Clarke, Mod
COLOMB

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-111636- -00022-0000
Fecha: 2015-04-15 15:55:41 Dep: 2020 DIR.NUEVASCF
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 523 RESPUESTA Folios: 40

P-2326

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

Re: Expediente No. **09-111.636**
Solicitud de patente a nombre de **CATALYST BIOSCIENCES, INC.**

Yo, SILVANA MARIA LOPEZ DIAZ identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada sustituta de acuerdo con la sustitución presentada el 30 de agosto de 2013 de la sociedad CATALYST BIOSCIENCES, INC., domiciliada en California, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **15697** notificado por fijación en lista el 30 de diciembre de 2014, relacionado con concepto técnico de fondo, y teniendo en cuenta el memorial presentado el 19 de marzo de 2015, mediante el cual se solicitó una prórroga de 30 días para dar respuesta al referido oficio, me permito manifestar:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de 21 reivindicaciones y reemplaza completamente el capítulo presentado anteriormente. En el nuevo capítulo reivindicatorio se realizaron las siguientes modificaciones:

1.1 Como primera medida, se modificaron las antiguas reivindicaciones 1, 4, 6, 7, 9, 17 y 25-27 con el fin de atender las sugerencias del examinador.

1.2 Adicionalmente, se eliminaron las antiguas reivindicaciones 2, 3, 5, 8, 11-14, 16, 21, y 22, dando claridad a la materia reclamada.

1.3 También, se modificaron las antiguas reivindicaciones 28 a 31, con el fin de eliminar las características relacionadas con métodos de tratamiento, que son consideradas como materia objeto no patentable de acuerdo a la legislación colombiana de patentes, y describir la composición farmacéutica reclamada mediante características técnicas apropiadas.

1.4 Asimismo, se incluyó la nueva reivindicación 16.

2. Por otra parte, se ha modificado el capítulo descriptivo, con el fin de corregir errores tipográficos obvios. Se presenta adjunto al presente memorial nueva versión del capítulo descriptivo que reemplaza completamente el originalmente presentado.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad, novedad y nivel inventivo planteadas por el examinador en su concepto técnico.

En cuanto al número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta tasa por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene menor número de cláusulas que el originalmente presentado y en esencia es el mismo objeto pero más limitado y ajustado a las normas de patentabilidad en Colombia. En relación con la modificación al capítulo descriptivo, se adjunta comprobante de pago de la tasa de modificación correspondiente.

3. Claridad de la solicitud

Como primera medida, es deseo del solicitante presentar modificaciones al capítulo descriptivo, con el fin de corregir errores tipográficos obvios. Particularmente se ha modificado el párrafo 1 en la página 324, con el fin de reemplazar "*K297E*" por "*K197E*" y algunas mutaciones en las tablas 16 y 21. Soporte para estas modificaciones se encuentra, por ejemplo, en las tablas 1, 5, 9, 11, 12, 13 y en las SEQ ID NOS 22, 23 y 27 a 29. Por ejemplo, la tabla 5 identifica los mutantes CB559 como K197A en numeración FVII (K60aA, numeración quimotripsina) y CB558 como K197E (K60aE, numeración quimotripsina). Las otras tablas identifican de manera similar los mutantes. Adicionalmente, la tabla 16, que se corrige en la nueva versión, incluye las mutaciones correctas para la numeración quimotripsina. Los errores corregidos en la tabla 21 son obvios teniendo en cuenta que los residuos incorrectos no son consistentes con la secuencia del polipéptido FVII y la descripción en la solicitud, incluyendo las reivindicaciones. De esta forma, la numeración quimotripsina describe los residuos correctos.

Respecto a las objeciones de claridad, el solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones, de modo tal que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención descrita, siguiendo las recomendaciones realizadas por el examinador en su concepto técnico.

A continuación, el solicitante presenta de manera particular respuesta a las objeciones planteadas por el examinador:

- **Antiguas reivindicaciones 2, 5, 13, 21 y 22**

Se aclara al examinador que dichas reivindicaciones fueron eliminadas por lo que se entienden las objeciones por superadas.

- **Antigua reivindicación 7**

Se indica al examinador que en la antigua reivindicación 7, que corresponde a la nueva reivindicación 4, se ha eliminado la expresión "*al menos una modificación se selecciona de entre*", de tal forma que se elimina la falta de claridad de dicha reivindicación.

- **Antiguas reivindicaciones 14 y 15**

La antigua reivindicación 14 ha sido eliminada del presente capítulo reivindicatorio. En cuanto a la antigua reivindicación 15, que corresponde a la nueva reivindicación 7, es deseo del solicitante aclarar que dicha reivindicación depende de la reivindicación 1, indicando que la expresión "*el polipéptido FVII no modificado tiene una secuencia de aminoácidos dispuesta en la SEQ ID NO:3*" corresponde a la secuencia madura de FVII. La reivindicación 1 indica que "*el polipéptido FVII sin modificar comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en cualquiera de SEQ ID NOS:1-3*". Las SEQ ID NOS: 1 y 2 corresponden a la secuencia de la proteína precursora FVII. Por lo tanto, la nueva reivindicación 7 describe que el polipéptido FVII no modificado es el FVII maduro, que es una limitación adicional sobre la reivindicación 1, que recita que el polipéptido FVII no modificado puede incluir las secuencias de FVII precursor y maduro.

- **Antiguas reivindicaciones 25 y 26**

Las antiguas reivindicaciones 25 y 26 han sido objetadas por el examinador debido a que se dirigen a materia objeto no patentable según la legislación colombiana de patentes. En este sentido, el solicitante indica que dichas reivindicaciones, que corresponde a las nuevas reivindicaciones 14 y 15, han sido modificadas de tal forma que ahora describen células aisladas. Por su parte, la nueva reivindicación 16 describe líneas de células que son utilizadas en la investigación biológica y médica y no se encuentran en la naturaleza. De esta forma, no es necesario que la nueva reivindicación 16 indique que las células son células aisladas.

- **Antigua reivindicación 27**

La antigua reivindicación 27, que corresponde a la nueva reivindicación 17, fue modificada de tal forma que define una composición farmacéutica que comprende "*una concentración o una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido FVII modificado de cualquiera de reivindicaciones 1 a 11, en un vehículo farmacéuticamente aceptable*".

A este respecto, es deseo del solicitante aclarar que el ingrediente activo de la composición reclamada es el polipéptido modificado FVII, molécula de ácido nucleico, vector o célula, y contiene un "*un vehículo farmacéuticamente aceptable*". En o antes de la fecha de la fecha de prioridad, una persona del oficio normalmente versada en la

técnica hubiera sido capaz de identificar excipientes adecuados para incluir con el ingrediente activo, y las proporciones adecuadas.

INGREDIENTES ACTIVOS: el solicitante desea indicar que en la nueva reivindicación 17, la expresión indicando que la concentración o cantidad es "*terapéuticamente efectiva*" describe que el polipéptido, molécula de ácido nucleico, vector o célula tiene un efecto terapéutico. Por lo tanto, la nueva reivindicación 17, al indicar que la composición farmacéutica contiene "*una concentración o una cantidad terapéuticamente efectiva*" de polipéptido FVII modificado, molécula de ácido nucleico, vector o célula, describe que el polipéptido, molécula de ácido nucleico, vector o célula es un ingrediente activo.

EXCIPIENTES: En o antes de la primera fecha de prioridad de la presente solicitud, un experto en la técnica entendería lo que se quiere decir mediante el término "*excipiente*" en una composición farmacéutica y fácilmente habría podido identificar los excipientes. La solicitud describe ejemplos de excipientes:

> "*Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros agentes. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo de un compuesto terapéutico y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Una composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y otros agentes. Las preparaciones para la administración oral también se pueden formular adecuadamente con inhibidores de proteasa, tales como un inhibidor de Bowman-Birk, un inhibidor de Bowman-Birk conjugado, aprotinina y camostat. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington Pharmaceutical Sciences" por EW Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, en general en forma purificada, junto con una cantidad adecuada del vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada a un sujeto o paciente.*"

Adicionalmente, como se describe más adelante en forma detallada, los ejemplos de excipientes que se añaden a las composiciones farmacéuticas eran bien conocidos por los expertos en la materia en o antes de la fecha de prioridad más antigua reivindicada de la presente solicitud (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 6'280.761, 6'569.416, 6'572.886, 7'132.435 y muchas otras; y la publicación de patente de Estados Unidos de América No. 2003-0195150 y 2.003-0206969; copias de estos documentos se presentan como anexos al presente memorial).

Por ejemplo, la publicación de patente estadounidense No. 2003-0195150, publicada el 16 de octubre de 2003, describe aditivos que incluyen azúcar, jarabe de maíz, aceite de sabor, fluoruro de sodio, estearato de magnesio y agua (véase, por ejemplo, ejemplo 6). La patente de Estados Unidos de América No. 6'569.416, expedida el 27 de mayo de 2003, describe aditivos que incluyen mentol, cloruro de cetilpiridinio, sabor a cereza, glucosa, sacarosa, D&C Rojo No. 33, FD&C Rojo No. 40 u otros colorantes (véase, por ejemplo, ejemplo 21). La patente de Estados Unidos de América No. 6'572.886, expedida el 3 de junio de 2003, describe aditivos que incluyen sacarosa, jarabe de glucosa, fructosa, dextrosa, sorbitol, glicerol, polioles tales como xilitol, manitol e hidrolizados de almidón hidrogenados, maltitol, y eritritol (véase, por ejemplo, la página 1, columnas 1 y 2).

La patente de Estados Unidos de América No. 6'280.761, expedida el 28 de agosto de 2001, describe ejemplos de excipientes absorbentes que se pueden añadir a una composición farmacéutica, y las concentraciones ejemplares de excipientes (véase, por ejemplo, la columna 6) (énfasis añadido):

> *"Los excipientes absorbentes son sustancias farmacéuticamente aceptables que son capaces de 1) reducir la volatilidad de la nicotina, por ejemplo, a través de la absorción o por la incorporación de nicotina, tal como en un complejo de inclusión, y 2) de ser comprimidas en una pastilla o tableta. Los excipientes absorbentes adecuados incluyen, pero no se limitan a,* ***manitol; ciclodextrinas, incluyendo α, β, y γ-ciclodextrina, así como los derivados de ciclodextrinas, tales como trimetil-β-ciclodextrina, dimetil-β-ciclodextrina, hidroxietil-β-ciclodextrina, e hidroxipropil-β-ciclodextrina; preparaciones de sílice, tales como la formulación de sílice sintético comercializado bajo el nombre comercial Syloid® por WR Grace Limited of North Dale House, North Circular Road, Londres; materiales celulósicos, tales como Avicel microcelulosa fabricada por FMC Corporation; y otros aglutinantes y sustancias de relleno convencionales utilizadas en la industria alimentaria, tal como polvo de acacia, gelatina, goma árabe, y sorbitol."***
>
> *"... el excipiente absorbente puede servir como un saborizante, agente de tampón, lubricante, u otro componente de la pastilla."*
>
> ***"El excipiente absorbente está presente típicamente en una cantidad entre aproximadamente 5 y 25% en peso (% en peso), preferiblemente en una cantidad entre aproximadamente 5 y 20% en peso, y más preferiblemente en una cantidad entre aproximadamente 5 y 15% en peso."***

La publicación de patente estadounidense No. 2003-0206969, publicada el 6 de noviembre de 2003, describe ejemplos de aditivos en cápsula (véase, por ejemplo, en la página 7, párrafo 56) (énfasis añadido):

> *"Los ejemplos de cápsulas incluyen, sin limitación, cápsulas de gelatina blanda y cápsulas de gelatina dura. Las cápsulas se pueden preparar por métodos bien conocidos por las personas de experiencia ordinaria en la técnica. Por ejemplo, un gel suave o una cápsula de gelatina blanda*

pueden prepararse por dispersión de la formulación en un vehículo apropiado (aceites vegetales se utilizan comúnmente) para formar una mezcla de alta viscosidad. Esta mezcla se encapsula luego con una película basada en gelatina utilizando tecnología y maquinaria conocidas en la industria del gel suave. Las unidades industriales así formadas se secan a continuación hasta obtener un peso constante"

La publicación de patente estadounidense No. 2003-0206969 describe también excipientes de tabletas, incluyendo lubricantes y agentes aromatizantes (véase, por ejemplo, la página 7, párrafos 53 a 55) (énfasis añadido):

"*En una modalidad de la presente invención, la composición incluye aditivos tales como, por ejemplo, almidones, sacáridos, grasas, antioxidantes, aminoácidos, proteínas y derivados o combinaciones de los mismos. Los antioxidantes generalmente mejoran la estabilidad de la composición final. Los aditivos usados para formular la composición final también pueden ser incluidos. Por ejemplo, los aditivos de formulación tales como aceites naturales, polímeros de celulosa, sabores, xilitol, almidón de maíz, aspartamo, acacia, sacarosa, gelatina, ácido cítrico, FB&C amarillo # 6, FD & C rojo # 40, y agentes de flujo pueden ser incluidos en la presente composición como se discute en el presente documento a continuación.*"

"*Los aditivos incluidos en la forma de dosificación final de la composición, tal como un comprimido, se refieren comúnmente como excipientes. Los excipientes proporcionan propiedades físicas o estéticas a la forma de dosificación para la administración de un compuesto o composición a la ubicación de destino deseado. Por ejemplo, con respecto a las propiedades físicas, los comprimidos generalmente pueden necesitar tener tasas de dureza, desintegración y disolución aceptables para la liberación de la composición terapéutica, así como la estabilidad y el tamaño para la entrega eficaz de la composición. Con respecto a la estética, la tableta puede incluir aditivos que atraen a los sentidos, tales como colorantes, fragancias, modificadores de la textura, y/o agentes aromatizantes*"

"*A modo de ejemplo, uno o más lubricantes pueden ser añadidos a la composición para ayudar en la formulación mediante la inhibición de la adherencia de los ingredientes durante la compresión de una píldora o un comprimido. Ejemplos de lubricantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido esteárico, palmitoestearato, talco, y aceites. Los aceites naturales pueden estar presentes como lubricantes en la composición. Además, los agentes aromatizantes se pueden añadir a la composición. Los agentes aromatizantes incluyen, por ejemplo, sabores de frutas, o edulcorantes, tales como sacarina sódica, aspartamo, azúcar de confitería, sorbitol, sacarosa, xilitol, o combinaciones de los mismos.*"

Adicionalmente, la patente de Estados Unidos de América No. 7'132.435, expedida el 7 de noviembre de 2006, describe vehículos tales como agua, etanol, propilenglicol, metilcelulosa, o un aceite adecuado, y uno o más agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión (véase, por ejemplo, columna 14).

