the respective documents to which he, the Consul, attests.

Signed in

On this day of

CERTIFICACION CONSULAR

SOCIEDADES

La infrascripta Cónsul certifica: que la(s) firma(s) que antecede(n) y dice(n)

es(son) auténtica(s); que el(los) signatario(s) desempeña(n) actualmente el(los) cargo(s) de

de

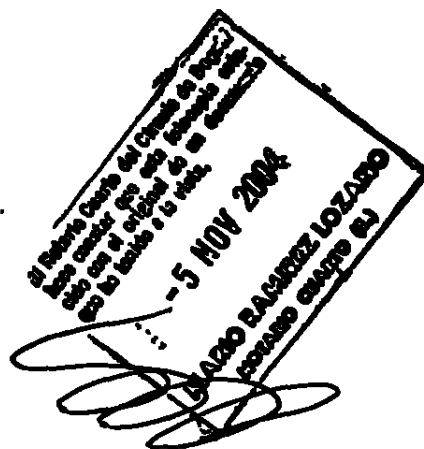
que tiene(n) facultad para otorgar este poder; y que dicha compañía existe y está organizada en

conforme a las leyes de

Todos los hechos anteriores le constan, por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Firmado en

El de de 19



Die vorstehenden, heute vor mir gefertigten Unterschriften der mir persönlich bekannten Prokuristen,

1. Dr. Uwe Hartmann,
2. Dr. Walter Klose,

- beide geschäftsansässig in 13353 Berlin,
Müllerstraße 178 -,

beglaubige ich hiermit.

Zugleich bescheinige ich aufgrund des mir vorliegenden beglaubigten Handelsregisterauszuges zum Aktenzeichen 93 HRB 283 des Amtsgerichts Berlin-Charlottenburg vom 17. Juni 1999, daß die vorgenannten Herren als Prokuristen gemeinsam zur Vertretung der Schering Aktiengesellschaft, Berlin, berechtigt sind.

Ich habe den Beteiligten das Mitwirkungsverbot des § 3 Abs. 1 Nr. 7 BeurkG erläutert. Meine Frage, ob eine meine Mitwirkung an der Amtshandlung ausschließende Vorbefassung vorliege, wurde von den Beteiligten verneint.

Berlin, den 11. August 1999
Urkundenrolle-Nr. 656/1999

Handwritten signature
Notarin

Kostenrechnung

§§ 141, 154 KostO

Geschäftswert: 20.000,00 DM

Beglaubigungsgebühr

§ 45 I

25,00 DM

Wegegebühr

§ 58

25,00 DM

Gebühr für Vertretungsbescheinigung

§ 150

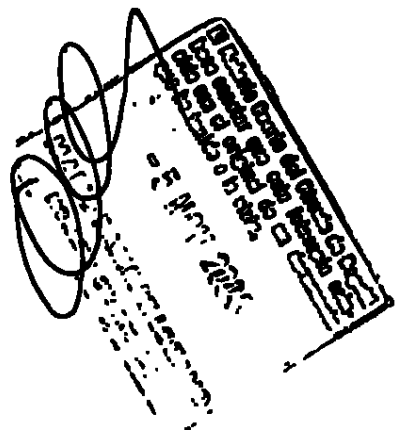
25,00 DM

16 % Mehrwertsteuer

12,00 DM

87,00 DM

Handwritten signature
Notarin



Die Echtheit vorstehender Unterschrift der Notarin

Elisabeth Quack

in Berlin und die Echtheit des beigedrückten Dienstsiegels werden hiermit bestätigt. Zugleich wird bescheinigt, daß die Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung gesetzlich befugt war.

Berlin, den 17. August 1999

Der Präsident des Landgerichts
Im Auftrag

Getferdt
(Getferdt)

Richterin am Landgericht

9101 E-F. 2233/99

Gebühr: 25,00 DM
gezahlt

Berlin, den 17. August 1999

Justiz
Justiz

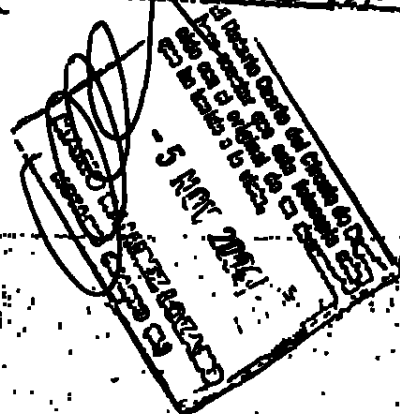
CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
Berlin, 23 Agosto 1999 No. 357/99

El suscrito Cónsul General de Colombia CERTIFICA:
Que R. Getferdt que autoriza el
presente documento ejerce legalmente en la fecha allí expresada
las funciones Encargado del Presidente
del Tribunal Regional de Berlín
y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos
son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.
El Cónsul no asume responsabilidad alguna por el contenido
del documento.



SECRETARÍA GENERAL
AVE. AMBROSIO MARTÍNEZ 143A
BOGOTÁ, COLOMBIA

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE
Y DERECHOS CONSULARES
(Valor de dólares: 22.00 (96))



~~SECRET~~

RESPONSABILIDAD DE
Nº 57 ASU/42 7770

1949 OCT 14 PM 12:17

JEFF DELEGALIZACIONES
SANTOFF DE RUMBA

el presente Comite del Consejo de Bogota
 para declarar que por consenso con
 fecha 11-11-2004 a las 15:00hs.
 -5 NOV 2004
 CARLOS RAMIREZ LOZANO
 SECRETARIO GENERAL

Traducción oficial del alemán de la notarización (Registro Notarial No. 656/1999) y de la legalización de firmas correspondientes al poder de la compañía SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT domiciliada D-13353 Berlín, República Federal de Alemania.

Por medio de este documento autentico oficialmente las firmas que aparecen anteriormente, ejecutadas en presencia mía el día de hoy por los Apoderados

1. Dr. Uwe Hartmann,

2. Dr. Walter Klose,

ambos con domicilio de negocios en Müllerstrasse 178, 13353 Berlín, y conocidos personalmente por la suscrita Notaria.

Al mismo tiempo, con base en el extracto autenticado del Registro Comercial HRB 283 Acta 93 del Juzgado Municipal de Berlín- Charlottenburg fechado el 17 de Junio de 1999, certifico que los mencionados Señores en su calidad de Apoderados están autorizados para representar conjuntamente a la compañía Schering Aktiengesellschaft domiciliada en Berlín.

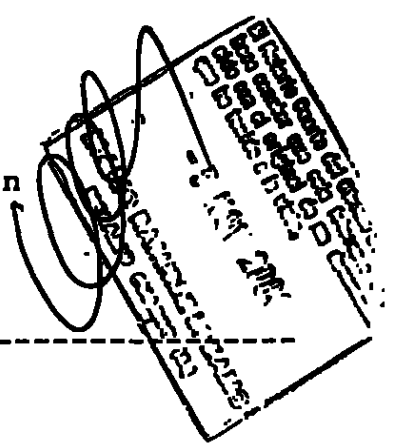
Yo les expliqué a los involucrados las prohibición de co-participación descrita en el Artículo 3 Inciso 1 Numeral 7 de la Ley de Certificaciones Notariales. Ellos contestaron negativamente mi pregunta acerca de si existía una prohibición que excluyera mi co-participación en este acto oficial.

Berlín, Agosto 11 de 1999

Registro Notarial No. 656/1999

Elisabeth Quack, Notaria en Berlín

(Firma y Sello Oficial)



------(continúa en la 2ª página)-----

Nota de gastos:

Artículos 141, 154 Disposición de ImpuestosValor del negocio: 20.000,-- DM

Derechos por autenticación Artículo 45I	25,00 DM
Derechos por concepto de porte Artículo 58	25,00 DM
Derechos por Cert. de Representación Art. 150	25,00 DM
16% Impuesto sobre el Valor Agregado	12,00 DM
Total:	87,00 DM

Elisabeth Quack, Notaria (firma)

Se confirma la autenticidad de la firma que aparece anteriormente, la cual pertenece a la Notaria Elisabeth Quack en Berlín, y también la autenticidad del sello oficial que aparece al lado de dicha firma. Al mismo tiempo, se certifica que la persona mencionada se encontraba legalmente autorizada para la ejecución de ese acto oficial.

Berlín, 17 de Agosto de 1999

Getferdt, Representante del Presidente Tribunal Regional

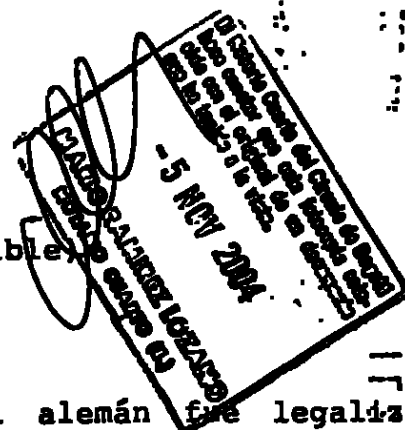
(Firma y Sello Oficial)

910 E-F. 2233/99

Impuesto: 25,00 DM pagado

Berlín, 17 de Agosto de 1999

La inspectora de Impuestos (firma ilegible)



El documento traducido del alemán fue legalizado bajo el No. 322052 y bajo el No. 322053 el 14 de Octubre de 1999 en la Oficina de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores.

ADOLF WATZKE
Traductor Oficial
Reg. 2439 Min. Relaciones Exteriores

NO SE ASUME.
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1999 OCT 20 11:08

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTIAFF DE BUNDTA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

323271.
ADOLF WATZKE
HA FIRMADO AFARECE EN EL
DOCUMENTO DESLIMPEN
LAS FUNCIONES INDICADAS

El Encarado del Círculo de Bogotá
tiene constancia que esta fotocopia es
fidelidad con el original de la documento
que se le indica a la cote.
-5 NOV 2004
MARIO RAMIREZ GARCIA
ENCARADO CÍRCULO (A)

DOCUMENTO DE CESIÓN ASSIGNMENT DOCUMENT

Los suscritos,
(We, the undersigned)

1) DAVID LIGHT
con domicilio en San Mateo, California, Estados Unidos de América
(domiciled in)

2) KIRK MCLEAN
con domicilio en Oakland, California, Estados Unidos de América
(domiciled in)

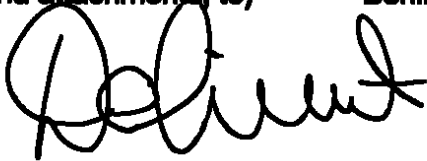
declaramos que somos los inventores de la invención que lleva el título
(declare that we are the inventors of the invention titled)

NOVEL TISSUE FACTOR TARGETED THROMBOMODULIN FUSION PROTEINS AS ANTICOAGULANTS

y que hemos cedido el derecho sobre esta invención en Colombia, junto con los privilegios
(and that we have assigned our rights over this invention in Colombia, together with its
privileges)

y anexidades a favor de
(and attachments, to)

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
Berlin, Alemania

1) 

2) 

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by ALISHIA L. ROWE-BABB*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of ALISHIA L. ROWE-BABB, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 5th day of November 2004*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 215041*
9. *Seal/Stamp:*

10. Signature



Kevin Shelley
KEVIN SHELLEY
Secretary of State

BY *[Signature]*



CALIF RNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of Contra Costa } ss.

On November 2, 2004 before me, Alishia L. Rowe-Babb
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

personally appeared David Light.
Name(s) of Signer(s)

- ☐ personally known to me
- ☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence



to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.
Alishia L. Rowe-Babb
Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
- ☐ Corporate Officer — Title(s): _____
- ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
- ☐ Attorney-in-Fact
- ☐ Trustee
- ☐ Guardian or Conservator
- ☐ Other: _____

Signer is Representing: _____

NOTARY PUBLIC SEAL

Top of thumb here

13

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by MARY ANN J. FLORES*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of MARY ANN J. FLORES, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 5th day of November 2004*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 215039*
9. *Seal/Stamp:*

10. Signature



Kevin Shelley
KEVIN SHELLEY
Secretary of State

BY

[Signature]



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

Contra Costa

ss.

On

October 29 2004

before me,

Mary Ann J. Flores, Notary

Date

Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

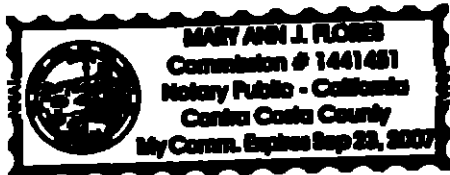
personally appeared

Kirk McLean

Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence



to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal

Mary Ann J. Flores
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document:

52295 Columbia Assignment M1

Document Date:

Number of Pages:

Signer(s) Other Than Named Above:

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name:

☐ Individual

☐ Corporate Officer — Title(s):

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney-in-Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other:

Signer Is Representing:



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



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

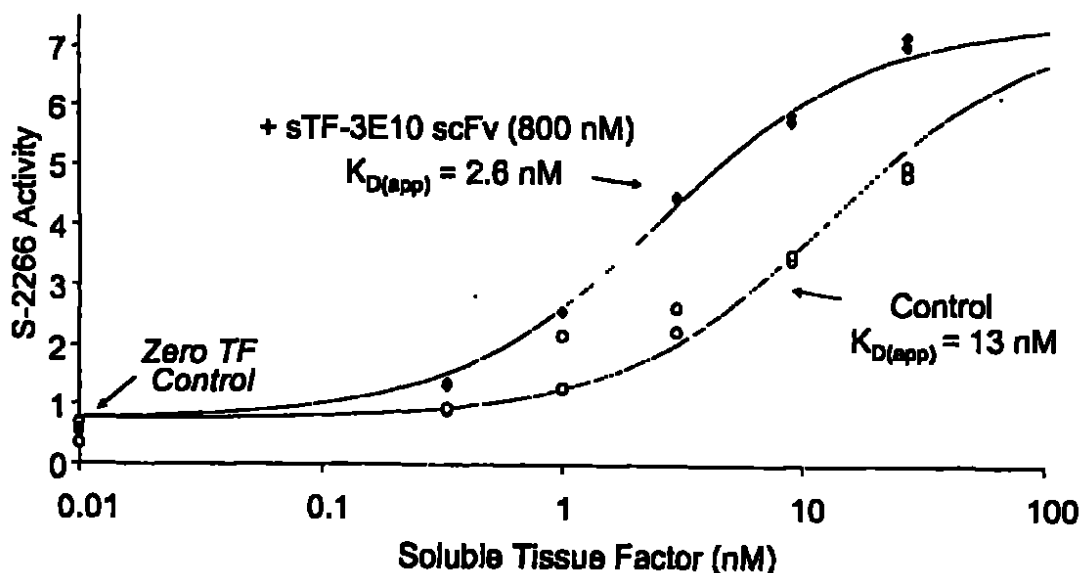
PCT

(10) International Publication Number
WO 03/092602 A2

- (51) International Patent Classification¹: A61K (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).
- (21) International Application Number: PCT/US03/13522
- (22) International Filing Date: 30 April 2003 (30.04.2003) (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, GH, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NI, NO, NZ, OM, PG, PI, 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.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/376,566 1 May 2002 (01.05.2002) US (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, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); D-13342 Berlin (DE).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): LIGHT, David [US/US]; 614 South Fremont Street, San Mateo, CA 94402 (US). MCLEAN, Kirk [US/US]; 291 Capricorn Avenue, Oakland, CA 94611 (US).
- 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.

NEW TISSUE FACTOR TARGETED THROMBOMODULIN FUSION PROTEINS AS ANTICOAGULANTS

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

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 μ M) is significantly below the reported K_m (5 μ M) 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.

SUMMARY OF THE INVENTION

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.

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-2286) 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 S2286. 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.

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 IC₅₀ 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 (ln 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 20 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 S2286 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 S2286 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 (Alexon 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-TM456 is efficacious in an *in vivo* model of disseminated intravascular coagulation ("DIC"). TF antibody (scFv(TF)3e10) and fusion (scFv(TF)3e10-TM456) 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 80% lethality (LD₈₀). scFv(TF)3e10-TM456 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-TM456 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-TM456 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-TM456 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-TM456 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.

25

"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.

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 228-344 is EGF123, consisting of the EGF-like repeats 1, 2 and 3 (residues 228-344); 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.

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 require 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 (*Bacillus Calmette-Guérin*) and *Corynebacterium 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.

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.

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 ("TM456"), 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 an 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 an 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 an 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

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).

Analog, Fragment, 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.

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.

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, carbodlimide, 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 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 (TM456). 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 IgM) V_κ 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 (3.8×10^8 members), pZ604- V_κ (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_κ and V_L genes were PCR amplified from the pZ604- V_κ and pZ604- V_L library with reverse J_H and linker sequence at the 5' end. The gel purified V_H , V_κ 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 5.2×10^8 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 TM456 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 – TM456, 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 R458G 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 TM456. 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-TM456 (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-TM456Δ (SEQ ID NO:3), is depicted in Example 3.

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.

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 line 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 cits857 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, isocytichrome 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 (Hiltzman, 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 YpGX285GAL4 (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).

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.

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

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

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* 1:387-384; U.S. Patent 4, 797,388, 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., All *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. All *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 (All *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

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. (1988) *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 may be 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+ Δ -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

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.