Por lo tanto, el solicitante se afirma muy respetuosamente que en o antes de la fecha de prioridad reivindicada más antigua de la presente solicitud, la persona del oficio normalmente versada en la técnica podría entender lo que se quiere decir con un excipiente de una composición farmacéutica y ser capaz de identificar los excipientes.

PROPORCIONES: La presente solicitud describe que las cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto activo "*pueden determinarse empíricamente ensayando los compuestos en sistemas conocidos in vitro e in vivo*", tales como los ensayos descritos en la aplicación (ver párrafo 1, página 243). La presente solicitud describe varios factores que se consideran en la determinación de una cantidad de dosis y enseña cantidades de dosificación ejemplares que pueden estar presentes en una composición farmacéutica.

a. Dosis:

"*La cantidad precisa o dosis del agente terapéutico administrado depende del polipéptido FVII particular, la vía de administración, y otras consideraciones, tales como la gravedad de la enfermedad y del peso y estado general del sujeto. La administración local del agente terapéutico requerirá típicamente una dosificación menor que cualquier modo de administración sistémica, aunque la concentración local del agente terapéutico puede, en algunos casos, ser más alta después de la administración local que se puede lograr con seguridad tras la administración sistémica. Si es necesario, un protocolo de dosificación y la duración y el tratamiento particular puede ser determinado empíricamente o extrapolado. Por ejemplo, las dosis ejemplares de polipéptidos FVII recombinantes y nativos se pueden utilizar como punto de partida para determinar dosificaciones apropiadas. Por ejemplo, un polipéptido recombinante FVII (rFVIIa) que ha sido activado para rFVIIa, NovoSeven®, se ha administrado a pacientes con hemofilia A o hemofilia B, que están experimentando un episodio de sangrado, a una dosis de 90 mg / kg por infusión en bolo durante 2 a 5 minutos, logrando un nivel circulante eficaz de al menos 2 g / ml. La dosis se repite cada 2 horas hasta que se logre la hemostasia. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento pueden ser eficaces en cantidades y/o frecuencias de dosificación reducidos en comparación con una FVII recombinante. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento pueden administrarse a una dosis de 80 mg / kg, 70 mg / kg, 60 mg / kg, 50 mg / kg, 40 mg / kg, 30 mg / kg, 20 mg / kg, 15 mg / kg o menos. En algunas modalidades, las dosis pueden ser mayores, tales como 100 mg / kg, 110 mg / kg, 120 mg / kg, o superior. La duración del tratamiento y el intervalo entre inyecciones variará según la gravedad de la hemorragia y la respuesta del paciente al tratamiento, y se puede ajustar en consecuencia. Factores tales como el nivel de actividad y la vida media del FVII modificado en comparación con el FVII no modificado pueden tenerse en cuenta al hacer las determinaciones de dosificación. Las dosis particulares y los regímenes pueden determinarse empíricamente.*"

"*En otro ejemplo, un polipéptido recombinante FVII (rFVIIa) que ha sido activado para rFVIIa, NovoSeven®, se ha administrado a pacientes con deficiencia congénita de FVII que están experimentando un episodio de sangrado, a una dosis de 15-30 mg / kg por infusión en bolo durante 2 a 5 minutos. La dosis se repite cada 4-6 horas hasta que se logre la hemostasia. Los polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento pueden ser eficaces en cantidades y/o frecuencias de dosificación reducidas en comparación con una FVII recombinante. Por ejemplo, los polipéptidos de FVII modificados proporcionados en este documento pueden administrarse a una dosis de 20 mg / kg, 15 mg / kg, 10 mg / kg, 5 mg / kg, 3 mg / kg o menos. En algunos ejemplos, las dosis pueden ser más altas, tales como 35 mg / kg, 40 mg / kg, 45 mg / kg, o superiores. La duración del tratamiento y el intervalo entre inyecciones variará según la gravedad de la hemorragia y la respuesta del paciente al tratamiento, y se puede ajustar en consecuencia. Factores tales como el nivel de actividad y la vida media del FVII modificado en comparación con el FVII no modificado se pueden utilizar en las determinaciones de dosificación.*

Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado que exhibe una vida media más larga que un polipéptido FVII sin modificar se puede administrar en dosis más bajas y/o con menos frecuencia que el polipéptido FVII sin modificar. Del mismo modo, las dosis requeridas para el efecto terapéutico usando un polipéptido FVII modificado que muestra aumento de la actividad coagulante en comparación con un polipéptido FVII sin modificar se pueden reducir en frecuencia y cantidad. Las dosis particulares y regímenes pueden ser determinadas empíricamente por un experto en la técnica."

Una persona del oficio normalmente versada en la técnica podría identificar cantidades relativas de excipientes e ingredientes activos para incluir en una composición farmacéutica. Los libros de texto disponibles antes de la primera fecha de prioridad describen los métodos por los cuales las cantidades relativas de excipientes y principios activos se pueden determinar (véase, por ejemplo, "*Un libro de Formulación farmacéutica*" BM Mithal (1997); y "*Formas de dosificación farmacéutica y Sistemas de entrega de drogas*" Ansel y otros (1997)). Por otra parte, FVII es conocida farmacéuticamente, por lo tanto se conocen numerosas formulaciones para la administración de FVII.

Considerando la anterior argumentación, es claro que una persona del oficio normalmente versada en la técnica después de leer la presente solicitud, reconocería que las enseñanzas de la formulación se podrían aplicar para preparar composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido FVII modificado, molécula de ácido nucleico, vector o célula según se describe . Después de la lectura del capítulo descriptivo originalmente presentado, la persona del oficio versada en la técnica no requeriría más que el conocimiento de métodos de rutina, para preparar la composición farmacéutica como se reivindica, en particular ya que FVII se ha preparado y administrado por más de 30 años. Consideramos que el solicitante no está obligado a recitar excipientes y proporciones de la composición farmacéutica de manera particular, ya que el experto en la técnica puede identificar otros excipientes y proporciones o utilizar composiciones conocidas, y de ese modo evitar una infracción. Por lo tanto, a la luz del conocimiento de la persona del oficio normalmente versada en la técnica, y la información incluida en el capítulo descriptivo originalmente presentado, la nueva reivindicación 17 cumple con los requisitos de claridad.

- **Antiguas reivindicaciones 28 a 31**

Se aclara al examinador que las expresiones relacionadas con métodos de tratamiento fueron eliminadas de las antiguas reivindicaciones 28 a 31, que corresponden a las nuevas reivindicaciones 18 a 21, de tal forma que la composición farmacéutica se describe únicamente mediante características técnicas. Es relevante indicar que las modificaciones realizadas en las nuevas reivindicaciones 18 a 21 se encuentran debidamente soportadas por la información incluida en las páginas 236 a 246 del capítulo descriptivo originalmente presentado.

En consecuencia, nos permitimos informar que las nuevas reivindicaciones 1 a 21 se ajustan a las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486.

4. Novedad

El examinador establece en su concepto técnico la falta de novedad de las antiguas reivindicaciones 1 a 4, 7, 8, 10 a 12 y 14 a 29 a la luz de las enseñanzas descritas en el documento WO2007031559 A2 (D1).

En este sentido, me permito decir que el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que la invención se considera nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica. Si de acuerdo con el espíritu de la norma legal indicada, la invención no se considera como nueva si está "*comprendida*" en el estado de la técnica, dicha norma se está refiriendo, naturalmente, a la totalidad del invento y no a alguno o a algunos de los componentes. Para que la invención pierda su calidad de novedosa, es claro que ella, TODA ELLA, ha de estar contenida en el "*conjunto de conocimientos existentes que son aplicables al proceso industrial*" como define el estado de la técnica el Tribunal de justicia del Acuerdo de Cartagena (Proceso No. 6-IP-89, sentencia de 31 de octubre de 1989, publicada en Jurisprudencia del Tribunal de Justicia del Acuerdo de Cartagena, Tomo 11, BID-INTAL, Buenos Aires, 1994, página 60).

Lo anterior significa que, para que las razones que aduce ese despacho para desvirtuar la novedad fuesen ciertas, sería forzoso que se demostrara que la invención de mi mandante está comprendida en el estado de la técnica de forma TOTAL, lo cual no sucede con la materia reclamada en las nuevas reivindicaciones.

Considerando la anterior definición, el solicitante desea manifestar que al revisar el documento D1, es claro que dicho documento no describe un polipéptido FVII modificado que comprende las secuencias de aminoácidos como se establece en cualquiera de SEQ ID NOS: 21, 23-26, 28, 29, 39-43, 128-133, 139-146, 229, 230, 232-235, 242-244, 248 and 250. El documento D1 únicamente describe un arreglo de variantes de FVII, y no selecciona o identifica los polipéptidos como se describen en el nuevo pliego reivindicatorio. Por lo tanto la invención reclamada es novedosa a la luz del estado de la técnica citado.

De manera particular, el documento D1 describe una gran variedad de variantes FVII. Por ejemplo, en las reivindicaciones y en las páginas 11-13, se describen variantes de FVII. Estas variantes de FVII contienen una sustitución de aminoácido en 40 posiciones en las que el aminoácido de tipo salvaje puede ser reemplazado por cualquier aminoácido.

El documento D1 describe un género muy grande de polipéptidos y no identifica ninguno de los polipéptidos FVII reivindicados en la presente solicitud. Las presentes reivindicaciones recitan una selección de los mismos que tienen propiedades particulares. La nueva reivindicación 1 describe polipéptidos de FVII que comprenden la secuencia de aminoácidos como se establece en cualquiera de las SEQ ID NOS: 21, 23-26, 28, 29, 39-43, 128-133, 139-146, 229, 230, 232- 235, 242-244, 248 y 250. Cada uno de estos polipéptidos de FVII incluye una modificación de aminoácidos seleccionada de entre un reemplazo seleccionado entre D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W, K199D y K199E. De esta

forma, el documento D1 no selecciona o identifica los polipéptidos reivindicados. Las presentes reivindicaciones se dirigen a subgrupos específicos de los muchos polipéptidos de FVII descritos en el documento D1.

Por ejemplo, en la página 3, línea 19 a la página 8, línea 17; página 9, líneas 18-25; página 10, líneas 7-16; página 22, líneas 6-21; y en la página 31, líneas 14 a 35 y la reivindicación 1, el documento D1 recita los polipéptidos de FVII, células huésped, animales y plantas transgénicas que contienen el polipéptido FVII y, que codifican moléculas de ácido nucleico, en donde el polipéptido FVII comprende una o más sustituciones que son:

> *"sustitución por cualquier otro aminoácido de uno o más aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste de la posición 172, 173, 175, 176, 177, 196, 197, 198, 199, 200, 203, 235, 237, 238, 239, 240, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 297, 299, 319, 320, 321, 327, 341, 363, 364, 365, 366, 367, 370, 373 correspondiente a las posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y en donde el polipéptido de factor VII ha incrementado la vida media funcional in vivo en comparación con el Factor de tipo salvaje humano VIIa."*

En los párrafos siguientes, el documento D1 describe cada una de las posiciones 172, 173, 175, 176, 177, 196, 197, 198, 199, 200, 203, 235, 237, 238, 239, 240, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 297, 299, 319, 320, 321, 327, 341, 363, 364, 365, 366, 367, 370, 373, y afirma que los otros 18 aminoácidos pueden sustituir el aminoácido nativo en cada una de estas 40 posiciones.

El documento D1 describe (véase, por ejemplo, páginas 11-13) variantes de FVII, en el que el residuo A175, Q186, L177, D196, K197, I198, K199, G237, T238, T239, Q286, L287, L288, D289, R290, G291, A292, T293, A294, L295, L297, V299, M327, K341, S363, W364, G365, V172, N173, N200, N203, V235, N240, D319, S320, P321, G367, T370 o H373 se reemplaza con cualquier grupo amino ácido. En las páginas 13 a 17, el aminoácido de sustitución se afirma que serán seleccionados de entre Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Met, Trp, Tyr, Asp, Asn, Glu, Gln, His, Lys, Arg, Cys y Ser, es decir, cualquier aminoácido distinto de Pro.

Así, el documento D1 describe una gran cantidad de modificaciones de cerca de 40 posiciones, que abarca más de 700 modificaciones posibles, además de un sinnúmero de polipéptidos, si se consideran los mutantes de combinación. El documento D1 no describe los polipéptidos reivindicados, ni describe las mutaciones seleccionadas de entre D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W, K199D y K199E. Por ejemplo, cuando se refiere a modificaciones en la posición 196, el documento D1 establece que:

> *"el polipéptido de factor VII es un polipéptido en el que D196 se sustituye por cualquier otro aminoácido seleccionado entre Gly, Ala, Leu, Ile, Phe, Met, Trp, Tyr, Asn, Glu, Gln, His, Lys, Arg, Cys, Ser, Val, Thr. (Véase, por ejemplo, la página 16, líneas 13-15)*

De esta forma, no hay ninguna descripción en el documento D1 indicando que el polipéptido FVII modificado exhibe una mayor resistencia a inhibidores o aumento de la actividad coagulante, ni que indique cuál de las modificaciones daría lugar a un polipéptido del factor VII con una mayor resistencia a los inhibidores o aumento de la actividad coagulante. La única modificación en las posiciones 196, 197 y 199 que se describe y se prueba específicamente para la actividad es D196A. D196A muestra una actividad catalítica reducida significativamente en comparación con la proteína de tipo salvaje. Ninguna de las reivindicaciones de la presente solicitud, recita la modificación D196A. Así, ninguno de los polipéptidos de FVII modificados recitados en las reivindicaciones incluye una modificación D196A. D196A no confiere ninguna propiedad ventajosa. El documento D1 no describe ninguno de los mutantes como se reivindica.

El documento D1 únicamente proporciona una larga lista de mutaciones (sustitución del aminoácido nativo con cualquier otro aminoácido) en alrededor de 40 posiciones y se indica que cualquier aminoácido puede estar sustituido en cualquiera de estas posiciones. D1 no indica que las mutaciones logren los resultados deseados ni tampoco divulga particularmente cualquiera de los polipéptidos de FVII reivindicados en la presente solicitud, ni ninguna de las mutaciones en las secuencias indicadas en la reivindicación 1. De este modo, mientras que el documento D1 da a conocer un género, las presentes reivindicaciones describen una selección de la misma que tienen propiedades particulares. El documento D1 no describe una mutación seleccionada de entre D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W, K199D y K199E. El documento D1 no describe un polipéptido modificado que contiene la secuencia de aminoácidos como se establece en cualquiera de las SEQ ID NOS: 21, 23-26, 28, 29, 39-43, 128-133, 139-146, 229, 230, 232 -235, 242-244, 248 y 250.

Por lo tanto, el documento D1 no anticipa TODAS las características técnicas descritas en la nueva reivindicación 1, ni cualquier reivindicación dependiente. Además, D1 no menciona o sugiere los resultados alcanzados por las mutaciones reivindicadas, y, por lo tanto, como veremos a continuación, no destruye la actividad inventiva de ninguna reivindicación.

Así, las nuevas reivindicaciones 1 a 21 se ajustan a las disposiciones del artículo 16 de la Decisión 486 a la luz de todos los documentos citados como estado de la técnica.

5. Nivel Inventivo

El examinador establece en su concepto técnico la falta de nivel inventivo de las antiguas reivindicaciones 5, 6, 9, 13 a la luz de las enseñanzas escritas en el documento D1.

De este modo, nos permitimos indicar que el artículo 18 de la Decisión 486 establece que "*Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni*

se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica".

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

Considerando lo anterior, es deseo del solicitante presentar argumentos que demuestran el nivel inventivo de la presente invención a la luz de las anterioridades citadas.

- **Diferencias entre el documento D1 y la nueva reivindicación 1**

Las enseñanzas descritas en el documento D1 se han descrito anteriormente. Como se describió anteriormente, D1 proporciona una lista de 40 posiciones (véase, por ejemplo, la reivindicación 1) que puede estar sustituida y establece que cada posición puede ser sustituida con cualquier aminoácido.

El documento D1 no enseña ni sugiere un reemplazo o reemplazos seleccionados entre K197Y, K197E, K197D, K197L, K197M, K199D, K199E, D196R / K197E / K199E, D196K / K197E / K199E, D196R / K197E / K199E / R290E, D196R / K197M / K199E, D196R / K197M / K199E / R290E, D196L, D196I, K197I, K197V, K197F, K197W, D196K / K197L, D196F / K197L, D196L / K197L, D196M / K197L, D196W / K197L, D196F / K197E, D196W / K197E , D196V / K197E, K197E / K341Q, K197L / K341Q, K197E / K199E, K197E / G237V, K199E / K341Q, K197E / G237V / K341Q, K197E / G237V / M298Q, K197E / G237V / M298Q / K341Q, K197E / K199E / G237V / M298Q / K341Q, K197E / M298Q y K197E / K199E / K341Q, que corresponden a las modificaciones en las SEC ID NO: 21, 23-26, 28, 29, 39-43, 128-133, 139-146, 229, 230 , 232-235, 242-244, 248 y 250, respectivamente, ni los mutantes de combinación de las reivindicaciones dependientes.

El documento D1 no enseña las modificaciones particulares en estos locus ni otros de los locus que afirman el aumento de la actividad catalítica o resistencia a los inhibidores, especialmente TFPI. El documento D1 no identifica cual de entre sus muchas mutaciones listadas en estas posiciones, confiere mayor actividad TF-dependiente. Por lo tanto, D1 proporciona únicamente una larga lista de muchas mutaciones en la posición listada, ninguna de los cuales exhibe una mayor actividad coagulante TF-dependiente. Los únicos datos proporcionados por una mutación en cualquiera de 196, 197 y 199 es para D196A, y esta sustitución se enseña por D1 para disminuir la actividad coagulante. Ninguna de las SEQ ID NOS: 21, 23-26, 28, 29, 128-133, 229, 230, 232-235, 243, 244, 248 y 250 contienen una modificación D196A de aminoácidos.

De esta forma, el documento D1 no menciona ni sugiere los polipéptidos de FVII mencionados en la reivindicación 1, ni ninguna de las variantes de FVII en cualquier reivindicación dependiente de la misma. Es la presente solicitud la que describe la identificación de mutaciones que exhiben una mayor resistencia a TFPI y/o muestran

una mayor actividad coagulante en virtud de los cambios de aminoácidos seleccionados para tener una resistencia alterada a inhibidores particulares de FVII. Estos resultados se reproducen a continuación.

Datos ejemplares en la aplicación que muestran que las modificaciones de aminoácidos seleccionados en los polipéptidos de FVII expuestos en la reivindicación 1 aumentan la actividad coagulante

Como se describe a continuación, los datos en la solicitud demuestran que cada uno de los polipéptidos FVI modificados que tienen la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NOS: 21, 23-26, 28, 29, 39-43, 128-133, 139-146 , 229, 230, 232-235, 242-244, 248 y 250 incluyen modificaciones de aminoácidos que aumentan la actividad coagulante del polipéptido FVII modificado. Además, los datos de la solicitud muestran que las propiedades conferidas por una mutación particular son aditivas o retenidas cuando se combinan con otras mutaciones. En particular, la solicitud proporciona ejemplos que muestran que los polipéptidos con una pluralidad de modificaciones de aminoácidos como se expone en las reivindicaciones dependientes presentan un aumento de la actividad catalítica y/o aumento de la resistencia a TFPI, que resulta en aumento de la actividad coagulante

Tabla A. Polipéptidos de FVII modificados y efectos

SEQ ID NO.	Modificación o modificaciones de aminoácidos	Efecto de la modificación o modificaciones	Referencia (s)
21	K197Y	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente; incrementa la actividad específica; incrementa la actividad catalítica	Página 213, Tabla 16, entrada CB561; Página 191, Tabla 11, entrada CB561; y Páginas 194 y 195, Tabla 12, entrada CB561
23	K197E	Incrementa la resistencia a TFPI; incrementa la actividad específica; incrementa la actividad catalítica	Página 219, Tabla 21, entrada CB558 (en su versión modificada); Páginas 194 y 195, Tabla 12, entrada CB558; y Página 191, Tabla 11, entrada CB558
24	K197D	Incrementa la resistencia a TFPI; incrementa la actividad específica; incrementa la actividad catalítica	Página 219, Tabla 21, entrada CB557; Página 191, Tabla 11, entrada CB557; y Páginas 194 y 195, Tabla 12, entrada CB557
25	K197L	Incrementa la resistencia a TFPI	Página 219, Tabla 21, entrada CB560
26	K197M	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente	Página 213, Tabla 16, entrada CB599

SEQ ID NO.	Modificación o modificaciones de aminoácidos	Efecto de la modificación o modificaciones	Referencia (s)
28	K199D	Incrementa la actividad específica	Página 191, Tabla 11, entrada CB562
29	K199E	Incrementa la actividad específica; incrementa la actividad catalítica; Incrementa la resistencia a TFPI	Página 191, Tabla 11, entrada CB563; Página 194, Tabla 12, entrada CB563; Página 219, Tabla 21, entrada CB563
39	D196R/K197E/K199E	Incrementa la actividad específica	Tabla 11, entrada CB586
40	D196K/K197E/K199E	Incrementa la actividad específica	Tabla 11, entrada CB586
41	D196R/K197E/K199E/R290E	Incrementa la actividad específica	Tabla 11, entrada CB586
42	D196R/K197M/K199E	Incrementa la actividad específica	Tabla 11, entrada CB586
43	D196R/K197M/ K199E/R290E	Incrementa la actividad específica	Tabla 11, entrada CB586
128	D196L	Incrementa la actividad catalítica	Tabla 16, entrada CB603
129	D196I	Incrementa la actividad catalítica	Tabla 16, entrada CB604
130	K197I	Incrementa la actividad catalítica	Tabla 16, entrada CB595
131	K197V	Incrementa la actividad catalítica	Tabla 16, entrada CB596
132	K197F	Incrementa la actividad catalítica	Tabla 16, entrada CB597
133	K197W	Incrementa la actividad catalítica	Tabla 16, entrada CB598
139	D196K/K197L	**D196K**: Incrementa la actividad catalítica; **K197L**: Incrementa la resistencia a TFPI	Tabla 12, entrada CB554; Tabla 21, entrada CB560
140	D196F/ K197L	**K197L**: Incrementa la resistencia a TFPI	Tabla 21, entrada CB560
141	D196L/ K197L	**D196L**: Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente; **K197L**: Incrementa la resistencia a TFPI	Tabla 16, entrada CB603; Tabla 21, entrada CB560
142	D196M/K197L	**K197L**: Incrementa la resistencia a TFPI	Tabla 21, entrada CB560
143	D196W/K197L	**K197L**: Incrementa la resistencia a TFPI	Tabla 21, entrada CB560
144	D196F/K197E	**K197E**: Incrementa la	Página 219, Tabla 21, entrada

SEQ ID NO.	Modificación o modificaciones de aminoácidos	Efecto de la modificación o modificaciones	Referencia (s)
145	D196W/K197E	resistencia a TFPI; incrementa la actividad específica; incrementa la actividad catalítica	CB558 (en su versión modificada); Páginas 194 y 195, Tabla 12, entrada CB558; y Página 191, Tabla 11, entrada CB558
146	D196V/K197E		
229	K197E/K341Q	Incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 21 y 23, entrada CB637
230	K197L/K341Q	Incrementa la resistencia a TFPI	Tabla 21, entrada CB638
232	K197E/K199E	Incrementa la resistencia a TFPI	Tabla 21, entrada CB688
233	K197E/G237V	Incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 21 y 23, entrada CB689
234	K199E/K341Q	Incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 21 y 23, entrada CB694
235	K197E/G237V/K341Q	Incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 21 y 23, entrada CB671
242	K197E/G237V/M298Q	**K197E**: Incrementa la resistencia a TFPI; incrementa la actividad específica; incrementa la actividad catalítica	Página 219, Tabla 21, entrada CB558 (en su versión modificada); Páginas 194 y 195, Tabla 12, entrada CB558; y Página 191, Tabla 11, entrada CB558
243	K197E/G237V/M298Q/K341Q		
244	K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q	**K197E**: Incrementa la resistencia a TFPI; incrementa la actividad específica; incrementa la actividad catalítica **K199E**: Incrementa la actividad específica; incrementa la actividad catalítica; Incrementa la resistencia a TFPI	Página 219, Tabla 21, entrada CB558 (en su versión modificada); Páginas 194 y 195, Tabla 12, entrada CB558; y Página 191, Tabla 11, entrada CB558; Página 191, Tabla 11, entrada CB563; Página 194, Tabla 12, entrada CB563; Página 219, Tabla 21, entrada CB563
248	K197E/M298Q	**K197E**: Incrementa la resistencia a TFPI; incrementa la actividad específica; incrementa la actividad catalítica	Página 219, Tabla 21, entrada CB558 (en su versión modificada); Páginas 194 y 195, Tabla 12, entrada CB558; y Página 191, Tabla 11, entrada CB558

SEQ ID NO.	Modificación o modificaciones de aminoácidos	Efecto de la modificación o modificaciones	Referencia (s)
250	K197E/K199E/K341Q	**K197E**: Incrementa la resistencia a TFPI; incrementa la actividad específica; incrementa la actividad catalítica **K199E**: Incrementa la actividad específica; incrementa la actividad catalítica; Incrementa la resistencia a TFPI	Página 219, Tabla 21, entrada CB558 (en su versión modificada); Páginas 194 y 195, Tabla 12, entrada CB558; y Página 191, Tabla 11, entrada CB558; Página 191, Tabla 11, entrada CB563; Página 194, Tabla 12, entrada CB563; Página 219, Tabla 21, entrada CB563

Así, los ejemplos incluidos en la solicitud muestran que una modificación de aminoácidos seleccionada entre D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W, K199D y K199E aumenta la resistencia de FVII a TFPI o aumenta la actividad de factor tisular (TF) dependiente de FVII. La solicitud describe que el aumento de la resistencia a TFPI o aumento de la actividad catalítica (TF) dependiente aumenta la actividad coagulante TF-dependiente. Por lo tanto, **una modificación de aminoácidos seleccionada de entre D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W, K199D y K199E aumenta la actividad coagulante TF-dependiente**. Los polipéptidos de FVII modificados enumerados en la reivindicación 1, como se muestra en la tabla 1 exhiben todos aumento de la actividad coagulante TF dependiente y/o contienen sustituciones de aminoácidos que lo hacen.

Los polipéptidos reclamados comparten características estructurales significativas. Son mutantes de FVII y, como se reclaman, difieren en uno o dos aminos o unos pocos residuos de ácido. Por lo tanto, los polipéptidos comparten identidad y homología de secuencia estructural significativa. Los mutantes descritos comparten características funcionales comunes en virtud de las mutaciones reclamadas en la estructura.

Además, la presente solicitud proporciona ejemplos que muestran que un polipéptido FVII modificado que incluye una modificación de aminoácidos seleccionada entre D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W, K199D y K199E, en combinación con una o más modificaciones, tales como las modificaciones que se exponen en las nuevas reivindicaciones 1, 2, 3, 4 y 5, exhiben un aumento de la actividad y/o aumento de la resistencia a TFPI. La siguiente tabla (Tabla B) resume los datos en la solicitud que demuestran polipéptidos de FVII modificados que incluyen una modificación de aminoácidos seleccionada entre D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W, K199D y K199E, en combinación con una o más de otras modificaciones de aminoácidos, y que exhibe un aumento de la actividad y/o aumento de la resistencia a TFPI (modificaciones de aminoácidos D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W, K199D y K199E están en negrita).