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

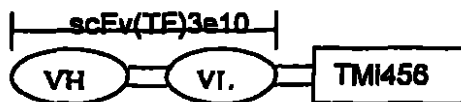
Single Chain Anti-TF Antibody Construct scFv(TF)3e10

(-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
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)

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

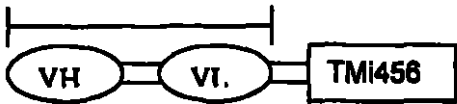


```
(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P E M A Q
V N L R E S G G T L V Q P G G S L R L S C A A S
G F S F T D A W M S W V R Q A P G K E L E W V S
S I S G S G G S T Y Y A G S V K G R F T I S R D
N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
R V L S L T D Y Y W Y G M D V W G Q G T L V T V
S A G G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



(-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 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), VH domain (1 to 126), VH-VL linker (127 to 131), VL domain (132 to 243), VL-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 Bacteria/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.

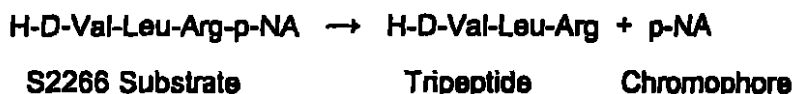
The amount of activated protein C formed was detected by adding 100 µl of 1 mM S2266 (in assay diluent), and continuing to incubate the plate at 37°C. The absorbance at 405 nm in each well was read every 10 seconds for 30 minutes, using a Molecular Devices plate reader. The absorbance data was stored,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

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

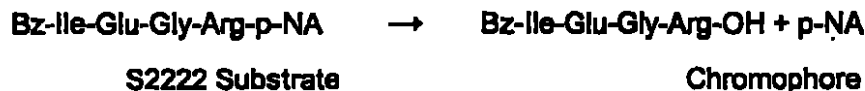
Assay Procedure:

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-0080, 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.

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 BIAcore, 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,

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-TM1456

The characteristics of a fusion protein of the invention, scFv(TF)3e10-TM1456, was assessed in a variety of *in vitro* assays. The fusion protein, scFv(TF)3e10-TM1456, 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 Tm1456 alone in the absence of TF-containing phospholipid vesicles. In contrast,

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 80% lethality (LD₈₀), 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.

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.

What is claimed is:

- 340
EGF 123
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 FVIIa.
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.

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.

29. 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.

Figure 1

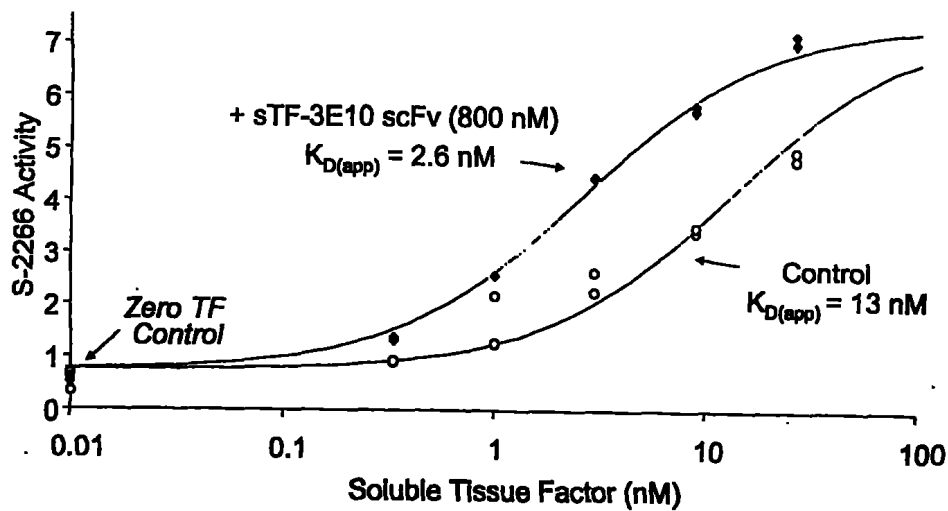


Figure 2

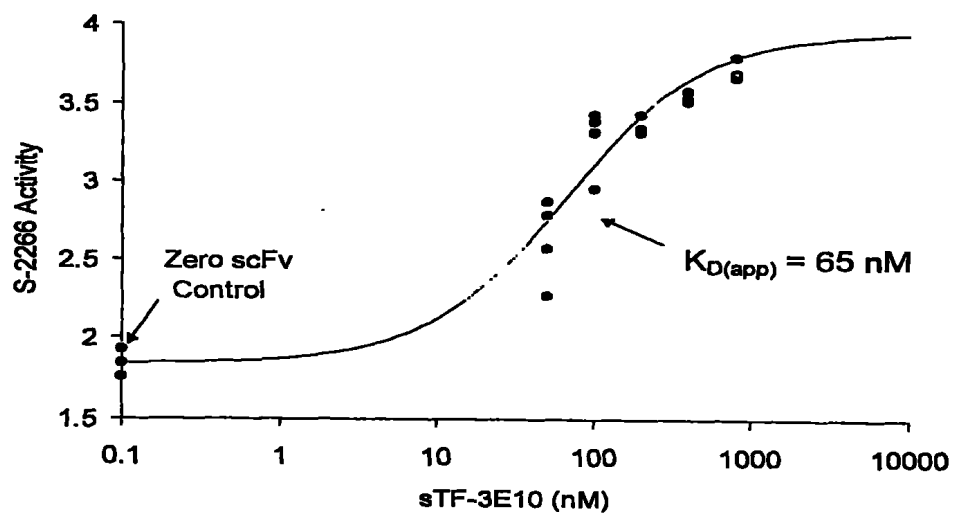


Figure 3

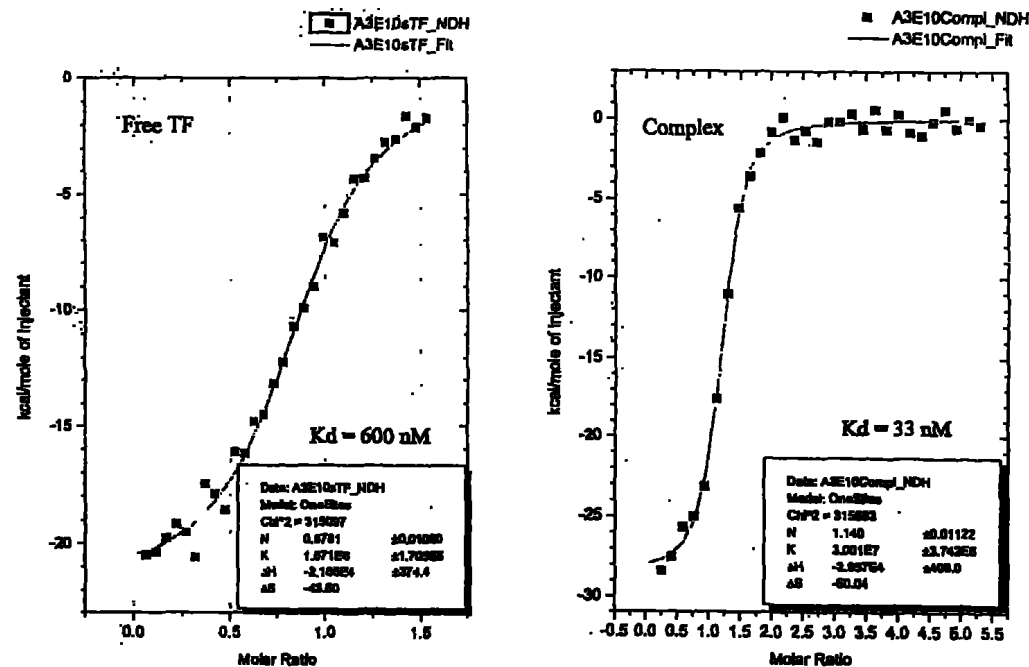


Figure 4

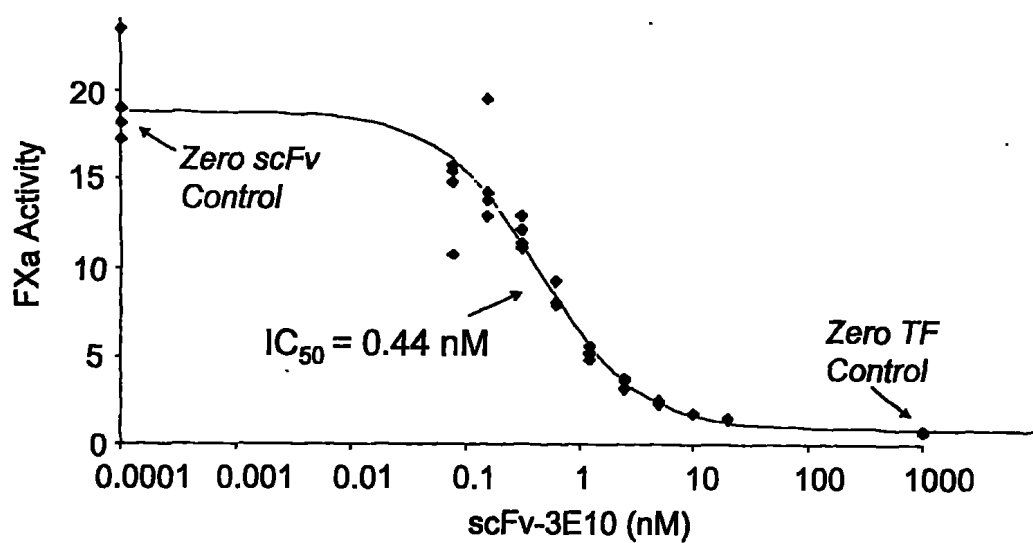


Figure 5

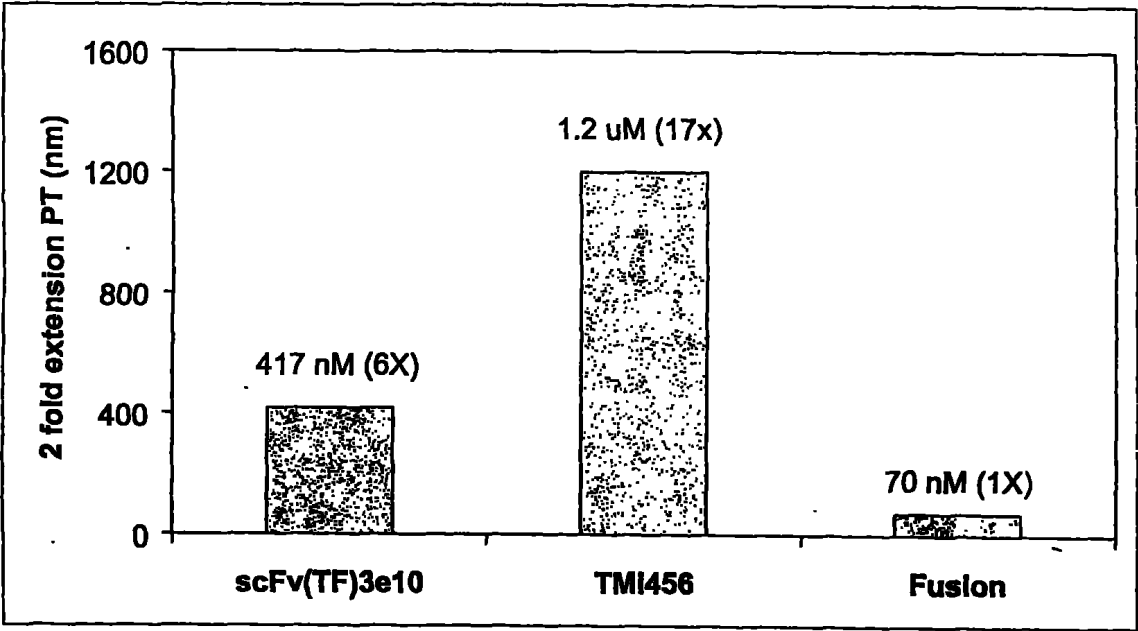


Figure 6

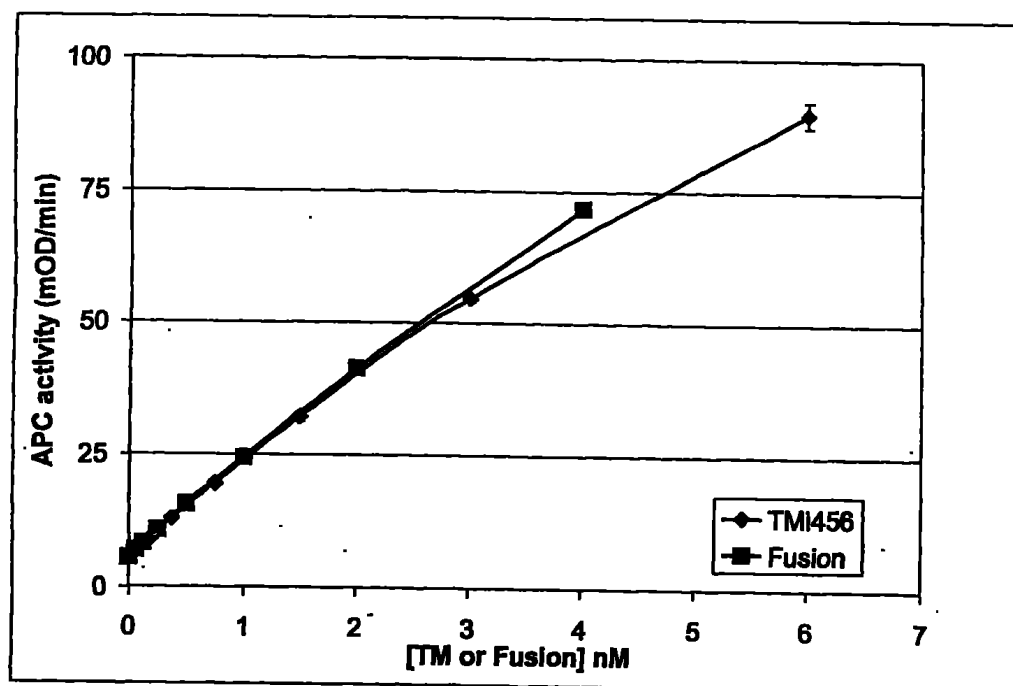


Figure 7

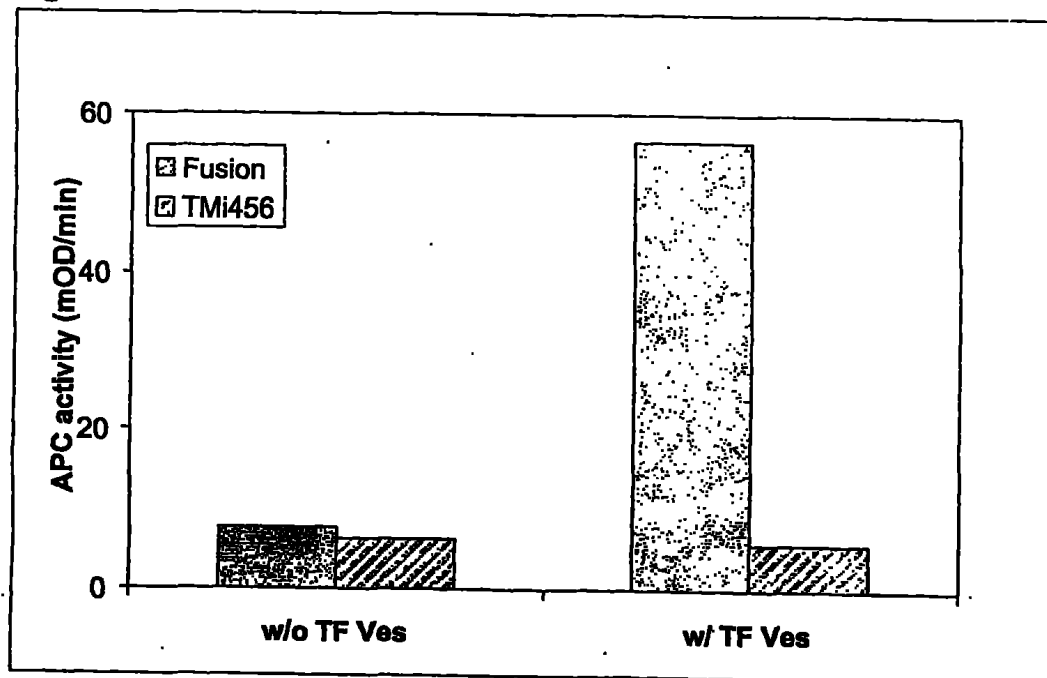


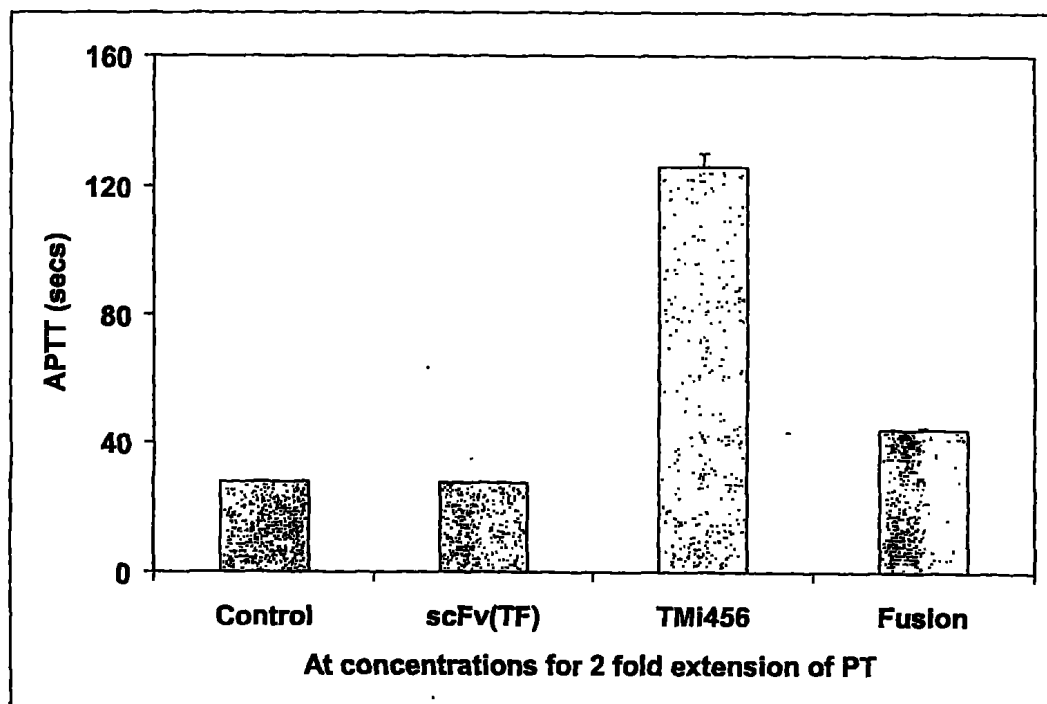
Figure 8

Figure 9

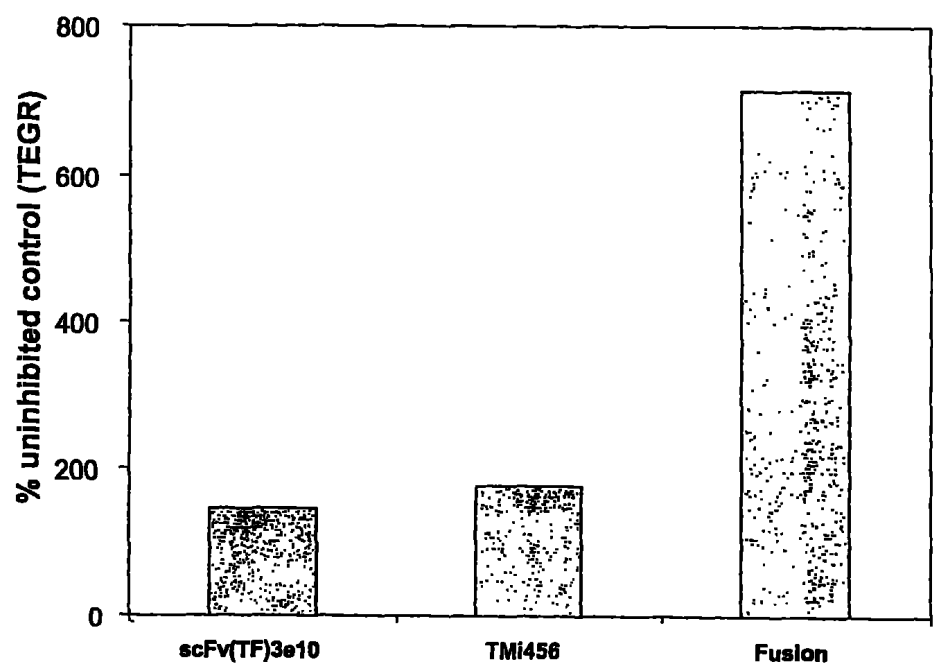


Figure 10

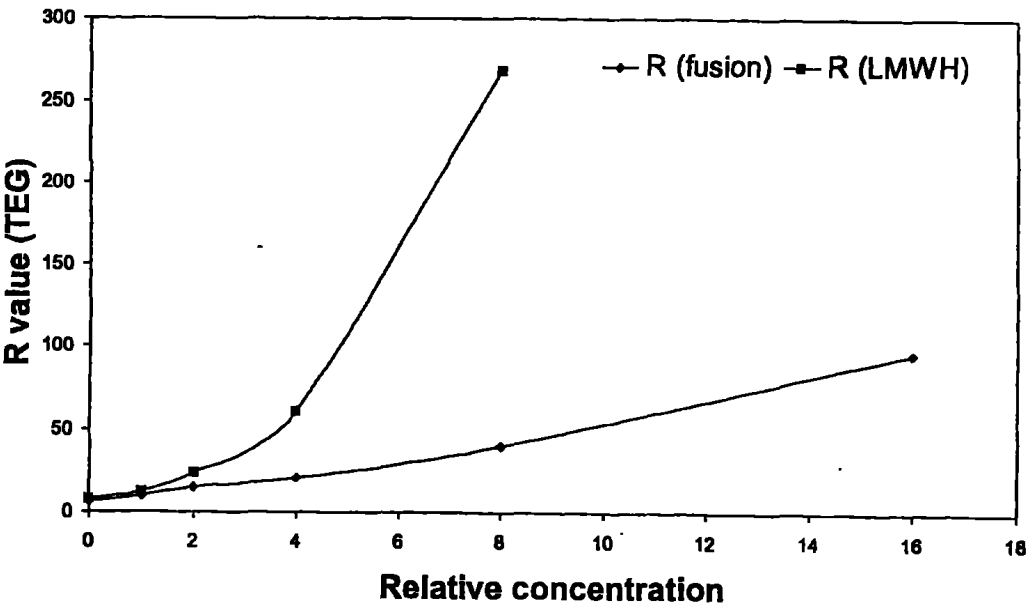
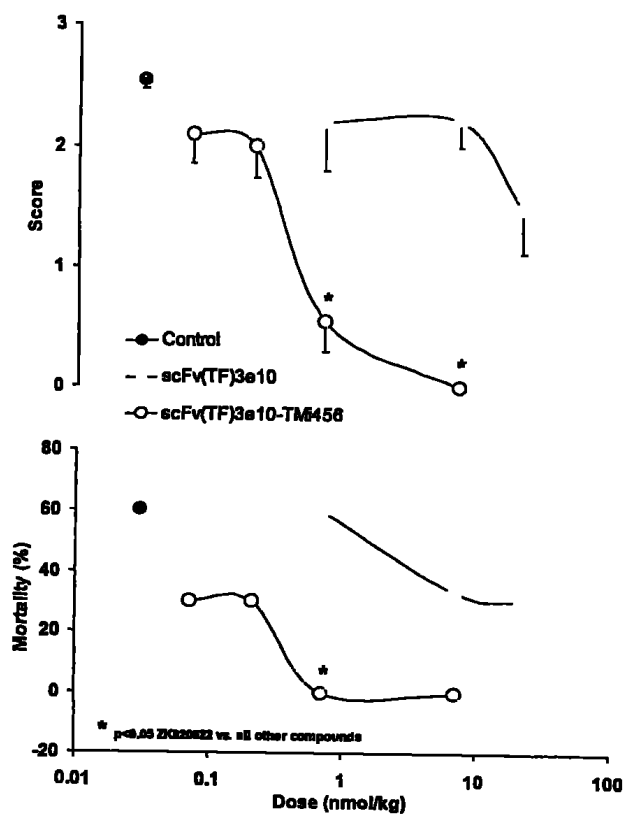


Figure 11



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

WO 03/092602

PCT/US03/13522

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

WO 03/092602

PCT/US03/13522

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	

- (12) **Publicación de la solicitud Internacional bajo PCT**
 - (19) **Organización Mundial de Propiedad Intelectual**
Oficina Internacional
 - (43) **Fecha de publicación internacional : 13 de noviembre de 2003**
(13.11.2003)
 - (10) **Número de publicación Internacional: WO 03/092602 A2**
-

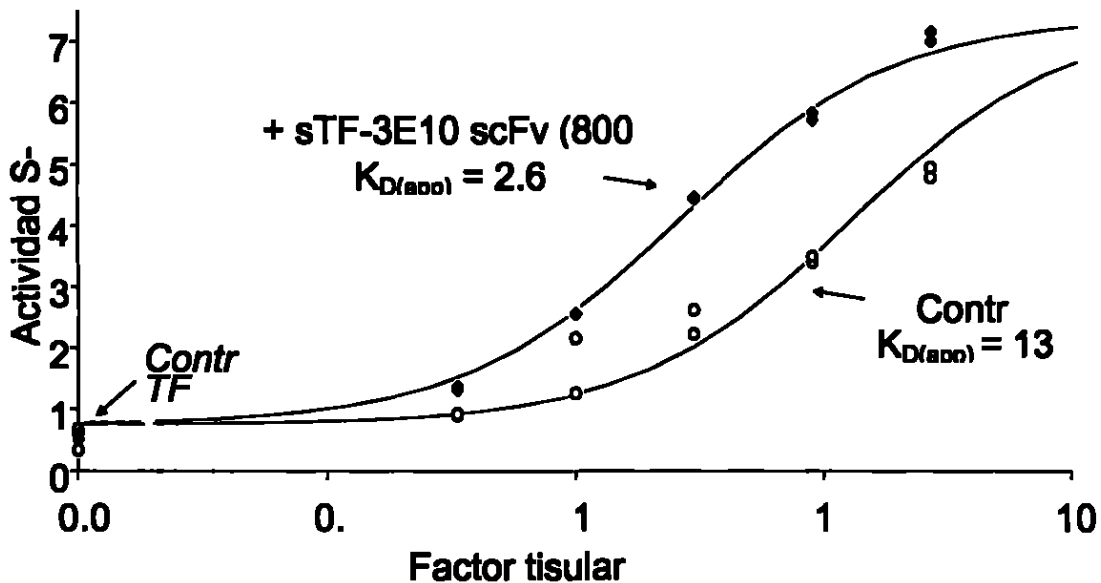
- (51) **Clasificación Internacional de patentes: A61K**
- (21) **Número de solicitud Internacional: PCT/US03/13522**
- (22) **Fecha de presentación Internacional: 30 de abril de 2003 (30.04.2003)**
- (25) **Idioma de la presentación: inglés**
- (26) **Idioma de la publicación: inglés**
- (30) **Antecedentes de prioridad: 60/376,566 1 de mayo de 2002**
(01.05.2002) US
- (71) **Solicitante (para todos los estados designados excepto los EE.UU.):**
SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT [DE/DE], 13342 Berlin (DE).
- (72) **Inventor; y**
- (75) **Inventor/solicitante (solo para los EE.UU.): 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) **Agentes: ZELANO, Anthony, J. et al.; Millen, White, Zelano &**
Branigan, P.C., Suite 1400, Arlington Courthouse Plaza 1, 2200
Clarendon Boulevard, Arlington, VA 22201 (US).
- (81) **Estados designados(nacional): 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) **Estados designados(regional): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW,**
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente euroasiatica (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (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), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- **sin el informe de búsqueda internacional y a ser republicada después de**
recibido dicho reporte.
-

[Continúa en la siguiente página]

(54) Título: Nuevas proteínas de fusión con trombomodulina dirigidas contra factores tisulares como anticoagulantes



(57) Resumen: Nuevas proteínas de fusión compuestas de una proteína direccionadora que se une al factor tisular (TF), ligadas operativamente al dominio EGF456 de la trombomodulina (TM) ya sea sola o en combinación 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 de los mismos. La proteína de fusión se une en el sitio de una lesión e impide el inicio de una trombosis. La proteína de fusión se puede usar en el tratamiento de diversas condiciones trombóticas, incluyendo, por ejemplo, la trombosis venosa profunda, la coagulación intravascular diseminada y el síndrome coronario agudo.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference BERLX 282 WO	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US03/13522	International filing date (day/month/year) 30 April 2003 (30.04.2003)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 01 May 2002 (01.05.2002)
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:



contained in the international application in written form.



filed together with the international application in computer readable form.



furnished subsequently to this Authority in written form.



furnished subsequently to this Authority in computer readable form.



the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.



the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



because the applicant failed to suggest a figure.



because this figure better characterizes the invention.



None of the figures

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article," "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended ?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When ? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments ?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How ? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments ?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

PCT Informe de Búsqueda Internacional

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

Referencia del solicitante o del agente BERLX 282 WO	PROCEDER Ver notificación del envío del informe de búsqueda internacional (formulario PCT/ISA/220), así como, en tanto corresponda, el siguiente punto 5.	
Referencia Internacional PCT/US 03/13522	Fecha de presentación Internacional 30 de abril de 2003 30/04/2003	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) 01 de mayo de 2002 (01/05/2002)
*Solicitante SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el organismo de búsquedas internacionales y, de acuerdo con el artículo 18, se envía al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este Informe de búsqueda Internacional comprende, en total, 3 hojas.

- ☒ Se adjunta también una copia de cada uno de los antecedentes del estado de la técnica mencionado en este Informe

1. Fundamentos del Informe

- a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional fue llevada a cabo, en tanto no se indique otra cosa en este punto, en el idioma en que se basa la solicitud internacional presentada.

- ☐ La búsqueda internacional fue llevada a cabo basada sobre una traducción de la solicitud internacional suministrada a este organismo (regla 23.1 b)).

- b. Con respecto a los nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la solicitud internacional, la búsqueda internacional fue llevada a cabo basada sobre el protocolo de secuencias que

- ☐ está contenido en forma escrita en la solicitud internacional.
☐ fue presentado en forma legible por computadora junto con la solicitud internacional.
☐ fue suministrado posteriormente ante el organismo por escrito.
☐ fue suministrado posteriormente ante el organismo en forma legible por computadora.
☐ se presentó la declaración de que el protocolo de secuencia suministrado posteriormente no supera el contenido revelado en la solicitud internacional en el momento de la presentación.
☐ se presentó la declaración de que las informaciones verídicas en forma legible por computadora se corresponden con el protocolo de secuencias suministrado por escrito.

2. ☐ Determinadas reivindicaciones no eran investigables (ver campo I).

3. ☐ Falta de uniformidad de la invención (ver campo II).

4. Con respecto al título de la invención,

- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por el organismo como sigue:

5. Con respecto al resumen,

- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por el organismo de acuerdo con la regla 38.2 b), tal como aparece en el campo III. El solicitante puede presentar una posición ante este organismo en el transcurso de un mes a partir de la fecha del envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. La figura de las ilustraciones a ser publicada con el resumen es la figura N° _____

- ☐ como se sugiere el solicitante ☒ ninguno de los dibujos
☐ porque el solicitante no sugiere ninguna figura.
☐ porque esta figura caracteriza mejor la invención.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		Referencia Internacional PCT/US 03/13522
A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
IPC 7 : A61K 38/19; C07K 14/52		
Según la clasificación internacional de patentes (IPC) o la clasificación internacional la IPC		
B. ÁMBITOS INVESTIGADOS		
Material mínimo investigado (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación)		
U.S.: 424/192.1; 514/8; 530/350		
Publicaciones investigadas pero no pertenecientes al material mínimo investigado, en tanto pertenezcan al ámbito investigado		
Banco electrónico de datos consultado durante la búsqueda internacional (nombre del banco de datos y expresiones de búsqueda eventualmente empleadas)		
Ver hoja de continuación		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Denominación del documento, así como, de ser requerido, indicación de los países relevantes	Relevante para la reivindicación N°
Y	US 5,874,407 A (KELLEY ET AL.), 23 de febrero de 1999 Ver documento completo	1 - 28
Y	US 5,298,599 /REZAIE ET AL. 29 de marzo de 1994 Ver documento completo	1 - 28
☐ Se pueden escoger otras publicaciones en la continuación del campo C ☐ Ver familia de patentes en el anexo		
A	Categorías particulares indicadas en publicaciones	*T*
B	publicación que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante	*T*
L	documento anterior pero publicado recién o después de la fecha de presentación internacional	*X*
O	publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada)	*Y*
P	publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones	*Z*
	publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada	
Fecha de finalización de la búsqueda internacional 19 de octubre de 2003 (19.10.2003)		Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional 16 de julio de 2004)
Nombre y Código Postal del ISA/US Mail Stop PC, Attn.: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Fax: N° (703) 305-3230		Funcionario Apoderado Phillip Gambel Teléfono N° 703-308-0198

Continuación de B. ÁMBITOS INVESTIGADOS, ítem 3

DIALOG, BIOSIS, CA, EMBASE, MEDLINE, WEST

Expresiones buscadas: tissue factor, thrombomodulin, fusion protein, antibod?, single chain, 3e10, thrombus, coagulation, cancer, graft?, transplant?, light, mclean

PATENT COOPERATION TREATY

90

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
ANTHONY J. ZELANO
MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
ARLINGTON COURTHOUSE PLAZA 1
2200 CLARENDON BOULEVARD, SUITE 1400
ARLINGTON, VA 22201

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference BERLX 282 WO	Date of Mailing (day/month/year) 18 JUL 2004
International application No. PCT/US03/13522	International filing date (day/month/year) 30 April 2003 (30.04.2003)
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.33

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 bis.1 and 90 bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

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

Phillip Gambel

Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/220 (April 2002)

(See notes on accompanying sheet)

Action: _____
Due Date: _____
Performed: *Search report*
By: *23 SEP 04*

INTERNATI NAL SEARCH REPORT

91
PCT/US03/13522

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

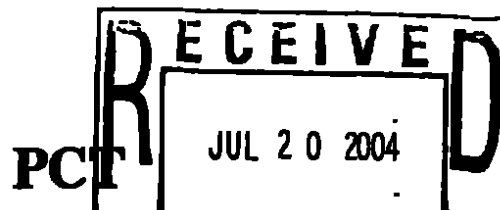
DIALOG, BIOSIS, CA, EMBASE, MEDLINE, WEST

search terms: tissue factor, thrombomodulin, fusion protein, antibody, single chain, 3e10, thrombus, coagulation, cancer, graft?,
transplant?, light, nucleus

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
ANTHONY J. ZELANO
MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
ARLINGTON COURTHOUSE PLAZA 1
2200 CLARENDON BOULEVARD, SUITE 1400
ARLINGTON, VA 22201



NOTIFICATION OF TRANSMISSION OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference BERLX 282 WO	Date of Mailing (day/month/year)
International application No. PCT/US03/13522	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT	International filing date (day/month/year) 30 April 2003 (30.04.2003)

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 bis.1 and 90 bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1430
Alexandria, Virginia 22313-1430
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Philip Gembel

Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/220 (April 2002)

(See notes on accompanying sheet)

Int 19 Due 09/16/04

07/20/04

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
none

Electronic 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 (REZAI 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:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A" document member of the same patent family
"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
18 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

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

Remitente: EL ORGANISMO ENCARGADO DEL INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

A

ANTHONY J. ZELANO
MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
ARLINGTON COURTHOUSE PLAZA 1
2200 CLARENDON BOULEVARD, SUITE 1400
ARLINGTON, VA 22201

PCT

NOTIFICACIÓN DE ENVÍO DEL INFORME DE
BÚSQUEDA INTERNACIONAL
O DE LA DECLARACIÓN

(regla PCT Nº 44.1)

	Fecha de envío (día/mes/año) 16.07.2004
Referencia del solicitante o del agente BERLX 282 WO	PROCEDER Ver abajo, puntos 1 y 4
Solicitud Internacional Nº PCT/US 03/13522	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) 30 de abril de 2003
Solicitante SHERING AKTIENGESELLSCHAFT	

1. ☒ Se notifica al solicitante de la confección del Informe de Búsqueda Internacional y de que se lo envía aquí adjunto.

Presentación de modificaciones y una declaración, según artículo 19:
El solicitante puede modificar por su propia voluntad las reivindicaciones de la solicitud internacional (ver regla 46):

¿Cuándo? El plazo para la presentación de tales modificaciones es usualmente de dos meses a partir del envío del Informe de Búsqueda Internacional; otros detalles se puedan obtener de las observaciones de la hoja adjunta.

¿Dónde? Directamente en la Oficina Internacional de la WIPO,
34, chemin des Colombettes, CH-1211 Ginebra 20. Telefax Nº: (41-22) 740.14.35

Otras indicaciones detalladas se pueden obtener en las observaciones de la hoja adjunta.

2. ☐ Se notifica al solicitante que no se confecciona un Informe de Búsqueda Internacional y de que, según el artículo 17(2)a, se envía aquí la declaración.

3. ☐ Acerca de la objeción contra el pago de una tasa(s) adicional(es) según la regla 40.2, se informa al solicitante que:

☐ la objeción y la resolución han sido enviadas desde aquí, junto con su solicitud de envío del texto, así como el requerimiento del solicitante de impulsar la objeción y la resolución, a los organismos designados por la Oficina Internacional.

☐ No existe ninguna resolución acerca de la objeción; el solicitante será informado en cuanto se tome una resolución.

4. **Recordatorio**

Brevemente tras el transcurso de 18 meses a partir de la fecha de prioridad la Oficina Internacional publicará la solicitud internacional. Si el solicitante quiere impedir o postergar la publicación, debe presentar en la Oficina Internacional, según la regla 90^{ter}.1 a 90^{ter}.3, antes de concluir las preparaciones técnicas para la publicación internacional, una declaración acerca del desistimiento de la solicitud internacional o de la reivindicación de prioridad.

Cuando el solicitante desea postergar en hasta 30 meses (en algunos organismos hasta más) a partir de la fecha de prioridad el ingreso en la fase nacional, debe presentar, solo en determinadas oficinas designadas, una solicitud de Examen Preliminar Internacional dentro de los 18 meses a partir de la fecha de prioridad; de otra manera, el solicitante deberá realizar los actos prescritos para entrar en la fase nacional ante tales oficinas designadas dentro del plazo de 20 meses a partir de la fecha de prioridad..