Tabla B. Polipéptidos FVII modificados

Variante	Referencia(s)
D196F/**K197E**	Tabla 16, entrada CB615
D196W/**K197E**	Tabla 16, entrada CB616
K197E/K341Q	Tablas 21 y 23, entrada CB637
K197L/K341Q	Tabla 21, entrada CB638
K197E/G237V/K341Q	Tablas 21 y 23, entrada CB671
K197E/K199E	Tablas 21 y 23, entrada CB688
K197E/G237V	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB689
K197E/G237V/M298Q	Tabla 16, entrada CB690
K197E/K199E/K341Q	Tablas 21 y 23, entrada CB691
K197E/G237V/M298Q/K341Q	Tablas 18, 21 y 23, entrada CB692
K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q	Tablas 21 y 23, entrada CB693
K199E/K341Q	Tablas 21 y 23, entrada CB694
K197E/M298Q	Tablas 16, 18 y 23, entrada CB902

Cada una de las SEQ ID NOS descrita en la nueva reivindicación 1 incluye una modificación de aminoácidos seleccionada de entre D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W, K199D y K199E. Cada una de las reivindicaciones 2 a 21 depende, directa o indirectamente, e incorpora las limitaciones de la nueva reivindicación 1. La solicitud demuestra que una modificación seleccionada de entre D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W, K199D y K199E aumenta la resistencia a TFPI y/o aumenta la actividad por sí sola o en combinación con otras mutaciones. Como se describió anteriormente, la aplicación proporciona ejemplos que demuestran que cada uno de las modificaciones de aminoácidos expuesta en la nueva reivindicación 1 aumenta la actividad coagulante, y los ejemplos en la solicitud demuestran tales efectos cuando se combinan modificaciones de aminoácidos (véase, por ejemplo, la Tabla A y Tabla B). Por lo menos estas razones, y por las razones adicionales que se describen más adelante con respecto a las reivindicaciones que recitan modificaciones de aminoácidos específicos adicionales, las reivindicaciones 1 a 11 recitan polipéptidos de FVII que presentan un aumento de la actividad coagulante.

Además del conocimiento disponible para un experto en la técnica con respecto a los efectos de las modificaciones FVII, la solicitud proporciona datos que muestran las propiedades de los polipéptidos en la nueva reivindicación 1 (véase la discusión anterior) y también los efectos de las mutaciones de acuerdo con las nuevas reivindicaciones 2, 3, 4, 5, 6 y 8. Para cada reivindicación, los datos de la solicitud se resumen.

- Nueva reivindicación 2

La nueva reivindicación 2 describe que el polipéptido FVII modificado incluye una modificación de aminoácidos adicional seleccionada de entre un reemplazo correspondiente a:

17

D196K, D196R, D196Y, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341R, K341N, K341M, K341D y K341Q

La tabla C a continuación, describe los efectos de las modificaciones mencionadas en la nueva reivindicación 2 en la estructura y/o actividad de FVII. Los efectos de las modificaciones se describen en una o más de las Tablas 11 13, 16, 21 y 23 de la solicitud.

Tabla C. Polipéptidos FVII variantes.

Variante en la reivindicación 2	Efecto(s) de la variación	Referencia(s)
D196K	Disminuye la actividad específica, incrementa la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB554
D196R	Disminuye la actividad específica, incrementa la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB555
D196Y	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB601
D196L	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB603
D196I	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB604
K197D	Incrementa la actividad específica, incrementa la actividad catalítica, disminuye la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB557

Variante en la reivindicación 2	Efecto(s) de la variación	Referencia(s)
K197E	Incrementa la actividad específica, incrementa la actividad catalítica, disminuye la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 11-13, 16, 21 y 23, entrada CB558
K197A	Incrementa la actividad específica, incrementa la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB559; Dickinson *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1996) 93(25):14379-84
K197L	Disminuye la actividad específica, disminuye la actividad catalítica, disminuye la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB560
K197Y	Incrementa la actividad específica, incrementa la actividad catalítica, disminuye la inhibición por TFPI, Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB561
K197I	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB595
K197V	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB596
K197F	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB597
K197W	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tabla 16 y 21, entrada CB598

Variante en la reivindicación 2	Efecto(s) de la variación	Referencia(s)
K197M	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB599
K199D	Incrementa la actividad específica, disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16, 21, entrada CB562
K199E	Incrementa la actividad específica, incrementa la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 11-13, 16, 21 y 23, entrada CB563
K199A	Incrementa la actividad específica, disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI, disminuye la unión de TF y la tasa de activación del Factor X	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB564; y Dickinson Proc. Natl. Acad. Sci U S A. 1996 93(25):14379-84
G237W	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB605
G237V	Incrementa la actividad catalítica, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16 y 23, entrada CB608
T239A	Incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 13 y 21, entrada CB565
R290D	Incrementa la actividad específica, incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 11, 13 y 21, entrada CB566
R290E	Incrementa la actividad específica, incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 11, 13 y 21, entrada CB567
R290A	Incrementa la actividad específica, incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 11, 13 y 21, entrada CB568

Variante en la reivindicación 2	Efecto(s) de la variación	Referencia(s)
R290N	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB697
R290Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB698
R290K	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI, disminuye la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB699
K341R	Incrementa la actividad específica, disminuye la actividad catalítica, disminuye la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB569
K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB609
K341N	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB733
K341M	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB734

Variante en la reivindicación 2	Efecto(s) de la variación	Referencia(s)
K341D	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 17, 21 y 23, entrada CB735

La tabla D, a continuación, enumera las variantes de los polipéptidos FVII descritos en la solicitud que incluyen una modificación descrita en la nueva reivindicación 2 en combinación con una o más de otras modificaciones, y el efecto(s) de la variación (modificación o modificaciones descritas en la reivindicación 2 se encuentran en negrita).

Tabla D. Polipéptidos FVII variantes.

	Variantes que incluyen una modificación de amino acido recitada en la reivindicación 2	Efecto de variación	Referencia(s)
1	**D196R/K197E/ K199E**	Incrementa la actividad específica, disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB586
2	**D196K/K197E/ K199E**	Incrementa la actividad específica, disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB587
3	**D196R/K197E/ K199E/R290E**	Incrementa la actividad específica, disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB588
4	**D196R/K197M/ K199E**	Incrementa la actividad específica, disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB589

22

	Variantes que incluyen una modificación de amino acido recitada en la reivindicación 2	Efecto de variación	Referencia(s)
5	D196R/K197M/ K199E/R290E	Incrementa la actividad específica, disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB590
6	D196F/ K197L	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB612
7	D196L/ K197L	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB611
8	D196M/K197L	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto)	Tabla 16, entrada CB613
9	D196W/K197L	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB614
10	D196F/K197E	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB615
11	D196W/K197E	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto)	Tabla 16, entrada CB616
12	D196V/K197E	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB617
13	K197E/K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB637
14	K197L/K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI	Tablas 16 y 21, entrada CB638
15	K197E/G237V/ K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB671
16	K197E/K199E	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB688

	Variantes que incluyen una modificación de amino acido recitada en la reivindicación 2	Efecto de variación	Referencia(s)
17	K197E/G237V	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB689
18	K199E/K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21, y 23, entrada CB694
19	K197E/K199E/ K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la afinidad para el TF soluble, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21, 22 y 23, entrada CB691
20	D196R/R290E	Incrementa la actividad específica, disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB579
21	D196K/R290E	Disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 12, 13, 16 y 21, entrada CB580
22	D196R/R290D	Incrementa la actividad específica, disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB581
23	G237V/K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB670
24	K197E/G237V/ M298Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la afinidad para el TF soluble	Tablas 16 y 22, entrada CB690

	Variantes que incluyen una modificación de amino acido recitada en la reivindicación 2	Efecto de variación	Referencia(s)
25	K197E/G237V/ M298Q/K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la afinidad para el TF soluble, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 18, 21, 22 y 23, entrada CB692
26	K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB693
27	G237V/M298Q	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la afinidad para el TF soluble, disminuye la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 18, 22 y 23, entrada CB695
28	G237V/M298Q/ K341Q	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la afinidad para el TF soluble, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 22 y 23, entrada CB696
29	K197E/M298Q	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 18 y 23, entrada CB902
30	M298Q/K341D	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 17 y 23, entrada CB945

- **Nueva reivindicación 3**

La nueva reivindicación 3 describe que el polipéptido FVII modificado incluye modificaciones seleccionadas de entre los reemplazos correspondientes a:

D196R / K197E / K199E, D196K / K197E / K199E, D196R / K197E / K199E / R290E, D196R / K197M / K199E, D196R / K197M / K199E / R290E, D196F / K197L, D196L / K197L, D196M / K197L, D196W / K197L, D196F / K197E,

D196W / K197E, K196V / K197E, K197E / K341Q, K197L / K341Q, K197E / G237V / K341Q, K197E / K199E, K197E / G237V, K199E / K341Q y K197E / K199E / K341Q.

La solicitud describe los efectos de las modificaciones mencionadas en la nueva reivindicación 3 en la actividad FVII (véase, por ejemplo, la Tabla D anterior, filas 1-19).

- **Nueva reivindicación 4**

La nueva reivindicación 4 describe que el polipéptido FVII modificado incluye dos o más modificaciones correspondientes a dos o más de:

D196K, D196R, D196Y, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341R, K341N, K341M, K341D, K341Q, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA y K197I198insS.

La solicitud describe polipéptidos de FVII que incluyen modificaciones mencionadas en la reivindicación 4. La Tabla C, más arriba, describe los efectos de las modificaciones:

D196K, D196R, D196Y, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341R, K341N, K341M, K341D y K341Q

La Tabla E, a continuación, describe los efectos de las modificaciones G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA y K197I198insS.

Tabla E. Polipéptidos FVII variantes.

Variante recitada en la reivindicación 7	Efecto de variación	Referencia(s)
G237T238insA	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 17 y 23, entrada CB853
G237T238insS	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 17 y 23, entrada CB854

Variante recitada en la reivindicación 7	Efecto de variación	Referencia(s)
G237T238insV	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 17 y 23, entrada CB855
G237T238insAS	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 17 y 23, entrada CB856
G237T238insSA	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 17 y 23, entrada CB857
D196K197insK	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto)	Tabla 17, entrada CB858
D196K197insR	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 16, 17 y 23, entrada CB859
D196K197insY	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto)	Tabla 16, entrada CB860
D196K197insA	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 17 y 23, entrada CB862
D196K197insM	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 17 y 23, entrada CB863
K197I198insE	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 17 y 23, entrada CB864

Variante recitada en la reivindicación 7	Efecto de variación	Referencia(s)
K197I198insY	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 17 y 23, entrada CB865
K197I198insA	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto)	Tabla 16, entrada CB866
K197I198insS	Incrementa la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI TF-dependiente	Tablas 17 y 23, entrada CB867

La solicitud también describe polipéptidos de FVII modificados que tienen dos o más modificaciones de aminoácidos seleccionados de entre los enumerados en la reivindicación 4, incluyendo polipéptidos de FVII que incluyen mutaciones D196R / K197E / K199E, D196K / K197E / K199E, D196R / K197E / K199E / R290E, D196R / K197M / K199E, D196R / K197M / K199E / R290E, D196K / K197L, D196L / K197L, D196F / K197L, D196M / K197L, D196W / K197L, D196F / K197E, D196W / K197E, K197E / K341Q, K197L / K341Q, K197E / G237V / K341Q, K197E / K199E, K197E / G237V, K197E / G237V / M298Q, K197E / K199E / K341Q, K197E / G237V / M298Q / K341Q y K199E / K341Q (véase, por ejemplo, la Tabla D, arriba).

- **Nueva reivindicación 5**

La nueva reivindicación 5 describe que el polipéptido FVII modificado incluye modificaciones de aminoácidos seleccionados de entre:

D196R / K197E / K199E, D196K / K197E / K199E, D196R / K197E / K199E / R290E, D196R / K197M / K199E, D196R / K197M / K199E / R290E, K197E / K341Q, K197L / K341Q, G237V / K341Q, K197E / G237V / K341Q, K197E / K199E, K197E / G237V, K199E / K341Q, K197E / K199E / K341Q y K197E / G237V / M298Q.

La solicitud ejemplifica específicamente los efectos de cada una de las modificaciones de aminoácidos como se expone en la reivindicación 9 (véase, por ejemplo, la Tabla F a continuación).

28

Tabla F. Polipéptidos FVII variantes.

Variantes recitadas en la reivindicación 9	Efecto de variación	Referencia(s)
D196R/K197E/ K199E	**Incrementa la actividad específica,** disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB586
D196K/K197E/ K199E	**Incrementa la actividad específica,** disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB587
D196R/K197E/ K199E/R290E	**Incrementa la actividad específica,** disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB588
D196R/K197M/ K199E	**Incrementa la actividad específica,** disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB589
D196R/K197M/ K199E/R290E	**Incrementa la actividad específica,** disminuye la actividad catalítica, incrementa la inhibición por TFPI, disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), disminuye la resistencia a TFPI	Tablas 11-13, 16 y 21, entrada CB590
K197E/K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), **incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente**	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB637
K197L/K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), **incrementa la resistencia a TFPI**	Tablas 16 y 21, entrada CB638
G237V/K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), **incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente**	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB670

Variantes recitadas en la reivindicación 9	Efecto de variación	Referencia(s)
K197E/G237V/ K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), **incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente**	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB671
K197E/K199E	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), **incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente**	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB688
K197E/G237V	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), **incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente**	Tablas 16, 21 y 23, entrada CB689
K199E/K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), **incrementa la resistencia a TFPI, incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente**	Tablas 16, 21, y 23, entrada CB694
K197E/K199E/ K341Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), **incrementa la resistencia a TFPI,** incrementa la afinidad para el TF soluble, **incrementa la resistencia a TFPI TF-dependiente**	Tablas 16, 21, 22 y 23, entrada CB691
K197E/G237V/ M298Q	Disminuye la actividad catalítica TF-dependiente (ensayo indirecto), incrementa la afinidad para el factor de tejido	Tablas 16 y 22, entrada CB690

- Nueva reivindicación 6

La nueva reivindicación 6 depende de las reivindicaciones 1 a 5 y recita que los polipéptidos FVII modificados "*presentan una mayor resistencia al inhibidor de la vía del factor de tejido (TFPI) en comparación con el polipéptido FVII no modificado*". La solicitud proporciona ejemplos de trabajo que muestran que los siguientes FVII variantes incrementan la resistencia a TFPI:

K197D, K197L, K199E, T239A, R290D, R290E, R290A, K341R, K341Q, K197E / K341Q, K197L / K341Q, G237V / K341Q, K197V / G237V / K341Q, K197E / K199E, K197E / G237V, K197E / K199E / K341Q, K197E / G237V / M298Q / K341Q, K197E / K199E / G237V / M298Q / K341Q, K199E / K341Q, G237V / M298Q / K341Q, R290N, R290Q, R290V, K341N, K341M y K341D.