Con respecto a otras oficinas designadas, se aplica el plazo de 30 meses (o más aún) si no se presenta una demanda en 18 meses.

Ver el anexo del formulario PCT/IB/301 y, para los detalles de los plazos aplicables, oficina por oficina, ver el PCT Applicant Guide, Volume II, National Chapter y el sitio de Internet de WIPO.

Nombre y dirección postal de IAS/US Mail Stop PCT, Attn.: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimil Nº (703) 305-3230	Funcionario autorizado Phillip Gambel Telefono Nº: 703-308-0196
---	---

Formulario PCT/ISA/220 (abril 2002)

(ver notas en la hoja adjunta)

INSTRUCCIONES PARA EL FORMULARIO PCT/ISA/220

Estas instrucciones son indicaciones básicas para la presentación de modificaciones según el artículo 19. Estas observaciones se basan sobre los requisitos del Tratado de Cooperación Internacional en Materia de Patentes (PCT), del reglamento de aplicación y de las normas administrativas del mismo. Ante diferencias entre estas observaciones y los textos mencionados anteriormente son aplicables los últimos. Otros detalles se pueden obtener en el *PCT Applicant's Guide*, una publicación de la WIPO.

Las expresiones "artículo", "regla" y "párrafo" empleados en estas instrucciones se refieren siempre a las disposiciones del Tratado PCT, al reglamento de aplicación PCT o a las normas administrativas PCT.

INSTRUCCIONES CONCERNIENTES A MODIFICACIONES SEGÚN ARTÍCULO 19

Luego de recibir el Informe de Búsqueda Internacional, el solicitante tiene la posibilidad de modificar una vez las reivindicaciones de la solicitud internacional. Sin embargo, se debe hacer notar que, dado que todas las partes de la solicitud internacional (reivindicaciones, descripción y figuras) pueden ser modificadas durante el Examen Preliminar Internacional, no existe usualmente la necesidad de presentar modificaciones de las reivindicaciones según el artículo 19, excepto cuando el solicitante desea la publicación de estas reivindicaciones o presenta algún otro motivo para la modificación de las reivindicaciones de su publicación internacional, por ejemplo, a los fines de una protección provisoria. También se debe tomar en consideración que una protección provisoria se puede obtener solo en algunos estados.

¿Que partes de una solicitud internacional pueden ser modificadas?

En el marco del artículo 17 solo pueden ser modificadas las reivindicaciones.

En la fase internacional, según el artículo 34, las reivindicaciones también pueden ser modificadas (o nuevamente modificadas) ante el organismo encargado del examen preliminar internacional. Según el artículo 34, la descripción y las figuras solo pueden ser modificadas ante el organismo encargado del Examen Preliminar Internacional.

Al ingresar en la fase nacional, según el artículo 28 o, en casos dados, el artículo 41, pueden ser modificadas todas las partes de la solicitud internacional.

¿Hasta cuando se pueden presentar modificaciones?

Dentro de los dos meses a partir del envío del informe de búsqueda internacional o dentro de dieciséis meses a partir de la fecha de prioridad, según el plazo que venza más tarde. No obstante, las modificaciones son consideradas como válidas cuando son enviadas a la Oficina Internacional luego del plazo establecido pero antes de la conclusión de las preparaciones técnicas para la publicación internacional (regla 48.1).

¿Dónde no se deben presentar las modificaciones?

Las modificaciones solo pueden ser presentadas ante la Oficina Internacional y no en la Oficina de Presentación o en el Organismo de Búsquedas Internacionales (regla 48.2).

Ver abajo donde se pueden presentar un requerimiento de Examen Preliminar Internacional.

¿En que forma pueden ser llevadas a cabo las modificaciones?

Una modificación puede proceder en la versión presentada mediante la eliminación de una o varias reivindicaciones, mediante el agregado de una o varias reivindicaciones nuevas o mediante modificaciones del texto de una o varias reivindicaciones.

Se debe presentar una hoja de reemplazo por cada hoja de reivindicaciones que, como consecuencia de una o varias modificaciones, se diferencia de la presentada originalmente.

Todas las reivindicaciones que aparezcan una hoja de reemplazo deben estar numeradas con cifras arábigas. Así, cuando se elimina una reivindicación, las demás no deben ser numeradas nuevamente. En el caso de una nueva numeración, las reivindicaciones deben ser numeradas en forma consecutiva (normas administrativas, ítem 205b)).

Las modificaciones deben estar redactadas en el idioma en que fue publicada la solicitud internacional.

¿Qué antecedentes deben acompañar a las modificaciones?

Escrito adjunto (ítem 205b)):

Las modificaciones se deben presentar con un escrito adjunto.

El escrito adjunto no se publica junto con la solicitud internacional y las reivindicaciones modificadas. No se debe confundir con "declaración según artículo 19(1)" (Ver abajo, "aclaración según artículo 19(1)").

El escrito adjunto puede estar redactado, a elección del solicitante, en idioma inglés o francés. En solicitudes internacionales vertidas en idioma inglés, el escrito adjunto debe estar redactado asimismo en idioma inglés y en las solicitudes internacionales redactadas en idioma francés en idioma francés.

INSTRUCCIONES PARA EL FORMULARIO PCT/ISA/220 (continuación)

En el escrito adjunto deben estar indicadas las diferencias existentes entre las reivindicaciones de la versión presentada y las reivindicaciones modificadas. Así, para cada reivindicación de la solicitud internacional deben estar indicadas (indicaciones equivalentes para reivindicaciones distintas pueden estar aunadas), en particular, si:

- i) la reivindicación no está modificada;
- ii) la reivindicación fue eliminada;
- iii) la reivindicación es nueva;
- iv) la reivindicación reemplaza a una o a varias reivindicaciones de la versión presentada;
- v) la reivindicación se origina en la división de una reivindicación de la versión presentada;

A continuación se indican ejemplos de cómo se deben aclarar modificaciones en el escrito adjunto:

- 1- [cuando en lugar de 48 reivindicaciones originales, luego de la modificación de algunas reivindicaciones existen 51 reivindicaciones:
"Las reivindicaciones 1 a 29, 31, 32, 34, 35, 37 a 48 son reemplazadas por reivindicaciones modificadas con la misma numeración; las reivindicaciones 30, 33 y 36 quedan sin modificar; las reivindicaciones 49 a 51 están agregadas."
- 2- [cuando en lugar de 15 reivindicaciones originales, luego de la modificación de todas las reivindicaciones existen 11 reivindicaciones:
"Las reivindicaciones modificadas 1 a 11 están en lugar de las reivindicaciones 1 a 15"
- 3- [cuando originalmente existen 14 reivindicaciones y las modificaciones consisten en la eliminación de algunas reivindicaciones y el agregado de nuevas reivindicaciones:
"Las reivindicaciones 1 a 6 y 14 están sin modificar; las reivindicaciones 7 a 13 son eliminadas; se agregan nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17. "O": se eliminan las reivindicaciones 7 a 13; se agregan nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17; todas las demás reivindicaciones quedan sin modificar."
- 4- [cuando se llevan a cabo distintos tipos de modificaciones:
"Reivindicaciones 1 a 10 sin modificar; reivindicaciones 11 a 13, 16 y 19 eliminadas; reivindicaciones 14, 15 y 16 reemplazadas por la nueva reivindicación 14; reivindicación 17 dividida en las nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17, nuevas reivindicaciones 20 y 21 agregadas."

"Declaración según artículo 19(1)" (Regla 48.4)

A las modificaciones se puede agregar una declaración mediante la cual se explican las modificaciones y se exponen sus consecuencias sobre la descripción y los dibujos (los que, según el artículo 19(1), no puedan ser modificados).

La declaración se publica junto con la solicitud internacional y las reivindicaciones modificadas.

La misma debe estar redactada en el idioma en que se publica la solicitud internacional.

La misma debe ser corta y no debe comprender más de 500 palabras cuando está redactada o traducida al idioma inglés.

La aclaración no se debe confundir con el escrito adjunto que indica las diferencias existentes entre las reivindicaciones de la versión original y las reivindicaciones modificadas, y no reemplaza al último. Se la debe presentar en una hoja separada y caracterizar como tal en el título, con preferencia, mediante las palabras "Declaración según artículo 29(1)".

La aclaración no debe contener manifestaciones desmerecedoras acerca del informe de búsqueda internacional o del significado de las publicaciones mencionadas en este informe. Solo se puede hacer referencia a publicaciones indicadas en el informe de búsqueda internacional que se relacionan con una reivindicación determinada, en el contexto de una modificación de esta reivindicación.

Consecuencias de una solicitud ya presentada sobre el examen preliminar internacional

Cuando en el momento de la presentación de modificaciones según el artículo 19 ya se requirió un requerimiento de examen preliminar internacional, el solicitante debería presentar al mismo tiempo, en su propio interés, junto con la presentación de las modificaciones (y cualquier declaración) ante la Oficina Internacional, una copia de las modificaciones ante el organismo encargado del examen preliminar internacional y, cuando es requerido, una traducción de tales modificaciones para proceder ante el organismo (ver regla 55.3 y regla 62.2 a), primera frase). Para mayor información, ver las notas al formulario de requerimiento (PCT/PEA/401).

Consecuencias de las modificaciones desde el punto de vista de la traducción de la solicitud internacional al ingresar en la fase nacional

Se hace notar al solicitante que, al ingresar en la fase nacional, en lugar de o adicionalmente a la traducción de las reivindicaciones en la versión original, se debe enviar una traducción de las reivindicaciones modificadas según el artículo 19 a los organismos designados / seleccionados.

Otros detalles acerca de las exigencias de cada organismo designado / seleccionado se obtienen en el *PCT Applicant Guide*, Volume II..

**NUEVAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN CON TROMBOMODULINA DIRIGIDAS
CONTRA FACTORES TISULARES COMO ANTICOAGULANTES**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisoria de los Estados Unidos Nro: 60/376.566, presentada el 1 de mayo, 2002, cuyo texto se incorpora por completo a la presente como referencia.

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 angioplastia 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 neointima. 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 asociado 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 citoplasmática 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.

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 μM) se encuentra significativamente por debajo del valor informado de K_m (5 μM) 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 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 trombomodulina ("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 isquémica, 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 toman 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 direccional, 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 agregó 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 FVIIa 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 μ M en la celda del microcalorímetro y anticuerpo scFv(TF)3e10 65 μ M a la jeringa. Para la determinación de la afinidad del anticuerpo por el sTF solamente, se agregó sTF 10 μ M a la celda y scFv(TF)3e10 141 μ M 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 IC₅₀ 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 anticuerpo 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 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 µl de plasma humano reconstituido hasta una concentración final que permitió obtener una prolongación al doble en el ensayo PT. El coagulómetro agregó entonces 50 µl de reactivo de APTT (Alexin HS) y 50 µl de reactivo de CaCl₂ (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 citrato, se agregó una concentración 120 nM de anticuerpo contra TF (scFv(TF)3e10), TMi456 o la fusión (scFv(TF)3e10-TMi456) junto con 10 µl de reactivo de tromboplastina (dilución 1: 64) y 20 µl de CaCl₂ 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 µl de un reactivo de tromboplastina (dilución 1:64) y 20 µl de CaCl₂ 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 (LD₅₀). 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-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:

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 heterólogas 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.

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 complejo 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 pro-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 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 conocidos 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 direccional:

La proteína direccional de esta invención es una proteína que tiene la capacidad para unirse específicamente a una molécula de interés particular preseleccionada, por ejemplo, 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 direccional 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'), 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 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 directamente 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 descriptas 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-específicos y pueden ser bivalentes o tetravalentes. La construcción de anticuerpos de cadena simple tetravalentes, bi-específicos se describe, por ejemplo, en Coloma y Morrison (1997) *Natl. Biotechnol.* 15: 159-163. La construcción de anticuerpos de cadena simple bivalentes, bi-específicos se describe en Mallendar y Voss (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 199-216.

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 FVIIa, la TM podrá ser dirigida a superficies protrombóticas ricas en TF.

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 FVIIa 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.

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 VIIIa 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 interdominio 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 variación 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,

derivados 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 utilizando 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 potenciales 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 rendimiento 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 direccionadora, 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

direccionadora 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 direccionadora 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 direccionadora 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 direccionador 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 direccionadora 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_H 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_H ($3,8 \times 10^8$ miembros), pZ604- V_H ($1,6 \times 10^7$) y pZ604- V_L ($3,2 \times 10^7$) representan la diversidad permanente y alta de genes V. Los genes V_H fueron amplificados a partir de la 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_D en el extremo 5'. A continuación, los genes V_D, 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 avidez, 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 separa los dominios V_D 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-TMi456 Δ (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 eucarionte. 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-traducción. 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 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, triosafofosfato 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 transcritos, 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 $\mu\text{g/ml}$ en el medio HAMS/F12. Los niveles de expresión fueron de aproximadamente 500 $\mu\text{g/l}$. 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 μ m y se cargaron 5 ml en una columna con la marca del epitope a razón de 2 ml/min. La columna se lavó con solución amortiguadora de fosfato 0,2 M NaH_2PO_4 , 0,05%, pH 7,0, y luego se recolectó en tubos que contenían 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 dimericas 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 anticoagulantes 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 mamíferos. 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 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 descriptos 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 descriptas 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 CaPO_4 . 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 introducirlas 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 nacentes, 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 derivatización 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 cuales 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 transplantes 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 antitrombina 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 descritos acordes con la presente invención que serán evidentes para el especialista en el arte relevante.

Sin una elaboración adicional, se considera que el especialista 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

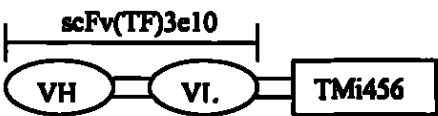
```
(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P
E M A Q V N L R E S G G T L V Q P G G S
L R L S C A A S G F S F T D A W M S W V
R Q A P G K E L E W V S S I S G S G G S
T Y Y A G S V K G R F T I S R D N S K N
T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
R V L S L T D Y Y W Y G M D V W G Q G T
L V T V S A G G 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 epitope (247 a 264).

EJEMPLO 2

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



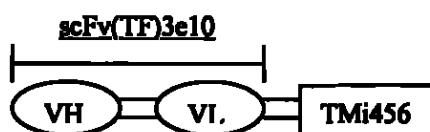
(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P
E M A Q V N L R E S G G T L V Q P G G S
L R L S C A A S G F S F T D A W M S W V
R Q A P G K E L E W V S S I S G S G G S
T Y Y A G S V K G R F T I S R D N S K N
T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
R V L S L T D Y Y W Y G M D V W G Q G T
L V T V S A G G G G 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 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/ μ l 370 nM) en diluyente de ensayo e incubación durante otros 10 minutos.

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 → 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 H₂O, 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.

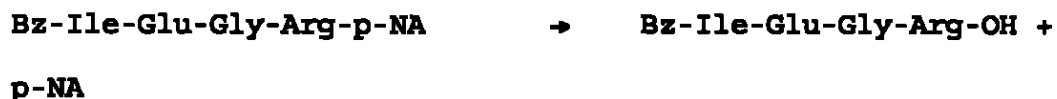
2. Agregar 0,025 ml de STF 10x e incubar durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave.

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 anticuerpos 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 epítipo 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_{50}), 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 utilizados 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.

REIVINDICACIONES:

1. Una proteína de fusión anticoagulante, la cual comprende una proteína direccionadora que interactúa con el factor tisular (TF) o el complejo de factor VIIa/TF (FVIIa/TF), ligada operativamente al dominio EGF456 de la trombomodulina (TM) o análogos, fragmentos, derivados o variantes de las mismas, sola o combinada con al menos un dominio adicional de TM seleccionado del grupo formado por el bucle de interdominio entre EGF3 y EGF4, el dominio EGF123, el dominio de glucosilación O-ligado, y el dominio hidrofóbico de la región N-terminal, o análogos, fragmentos, derivados o variantes de las mismas.
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde el dominio TM comprende el bucle de interdominio entre EGF3 y EGF 4.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 2, donde dicho dominio EGF456 contiene mutaciones puntuales que vuelven más resistente a dicha proteína de fusión a los daños oxidativos o la actividad proteasa o incrementan la eficacia catalítica de dicha proteína de fusión.
4. La proteína de fusión de la reivindicación 3, donde dicho dominio EGF456 contiene al menos una mutación puntual seleccionada del grupo formado por H381G, M388L, R456G y H457Q.

5. La proteína de fusión de la reivindicación 4, donde dicho dominio EGF456 consiste de mutaciones puntuales en H381G, M388L, R456G y H457Q.
6. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde dicha proteína direccionadora es un anticuerpo que se une al TF.
7. La proteína de fusión de la reivindicación 6, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
8. La proteína de fusión de la reivindicación 7, donde dicho anticuerpo monoclonal se une al complejo de FVIIa/TF con mayor afinidad que al TF solo.
9. La proteína de fusión de la reivindicación 8, donde dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo dimérico Fab o un anticuerpo contra IgG.
10. La proteína de fusión de la reivindicación 9, donde dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de cadena simple.
11. La proteína de fusión de la reivindicación 7, donde dicho anticuerpo monoclonal está ligado operativamente a más de un dominio de TM.
12. La proteína de fusión de la reivindicación 7, donde dicho anticuerpo monoclonal neutraliza el TF.
13. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde

dicha proteína de fusión está glicosilada.

14. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde dicha proteína de fusión ha sido modificada por la adición de polietilenglicol.

15. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde dicha proteína de fusión está biotinilada para su unión a estreptavidina.

16. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde dicha proteína direccionadora es FVIIai.

17. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde dicha proteína direccionadora es TFPI.

18. Una composición farmacéutica, donde comprende la proteína de fusión de la reivindicación 1, donde dicha composición comprende un excipiente aceptable para uso farmacéutico y una cantidad eficaz para uso terapéutico de dicha proteína de fusión.

19. Un método de protección contra la formación de trombos, que comprende la administración de una cantidad eficaz para uso terapéutico de la proteína de fusión de la reivindicación 1, donde dicha proteína de fusión inhibe la generación de trombina sin afectar directamente otros parámetros de coagulación, tal como la activación y agregación de plaquetas.

20. El método de la reivindicación 19, donde 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.

21. 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 de la proteína de fusión de la reivindicación 1 a dicho paciente.

22. Un método para regular la respuesta inflamatoria en un paciente, que comprende la administración de una cantidad eficaz para uso terapéutico de la proteína de fusión de la reivindicación 1 a dicho paciente.

23. El método de la reivindicación 22, donde dicha respuesta inflamatoria se selecciona del grupo formado por sepsis, injertos de piel y venas y trasplantes de órganos.

24. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde dicha proteína de fusión 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.

25. Un conjunto de elementos, que comprende la proteína de

fusión de la reivindicación 1.

26. Un conjunto de elementos, que comprende secuencias de ADN que codifican los componentes de la proteína de fusión de la reivindicación 1.

27. Una composición de terapia genética, donde comprende el ADN que codifica una proteína de fusión que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2 o SEQ ID N°: 3, en combinación con una cantidad eficaz para uso terapéutico de un vector de terapia genética.

28. Una proteína de fusión anticoagulante, donde comprende una proteína direccionadora que interactúa con el TF o el complejo de FVIIa/TF, donde dicha proteína direccionadora es un anticuerpo de cadena simple que se une al TF, ligada operativamente al dominio EGF456 de la TM y el bucle de interdominio entre EGF3 y EGF4, donde dicho dominio EGF456 consiste de mutaciones puntuales en H381G, M388L, R456G y H457Q.

29. La proteína de fusión de la reivindicación 28, donde dicha proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2 o SEQ ID N°: 3.

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
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> 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

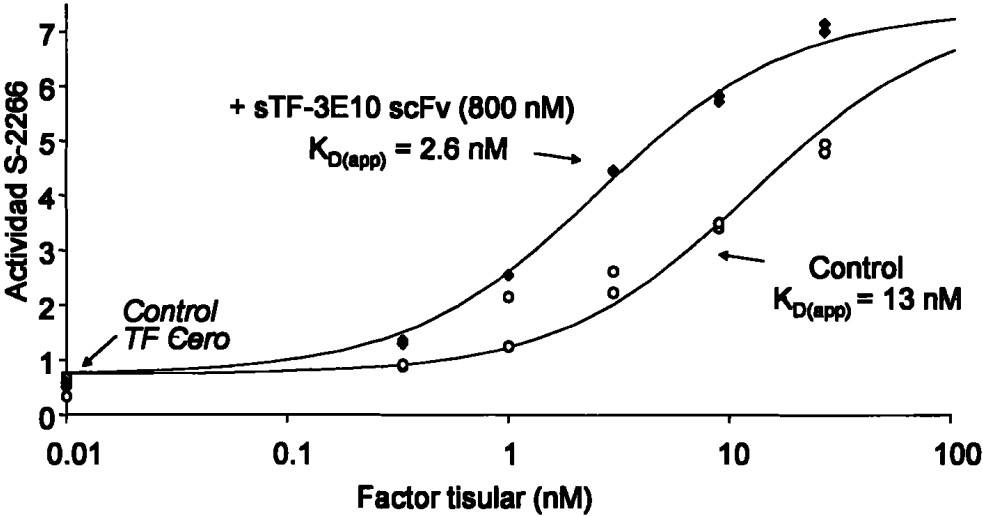
Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr

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
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
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
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 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