La solicitud también proporciona ejemplos de trabajo que muestran que las siguientes variantes FVII incrementan la resistencia a TFPI TF-dependiente:

K197A, K197E, M298Q, G237V, K341Q, K197E / K341Q, G237V / K341Q, K197V / G237V / K341Q, K197E / K199E, K197E / G237V, K197E / K199E / K341Q, K197E / G237V / M298Q / K341Q, K197E / K199E / G237V / M298Q / K341Q, K199E / K341Q, G237V / M298Q / K341Q, R290N, R290Q, R290M, R290V, K341N, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, K197I198insE, K197I198insY, K197E / M298Q y M298Q / K341D.

(Véase, por ejemplo, las Tablas 21 y 23, que se reproducen a continuación (énfasis añadido para los mutantes que presentan una mayor resistencia TFPI y/o aumento de la resistencia TFPI TF-dependiente)):

Tabla 21. Inhibición de variantes FVIIa por TFPI

ID	Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración Quimotripsina)	Resistencia a TFPI
CB553	wt	wt	1.0
CB554	D196K	D60K	0.6
CB555	D196R	D60R	0.5
CB556	D196A	D60A	<0.3
CB557	**K197D**	**K60aD**	**3.0**
CB558	K197E	K60aE	1.3
CB559	K197A	K60aA	0.7
CB560	**K197L**	**K60aL**	**16.0**
CB561	K197Y	K60aY	1.5
CB562	K199D	K60cD	0.9
CB563	**K199E**	**K60cE**	**1.3**
CB564	K199A	K60cA	0.9
CB565	**T239A**	**T99A**	**4.5**
CB566	**R290D**	**R147D**	**3.3**
CB567	**R290E**	**R147E**	**6.1**
CB568	**R290A**	**R147A**	**2.8**
CB569	**K341R**	**K192R**	**4.1**
CB579	D196R/R290E	D60R/R147E	0.4
CB580	D196K/R290E	D60K/R147E	0.7
CB581	D196R/R290D	D60R/R147D	0.4
CB586	D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/K60cE	<0.3
CB587	D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/K60cE	0.3
CB588	D196R/ K197E/ K199E/R290E	D60R/K60aE/K60cE/R147E	0.4
CB589	D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/K60cE	0.6
CB590	D196R/ K197M/ K199E/R290E	D60R/K60aM/K60cE/R147E	0.9
CB591	L305V/S314E/L337A/F374Y	L163V/S170bE/K188A/F225Y	0.6
CB592	M298Q	M156Q	0.5

Clarke, Modet & C°

COLOMBIA

ID	Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración Quimotripsina)	Resistencia a TFPI
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	0.8
CB594	V158D/E296V/M298Q/K337A	V21D/E154V/M156Q/K188A	0.3
CB595	K197I	K60aI	0.8
CB596	K197V	K60aV	0.6
CB597	K197F	K60aF	<0.3
CB598	K197W	K60aW	<0.3
CB599	K197M	K60aM	0.3
CB600	D196F	D60F	<0.3
CB601	D196Y	D60Y	<0.3
CB602	D196W	D60W	<0.3
CB603	D196L	D60L	<0.3
CB604	D196I	D60I	<0.3
CB605	G237W	G97W	<0.3
CB606	G237T	G97T	0.3
CB608	G237V	G97V	0.8
CB609	K341Q	K192Q	12.2
CB611	K197L/D196L	K60aL/D60L	<0.3
CB612	K197L/D196F	K60aL/D60F	<0.3
CB614	K197L/D196W	K60aL/D60W	<0.3
CB615	K197E/D196F	K60aE/D60F	<0.3
CB617	K197E/D196V	K60aE/D60V	<0.3
CB637	K197E/K341Q	K60aE/K192Q	80.7
CB638	K197L/K341Q	K60aL/K192Q	39.0
CB670	G237V/K341Q	G97V/K192Q	14.1
CB671	K197V/G237V/K341Q	K60aE/G97V/K192Q	18.9
CB688	K197E/K199E	K60aE/K60cE	2.1
CB689	K197E/G237V	K60aE/G97V	1.7
CB691	K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	34.3
CB692	K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	15.2
CB693	K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/K60cE/G97V/M156Q/K192Q	22.1
CB694	K199E/K341Q	K60cE/K192Q	19.1
CB696	G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	3.2
CB697	R290N	R147N	1.5
CB698	R290Q	R147Q	1.2
CB699	R290K	R147K	0.6
CB700	R290M	R147M	1.0
CB701	R290V	R147V	2.5
CB733	K341N	K192N	10.7
CB734	K341M	K192M	4.4
CB735	K341D	K192D	148.0

32

Tabla 23. Resistencia de variantes FVIIa a la inhibición por TFPI

ID	Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración Quimotripsina)	Ensayo de Resistencia a TFPI TF-Dependiente			
			293-F Células		BHK-21 Células	
			Unión (wt/ variante)	Disociación (wt/ variante)	Unión (wt/ variante)	Disociación (wt/ variante)
CB553	WT	WT	1.0	1.0	1.0	1.0
CB558	K197A	K60aE	1.4	1.3		
CB563	K197E	K60cE	1.4	1.4		
CB592	M298Q	M156Q	1.9	1.8		
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	0.8	0.8	1.0	1.0
CB608	G237V	G97V	2.2	1.8		
CB609	K341Q	K192Q	13.0	19.7		
CB637	K197E/K341Q	K60aE/K192Q	67.2	171.1		
CB670	G237V/K341Q	K192Q/G97V	12.8	12.4		
CB671	K197V/G237V/K341Q	K60aE/K192Q/G97V	18.9	21.8		
CB688	K197E/K199E	K60aE/K60cE	2.2	2.1		
CB689	K197E/G237V	K60aE/G97V	1.8	1.6		
CB691	K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	33.9	68.1		
CB692	K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	15.9	21.5		
CB693	K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/K60cE/G97V/M156Q/K192Q	23.4	43.5		
CB694	K199E/K341Q	K60cE/K192Q	18.8	30.7		
CB695	G237V/M298Q	G97V/M156Q	0.9	0.8		
CB696	G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	4.5	6.0		
CB697	R290N	R147N	1.6	1.5		
CB698	R290Q	R147Q	1.3	1.2		
CB699	R290K	R147K	0.7	0.7		
CB700	R290M	R147M	1.1	1.1		
CB701	R290V	R147V	2.6	2.7		
CB733	K341N	K192N	11.3	63.8		
CB734	K341M	K192M	4.9	5.4		
CB735	K341D	K192D	185.6	380.7		
CB853	G237T238insA	G97T98insA	-	-	6.5	18.2
CB854	G237T238insS	G97T98insS	-	-	5.2	13.0
CB855	G237T238insV	G97T98insV	-	-	7.3	16.8
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS	-	-	22.8	154.5
CB857	G237T238insSA	G97T98insSA	-	-	21.5	146.5
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK			1.0	0.8
CB859	D196K197insR	D60K60ainsR			0.5	0.5
CB862	D196K197insA	D60K60ainsA			0.5	0.4
CB863	D196K197insM	D60K60ainsM			0.4	0.4
CB864	K197I198insE	K60aI60binsE	-	-	1.3	1.1
CB865	K197I198insY	K60aI60binsY	-	-	1.1	1.0
CB867	K197I198insS	K60aI60binsS			0.7	0.6

33

ID	Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración Quimotripsina)	Ensayo de Resistencia a TFPI TF-Dependiente			
			293-F Células		BHK-21 Células	
			Unión (wt/ variante)	Disociación (wt/ variante)	Unión (wt/ variante)	Disociación (wt/ variante)
CB902	K197E/M298Q	K60aE/M156Q	2.6	2.3		
CB945	M298Q/K341D	M156Q/K192D	146.8	196.5		

- Nueva reivindicación 8

La nueva reivindicación 8 describe que el polipéptido FVII modificado consiste en una secuencia de aminoácidos establecidos en "*cualquiera de las SEC ID NOS: 21, 23-26, 28, 29, 39-43, 128-133, 139-146, 229, 230, 232-235, 242-244, 248 y 250*". Cada uno de los polipéptidos FVII modificados cuya secuencia se establece en la SEQ ID NOS: 21, 23-26, 28, 29, 39-43, 128-133, 139-146, 229, 230, 232-235, 242-244, 248 y 250 se enumeran en la tabla A anterior. La solicitud describe los efectos de cada mutación que corresponde a una secuencia expuesta en la nueva reivindicación 8.
En conclusión, se tiene que el documento D1 no describe el polipéptido FVII modificado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 21, 23-26, 28, 29, 39-43, 128-133, 139-146, 229, 230, 232 -235, 242-244, 248 y 250. Dicho documento no menciona ni sugiere los efectos técnicos de cada polipéptido reivindicado, ni los resultados descritos en la presente solicitud, lo que demuestra que una modificación de aminoácidos seleccionada entre D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W y K199E aumenta la actividad coagulante del FVII. Los polipéptidos cuya secuencias se exponen en las SEQ ID NOS: 21, 23-26, 28, 29, 39-43, 128-133, 139-146, 229, 230, 232-235, 242-244, 248 y 250 incluyen una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W, K199D y K199E.

Como se discutió anteriormente, estos polipéptidos se han preparado y demostrado para exhibir efectos técnicos en virtud de las modificaciones. La solicitud describe y ofrece ejemplos prácticos que demuestran que los polipéptidos FVII modificados mencionados en la presente reivindicación 1 exhiben mayor actividad coagulante. Los ejemplos incluidos en la solicitud demuestran tales efectos cuando las modificaciones de aminoácidos mencionadas en la reivindicación 1 se combinan con otras modificaciones de aminoácidos, incluyendo modificaciones de aminoácidos recitadas en las reivindicaciones dependientes. La solicitud también describe y ofrece ejemplos prácticos que demuestran que los polipéptidos modificados recitados en las reivindicaciones dependientes exhiben un aumento de la actividad coagulante. Por lo tanto, el solicitante manifiesta que la solicitud demuestra que los polipéptidos FVII modificados citados en las reivindicaciones 1 a 11 que incluyen una sustitución de aminoácidos seleccionada de entre D196L, D196I, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197Y, K197F, K197W y K199E exhiben mayor actividad coagulante.

34

Considerando lo anterior, es claro para una persona del oficio normalmente versada el nivel inventivo de la invención descrita en la presente solicitud. Así, se demuestra que las nuevas reivindicaciones 1 a 21 se ajustan a las disposiciones del artículo 18 de la Decisión 486.

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el señor examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo-, 35 y 59 del Código Contencioso Administrativo que señala que: *"habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión que será motivada al menos en forma sumaria si afecta a particulares"* y *"(..) deberá proferirse la decisión definitiva. Esta se motivará en sus aspectos de hecho y de derecho, y en los de conveniencia si es el caso"*, respectivamente (El subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional

Señor Superintendente,

SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ
C.C. 22.468.787 de Barranquilla
T.P 147463 del CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

ANEXOS

- CD que contiene los siguientes documentos:
  Nueva versión de memoria descriptiva y capítulo reivindicatorio que incluye 21 reivindicaciones
  Copia de documento US 6'280.761.
  Copia de documento US 6'569.416
  Copia de documento US 6'572.886
  Copia de documento US 7'132.435
  Copia de documento US 2003-0195150
  Copia de documento US 2003-0206969

36

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Tramite

[ ] Error material

[X] **Modificación a una Solicitud en trámite**

[X] Patente de Invención
[ ] Patente de Modelo de Utilidad
[ ] Registro de Diseño Industrial
[ ] Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural [ ] Persona Jurídica [X]

CATALYST BIOSCIENCES, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro [ ] Pequeña [ ] Mediana [ ] Otra [ ]

Documento de identificación: [ ] C.C. [ ] C.E. [ ] NIT [ ] Otro Número_____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	260 Littlefield Avenue South San Francisco,	California 94080,

Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

[ ] Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ	. C.C. 22.468.787	147463 CSJ
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia		Bogotá D.C.
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
notificaciones@clarkemodet.com.co	6350824	6181088

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

37

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No. 09-111.636

Aparece _____

_____

Debe ser _____

_____

Modificación:

☐ Presentación Solicitud Divisional.

_____

☐ Modificación al capítulo descriptivo.

_____

_____

■ Modificación al capítulo Reivindicatorio

_____

_____

☐ Modificación al resumen.

_____

_____

☐ Modificación a los dibujos.

_____

5. Anexos

■ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación

☐ Poder, si fuere el caso.

■ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.

■ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma

SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ
C.C. 22.468.787 de Barranquilla
T.P 147463 del CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

38

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0030688

Bogotá D.C., Marzo 16 de 2015 - 15:02:21

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	8845	22/01/2015		185.000.00
RECIBO DE CA	999999999	8870	22/01/2015		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	8940	22/01/2015		509.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES EN N.CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODOFICA	132.000.00	132.000.00
				$132.000.00

SON: **CIENTO TREINTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-*****-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-111636- -00022-0000
Fecha: 2015-04-15 15:55:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCF
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 523 RESPUESTA Folios: 40

39

P-2326

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	**TESTIGO DOCUMENTAL**	Folio: 10

Dependencia Jerárquica: DELG. PROPIEDAD INDUSTRIAL	**Código**	2020
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES	**Código**	2020
Tipo de Radicación: Entrada: **X** Salida: □ Traslado: □ Convenio: □		
Radicador:		

DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA

Nombre de la Serie / Subserie:	Código:
Expediente: 09-111636 — 22	Solicitante / ***Quejoso / Demandante / otros.***
Prueba excluida: Cd	
N°. de Pruebas excluidas: 1	
Fecha de emisión de la Prueba:	

UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO

N°. de bloque:		Otras especificaciones:
Nº. de rodante:		
Nº. de estante:		
N°. de archivador:		
Nº. de entrepaño:		
Nº. de gaveta:		
N°. de caja:		

IMPORTANTE:

- El material gráfico ***o especial*** que se encuentra ***dentro o anexo a*** las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos.
- Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códices, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.