Figura 1



9/13/2006

Figura 2

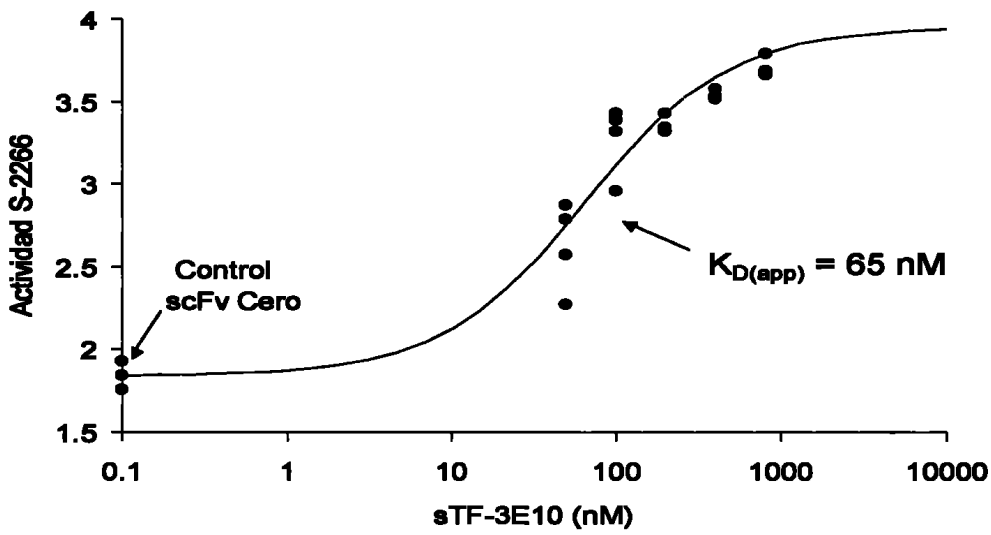


Figura 3

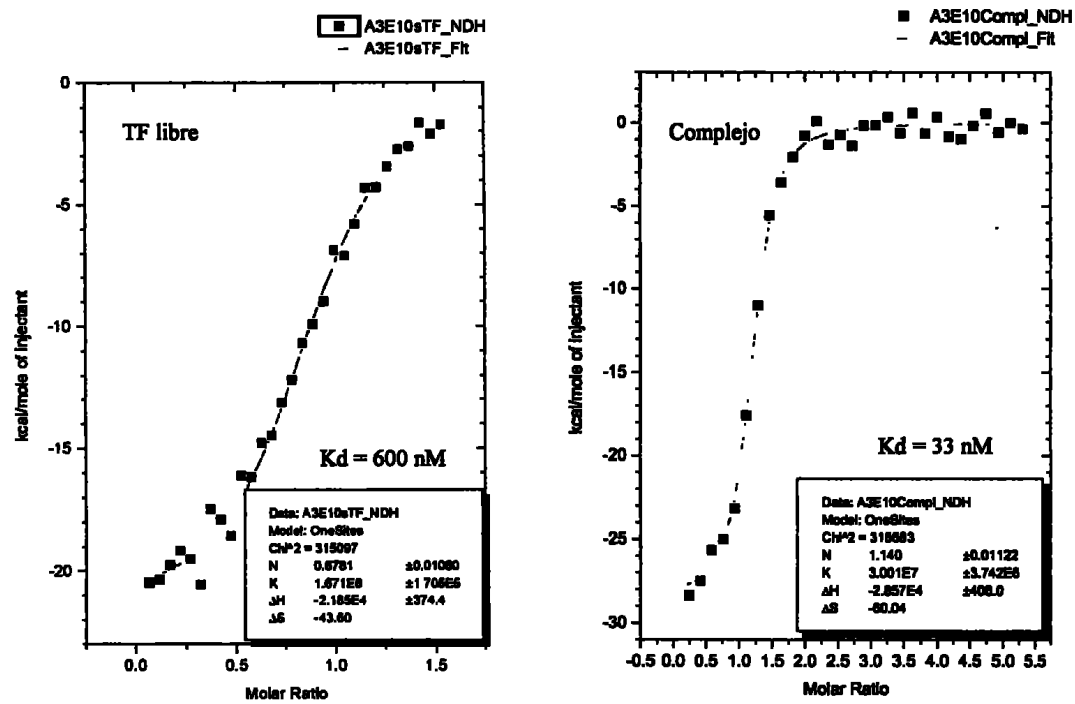
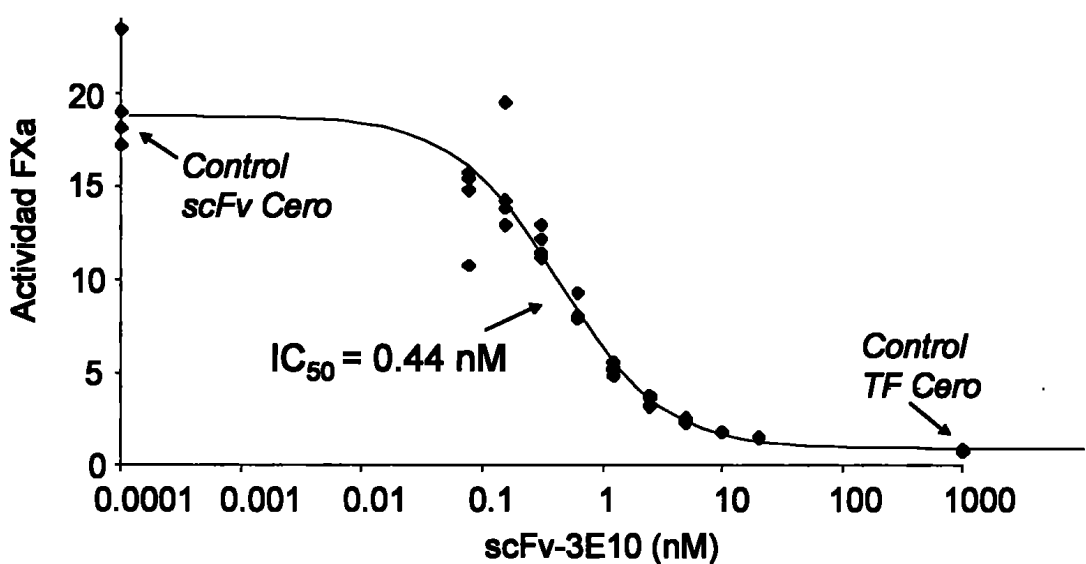


Figura 4



920
209

Figura 5

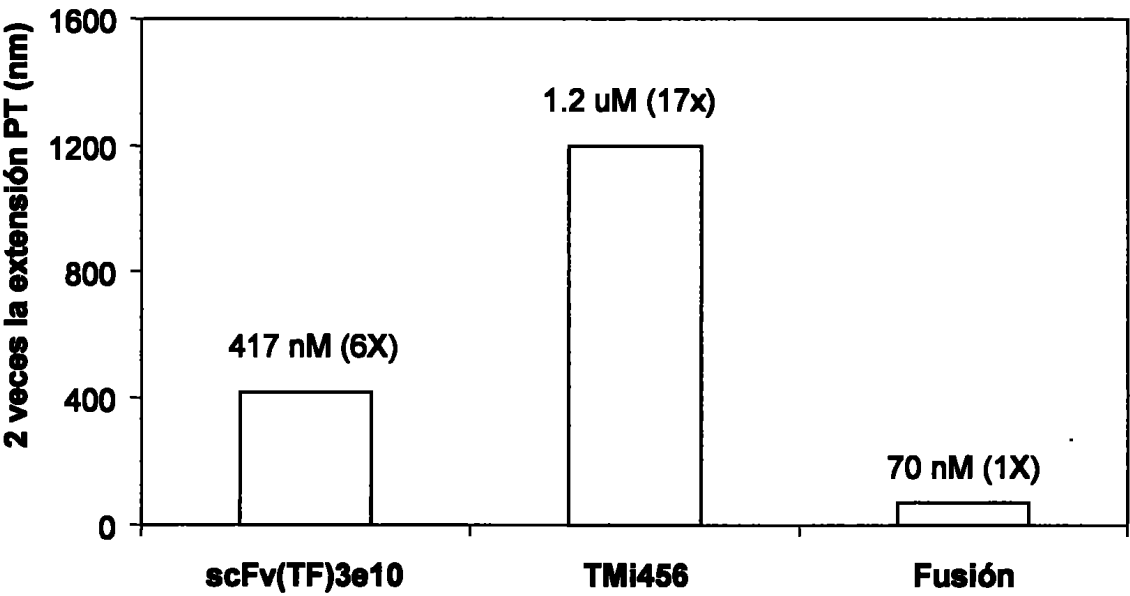


Figura 6

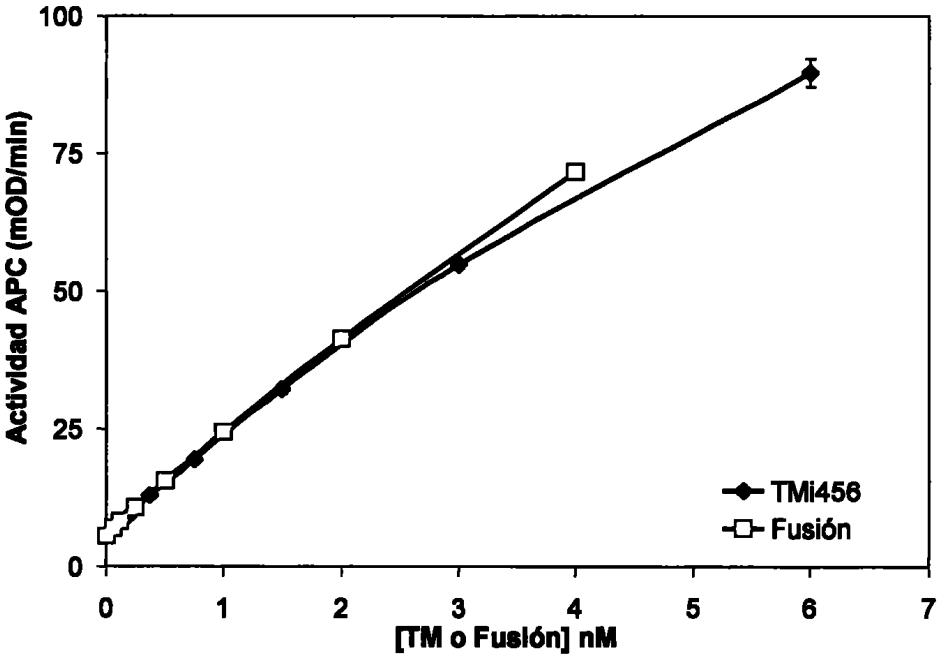
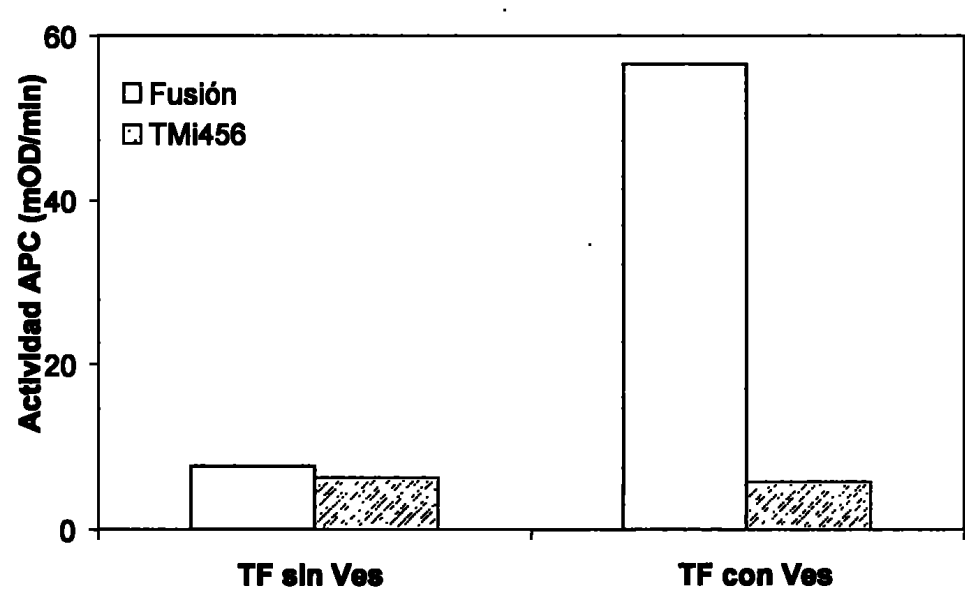


Figura 7



993
212

Figura 8

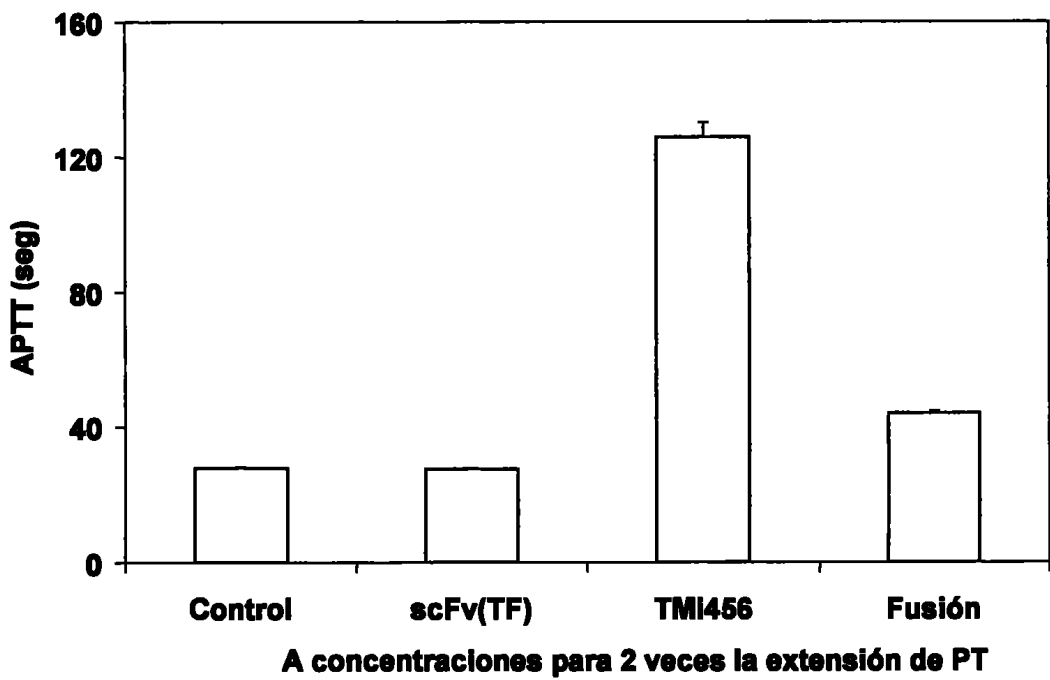
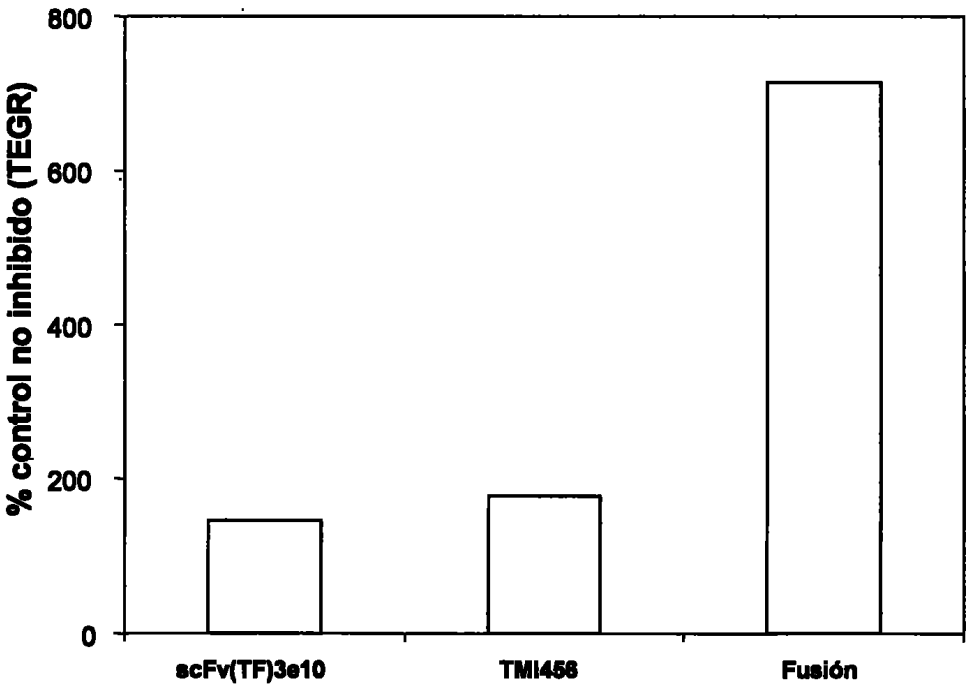
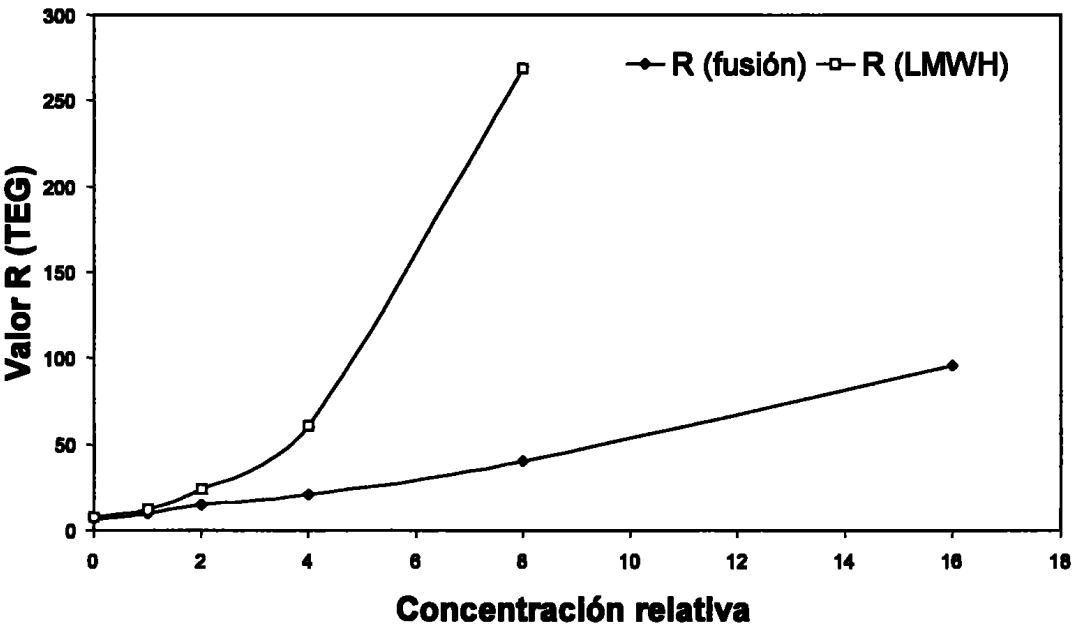


Figura 9



214
212
210

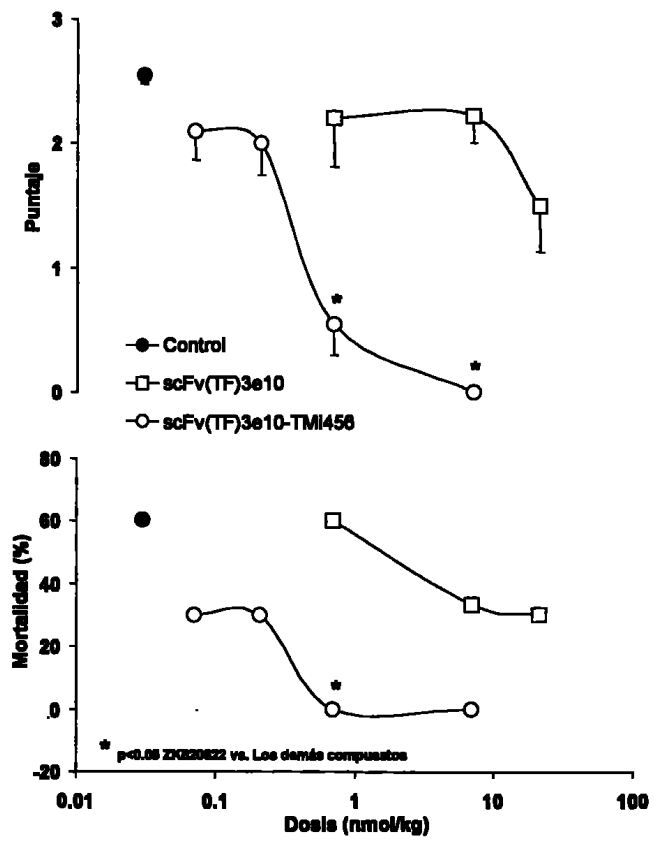
Figura 10



●

296
215

Figura 11



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			
	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	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
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 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

234
220

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

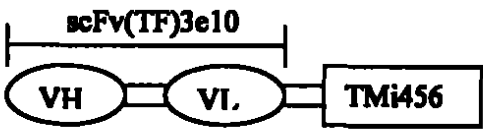
Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys
355 360 365

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

EJEMPLO 2

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

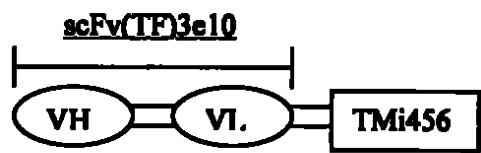


(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P E M
A Q V N L R E S G G T L V Q P G G S L R L S
C A A S G F S F T D A W M S W V R Q A P G K
E L E W V S S I S G S G G S T Y Y A G S V K
G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R
A E D T A V Y Y C A R V L S L T D Y Y W Y G
M D V W G Q G T L V T V S A G G G G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

Las enmiendas de la memoria descriptiva y del listado de secuencias, ambas por escrito y en formato para lectura por computadora, son correcciones de un error evidente. No se incorporan elementos nuevos con estas enmiendas.

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) : BERLX 282 WO**Box No. I TITLE OF INVENTION**

NOVEL TISSUE FACTOR TARGETED THROMBOMODULIN FUSION PROTEINS AS ANTICOAGULANTS

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
D-13342 Berlin
DE☐ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

N/A

State (that is, country) of nationality: DE

State (that is, country) of residence: DE

This person is applicant ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America
for the purposes of: ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box**Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

LIGHT, David
614 South Fremont Street
San Mateo, CA 94402
USThis person is:
☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality: US

State (that is, country) of residence: US

This person is applicant ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America
for the purposes of: ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.**Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE**The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf ☒ agent ☐ common representative
of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

ZELANO, Anthony J.
MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
Arlington Courthouse Plaza I
2200 Clarendon Boulevard, Suite 1400
Arlington, Virginia 22201

Telephone No.

(703) 243-6333

Facsimile No.

(703) 243-6410

Teleprinter No.

N/A

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

TRANSMITTAL LETTER TO THE
UNITED STATES RECEIVING OFFICE

Date	30 APRIL 2003 225
International Application No.	To Be Assigned
Attorney Docket No.	BERLY 282 WO

I. Certification under 37 CFR 1.10 (if applicable)

Express Mail mailing number

Date of Deposit

I hereby certify that the application/correspondence attached hereto is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to the Commissioner of Patents and Trademarks, Washington, D.C. 20231

Signature of person mailing correspondence
--

Typed or printed name of person mailing correspondence
--

II. [X] New International Application

TITLE	NOVEL TISSUE FACTOR TARGETED THROMBOMODULIN FUSION PROTEINS AS ANTICOAGULANTS
-------	---

Earliest priority date (Day/Month/Year)
01 MAY 2002

SCREENING DISCLOSURE INFORMATION: In order to assist in screening the accompanying international application for purposes of determining whether a license for foreign transmittal should and could be granted and for other purposes, the following information is supplied. (Note: check as many boxes as apply):

- A. [] The invention disclosed was not made in the United States.
 B. [] There is no prior U.S. application relating to this invention.
 C. [X] The following prior U.S. application(s) contain subject matter which is related to the invention disclosed in the attached international application. (NOTE: priority to these applications may or may not be claimed on form PCT/RO/101 (Request) and this listing does not constitute a claim for priority)

application no.	60/376,566	filed on	01 MAY 2002 (01.05.02)
application no.		filed on	

- D. [] The present international application [] is identical to [] contains less subject matter than that found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C above.
 E. [X] The present international application [X] contains additional subject matter not found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C above. The additional subject matter [X] DOES NOT ALTER [] MIGHT BE CONSIDERED TO ALTER the general nature of the invention in a manner which would require the U.S. application to have been made available for inspection by the appropriate defense agencies under 35 U.S.C. 181 and 37 CFR 5.1. See 37 CFR 5.15.

[] A Response to an Invitation from the RO/US. The following document(s) is(are) enclosed:

- A. [] A Request for An Extension of Time to File a Response
 B. [] A Power of Attorney (General or Regular)
 C. [] Replacement pages:

pages		of the request (PCT/RO/101)	pages		of the figures
pages		of the description	pages		of the abstract
pages		of the claims			

- D. [] Submission of Priority Documents
 E. [] Fees as specified on attached Fee Calculation sheet form PCT/RO/101 annex

IV. [] A Request for Rectification under PCT Rule 91 [] A Petition [] A Sequence Listing Diskette

V. [] Other (please identify):

The person signing this form is the: ☐ Applicant ☒ Attorney/Agent (Reg. No. 27,969) ☐ Common Representative

Typed name of signer	Anthony J. Zelano	Signature	
----------------------	-------------------	-----------	--

COPY

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTORS	
If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> McLEBAN, KIRK 291 Capricorn Avenue Oakland, CA 94611 US	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(if this check-box is marked, do not fill in below.)</i>
State <i>(that is, country)</i> of nationality: US	State <i>(that is, country)</i> of residence: US
This person is applicant ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America for the purposes of: ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i>	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(if this check-box is marked, do not fill in below.)</i>
State <i>(that is, country)</i> of nationality:	State <i>(that is, country)</i> of residence:
This person is applicant ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America for the purposes of: ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i>	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(if this check-box is marked, do not fill in below.)</i>
State <i>(that is, country)</i> of nationality:	State <i>(that is, country)</i> of residence:
This person is applicant ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America for the purposes of: ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i>	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(if this check-box is marked, do not fill in below.)</i>
State <i>(that is, country)</i> of nationality:	State <i>(that is, country)</i> of residence:
This person is applicant ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America for the purposes of: ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i>	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(if this check-box is marked, do not fill in below.)</i>
State <i>(that is, country)</i> of nationality:	State <i>(that is, country)</i> of residence:
This person is applicant ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America for the purposes of: ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.	

227

Box No. V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):
Regional Patent

- [X] AP ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- [X] EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- [X] EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- [X] OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|--|--|
| [X] AE United Arab Emirates | [X] LK Sri Lanka |
| [X] AG Antigua and Barbuda | [X] LR Liberia |
| [X] AL Albania | [X] LS Lesotho |
| [X] AM Armenia | [X] LT Lithuania |
| [X] AT Austria | [X] LU Luxembourg |
| [X] AU Australia | [X] LV Latvia |
| [X] AZ Azerbaijan | [X] MA Morocco |
| [X] BA Bosnia and Herzegovina | [X] MD Republic of Moldova |
| [X] BB Barbados | [X] MG Madagascar |
| [X] BG Bulgaria | [X] MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| [X] BR Brazil | [X] MN Mongolia |
| [X] BY Belarus | [X] MW Malawi |
| [X] BZ Belize | [X] MX Mexico |
| [X] CA Canada | [X] MZ Mozambique |
| [X] CH and LI Switzerland and Liechtenstein | [X] NO Norway |
| [X] CN China | [X] NZ New Zealand |
| [X] CO Colombia | [X] OM Oman |
| [X] CR Costa Rica | [X] PH Philippines |
| [X] CU Cuba | [X] PL Poland |
| [X] CZ Czech Republic | [X] PT Portugal |
| [X] DE Germany | [X] RO Romania |
| [X] DK Denmark | [X] RU Russian Federation |
| [X] DM Dominica | [X] SC Seychelles |
| [X] DZ Algeria | [X] SD Sudan |
| [X] EC Ecuador | [X] SE Sweden |
| [X] EE Estonia | [X] SG Singapore |
| [X] ES Spain | [X] SI Slovenia |
| [X] FI Finland | [X] SK Slovakia |
| [X] GB United Kingdom | [X] SL Sierra Leone |
| [X] GD Grenada | [X] TJ Tajikistan |
| [X] GE Georgia | [X] TM Turkmenistan |
| [X] GH Ghana | [X] TN Tunisia |
| [X] GM Gambia | [X] TR Turkey |
| [X] GR Greece | [X] TT Trinidad and Tobago |
| [X] HR Croatia | [X] TZ United Republic of Tanzania |
| [X] HU Hungary | [X] UA Ukraine |
| [X] ID Indonesia | [X] UG Uganda |
| [X] IL Israel | [X] US United States of America |
| [X] IN India | [X] UZ Uzbekistan |
| [X] IQ Iraq | [X] VC Saint Vincent and the Grenadines |
| [X] JP Japan | [X] VN Viet Nam |
| [X] KE Kenya | [X] YU Yugoslavia |
| [X] KG Kyrgyzstan | [X] ZA South Africa |
| [X] KP Democratic People's Republic of Korea | [X] ZM Zambia |
| [X] KR Republic of Korea | [X] ZW Zimbabwe |
| [X] KZ Kazakhstan | |
| [X] LC Saint Lucia | |
- Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:
[X] Any countries available at time of filing but not included on this form

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that these additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

289
228

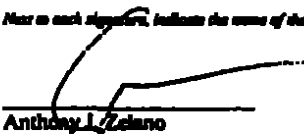
Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. If, in any of the Boxes, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular.
 - (i) If more than two persons are involved as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;
 - (ii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;
 - (iii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
 - (iv) If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;
 - (v) If, in Box No. V, the name of a State (or OAPI) is accompanied by the indication "parent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. V" and the names of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;
 - (vi) If, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI;
 - (vii) If, in Box No. VI, the earlier application is an ARIPO application: in such case, write "Continuation of Box No. VI"; specify the number of the item corresponding to that earlier application and indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed.
2. If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.
3. If the applicant claims, in respect of any designated Office, the benefits of provisions of the national law concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty: in such case write "Statement concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty" and furnish that statement below.

Continuation of Box No. IV:

BRANIGAN, Alan E. J.
BRANIGAN, Jennifer J.
BRANEY, Brian P.
MILLEN, I. William
MOSES, John R.
RULAND, James E.
SKUBIN, Harry B.
SOPE, John A.
TRAVERSO, Richard J.
WHITE, John L.
ZELANO, Anthony J.
MC CARTHY, Robert E.
HENTOR, Cmba
KINSEY, Nicole

All members of the firm of MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C. at the address, telephone and facsimile numbers as indicated in Box No. IV.

Box No. VI PRIORITY CLAIM ☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.				
		Where earlier application is:		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 01 MAY 2002	60/376,566	US		
item (2)				
item (3)				
☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): <u>(1)</u> * Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.				
Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY				
Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used): ISA/EP		Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority): Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)		
Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING				
This international application contains the following number of sheets: request : 5 sheets description (excluding sequence listing part) : 46 sheets claims : 3 sheets abstract : 1 sheet drawings : 11 sheets sequence listing part of description : 5 sheets Total number of sheets : 71 sheets		This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. ☒ fee calculation sheet (duplicate) 2. ☐ separate signed power of attorney 3. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: 4. ☐ statement explaining lack of signature 5. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. ☐ translation of international application into (language): 7. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. ☒ other (specify): Transmittal		
Figure of the drawings which should accompany the abstract: Fig. 1		Language of filing of the international application: ENGLISH		
Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT				
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).				
 Anthony J. Zelano Agent for the Applicant(s)				
For receiving Office use only				
1. Date of actual receipt of the purported international application:		2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:		
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:				
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):				
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA/		6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid		
For International Bureau use only				
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:				

**CARTA DE ENVÍO A LA OFICINA
RECEPTORA DE LOS ESTADOS UNIDOS**

Fecha	30 de abril de 2003
Solicitud Internacional N°	A assignar
Referencia del Agente N°	BERLX 282 WO

I. Certificación CFR 37 1.10 (el corresponde)

Número de envío expreso	Fecha de depósito
Certifico que la solicitud/correspondencia adjunta a la presente ha sido depositada mediante el Servicio Postal de los E.E.U.U. con la prestación "Express Mail Post Office to Addressee" bajo CFR 37 1.10 en la fecha indicada arriba y está remitida al comisionado de Patentes y Marcas, Washington, D.C. 20231	
Firma del remitente	Nombre del remitente en letras de imprenta

II. [X] Nueva solicitud Internacional

TÍTULO	NUEVAS PROTEINAS DE FUSIÓN CON TROMBOMODULINA DIRIGIDOS CONTRA FACTORES TISULARES COMO ANTICOAGULANTES	Fecha de prioridad más temprana (día/mes/año) 01 de mayo de 2002
--------	--	---

INFORMACIÓN PARA EL EXAMEN DE REVELACIONES: se suministra la siguiente información a los fines de apoyar el examen de la presente Solicitud Internacional y con el propósito de determinar si puede o debe o no ser otorgada una licencia de transmisión extranjera. (NOTA: comentar todos los campos posibles)

- A. ☐ La invención revelada no fue producida en los E.E.U.U.
 B. ☐ En los E.E.U.U. no existe una solicitud anterior con relación a esta invención.
 C. ☒ La siguiente(s) solicitud(es) de E.E.U.U. anterior(es) contienen objetos que se relacionan con la invención revelada en la Solicitud Internacional adjunta. (NOTA: la prioridad de estas solicitudes pueden o no ser reivindicadas con el formulario PCT/RO/101 (Request), y esta lista no constituye una reivindicación de prioridad)

Solicitud N°	60/378,568	Presentada el	01 de mayo de 2002
Solicitud N°		Presentada el	

- D. ☐ La presente Solicitud Internacional ☐ es idéntica a ☐ contiene menos objetos que los encontrados en las solicitud(es) de E.E.U.U. anterior(es) identificadas en el ítem C de arriba.
 E. ☒ La presente Solicitud Internacional ☒ contiene objetos adicionales no encontrados en las solicitud(es) de E.E.U.U. anterior(es) identificadas en el ítem C de arriba. El objeto adicional ☒ NO ALTERA ☐ PUEDE CONSIDERARSE QUE ALTERA la naturaleza general de la invención de manera de requerir que la Solicitud de E.E.U.U. esté disponible para ser inspeccionada por la agencia defensora apropiada bajo la U.S.C. 181 y 37 CFR 5.1. Ver 37 CFR 5.15.

III. ☐ Respuesta a una invitación de RO/US. Se adjuntan el(los) siguiente(s) documento(s):

- A. ☐ Requerimiento de una extensión de plazo para presentar una respuesta.
 B. ☐ Poder de un abogado (general o normal)
 C. ☐ Páginas de reemplazo

Páginas		del requerimiento (PCT/RO/101)	Páginas		De las figuras
Páginas		de la descripción	Páginas		
Páginas		de las reivindicaciones			

- D. ☐ Envío de documentos de prioridad.
 E. ☐ Tasas como las especificadas en el formulario Cálculo de Tasas PCT/RO/101 adjunto

IV. ☐ Respuesta para una rectificación bajo regla PCT 81

- ☐ Petición
☐ Disquete con lista de secuencias

V. ☐ Otros (se ruega identificarlos)

La persona que firma este formulario es el: ☐ Solicitante ☒ Abogado/Agente ☐ Representante común

Nombre del Firmante (en letras de imprenta)	Anthony J. Zelano	Firma	Firmado
---	-------------------	-------	---------

PCT
SOLICITUD

El abajo firmante solicita que la presente
Solicitud Internacional
sea procesada de acuerdo con el
Tratado de Cooperación Internacional
en Materia de Patentes

Únicamente para la oficina receptora

Solicitud Internacional N°

Fecha de presentación Internacional

Nombre de la oficina receptora y
"Solicitud PCT Internacional"

Referencia del solicitante
o del agente

BERLX 282 WO

TÍTULO DE LA INVENCIÓN	
Campo N° I NUEVAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN CON TROMBOMODULINA DIRIGIDOS CONTRA FACTORES TISULARES COMO ANTICOAGULANTES	
Campo N° II SOLICITANTE	
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	☐ Esta persona es también inventor
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT D - 13353 Berlin DE	Teléfono N°: Facsimil N°: Teleprinter N°: N/A
Estado (esto es, país) de nacionalidad: US	Estado (esto es, país) de residencia: US
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados ☐ Únicamente E.E.U.U.	☒ Todos los estados designados excepto E.E.U.U. ☐ Los estados indicados en el campo suplementario
Campo N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES)	
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☒ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
LIGHT, David 814 South Fremont Street San Mateo, CA 94402 E.E.U.U.	
Estado (esto es, país) de nacionalidad: US	Estado (esto es, país) de residencia: US
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados ☒ Únicamente E.E.U.U.	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U. ☐ Los estados indicados en el campo suplementario
☒ Otros solicitantes y/u (otros) inventores están indicados en una hoja de continuación.	
Campo N° IV AGENTE O REPRESENTANTE COMÚN; O DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA	
La persona identificada abajo por este medio ha sido autorizada a actuar en nombre de(los) solicitante(s) ante los organismos internacionales competentes ☒ Agente ☐ Representante común	
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país).	Teléfono N° (703) 243-6333
Zelano, Anthony J. MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C. Arlington Courthouse Plaza 1 2200 Clarendon Boulevard, Suite 401 Arlington, Virginia 22201 E.E.U.U.	Facsimil N° (703) 243-6410
	Teleprinter N° N/A
☐ Dirección Postal: marcar este casillero cuando no está/ha sido autorizado ningún agente o representante común, utilizando el espacio de arriba en lugar de indicar una dirección particular a la cual debe ser enviada la correspondencia.	

Continuación de Campo N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES)	
Si no es utilizado ninguno de los siguientes subcampos, no incluir esta hoja en el requerimiento	
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia). McLEAN, Kirk 291 Capricorn Avenue Oakland, CA 94611 E.E.U.U.	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☒ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad: US	Estado (esto es, país) de residencia: US
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
☒ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
☒ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
☐ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
☐ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
☐ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
☐ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
☐ Otros solicitantes y/u (otros) inventores están indicados en una hoja de continuación.	

Campo Nº V - DESIGNACIÓN DE ESTADOS

Las siguientes designaciones se hacen aquí de acuerdo con la regla 4.9 (a) (marcar las casillas que correspondan, debe ser marcada a lo menos una):

☒ AP Patente ARIPO: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudán, SL Sierra Leona, SZ Swazilandia, TZ República Unida de Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, y cualquier otro estado que sea signatario del Protocolo de Harare y del PCT.

☒ EA Patente Eurasática: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Bielorusia, KG Kirguizistán, KZ Kazakstán, MD República de Moldavia, RU Federación Rusa, TJ Tayikistán, TM Turkmenistán, y cualquier otro estado que sea signatario de la Convención Eurasática de Patentes y del PCT.

☒ EP Patente Europea: AT Austria, BE Bélgica, CH y LI Suiza y Liechtenstein, CY Chipre, DE Alemania, DK Dinamarca, ES España, FI Finlandia, FR Francia, GB Gran Bretaña, GR Grecia, IE Irlanda, IT Italia, LU Luxemburgo, MC Mónaco, NL Holanda, PT Portugal, SE Suecia, TR Turquía, y cualquier otro estado que sea signatario de la Convención Europea de Patentes y del PCT.

☒ OA Patente OAPI: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF República Central Africana, CG Congo, CI Costa de Marfil, CM Camerún, GA Gabón, GN Guinea, GW Guinea Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Níger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, y cualquier otro estado que sea miembro del OAPI y signatario del PCT. (si se desea otro tipo de protección o tratamiento, especificar en la línea punteada).....