Observaciones:

El Cd Contiene:

7 Archivos en formato Pdf los Cuales Son procesados y Cargados al Sistema.

Okado

Unidad de Conservación

- ○ Bolsa
- ○ Caja
- ○ Libro
- ○ Sobre
- ○ Tomo
- ○ Otro

Soporte Documental

- — CD
- ○ Disquete
- ○ DVD
- ○ Folleto
- ○ Periódico
- ○ Plano
- ○ Publicación Periódica
- ○ USB
- ○ Otro

POLIPEPTIDOS DE FACTOR VII MODIFICADOS

Solicitudes Relacionadas

Se reclama beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de EEUU No. 60/923,512, a Edwin Madison, Christopher Thanos, Sandra Waugh Ruggles y Shaun Coughlin, titulada “POLIPEPTIDOS DE FACTOR VII MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS”, presentada el 13 de abril de 2007.

Esta solicitud está relacionada con la correspondiente Solicitud de EEUU No. 12/082, 662 a Edwin Madison, Christopher Thanos, Sandra Waugh Ruggles y Shaun Coughlin, titulada “POLIPEPTIDOS DE FACTOR VII MODIFICADOS Y USOS DE LOS MISMOS”, la cual también reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de EEUU No. 60/923,512.

Donde sea permitido, la materia objeto de cada una de las solicitudes anteriormente mencionadas es incorporada por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

Se proporcionan proteínas terapéuticas modificadas. En particular se suministran polipéptidos de Factor VII modificados, los cuales incluyen Factor VIIa y otras formas de Factor VII, y usos de los mismos.

ANTECEDENTES

La hemostasia es el proceso fisiológico complejo que lleva al cese del sangrado. Las plaquetas, proteínas plasmáticas, vasos sanguíneos y las células endoteliales son los tres componentes de este proceso donde los tres juegan un papel importante en los eventos que siguen inmediatamente a la

lesión de los tejidos y el cual, bajo circunstancias normales, resulta en la formación rápida de un coágulo. Central a esto es la cascada de coagulación, una serie de eventos proteolíticos en los cuales ciertas proteínas plasmáticas (o factores de coagulación) son activadas secuencialmente en una “cascada” por otro factor de coagulación previamente activado, llevando a la rápida generación de trombina. Las grandes cantidades de trombina producida en esta cascada fuego funcionan para rajar fibrinógeno en los péptidos de fibrina que se requieren para la formación del coágulo.

Los factores de coagulación circulan como zimógenos de cadena simple inactivos, y son activados por medio de la división de una o más posiciones para generar una forma activada de dos cadenas de la proteína. El Factor VII (FVII), una proteína plasmática dependiente de vitamina K, inicialmente circula en la sangre como un zimógeno. El zimógeno FVII es activado por medio de la separación proteolítica en un sitio simple, Arg^{152}-Ile^{153}, resultando en una proteína de dos cadenas vinculada por una unión de disulfuro simple (FVIIa). El FVIIa une su cofactor, factor de tejido (TF), para formar un complejo en el cual el FVIIa puede eficientemente activar el factor X (FX) a FXa, iniciando así la serie de eventos que resulta en la formación de fibrina y la hemostasia.

Mientras que la hemostasia normal se logra en la mayoría de los casos, los defectos en el proceso pueden llevar a desordenes de sangrado en los cuales se prolonga el tiempo tomado para la formación de coágulo. Dichos desórdenes pueden ser congénitos o adquiridos. Por ejemplo, la hemofilia A y B son enfermedades heredadas caracterizadas por las deficiencias en el factor

VIII (FVIII) y el factor IX (FIX), respectivamente. La terapia de reemplazo es el tratamiento tradicional para la hemofilia A y B, e involucra la administración intravenosa de FVII o FIX, bien sea preparado de plasma humano o como proteínas recombinantes. En muchos casos, sin embargo, los pacientes desarrollan anticuerpos (también conocidos como inhibidores) contra las proteínas infundidas, lo cual reduce o niega la eficacia del tratamiento. El recombinante FVIIa (Novoseven®) ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes de hemofilia A o B que tienen inhibidores a FVIII o FIX, y también es utilizado para detener los episodios de sangrado o prevenir el sangrado asociado con trauma y/o cirugía. El recombinante FVIIa también ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con deficiencia de FVII congénita, y está siendo utilizado de forma incrementada en usos sin etiqueta, tales como el tratamiento del sangrado asociado con otros desórdenes de sangrado congénitos o adquiridos, trauma, y cirugía en pacientes no hemofílicos.

El uso de recombinante FVIIa para promover la formación de coágulos sobresalta su creciente importancia como un agente terapéutico. La terapia de FVIIa deja significantes necesidades médicas insatisfechas. Por ejemplo, con base en datos de pruebas clínicas, un promedio de 3 dosis de FVIIa por un periodo de tiempo de 6 horas o más es requerido para gestionar episodios de sangrado agudos en pacientes con hemofilia. Se necesitan variantes más eficaces de FVIIa para reducir estos requerimientos. Por lo tanto, entre los objetos acá, es un objeto el suministrar polipéptidos FVII modificados que son diseñados para tener propiedades terapéuticas mejoradas.

RESUMEN

Acá se suministran polipéptidos de Factor VII (FVII) modificados. En particular, acá se proporcionan polipéptidos FVII modificados que exhiben actividades procoagulantes. Los polipéptidos FVII son modificados en secuencia primaria comparado a un polipéptido FVII no modificado, y pueden incluir inserciones, supresiones y reemplazos de aminoácido. Los polipéptidos FVII modificados que acá se proveen incluyen polipéptidos FVII que exhiben resistencia incrementada a los afectos inhibidores del inhibidor del factor de tejido (TFPI), resistencia aumentada a los efectos inhibidores antitrombina-III (AT-III), unión ZN^{+2} reducida, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media mejorada, actividad catalítica incrementada en la presencia y/o ausencia de TF, y/o unión incrementada a las plaquetas activadas. Los polipéptidos FVII modificados pueden contener cualquier combinación de modificaciones acá suministradas, por la cual una o más actividades o propiedades del polipéptido son alteradas en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Típicamente el polipéptido FVII modificado retiene la actividad procoagulante. Acá también se suministran moléculas de ácido nucleico, vectores y células que codifican/expresan polipéptidos FVII modificados. Las composiciones farmacéuticas, artículos de manufactura, kits y métodos de tratamiento también son suministrados acá. Los polipéptidos FVII incluyen alélicas y variantes de especies y polipéptidos y otras variantes que tienen modificaciones que afectan otras actividades y/o propiedades. También se incluyen fragmentos activos de los polipéptidos FVII que incluyen una

modificación acá provista. Ejemplos de polipéptidos FVII son aquellos que incluyen la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3, así como las variantes de las mismas que tienen 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidades de secuencia con las mismas.

Los polipéptidos de factor VII (FVII) son modificados en secuencia primaria comparado a un polipéptido FVII no modificado, y pueden incluir inserciones, supresiones y reemplazos de aminoácido. Los polipéptidos FVII modificados que acá se proveen incluyen polipéptidos FVII que exhiben resistencia incrementada a los afectos inhibidores de TFPI, resistencia aumentada a los efectos inhibidores AT-III, unión ZN^{+2} reducida, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media mejorada, actividad catalítica incrementada en la presencia y/o ausencia de (factor de tejido) TF, y/o unión incrementada a las plaquetas activadas. Los polipéptidos FVII modificados pueden contener cualquier combinación de modificaciones acá suministradas, por la cual una o más actividades o propiedades del polipéptido son alteradas en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Los polipéptidos FVII pueden incluir otras modificaciones que alteran otras propiedades y/o actividades. Típicamente el polipéptido FVII modificado retiene la actividad procoagulante. Acá también se suministran moléculas de ácido nucleico, vectores y células que codifican/expresan polipéptidos FVII modificados. Las composiciones farmacéuticas, artículos de manufactura, kits y métodos de tratamiento también son suministrados acá.

En particular, se suministran polipéptidos alélicas de factor VII (FVII) modificados y variantes de especies de los mismos o fragmentos activos u otras variantes de los mismos. Acá se suministran polipéptidos FVII, incluyendo variantes alélicas y especies de los mimos o fragmentos activos de los mismos, que contienen una modificación que está en una posición correspondiente a la posición D196, K197 o K199 en un polipéptido FVII con una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3, o en los residuos correspondientes en un polipéptido FVII, que incluye variantes alélicas y especies de los mismos, fragmentos activos, y otros polipéptidos FVII modificados para otras actividades o propiedades. Los polipéptidos FVII contienen al menos una modificación en una posición correspondiente a la posición D196, K197 o K199 en un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 3 o en los residuos correspondientes en un polipéptido FVII. La modificación es una inserción y/o un reemplazo por un aminoácido hidrofóbico o acídico seleccionado de entre VaI (V), Leu (L), Ile (I), Phe (F), Trp (W), Met (M), Tyr (Y), Cys (C), Asp (D) y GIu (E). Cuando se proporciona un fragmento activo, el fragmento activo incluye dicha modificación. Por ejemplo, se suministra los polipéptidos de factor VII (FVII) modificados, variantes alélicas y especies de los mismos o fragmentos activos u otras variantes de los mismos que también incluyen un reemplazo seleccionado de entre D196F, D196W, D196L, D196I, D196Y, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199D, K199E y K197Y.

Adicionalmente, los polipéptidos FVII modificados suministrados pueden contener una modificación adicional, que incluye un reemplazo, inserción o supresión de aminoácido, en otra posición en el polipéptido FVII. En algunos ejemplos, la modificación adicional es un reemplazo de aminoácido en una posición que corresponde a una posición seleccionada de entre D196, K197, K199, G237, T239, R290 y K341, en donde la primera modificación y la segunda modificación están en diferentes aminoácidos. Estas modificaciones pueden incluir, pero no están limitadas a D196K, D196R, D196A, D196Y, D196F, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341E, K341R, K341N, K341M, K341D y K341Q. Otras modificaciones de ejemplo que son inserciones de aminoácido, tales como, pero no limitados a, cualquiera de las siguientes inserciones: G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA y K197I198insS. Otros polipéptidos FVII modificados ejemplares incluyen las modificaciones siguientes: D196R/K197E/K199E, D196K/K197E/K199E, D196R/K197E/K199E/R290E, D196R/K197M/K199E, D196R/K197M/ K199E/R290E, D196K/K197L, D196F/ K197L, D196L/ K197L, D196M/K197L, D196W/K197L, D196F/K197E, D196W/K197E, K196V/K197E, K197E/K341Q,

K197L/K341Q, K197E/G237V/K341Q, K197E/K199E, K197E/G237V, K199E/K341Q o K197E/K199E/K341Q.

También se suministran polipéptidos FVII modificados, que incluyen variantes alélicas y especies de los mismos o fragmentos activos u otras variantes de los mismos, que también pueden contener modificaciones de aminoácido que corresponden a cualquiera o más de D196R, D 196 Y, D196F, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197E, K197D, K197L, K197M, K197M, Kl 971, K197V, K197F, K197W, K199D, K199E, G237W, G237I, G237V, R290M, R290V, K341M, K341D, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA o K197I198insS en un polipéptido FVII que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3 o en residuos correspondientes en un polipéptido FVII. Adicionalmente, estos polipéptidos FVII modificados pueden contener una modificación adicional, que incluye un reemplazo, inserción o supresión de aminoácido, en otra posición en el polipéptido FVII. En algunos ejemplos, la modificación adicional puede ser un reemplazo de aminoácido en una posición que corresponde a una posición D196, K197, K199, G237, T239, R290 y K341, en donde la modificación adicional está en una posición diferente de la primera modificación. Por ejemplo, el polipéptido FVII modificado puede adicionalmente contener un reemplazo de aminoácido seleccionado de entre D196K, D196R, D 196 A, D196Y, D196F, D196M, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E,

K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341E, K341R, K341N, K341M, K341D y K341Q. Los ejemplos de dicho polipéptido FVII modificado son aquellos que incluyen modificaciones seleccionadas de entre D196R/R290E, D196R/R290D, D196R/K197E/K199E, D196K/K197E/K199E, D196R/K197E/K199E/R290E, D196R/K197M/K199E, D196R/K197M/K199E/R290E, D196K/K197L, D196F/K197L, D196L/K197L, D196M/K197L, D196W/K197L, D196F/K197E, D196W/K197E, K197L/K341Q, G237V/K341Q, K197E/G237V/K341Q, K197E/K199E, K197E/G237V, K199E/K341Q, K197E/K199E/K341Q y K196V/K197E.

En algunos casos, un polipéptido de factor VII (FVII) modificado, que incluye variante alélicas y especies de los mismos o fragmentos activos de los mismos u otras variantes de los mismos pueden incluir dos o más modificaciones en un polipéptido FVII, donde al menos dos de las modificaciones de aminoácido corresponde a D196K, D196R, D 196 A, D 196 Y, D196F, D196M, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341E, K341R, K341N, K341M, K341D, K341Q, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY,

K197I198insA o K197I198insS en un polipéptido FVII que tiene o que incluye una secuencia de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO:3 o en residuos correspondientes en un polipéptido FVII. El polipéptido puede incluir más de dos modificaciones, tales como 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 modificaciones.

Ejemplos de estos son los polipéptidos FVII que incluyen modificaciones seleccionados de entre D196R/R290E, D196K/R290E, D196R/R290D, D196R/ K197E/ K199E, D196K/ K197E/ K199E, D196R/ K197E/ K199E/R290E, D196R/ K197M/ K199E, D196R/ K197M/ K199E/R290E, D196K/K197L, D196F/ K197L, D196L/ K197L, D196M/K197L, D196W/ K197L, D196F/K197E, D196W/K197E, D196V/K197E, K197E/K341Q, K197L/K341Q, G237V/K341Q, K197E/G237V/K341Q, K197E/K199E, K197E/G237V, K199E/K341Q, K197E/K199E/K341Q y K197E/G237V/M298Q.

Cualquiera de los polipéptidos FVII modificados mencionados anteriormente puede exhibir resistencia incrementada al inhibidor de camino de factor de tejido (TFPI) comparado con el polipéptido FVII sin modificar. En algunos ejemplos, el polipéptido FVII modificado es al menos aproximadamente o es 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más resistente a TFPI. Adicionalmente, estos polipéptidos FVII modificados también pueden contener un dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo, tal como 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de el dominio Gla heterólogo, para afectar la unión de fosfolípidos. Cualquiera y

todos los polipéptidos FVII modificados mencionados anteriormente también pueden incluir un intercambio Gla, que incluye intercambios Gla como acá se establecen como ejemplos y como se describen.

Un dominio Gla heterólogo puede ser seleccionado de los dominios Gla de Factor IX (FIX), Factor X (FX), protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína Gla de matriz, proteína 6 específica de arresto de crecimiento (Gas6) o proteína Z. En algunos ejemplos, el dominio Gla heterólogo en el polipéptido FVII modificado acá suministrado tiene una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 110-118, 120 y 121, o una porción suficiente de la misma para afectar la unión de fosfolípidos. Las modificaciones al polipéptido FVII pueden llevarse a cabo por medio de la remoción de todo o una porción contigua del dominio Gla FVII nativo, el cual puede incluir aminoácidos 1-45 en un polipéptido FVII que tiene o que incluye una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3, o en los residuos correspondientes en un polipéptido FVII, y reemplazándolo con el dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo para llevar a cabo la unión de fosfolípidos, tal como para incrementarlo. Dichas modificaciones pueden resultar en el polipéptido FVII modificado que exhibe unión de fosfolípidos aumentada en comparación con el polipéptido FVII sin modificar. Por ejemplo, el polipéptido modificado puede exhibir al menos aproximadamente o 1 %, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más de unión de fosfolípidos aumentada.

Los polipéptidos FVII modificados pueden tener todo o una porción contigua del dominio Gla FVII nativo removido y reemplazado con el dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo para llevar a cabo la unión de fosfolípidos. Los ejemplos de dichos polipéptidos son aquellos en los cuales el dominio Gla FVII nativo incluye aminoácidos 1-45 en un polipéptido FVII que tiene o que incluye una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3, o en residuos correspondientes en un polipéptido FVII. Las modificaciones Gla incluyen, pero no están limitadas a, modificaciones entre Gla Intercambio FIX, Gla Intercambio FX, Gla Intercambio Prot C, Gla Intercambio Prot S y Gla Intercambio Trombina.

En virtud de un intercambio Gla el polipéptido FVII modificado puede exhibir una unión de fosfolípidos incrementada. Dicho incremento puede ser de al menos aproximadamente o 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más de unión de fosfolípidos incrementada.

Los polipéptidos FVII modificados que contienen dominios Gla heterólogos pueden contener modificaciones adicionales en posiciones que resultan en o exhiben resistencia incrementada al inhibidor de camino de factor de tejido (TFPI) en comparación con un polipéptido FVII sin modificar. Ejemplos de dichas modificaciones son una o más modificaciones de aminoácido en las

posiciones seleccionadas de entre D196, K197, K199, G237, T239, R290, y K341 en un polipéptido FVII que tiene o que incluye una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3 o en residuos correspondientes en un polipéptido FVII. Específicamente, dichas modificaciones pueden incluir una o más modificaciones de aminoácido seleccionadas de entre D196K, D196R, D196A, D196Y, D196F, D196M, D196W, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K.197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237T, G237I, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341E, K341R, K341N, K341M, K341D, K341Q, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insW, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA y K197I198insS. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados que contienen un dominio Gla heterólogo también pueden contener los reemplazos de aminoácido y/o inserciones tales como, pero no limitadas a, D196R/R290E, D196K/R290E, D196R/R290D, D196R/ K197E/K199E, D196K/K197E/K199E, D196R/K197E/ K199E/R290E, D196R/ K197M/ K199E, y D196R/ K197M/K199E/R290E.

En algunos casos, dichas modificaciones adicionales resultan en una resistencia aumentada al TFPI del polipéptido modificado en comparación con el polipéptido FVII que no contiene la modificación, es decir, el polipéptido FVII sin modificar.

Cualquiera de los polipéptidos FVII modificados descritos anteriormente, incluyen aquellos que exhiben resistencia incrementada al TFPI o unión aumentada a fosfolípidos, o cualquier combinación de los mismos, puede adicionalmente contener otras modificaciones, incluyendo cualquiera descrita en el arte. Dichas modificaciones adicionales de aminoácido pueden aumentar la resistencia a antitrombina-III (AT-III), incrementar la unión y/o afinidad a fosfolípidos, incrementar la afinidad para el factor de tejido (TF), incrementar la actividad intrínseca, alterar la conformación del polipéptido para alterar zimogenicidad, incluyendo la alteración de la conformación a una o más formas parecidas a zimógeno o una forma menos parecida a zimógeno, incrementar la resistencia a proteasas, disminuir la glicosilación, incrementar la glicosilación, reducir la inmunogenicidad, incrementar la estabilidad, y/o facilitar la vinculación del grupo químico. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados acá suministrados pueden contener modificaciones en la posición Q176, M298 o E296 en un polipéptido FVII que tiene o que incluye una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3 o en residuos correspondientes en un polipéptido FVII. En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados pueden contener adicionalmente modificaciones de aminoácido de entre Q176A, M298Q, E296V y/ E296A. En otros ejemplos, los polipéptidos FVII modificados pueden adicionalmente contener, adicional al intercambio Gla y/u otras modificaciones anotadas, una o más de las siguientes modificaciones de aminoácido: S278C/V302C, L279C/N301C, V280C/V301C, S281C/V299C, inserción de una tirosina en la posición 4, F4S, F4T, P10Q, P10E, P10D, P10N,

Q21N, R28F, R28E, I30C, I30D, I30E, K32D, K32Q, K32E, K32G, K32H, K32T, K32C, K32A, K32S, D33C, D33F, D33E, D33K, A34C, A34E, A34D, A34I, A34L, A34M, A34V, A34F, A34W, A34Y, R36D, R36E, T37C, T37D, T37E, K38C, K38E, K38T, K38D, K38L, K38G, K38A, K38S, K38N, K38H, L39E, L39Q, L39H, W41N, W41C, W41E, W41 D, I42R, I42N, I42S, I42A, I42Q, I42N, I42S, I42A, I42Q, I42K, S43Q, S43N, Y44K, Y44C, Y44D, Y44E, S45C, S45D, S45E, D46C, A51N, S53N, G58N, G59S, G59T, K62E, K62R, K62D, K62N, K62Q, K62T, L65Q, L65S, L65N, F71D, F71Y, F71 E, F71Q, . F71N, P74S, P74A, A75E, A75D, E77A, E82Q, E82N, E82S, E82T T83K, N95S, N95T, G97S, G97T, Y101N, D104N, T106N, K109N, E116D, G117N, G124N, S126N, T128N, L141C, L141D, L141E, E142D, E142C, K143C, K143D, K143E, R144E, R144C, R144D, N145Y, N145G, N145F, N145M, N145S, N145I, N145L, N145T, N145V, N145P, N145K, N145H, N145Q, N145E, N145R, N145W, N145D, N145C, K157V, K157L, K157I, K157M, K157F, K157W, K157P, K157G, K157S, K157T, K157C, K157Y, K157N, K157E, K157R, K157H, K157D, K157Q, V158L, V158I, V158M, V158F, V158W, V158P, V158G, V158S, V158T, V158C, V158Y, V158N, V158E, V158R, V158K, V158H, V158D, V158Q, A175S, A175T, G179N, I186S, I186T, V188N, R202S, R202T, I205S, I205T, D212N, E220N, I230N, P231N, P236N, G237N, Q250C, V253N, E265N, T267N, E270N, A274M, A274L, A274K, A274R, A274D, A274V, A274I, A274F, A274W, A274P, A274G, A274T, A274C, A274Y, A274N, A274E, A274H, A274S, A274Q, F275H, R277N, F278S, F278 A, F278N, F278Q, F278G, L280N, L288K, L288C, L288D, D289C, D289K, L288E, R290C, R290G,

R290A, R290S, R290T, R290K, R290D, R290E, G291E, G291D, G291C, G291N, G291K, A292C, A292K, A292D, A292E, T293K, E296V, E296L, E296I, E296M, E296F, E296W, E296P, E296G, E296S, E296T, E296C, E296Y, E296N, E296K, E296R, E296H, E296D, E296Q, M298Q, M298V, M298L, M298I, M298F, M298W, M298P, M298G, M298S, M298T, M298C, M298Y, M298N, M298K, M298R, M298H, M298E, M298D, P3O3S, P3O3ST, R304Y, R304F, R304L, R304M, R304G, R304T, R304A, R304S, R304N, L305V, L305Y, L305I, L305F, L305A, L305M, L305W, L3O5P, L305G, L305S, L305T, L305C, L305N, L305E, L305K, L305R, L305H, L305D, L3O5Q, M306D, M306N, D309S, D309T, Q312N, Q313K, Q313D, Q313E, S314A, S314V, S3141, S314M, S314F, S314W, S314P, S314G, S314L, S314T, S314C, S314Y, S314N, S314E, S314K, S314R, S314H, S314D, S314Q, R315K, R315G, R315A, R315S, R315T, R315Q, R315C, R315D, R315E, K316D, K316C, K316E, V317C, V317K, V317D, V317E, G318N, N322Y, N322G, N322F, N322M, N322S, N322I, N322L, N322T, N322V, N322P, N322K, N322H, N322Q, N322E, N322R, N322W, N322C, G331N, Y332S, Y332A, Y332N, Y332Q, Y332G, D334G, D334E, D334A, D334V, D334I, D334M, D334F, D334W, D334P, D334L, D334T, D334C, D334Y, D334N, D334K, D334R, D334H, D334S, D334Q, S336G, S336E, S336A, S336V, S336I, S336M, S336F, S336W, S336P, S336L, S336T, S336C, S336Y, S336N, S336K, S336R, S336H, S336D, S336Q, K337L, K337V, K337I, K337M, K337F, K337W, K337P, K337G, K337S, K337T, K337C, K337Y, K337N, K337E, K337R, K337H, K337D, K337Q, K341E, K341Q, K341G, K341T, K341A,

K341S, G342N, H348N, R353N, Y357N, I361N, F374P, F374A, F374V, F374I, F374L, F374M, F374W, F374G, F374S, F374T, F374C, F374Y, F374N, F374E, F374K, F374R, F374H, F374D, F374Q, V376N, R379N, L390C, L390K, L390D, L390E, M391D, M391C, M391K, M391N, M391E, R392C, R392D, R392E, S393D, S393C, S393K, S393E, E394K, P395K, E394C, P395D, P395C, P395E, R396K, R396C, R396D, R396E, P397D, P397K, P397C, P397E, G398K, G398C, G398D, G398E, V399C, V399D, V399K, V399E, L400K, L401K, L401C, L401D, L401E, R402D, R402C, R402K, R402E, A403K, A403C, A403D, A403E, P404E, P404D, P404C, P404K, F405K, P406C, K32N/A34S, K32N/A34T, F31N/D33S, F31N/D33T, I3ON/K32S, I30N/K32T, A34N/R36S, A34N/R36T, K38N/F40S, K38N/F40T, T37N/L39S, T37N/L39T, R36N/K38S, R36N/K38T, L39N/W41S, L39N/W41T, F40N/I42S, F40N/I42T, I42N/ Y44S, I42N/ Y44T, Y44N/ D46S, Y44N/ D46T, D46N/D48S, D46N/D48T, G47N/Q49S, G47N/Q49T, K143N/ N145S, K143N/ N145T, E142N/R144S, E142N/R144T, L141N/K143S, L141N/K143T, I140N/E142S/, I140N/E142T, R144N/A146S, R144N/A146T, A146N/K148S, A146N/K148T, S147N/P149S/, S147N/P149T, R290N/A292S, R290N/A292T, D289N/G291 S, D289N/G291T, L288N/R290S, L288N/R290T, L287N/D289S, L287N/D289, A292N/A294S, A292N/A294T, T293N/L295S, T293N/L295T, R315N/V317S, R315N/V317T, S314N/ K316S, S314N/ K316T, Q313N/ R315S, Q313N/ R315T, K316N/G318S, K316N/G318T, V317N/D319S, V317N/D319T, K341N/ D343S, K341N/ D343T, S339N/K341S, S339N/K341T, D343N/G345S, D343N/G345T, R392N/E394S, R392N/E394T, L390N/ R392S, L390N/ R392T, K389N/M391S, K389N/M391T, S393N/P395S,

S393N/P395T, E394N/R396S, E394N/R396T, P395N/P397S, P395N/P397T, R396N/G398S, R396N/G398T, P397N/V399S, P397N/V399T, G398N/L400S, G398N/L400T, V399N/L401S, V399N/L401T, L400N/R402S, L400N/R402T, L401N/A403S, L401N/A403T, R402N/P404S, R402N/P404T, A403N/F405S, A403N/F405T, P404N/P406S y P404N/P406T, V158D/G237V/E296V/M298Q, K197E/G237V/M298Q, K197E/G237V/M298Q/K341Q, K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q, G237V/M298Q, G237V/M298Q/K341Q, M298Q/Gla Intercambio FIX, K197E/M298Q y M298Q/K341D.