Patente Nacional (si se desea otro tipo de protección o tratamiento, especificar en la línea punteada)

☒ AE Emiratos Árabes Unidos	☒ LK Sri Lanka
☒ AG Antigua y Barbuda	☒ LR Liberia
☒ AL Albania	☒ LS Lesotho
☒ AM Armenia	☒ LT Lituania
☒ AT Austria	☒ LU Luxemburgo
☒ AU Australia	☒ LV Letonia
☒ AZ Azerbaiyán	☒ MA Marruecos
☒ BA Bosnia y Herzegovina	☒ MD República de Moldavia
☒ BB Barbados	☒ MG Madagascar
☒ BG Bulgaria	☒ MK Ex República Yugoslava de Macedonia
☒ BR Brasil	☒ MN Mongolia
☒ BY Bielorusia	☒ MW Malawi
☒ BZ Belice	☒ MX México
☒ CA Canadá	☒ MZ Mozambique
☒ CH y LI Suiza y Liechtenstein	☒ NO Noruega
☒ CN China	☒ NZ Nueva Zelanda
☒ CO Colombia	☒ OM Omán
☒ CR Costa Rica	☒ PH Filipinas
☒ CU Cuba	☒ PL Polonia
☒ CZ República Checa	☒ PT Portugal
☒ DE Alemania	☒ RO Rumania
☒ DK Dinamarca	☒ RU Federación Rusa
☒ DM Dominica	☒ SC Seychelles
☒ DZ Argelia	☒ SD Sudán
☒ EC Ecuador	☒ SE Suecia
☒ EE Estonia	☒ SG Singapur
☒ ES España	☒ SI Eslovenia
☒ FI Finlandia	☒ SK Eslovaquia
☒ GB Gran Bretaña	☒ SL Sierra Leona
☒ GD Grenada	☒ TJ Tayikistán
☒ GE Georgia	☒ TM Turkmenistán
☒ GH Ghana	☒ TN Túnez
☒ GM Gambia	☒ TR Turquía
☒ HR Croacia	☒ TT Trinidad y Tobago
☒ HU Hungría	☒ TZ República Unida de Tanzania
☒ ID Indonesia	☒ UA Ucrania
☒ IL Israel	☒ UG Uganda
☒ IN India	☒ US E.E.U.U.
☒ IS Islandia	☒ UZ Uzbekistán
☒ JP Japón	☒ VC San Vicente y Las Granadinas
☒ KE Kenya	☒ VN Vietnam
☒ KG Kirguizistán	☒ YU Yugoslavia
☒ KP República Popular Democrática de Corea	☒ ZA Sudáfrica
☒ KR República de Corea	☒ ZM Zambia
☒ KZ Kazakstán	☒ ZW Zimbabwe
☒ LC Santa Lucía	

Casillas reservadas para designar estados (a los fines de una patente nacional) que formen parte del PCT luego de la edición de esta hoja

☒ País disponible al momento de la presentación pero no incluido en este formulario

Declaración preventiva de designación: adicionalmente a las designaciones efectuadas arriba, el solicitante también hace, de acuerdo con la regla 4.9(b), todas las designaciones permitidas por el PCT, excepto aquellas indicadas en el Campo Suplementario como excluidas del ámbito de esta declaración. El solicitante declara que tales designaciones suplementarias están sujetas a confirmación y que cualquier designación no confirmada antes de la expiración de los 15 meses a partir de la fecha de prioridad es abandonada por el solicitante a la expiración de este plazo. (La confirmación (incluyendo tasas) debe acceder a la oficina receptora dentro de tal plazo de 15 meses).

Campo Suplementario Si el campo suplementario no es utilizado, esta hoja no se debe incluir en la solicitud

1. En el caso de que en uno de los campos sea insuficiente el espacio para suministrar toda la información, escribir "continuación del campo Nº....." (indicar el número del campo) y suministrar la información de la misma manera que la requerida de acuerdo con las leyendas del campo en el que el espacio era insuficiente, en particular:
 - (i) Si más de dos personas están involucradas como solicitantes y/o inventores y no está disponible una Hoja de continuación: en tal caso, escribir "Continuación del campo Nº III" e indicar, para cada persona adicional, el mismo tipo de información que la requerida en el Campo Nº III. El país de la dirección indicado en este campo es el estado (esto es, el país) de residencia del solicitante si no está indicado abajo el estado de residencia.
 - (ii) Si en el campo Nº II o en cualquier Subcampo del campo Nº III está marcada la indicación "el estado indicado en el campo suplementario": en este caso, escribir "Continuación de campo Nº II" o "Continuación del campo Nº III" o "Continuación de los campos Nº II y Nº III" (según sea el caso), indicar el nombre de(los) solicitante(s) involucrados y, próximo a (cada uno de) tales nombres, el estado, (y/o, cuando corresponda, Patente ARIPO, Eurselítica, Europea u OAPI), a los fines por los cuales la persona nombrada es solicitante.
 - (iii) Si en el campo Nº II o en cualquier Subcampo del campo Nº III el inventor o el inventor/solicitante no es inventor a los fines de todos los estados designados o a los fines de E.E.U.U.: en tal caso, escribir "Continuación de campo Nº II" o "Continuación del campo Nº III" o "Continuación de los campos Nº II y Nº III" (según sea el caso), indicar el nombre de(los) inventor(es) involucrados y, próximo a (cada uno de) tales nombres, el estado, (y/o, cuando corresponda, Patente ARIPO, Eurselítica, Europea u OAPI), a los fines por los cuales la persona nombrada es inventor.
 - (iv) Si existe(n) otro(s) agente(s) adicionalmente a los indicados en el campo Nº IV: en tal caso, escribir "Continuación de campo Nº IV" e indicar, para cada otro agente, el mismo tipo de información que la requerida en el campo Nº IV.
 - (v) Si en el campo Nº V el nombre de un estado (u OAPI) es acompañado por la indicación "patente de edición" o "certificado de edición", o si en el campo Nº V el nombre de E.E.U.U. es acompañado por una indicación "continuación" o "continuación-parte": en tal caso, escribir "Continuación del campo Nº V", el nombre de cada estado (u OAPI) involucrado y luego el nombre de cada estado (u OAPI), el número del título o solicitud relacionado y la fecha de otorgamiento del título o solicitud relacionado.
 - (vi) Si en el campo Nº VI existen más de tres solicitudes anteriores cuya prioridad es reclamada: en tal caso, escribir "Continuación del campo Nº VI" e indicar, para cada solicitud adicional anterior, el mismo tipo de información que la requerida en el campo Nº VI.
 - (vii) Si en el campo VI la solicitud anterior es una solicitud ARIPO, en tal caso, escribir "Continuación del Campo Nº VI" especificar la cantidad de ítem correspondientes a tal solicitud anterior e indicar a lo menos un país que participe de la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial en el cual fue presentada la solicitud anterior.
2. Si con respecto a la declaración preventiva de designación contenida en el campo Nº V, el solicitante desea excluir un estado(s) del ámbito de esta declaración: en tal caso, escribir "Designación(ones) excluida(s) de la declaración preventiva de designación" e indicar el nombre del código de dos letras de cada estado excluido de esta manera.
3. Si el solicitante reivindica, con respecto a cualquier oficina designada, los beneficios de disposiciones de la ley nacional concerniente a revelaciones no perjudiciales o a excepciones por falta de novedad: en tal caso, escribir "Declaración concerniente a revelaciones no perjudiciales o a excepciones por falta de novedad" y suministrar abajo tal declaración.

Continuación del Campo Nº IV:

BRANIGAN, Alan E. J.
BRANIGAN, Jennifer J.
HEANEY, Brian P.
MILLEN, I. William
MOSES, John R.
RULAND, James E.
SHUBIN, Harry B.
SOPP, John A.
TRAVERSO, Richard J.
WHITE, John L.
ZELANO, Anthony J.
McCARTHY, Robert E.
HENTOR, Casba
KINSEY, Nicole

Todos miembros de la firma MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C. en la dirección, números de teléfono y facsimil indicados en el campo Nº IV.

2546
235

Campo N° VI -REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD ☐ Otras reivindicaciones de prioridad están indicadas en el campo suplementario				
Fecha de presentación de la solicitud anterior (día/mes/año)	Número de la solicitud anterior	Solicitud nacional: País	Solicitud regional: Oficina regional	Solicitud internacional: Oficina receptora
(1) 01 de mayo de 2002	60/378,568	US		
(2)				
(3)				
[x] Se solicita a la oficina receptora preparar y transmitir a la Oficina Internacional una copia certificada de la(s) solicitud(es) anterior(es) (solo si la solicitud anterior fue presentada ante el organismo que es la oficina receptora a los fines de la presente solicitud internacional) identificada(s) arriba con los ítem:(1) * Cuando la solicitud anterior es una solicitud ARIPO, es obligatorio indicar en el campo suplementario a lo menos un país participante de la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial ante el cual se presentó la solicitud anterior (regla 4.10(b)(II). Ver campo suplementario				
Campo N° VII Organismo de Búsqueda Internacional				
Elección de Organismo de Búsqueda Internacional (ISA): (Indicar el organismo elegido cuando dos o más Organismos de Búsqueda Internacional son competentes para llevar a cabo la búsqueda internacional; se puede utilizar el código de dos letras): ISA/EP		Solicitud para utilizar resultados de búsquedas anteriores; referencia a la búsqueda: (cuando una búsqueda anterior fue llevada a cabo por o solicitada ante el Organismo de Búsqueda Internacional): Fecha(día/mes/año) Número País (u oficina regional)		
Campo N° VIII Listado de verificación; Lengua de presentación				
Esta solicitud internacional contiene la siguiente cantidad de hojas: Solicitud : 5 hojas Descripción (excluyendo la parte de listado de secuencias : 46 hojas Reivindicaciones : 3 hojas Resumen : 1 hojas Ilustraciones : 11 hojas Parte de listado de secuencias de la descripción : 5 hojas Cantidad total de hojas : 71 hojas		Esta solicitud internacional es acompañada por los ítem marcados abajo: 1. [x] Hoja de cálculo de tasas (duplicado) 2. [] Poder del abogado firmado por separado 3. [] Copia del poder general del abogado, número de referencia, si existe 4. [] Declaración explicando la falta de firma 5. [] Documento(s) de prioridad identificado(s) como ítem en el campo N° VI 6. [] Traducción de la solicitud internacional al (lengua) 7. [] Indicaciones separadas concernientes a los microorganismos depositados o a otro material biológico 8. [] Secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos listados en forma legible por computadora 9. [x] Otros (especificar): Transmisión		
Figura de las ilustraciones que pueden acompañar el resumen: Fig. 1		Lengua de presentación de la solicitud internacional: INGLÉS		
Campo N° IX Firma del solicitante o del agente				
Próximo a cada una de las firmas indicar el nombre de la persona, firmante y la capacidad por la cual firma (si tal capacidad no es obvia por lectura de la solicitud)				
Firmado _____ Anthony J. ZELANO Agente del Solicitante				

Para uso exclusivo de la Oficina Receptora

1. Fecha de recepción real de la solicitud internacional pretendida:	2. Ilustraciones [] Recibidas [] No recibidas
3. Fecha corregida de la recepción real debido a escritos o ilustraciones que completan la solicitud internacional pretendida y recibidos más tarde pero en término:	
4. Fecha de recepción en término de las correcciones requeridas según artículo PCT 11(2):	
5. Organismo de Búsqueda Internacional (cuando o dos o más competentes) ISA/	6. [] Transmisión de copia de búsqueda demorada hasta el pago de la tasa de búsqueda

Para uso exclusivo de la Oficina Internacional

Fecha de recepción de la copia registrada por la Oficina Internacional:

SEQUENCE LISTING AMENDMENT UNDER RULE 5.2

The Amendments to the Specification and to the Sequence Listing, in both written and computer readable form, are to correct an obvious error. No new matter is added by these Amendments.

Enclosed herein is an amendment to both the written and computer readable form of the Sequence Listing under PCT Rule 5.2. Enclosed are substitute sheets of the Sequence Listing. Agent for Applicants attests that the substitute sheets include no new matter. Enclosed are two copies of the Sequence Listing in computer readable form on diskette as required. Agent for Applicants attests that the computer readable form includes no new matter. Agent for Applicants attests that the herein submitted Sequence Listing information recorded in computer readable form is identical to the herein submitted substitute copy of the Sequence Listing in written form. Support for the amendment in the Specification as originally filed is found below.

The amendments to the written and computer readable form of the Sequence Listing are to correct two obvious typographical errors in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3, which correspond to the amino acid sequences depicted in Examples 2 and 3, respectively. For the amino acid corresponding to position 381 of thrombomodulin, the wild-type amino acid histidine (single letter designation, H) was inadvertently inserted into the sequence instead of the mutated amino acid glycine (G). Similarly, for the amino acid corresponding to position 388 of thrombomodulin, the wild-type amino acid methionine (M) was inadvertently inserted into the sequence instead of the mutated amino acid leucine (L).

Support for the assertion that it was obvious error to have inserted the wild-type amino acids at positions 381 and 388 is found in the Specification on page 25, line 14 to page 26, line 7. In particular, it is clearly stated that in a preferred embodiment, the fusion proteins of the invention are prepared with the H381G and M388L mutations. According to the nomenclature defined on page 25, lines 17 to 21, H381G and M388L specifies that the amino acid at position 381 is G and the amino acid at position 388 is L. The Specification thereafter describes the generation of scFv(TF)3e10-TMi456 (Example 2, SEQ ID NO:2) and scFv(TF)3e10-TMi456Δ (Example 3, SEQ ID NO:3), both of which include the H381G and

M388L mutations. Further support is found in the text following Examples 2 and 3 on page 39, line 24 and page 40, line 18, wherein it is stated that the H381G and M388L mutations are underlined. Hence, the "Sequence Listing" should reflect the fact that the fusion proteins described in Examples 2 and 3 have the mutated, not the wild-type, amino acids at positions 381 and 388.

Amendments to the Specification and Sequence Listing

Examples 2 and 3 in the Specification as originally filed, and the Sequence Listing, both in written and computer readable form, as originally filed, contain obvious errors. The amino acid sequences of two fusion proteins of the invention, scFv(TF)3e10-TMi456 (Example 2, SEQ ID NO:2) and scFv(TF)3e10-TMi456Δ (Example 3, SEQ ID NO:3), both include mutations in the thrombomodulin portion of the fusion protein. Two of these mutations are specified as H381G and M388L. Inadvertently, the Specification and Sequence Listing lists the wild-type amino acids at positions 381 and 388 instead of the mutated amino acids. Support for the assertion that the designation of the wild-type amino acids is obvious error is found in the Specification on page 25, line 14 to page 26, line 7 wherein it is stated that in a preferred embodiment the fusion proteins of the invention are prepared with the H381G and M388L mutations. Further support is found in the Specification in the text following Examples 2 and 3 on page 39, line 24 and page 40, line 18, wherein it is stated that the H381G and M388L mutations (in scFv(TF)3e10-TMi456 or scFv(TF)3e10-TMi456Δ) are underlined. The amendment to Example 3 has one addition to correct the obvious omission of the designator "scFv(TF)3e10" above the cartoon directly under the title of the Example. Support for this amendment is found in the Specification in the same cartoon that accompanies Example 2. Therefore, the amendments to Examples 2 and 3, and to SEQ ID

No:2 and SEQ ID NO:3, in both written and computer readable form, are fully supported by the Specification as originally filed.

Respectfully submitted,

Richard M. Lebovitz
Attorney for the Applicant(s)
Registration No. 37,067

MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
Arlington Courthouse Plaza 1
2200 Clarendon Boulevard, Suite 1400
Arlington, VA 22201
(703) 243-6333

Date: September 16, 2004

ENMIENDA DEL LISTADO DE SECUENCIAS BAJO LA REGLA 5.2

Las Enmiendas de la Memoria descriptiva y del Listado de secuencias, tanto por escrito como en formato para lectura por computadora, son correcciones de un error evidente. No se incorporan elementos nuevos con estas Enmiendas.

En la presente se adjunta una enmienda tanto por escrito como en formato para computadora del Listado de secuencias bajo PCT regla 5.2. Se adjuntan las hojas sustitutas del Listado de secuencias. El agente de los solicitantes declara que las hojas sustitutas no incluyen temas nuevos. Se adjuntan dos copias del Listado de secuencias en formato de lectura para computadora en un disquete según lo requerido. El agente de los solicitantes declara que el formato de lectura para computadora no incluye temas nuevos. El agente de los solicitantes declara que la información del Listado de secuencias enviada en formato de lectura para computadora es idéntica a la copia enviada por la presente del Listado de secuencias en formato por escrito. El fundamento para la enmienda de la Memoria descriptiva presentada originalmente se muestra más adelante.

Para el aminoácido correspondiente a la posición 381 de la trombomodulina, el aminoácido histidina de tipo

salvaje (denominación de una sola letra, H) fue insertado inadvertidamente en la secuencia en lugar del aminoácido mutado glicina (G). De manera similar, para el aminoácido correspondiente a la posición 388 de la trombomodulina, el aminoácido de tipo salvaje amino metionina (M) fue insertado inadvertidamente en la secuencia en lugar del aminoácido mutado leucina (L).

El fundamento de la aseveración que se trataba de un error evidente el haber insertado los aminoácidos de tipo salvaje en las posiciones 381 y 388 se puede encontrar en la Memoria descriptiva en la página 25, línea 14 a la página 26, línea 7. En particular, se establece claramente que en una realización preferida, las proteínas de fusión de la invención se preparan con las mutaciones H381G y M388L. De acuerdo con la nomenclatura definida en la página 25, líneas 17 a 21, los nombres H381G y M388L especifican que el aminoácido en la posición 381 es G y que el aminoácido en la posición 388 es L. De allí en adelante, en la Memoria descriptiva se describe la generación de scFv(TF)3e10-TMi456 (Ejemplo 2, SEQ ID N°: 2) y scFv(TF)3e10-TMi456Δ (Ejemplo 3, SEQ ID N°: 3), donde ambas incluyen las mutaciones H381G y M388L. Se ofrece un fundamento adicional en el texto que le sigue a los Ejemplos 2 y 3 en la página 39, línea 24 y en la página 40,

línea 18, donde se establece que las mutaciones H381G y M388L están subrayadas. Por ende, el "Listado de secuencias" debería reflejar el hecho que las proteínas de fusión descritas en los Ejemplos 2 y 3 contienen a los aminoácidos mutados, no los de tipo salvaje, en las posiciones 381 y 388.

Enmiendas de la Memoria descriptiva y del Listado de secuencias

Los Ejemplos 2 y 3 en la Memoria descriptiva presentada originalmente y el Listado de secuencias, ambas en formato por escrito y de lectura para computadora, presentada originalmente, contienen errores evidentes. Las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas de fusión de la invención, scFv(TF)3e10-TMi456 (Ejemplo 2, SEQ ID N°: 2) y scFv(TF)3e10-TMi456Δ (Ejemplo 3, SEQ ID N°: 3), incluyen ambas mutaciones en la porción de trombomodulina de la proteína de fusión. Dos de estas mutaciones se especifican como H381G y M388L. Inadvertidamente, en la Memoria descriptiva y en el Listado de secuencias se enumeran aminoácidos de tipo salvaje en las posiciones 381 y 388 en lugar de los aminoácidos mutados. El fundamento de la aseveración que se trata de un error evidente en la designación de los aminoácidos de tipo salvaje se puede consultar en la Memoria descriptiva en la página 25, línea

14 a la página 26, línea 7, donde se establece que en una realización preferida las proteínas de fusión de la invención se preparan con las mutaciones H381G y M388L. Se puede encontrar un fundamento adicional en la Memoria descriptiva en el texto que le sigue a los Ejemplos 2 y 3 en la página 39, línea 24 y en la página 40, línea 18, donde se establece que las mutaciones H381G y M388L (en scFv(TF)3e10-TMi456 o scFv(TF)3e10-TMi456Δ) están subrayadas. La enmienda del Ejemplo 3 tiene una adición para corregir la omisión evidente de la designación "scFv(TF)3e10" arriba del diagrama directamente debajo del título de dicho Ejemplo. El fundamento de esta enmienda se puede encontrar en la Memoria descriptiva en el mismo diagrama que acompaña al Ejemplo 2. Por ello, las enmiendas de los Ejemplos 2 y 3, y de la SEQ ID N°: 2 y la SEQ ID N°: 3, ambas en formato por escrito y de lectura para computadora, están completamente fundamentadas en la Memoria descriptiva presentada originalmente.

Respetuosamente,

Richard M. Lebovitz

Abogado de los Solicitantes

N° Registro 37.067

~~854~~
5-243

MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.

Arlington Courthouse Plaza 1

2200 Clarendon Boulevard, Suite 1400

Arlington, VA 22201

(703) 243-6333

Fecha: 16 de septiembre, 2004

ENMIENDA DEL LISTADO DE SECUENCIAS BAJO LA REGLA 5.2

Las Enmiendas de la Memoria descriptiva y del Listado de secuencias, tanto por escrito como en formato para lectura por computadora, son correcciones de un error evidente. No se incorporan elementos nuevos con estas Enmiendas.

En la presente se adjunta una enmienda tanto por escrito como en formato para computadora del Listado de secuencias bajo PCT regla 5.2. Se adjuntan las hojas sustitutas del Listado de secuencias. El agente de los solicitantes declara que las hojas sustitutas no incluyen temas nuevos. Se adjuntan dos copias del Listado de secuencias en formato de lectura para computadora en un disquete según lo requerido. El agente de los solicitantes declara que el formato de lectura para computadora no incluye temas nuevos. El agente de los solicitantes declara que la información del Listado de secuencias enviada en formato de lectura para computadora es idéntica a la copia enviada por la presente del Listado de secuencias en formato por escrito. El fundamento para la enmienda de la Memoria descriptiva presentada originalmente se muestra más adelante.

Para el aminoácido correspondiente a la posición 381 de la trombomodulina, el aminoácido histidina de tipo

salvaje (denominación de una sola letra, H) fue insertado inadvertidamente en la secuencia en lugar del aminoácido mutado glicina (G). De manera similar, para el aminoácido correspondiente a la posición 388 de la trombomodulina, el aminoácido de tipo salvaje amino metionina (M) fue insertado inadvertidamente en la secuencia en lugar del aminoácido mutado leucina (L).

El fundamento de la aseveración que se trataba de un error evidente el haber insertado los aminoácidos de tipo salvaje en las posiciones 381 y 388 se puede encontrar en la Memoria descriptiva en la página 25, línea 14 a la página 26, línea 7. En particular, se establece claramente que en una realización preferida, las proteínas de fusión de la invención se preparan con las mutaciones H381G y M388L. De acuerdo con la nomenclatura definida en la página 25, líneas 17 a 21, los nombres H381G y M388L especifican que el aminoácido en la posición 381 es G y que el aminoácido en la posición 388 es L. De allí en adelante, en la Memoria descriptiva se describe la generación de scFv(TF)3e10-TMi456 (Ejemplo 2, SEQ ID N°: 2) y scFv(TF)3e10-TMi456Δ (Ejemplo 3, SEQ ID N°: 3), donde ambas incluyen las mutaciones H381G y M388L. Se ofrece un fundamento adicional en el texto que le sigue a los Ejemplos 2 y 3 en la página 39, línea 24 y en la página 40,

línea 18, donde se establece que las mutaciones H381G y M388L están subrayadas. Por ende, el "Listado de secuencias" debería reflejar el hecho que las proteínas de fusión descritas en los Ejemplos 2 y 3 contienen a los aminoácidos mutados, no los de tipo salvaje, en las posiciones 381 y 388.

**Enmiendas de la Memoria descriptiva y del Listado de
secuencias**

Los Ejemplos 2 y 3 en la Memoria descriptiva presentada originalmente y el Listado de secuencias, ambas en formato por escrito y de lectura para computadora, presentada originalmente, contienen errores evidentes. Las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas de fusión de la invención, scFv(TF)3e10-TMi456 (Ejemplo 2, SEQ ID N°: 2) y scFv(TF)3e10-TMi456A (Ejemplo 3, SEQ ID N°: 3), incluyen ambas mutaciones en la porción de trombomodulina de la proteína de fusión. Dos de estas mutaciones se especifican como H381G y M388L. Inadvertidamente, en la Memoria descriptiva y en el Listado de secuencias se enumeran aminoácidos de tipo salvaje en las posiciones 381 y 388 en lugar de los aminoácidos mutados. El fundamento de la aseveración que se trata de un error evidente en la designación de los aminoácidos de tipo salvaje se puede consultar en la Memoria descriptiva en la página 25, línea

14 a la página 26, línea 7, donde se establece que en una realización preferida las proteínas de fusión de la invención se preparan con las mutaciones H381G y M388L. Se puede encontrar un fundamento adicional en la Memoria descriptiva en el texto que le sigue a los Ejemplos 2 y 3 en la página 39, línea 24 y en la página 40, línea 18, donde se establece que las mutaciones H381G y M388L (en scFv(TF)3e10-TMi456 o scFv(TF)3e10-TMi456A) están subrayadas. La enmienda del Ejemplo 3 tiene una adición para corregir la omisión evidente de la designación "scFv(TF)3e10" arriba del diagrama directamente debajo del título de dicho Ejemplo. El fundamento de esta enmienda se puede encontrar en la Memoria descriptiva en el mismo diagrama que acompaña al Ejemplo 2. Por ello, las enmiendas de los Ejemplos 2 y 3, y de la SEQ ID N°: 2 y la SEQ ID N°: 3, ambas en formato por escrito y de lectura para computadora, están completamente fundamentadas en la Memoria descriptiva presentada originalmente.

Respetuosamente,

Richard M. Lebovitz

Abogado de los Solicitantes

N° Registro 37.067

MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.

Arlington Courthouse Plaza 1

2200 Clarendon Boulevard, Suite 1400

Arlington, VA 22201

(703) 243-6333

Fecha: 16 de septiembre, 2004

PATENT COOPERATION TREATY

260 249

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ZELANO, Anthony, J.
Millen, White, Zelano & Bramigan,
P.C.
Arlington Courthouse Plaza I
Suite 1400
2200 Clarendon Boulevard
Arlington, VA 22201
United States of America

JUL - 8 2003

Date of mailing (day/month/year) 18 June 2003 (16.06.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference BERLX 282 WO	International application No. PCT/US03/13522

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT (for all designated States except US)
LIGHT, David et al (for US)

International filing date : 30 April 2003 (30.04.03)

Priority date(s) claimed : 01 May 2002 (01.05.02)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 05 June 2003 (05.06.03)

List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : 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

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

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

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

☒ time limits for entry into the national phase - see updated important information (as of April 2002)

☐ confirmation of precautionary designations (if applicable)

☒ requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740-1435

Authorized officer:

Junko TAKEUCHI (Fax 338 7010)

Telephone No. (41-22) 338 8448

21/10/03

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this Notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office where a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 18 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see PCT Gazette No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the PCT Newsletter, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the PCT Gazette ("Section IV" part published on a weekly basis), to the PCT Newsletter (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the PCT Applicant's Guide (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages the site including those of the Gazette, Newsletter and Guide, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in the PCT Applicant's Guide, Volume IA, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(a) before the expiration of 15 months from the priority date (this time limit may not be extended). If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. The Notice of confirmation and payment must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 18 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 18-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 18-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within the time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 18-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

260
251

PCT

Notificación de Recepción de
Copia Registrada

(Regla PCT 24.2(a))

De la OFICINA INTERNACIONAL

A:

ZELANO, Anthony J.
Millen, White, Zelano & Branigan, P.C.
Suite 1400
Arlington Courthouse Plaza 1
2200 Clarendon Boulevard
Arlington, VA 22201
E.E.U.U.

Fecha de envío (día/mes/año): 16 de junio de 2003 (16.06.03)	NOTIFICACIÓN IMPORTANTE
Referencia del solicitante o del agente: BERLX 282 WO	Solicitud Internacional Nº: PCT/US 03/13522

Se notifica al solicitante por este medio que la Oficina Internacional ha recibido la copia registrada de la Solicitud Internacional, como se detalla abajo.

Nombre(s) del(los) solicitante(s) y países para los cuales son solicitadas

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT (para todos los países designados excepto E.E.U.U.)
LIGHT, David et al. (para E.E.U.U.)

Fecha de presentación internacional	30 de abril de 2003 (30.04.03)
Fecha de prioridad reivindicada	01 de mayo de 2002 (01.05.02)
Fecha de recepción de la copia registrada por La Oficina Internacional	05 de junio de 2003 (05.06.03)

Lista de Oficinas designadas:

AP: GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
EP: 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
OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
Nacional: 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

ATENCIÓN

El solicitante debe verificar cuidadosamente los datos que aparecen en esta notificación. En caso de cualquier discrepancia entre estos datos y las indicaciones de la solicitud internacional, el solicitante debe informar inmediatamente a la Oficina Internacional.

Además, el solicitante debe prestar atención a la información contenida en el anexo, relacionada con:

- ☒ plazo para ingresar en la fase nacional – ver información importante actualizada (como de abril de 2002)
- ☐ confirmación de designaciones preventivas (si es necesario)
- ☒ requerimientos con respecto a documentos de prioridad (si es necesario)

Se envía una copia de esta notificación a la Oficina Receptora y al Organismo de Búsqueda Internacional.

La Oficina Internacional de WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Ginebra 20, Suiza	Funcionario autorizado: Junko TAKEUCHI (Fax 338 7010)
Facsimil Nº: (41-22) 740-1435 Formulario PCT/IB/301 (abril 2002)	Teléfono Nº: (41-22) 338 8448 006883008

INFORMACIÓN DE PLAZOS PARA INGRESAR EN LA FASE NACIONAL

Se recuerda al solicitante que la "fase nacional" debe ser ingresada ante cada una de las oficinas designadas indicadas en la cántula de esta notificación mediante el pago de tasas nacionales y suministrando traducciones, tal como está prescrito por los artículos 22 y 39 y las leyes nacionales aplicables. Además, el solicitante debe cumplir con otros requerimientos especiales aplicables de determinadas oficinas. Es responsabilidad del solicitante asegurar que los pasos necesarios para ingresar en la fase nacional estén ejecutados en el tiempo establecido. La mayoría de las oficinas no expiden recordatorios para los solicitantes con respecto al ingreso en la fase nacional.

El plazo aplicable para ingresar en la fase nacional es, con sujeción a lo que dice el siguiente párrafo, de 30 meses a partir de la fecha de prioridad, no solo con respecto a cualquier oficina seleccionada en la que se presentó una demanda de Examen Preliminar Internacional antes de la expiración de 19 meses a partir de la fecha de prioridad (ver artículo 38(1)), sino también, en ausencia de la presentación de tal demanda, con respecto a cualquier oficina designada en la cual se aplica el artículo 22(1), modificado en sus efectos a partir del 1 de abril de 2002, en relación con tal oficina designada. Para mayores detalles, ver la PCT Gazette N° 44/2001, del 1 de noviembre de 2001, pp. 19928, 19932 y 19934, así como los ejemplares de PCT Newsletter, octubre y noviembre de 2001 y febrero 2002.

En la práctica, los plazos distintos a 30 meses se aplican continuamente, para varios períodos de tiempo, con respecto a determinadas oficinas designadas o seleccionadas. Para actualizaciones normales de los plazos aplicables (20, 21, 30 o 31 meses, u otros plazos), oficina por oficina, remítase a la PCT Gazette (parte "Section IV", publicada semanalmente), el PCT Newsletter (mensual) y a los capítulos nacionales relevantes que figuran en el volumen II la Guía PCT del Solicitante (del cual la versión en papel se actualiza usualmente dos veces al año y la versión de Internet semanalmente). Finalmente, en el sitio de Internet de WIPO está disponible una tabla acumulativa de todos los tiempos límites aplicables para ingresar en la fase nacional, mediante vínculos con varias páginas, el sitio incluye aquellos de Gazette, Newsletter y guía, en <http://wipo.int/pct/en/index/html>.

La información acerca de los requerimientos para presentar una demanda de Examen Preliminar Internacional se encuentra en la Guía PCT del Solicitante, volumen I/A, capítulo IX. Hacemos notar que solo un solicitante que tenga la nacionalidad o sea residente de un país signatario del PCT comprometido por el capítulo II posee los derechos para presentar la demanda de Examen Preliminar Internacional (actualmente, todos los estados signatarios del PCT están comprometidos por el capítulo II).

CONFIRMACIÓN DE DESIGNACIONES PREVENTIVAS

Esta notificación lista solo designaciones específicas realizadas bajo la regla 4.9(a) en el requerimiento. Es importante verificar que estas designaciones sean correctas. Los errores en la designación pueden ser corregidos cuando las designaciones preventivas fueron efectuadas según la regla 4.9(b). Se recuerda por este medio al solicitante que toda designación preventiva debe ser confirmada de acuerdo con la regla 4.9(c) antes de la expiración de 16 meses a partir de la fecha de prioridad (este plazo no será extendido). Si no se confirma, será automáticamente considerada como abandonada por el solicitante. No existirán recordatorios ni invitaciones. La confirmación de una designación consiste en la presentación de un escrito especificando el estado designado concierne (con indicación del tipo de protección o tratamiento deseado) y el pago de las tasas de designación y de confirmación. El escrito de confirmación y el pago deben llegar a la oficina receptora en el plazo de 15 meses.

REQUERIMIENTOS CON RESPECTO A LOS DOCUMENTOS DE PRIORIDAD

Para los solicitantes que aún no cumplieron con los requerimientos con respecto a los documentos de prioridad, se les recuerda lo siguiente.

Cuando se reivindica la prioridad de una solicitud nacional, regional o internacional anterior, el solicitante debe enviar una copia de tal solicitud anterior, certificada por el Organismo al cual fue presentado ("el documento de prioridad") a la oficina receptora (que lo transmitirá a la Oficina Internacional) o directamente a la Oficina Internacional antes de la expiración del 16 meses a partir de la fecha de prioridad, estableciendo que todo documento de prioridad ha sido enviado a la Oficina Internacional antes de la fecha de la publicación internacional o de la solicitud internacional, en cuyo caso tal documento será considerado como haber sido recibido por la Oficina Internacional el último día del término de 16 meses (regla 17.1(a)).

Cuando el documento de prioridad es distribuido por la oficina receptora, el solicitante puede, en lugar de enviar el documento de prioridad, requerir de la oficina receptora que prepare y transmita el documento de prioridad a la Oficina Internacional. Tal requerimiento debe ser efectuado antes de la expiración del plazo de 16 meses y puede quedar sujeto por la oficina receptora al pago de una tasa (regla 17.1(b)).

Si el documento de prioridad concierne no es enviado a la Oficina Internacional o si no se efectuó el requerimiento a la oficina receptora de que prepare y transmita el documento de prioridad (y se pagó la correspondiente tasa, si es pertinente) dentro del plazo aplicable bajo los párrafos precedentes, un estado designado debe pasar por alto la reivindicación de prioridad, pues está establecido que tal estado no designado debe pasar por alto la reivindicación de prioridad concierne antes de dar al solicitante una oportunidad, al entrar en la fase nacional, de suministrar el documento de prioridad en un tiempo límite razonable con las circunstancias.

Cuando se reivindican varias prioridades, la fecha de prioridad a ser considerada para el propósito de computar el plazo de 16 meses es la fecha de presentación de la solicitud más antigua por la que se reivindica prioridad.

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

JUL - 8 2003
ZELANO, Anthony, J.
Millen, White, Zeland & Branigan
P.C.
Millen, White, Zeland & Branigan
Arlington Courthouse Plaza
Suite 1400
2200 Clarendon Boulevard
Arlington, VA 22201
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 16 June 2003 (16.06.03)	
Applicant's or agent's file reference BERLX 282 WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US03/13522	International filing date (day/month/year) 30 April 2003 (30.04.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 01 May 2002 (01.05.02)
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
01 May 2002 (01.05.02)	60/376,566	US	05 June 2003 (05.06.03)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740-1435

Authorized officer

Junko TAKEUCHI (Fax 338 7010)

Telephone No. (41-22) 338 8448

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

265
254

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

Notificación concerniente al
envío o transmisión del
Documento de prioridad

(Instrucciones Administrativas PCT, sección 411)

A:

ZELANO, Anthony J.
Millen, White, Zelano & Branigan, P.C.
Suite 1400
Arlington Courthouse Plaza 1
2200 Clarendon Boulevard
Arlington, VA 22201
E.E.U.U.

Fecha de envío (día/mes/año): 16 de junio de 2003 (16.06.03)	
Referencia del solicitante o del agente: BERLX 282 WO	NOTIFICACIÓN IMPORTANTE
Solicitud Internacional N°: PCT/US 03/13522	Fecha de presentación (día/mes/año): 30 de abril de 2003 (30.04.03)
Fecha de publicación internacional (día/mes/año): Aún sin publicar	Fecha de prioridad (día/mes/año): 01 de mayo de 2002 (01.05.02)
Solicitante: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al.	

- Se notifica al solicitante por medio de la presente de la fecha de recepción (excepto cuando aparezcan las letras "NR" en la columna derecha) por la Oficina Internacional del(los) documento(s) que se refieren a la(s) solicitud(es) anterior(es) indicada(s) abajo. En tanto no aparezca un asterisco próximo a la fecha de recepción o las letras "NR" en la columna derecha, el documento de prioridad concerniente ha sido enviado o transmitido a la Oficina Internacional, en cumplimiento de la PCT 17.1(a) o (b).
- Esta actualiza y reemplaza cualquier notificación anterior concerniente al envío o transmisión de documentos de prioridad.
- Un asterisco que aparece próximo a la fecha de recepción, en la columna de la derecha, denota un documento de prioridad enviado o transmitido a la Oficina Internacional pero que no cumple con la regla PCT 17.1(a) o (b). En tal caso, la atención del solicitante se debe dirigir a la regla 17.1(c), que establece que un organismo no designado debe pasar por alto la reivindicación de prioridad antes de dar al solicitante una oportunidad, al entrar en la fase nacional, de suministrar el documento de prioridad en un tiempo límite razonable con las circunstancias.
- Las letras "NR" que aparezcan en la columna derecha denotan un documento de prioridad que no fue recibido por la Oficina Internacional o del que el solicitante no requirió a la Oficina Receptora que lo prepare y transmita a la Oficina Internacional, como establece la regla 17.1(a) o (b), respectivamente. En tal caso, la atención del solicitante se debe dirigir a la regla 17.1(e), que establece que un organismo no designado debe pasar por alto la reivindicación de prioridad antes de dar al solicitante una oportunidad, al entrar en la fase nacional, de suministrar el documento de prioridad en un tiempo límite razonable con las circunstancias.

<u>Fecha de Prioridad</u>	<u>Solicitud de Prioridad</u>	<u>País u Oficina Regional u Oficina receptora del PCT</u>	<u>Fecha de Recepción o del Documento de Prioridad</u>
01 de mayo de 2002 (01.05.02)	60/376,566	E.E.U.U.	05 de junio de 2003 (05.06.03)

La Oficina Internacional de WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Suiza	Funcionario autorizado: Junko TAKEUCHI (Fax 338 7010)
Faximil N°: (41-22) 740-1435 Formulario PCT/IB/304 (julio 1998)	Teléfono N°: (41-22) 338 8446 005694026

266
255

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176009-2

Radicacion : 84116568 82892223 Folios: 266
Fecha (ADM): 2004-11-25 11:07:24
Trucite : 011 PCT-PATENT 379 FASE 1321 411 PRESENTE
Dependencia: 2828 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 91,215
FECHA : NOVIEMBRE 24 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

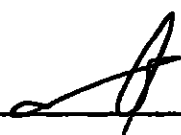
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
GUSTAVO HOLLMAN	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	29812348	24/11/2004	6,661,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
		TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

Ref: 56572

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

267
256

INDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 64118560 6338223 Folios: 266
Fecha (USD): 2004-11-25 11:07:24
Trámite : 811 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTA
Dependencia: 2626 DIVISION DE NUEVOS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓		
MODELO DE UTILIDAD	()	(/)
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	(/)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	(/)
- Descripción de la invención.	()	(/)
- Dibujos de ser estos pertinentes. X	()	(/)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable: Claudia M Neiva

Fecha:

268
257



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2020

Bogotá D C

Doctor(a) A
GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO
Apoderado(a)
SCGERING AG

11482

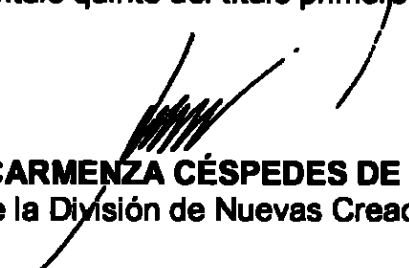
REFERENCIA:	Radicación N°	04-118560
	Solicitud internacional	PCT/US03/113522
	Fecha inicio fase nacional	2004-12-01
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- En caso que el examen preliminar contenga anexos estos deben ser adjuntados junto con su traducción.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

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 N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,
17 Dic. 2019
202063