Cualquiera de los polipéptidos FVII modificados acá suministrados puede contener uno o más modificaciones adicionales de aminoácidos que aumenta la resistencia a la antitrombina-III (AT-III), aumenta la unión y/o afinidad a los fosfolípidos, aumenta la afinidad del factor de tejido (TF), aumenta la actividad intrínseca, altera la conformación del polipéptido para alterar la zimogenicidad, aumenta la resistencia a las proteasas, disminuye la glicosilación, aumenta la glicosilación, reduce la inmunogenicidad, aumenta la estabilidad, y/o facilita la vinculación del grupo químico. Por ejemplo, la zimogenicidad alterada puede conferir una forma más parecida a zimógeno o una forma menos parecida a zimógeno. Dichos polipéptidos FVII modificados, por ejemplo, pueden incluir la sustitución de las posiciones 300-322, 305-322, 300-312, o 305-312 con los aminoácidos correspondientes de la tripsina, trombina o FX, o la sustitución de las posiciones 310-329, 311-322 o 233-329 con los aminoácidos correspondientes de la tripsina.

Los polipéptidos modificaods que acá se suministran incluyen aquellos en los cuales el polipéptido FVII sin modificar sólo contiene o incluye una secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO: 3. Ejemplos de polipéptidos FVII modificados son los polipéptidos que tienen o que incluyen una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 18-43, 125-150 y 206 a 250 o variantes alélicas o especies de las mismas. Las variantes alélicas o especies u otra variante puede tener 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia para el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 3, con exclusión de las modificaciones de aminoácidos. Las fuentes de polipéptidos FVII incluyen los seres humanos y otras especies no humanas. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos maduros o polipéptidos precursores. En algunas modalidades, únicamente se modifica la secuencia primaria del polipéptido FVII. Adicionalmente, los polipéptidos FVII puede incluir una modificación química o una modificación post-translacional, tal como, pero no limitado a, glicosilación, carboxilación, hidroxilación, sulfonación, fosforilación, albuminación, o la conjugación a otra fracción, tal como una fracción de polietilenglicol (PEG).

Los polipéptidos FVII modificados pueden suministrarse como polipéptidos de cadena simple o como mezclas de cadena simple y cadena doble o formas de cadena múltiple, o como cadena doble, cadena de tres o de otras formas de cadena múltiple. Los polipéptidos FVII modificados pueden ser proporcionados como polipéptidos inactivos o activos. La activación puede

realizarse, por ejemplo, por desdoblamiento proteolítico por auto activación, desdoblamiento por Factor IX (FIXa), desdoblamiento por Factor X (FXa), desdoblamiento por factor XII (FXIIa), o desdoblamiento por trombina.

Los polipéptidos FVII modificados típicamente retienen una o más actividades o las propiedades del polipéptido FVII sin modificar. Las modificaciones pueden incluir modificaciones en el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 60 posiciones de aminoácidos, siempre que el polipéptido retenga al menos una actividad FVII del polipéptido FVII sin modificar. La retención de actividad puede ser al menos aproximadamente, el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% , 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más de la actividad del polipéptido FVII sin modificar. Las actividades incluyen, por ejemplo, la unión del factor de tejido (TF), la activación del factor X (FX), la activación del factor IX (FIX), unión de fosfolípidos, y la actividad de coagulación. Las actividades se pueden aumentar o disminuir. Entre los polipéptidos modificados acá suministrados se encuentran aquellos en los cuales se incrementa la actividad de coagulación. La actividad puede ser evaluada *in vitro* o *in vivo*.

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos FVII modificados. También se proporcionan vectores, tales como vectores procariotas o vectores eucariotas, incluyendo vectores de mamíferos, y vectores virales. Ejemplos de vectores virales incluyen un adenovirus, un virus adeno asociado, un retrovirus, un virus de herpes, un lentivirus, un poxvirus, y

vectores de citomegalovirus. También se proporcionan células que contienen las moléculas de ácido nucleico o los vectores. Las células pueden ser eucariotas, tales como células de mamíferos o de levadura, o células procariotas. Las células de mamíferos incluyen, por ejemplo, células de riñón de hámster bebé (BHK.-21) o células 293 y células CHO. Las células pueden ser cultivadas en condiciones en las que se expresa el polipéptido FVII modificado. Esta puede ser secretada. Se suministra el polipéptido FVII modificado producido por dichas células.

También se proporcionan composiciones que contienen los polipéptidos FVII modificados acá suministrados. En particular, se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen dichos polipéptidos. Las composiciones pueden contener una concentración o cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido FVII modificado, o una molécula de ácido nucleico o un vector o una célula acá suministrada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas para administración de dosis única o de dosis múltiple. La composición farmacéutica puede ser en cualquier forma, como un líquido, gel o sólido, y provista en forma de cápsulas, contenedores y otros vehículos adecuados. Estas pueden ser formuladas para dilución antes de la administración o en cualquier otra forma adecuada. La cantidad puede depender de la enfermedad tratada y/o el individuo tratado y, en caso necesario, puede determinarse empíricamente. La composición farmacéutica puede formularse por cualquier vía de administración, incluyendo, por ejemplo,

administración local, sistémica o tópica, o formulada para administración oral, nasal, pulmonar, bucal, transdérmica, subcutánea, intraduodenal, enteral, parenteral, intravenosa o intramuscular. Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas para liberación controlada.

También se proporcionan métodos de tratamiento y usos de las composiciones para el tratamiento. Las composiciones farmacéuticas se administran o se formulan para administración a un sujeto que tiene una enfermedad o condición que es tratada por la administración de FVII, incluyendo el tratamiento mediante la administración de FVII activo (FVIIa). El tratamiento con la composición farmacéutica aminora o alivia los síntomas asociados con la enfermedad o condición. La administración puede ser seguida o acompañado por la vigilancia a un sujeto para cambios en los síntomas asociados con la enfermedad mediada por FVII o condición. Las enfermedades o afecciones tratadas, incluyen, pero no se limitan a, desórdenes de coagulación sanguínea, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias, deficiencia de factor VII y trastornos de sangrado. Ejemplos de estos son la hemofilia A o hemofilia B o hemofilia C. La hemofilia puede ser congénita o adquirida, como por ejemplo debido a una complicación hemorrágica por una cirugía o traumatismo. El sangrado puede manifestarse como hemartrosis aguda, artropatía hemofílica crónica, hematomas, hematuria, hemorragias del sistema nervioso central, hemorragias gastrointestinales o hemorragia cerebral, y puede ser consecuencia de, por ejemplo, extracción dental o cirugía, tal como, por ejemplo, angioplastia, cirugía pulmonar, cirugía

abdominal, cirugía espinal, cirugía cerebral, cirugía vascular, cirugía dental, o cirugía de trasplante de órganos, tal como el trasplante de médula ósea, corazón, pulmón, páncreas e hígado. El sujeto puede tener anticuerpos contra el factor VIII o factor IX. El tratamiento puede ir acompañado de, o se administran de forma secuencial o intermitente, con uno o más factores de coagulación adicionales, tales como, por ejemplo, factores de coagulación de plasma o recombinantes purificadas, procoagulantes, tales como vitamina K, derivados de la vitamina K e inhibidores de la proteína C, plasma, plaquetas, glóbulos rojos y corticosteroides. Las composiciones farmacéuticas pueden ser utilizadas con composiciones que contengan esos otros factores de coagulación.

Se suministran artículos de fabricación que contienen material de embalaje y una composición farmacéutica contenida en el material de embalaje, y, opcionalmente, instrucciones para su administración. Por ejemplo, el polipéptido FVII modificado en la composición farmacéutica puede ser para el tratamiento de una enfermedad mediada por FVII o trastorno, y el material de embalaje puede incluir una etiqueta que indica que el polipéptido FVII modificado se utiliza para el tratamiento de una enfermedad mediada por FVII o trastorno. También se proporcionan kits que contienen las composiciones farmacéuticas y un dispositivo para la administración de la composición y, opcionalmente, instrucciones para su administración.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra la cascada de coagulación. La figura muestra la vía intrínseca y la vía extrínseca de coagulación para la producción independiente de FXa y la convergencia de las vías a una vía común para generar trombina y fibrina para la formación de un coágulo. Estas vías están interconectadas. La figura muestra el orden de las moléculas implicadas en la cascada de activación en el que un zimógeno se convierte en una proteasa activa por medio de la ruptura de uno o más enlaces peptídicos. La proteasa activada luego sirve como activador de la proteasa para la molécula de zimógeno siguiente en la cascada, en última instancia, resultando en la formación de coágulos.

La **Figura 2** muestra el modelo basado en células de coagulación (ver por ejemplo, Hoffman *et al.* (2001) Thromb Haemost 85:958-965). La figura muestra los eventos de coagulación a medida que son separados en tres fases, donde la iniciación de la coagulación se efectúa mediante la activación de FX a FXa por el complejo TF/FVIIa sobre la célula de apoyo TF, lo que resulta en la generación de una pequeña cantidad de trombina después de la activación por FXa / FVA. La amplificación se produce cuando la trombina se une y activa las plaquetas, y se inicia la activación de una cantidad suficiente de los factores de coagulación adecuados para formar los complejos FVIIIa/FIXa y FVa/FXa. La propagación de la coagulación se produce en la superficie de un gran número de plaquetas activadas en el sitio de la lesión, resultando en un estallido de la generación de trombina, que es lo suficientemente grande para generar

suficiente fibrina de fibrinógeno para establecer un coágulo en el sitio de la lesión.

La **Figura 3** muestra los mecanismos por los cuales la FVIIa puede iniciar la formación de trombina. La figura ilustra la vía dependiente de TF de la generación de trombina FVIIa, que actúa en la superficie de una célula de rumbo TF y consiste en complejos de FVIIa con TF previo a la activación de FX a FXa. La figura también muestra la vía independiente de TF de generación de trombina FVIIa, durante la cual la FVIIa se une a los fosfolípidos en las plaquetas activadas y activa FX a FXa, que a su vez con los complejos con FVa para unir protrombina en trombina.

La **Figura 4** muestra el complejo inhibidor cuaternario que se produce cuando el complejo TFPI/FXa se une al complejo TF/FVIIa. El TFPI contiene tres dominios Kunitz. El dominio Kunitz 2 (K-2) interactúa e inhibe FXa, mientras que el dominio Kunitz (K-1) interactúa e inhibe FVIIa.

La **Figura 5** muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de los primeros dominios de Kunitz de (a) $BPTI^{5L15}$ (posiciones de aminoácidos 1 a 55 de la SEQ ID NO:106) y TFPI-2 (posiciones de aminoácidos 14-65 de la SEQ ID NO:105), y (b) TFPI-1 (posiciones de aminoácidos 26-76 de la SEQ ID NO:102) y TFPI-2 (posiciones de aminoácidos 14-65 de la SEQ ID NO:105), y muestra los aminoácidos conservados.

La **Figura 6** muestra el modelo de homología para determinar los residuos de contacto en la interfaz de la interacción entre FVIIa y TFPI. La estructura de dominio Kunitz 1 (K1) de TFPI-2 fue tomada de l estructura de

cristal de complejo de tripsina/TFPI y modelado en $BPTI^{5L15}$ en la estructura de cristal de TF/FVIIa/$BPTI^{5L15}$. La mutagénesis *in silico* se llevó a cabo para adaptar los aminoácidos correspondientes de TFPI-1 K1 al modelo. Los residuos de contacto de FVIIa que puedan participar en la interacción con TFPI en la interfaz proteína-proteína fueron identificados y establecidos como candidatos para la mutagénesis en el desarrollo de polipéptidos FVII resistentes a TFPI.

La **Figura 7** muestra la interacción modelada entre FVIIa y TFPI. En particular, la figura muestra los residuos de contacto de FVII que están presentes en la interfaz del FVIIa y la interacción de TFPI, y los residuos de contacto correspondientes de TFPI, que forman contactos electrostáticas complementarios.

DESCRIPCION DETALLADA

Esquema
A. Definiciones
B. Información general de Hemostasia
    1. Adhesión y agregación plaquetaria
    2. Cascada de la coagulación
        a. Iniciación
        b. Amplificación
        c. Propagación
    3. Regulación de la Coagulación
C. Factor VII (FVII)
    1. Estructura y organización de FVII
    2. Modificaciones post-traslacionales
    3. Procesamiento de FVII
    4. Activación de FVII
    5. Función de FVII
        a. Actividad de FVIIa dependiente del factor de tejido
        b. Actividad de FVIIa independiente del factor de tejido
    6. FVII como un biofarmacéutico
D. Polipéptidos FVII modificados
    1. Resistencia a inhibidores

a. TFPI

Modificaciones para llevar a cabo una mayor resistencia a TFPI

b. Antitrombina III (AT-III)

Modificaciones para llevar a cabo una mayor resistencia a la AT-III

2. Unión a Plaquetas Activadas

Modificación por medio de la introducción de un dominio GIa heterólogo

3. Combinaciones y modificaciones adicionales

a. Modificaciones que aumentan la actividad intrínseca

b. Modificaciones que aumentan la resistencia a las proteasas

c. Modificaciones que aumentan la unión a fosfolípidos

d. Modificaciones que alteran la glicosilación

e. Modificaciones que facilitan la vinculación del grupo químico

f. Ejemplos de mutantes de combinación FVII

E. Diseño y métodos para modificar FVII

1. Racional
2. Empírica (es decir, de selección)
   a. Mutagénesis aleatoria
   b. Mutagénesis enfocada
   c. Proyección
3. Selección de variantes FVII

F. Producción de polipéptidos FVII

1. Vectores y células
2. Sistemas de expresión
   a. Expresión procariota
   b. Levadura
   c. Insectos y células de insecto
   d. Células de mamíferos
   e. Plantas
2. Purificación
3. Proteínas de fusión
4. Modificaciones de polipéptido
5. Secuencias de nucleótido

G. Evaluación de las actividades del polipéptido FVII modificado

1. Ensayos *in vitro*
   a. Modificación post-translacional
   b. Actividad proteolítica
   c. Actividad de coagulación
   d. Unión y/o inhibición por otras proteínas
   e. Unión de fosfolípidos
2. Modelos animales no humanos
3. Ensayos clínicos

H. Formulación y administración
    1. Formulaciones
        a. Dosis
        b. Formas de dosificación
    2. Administración de polipéptidos FVII modificados
    3. Administración de ácidos nucleicos de codificación polipéptidos FVII modificados (terapia génica)
I. Usos Terapéuticos
    1. Trastornos congénitos de sangrado
        a. Hemofilia
        b. Deficiencia de FVII
        c. Otros
    2. Trastornos de sangrado adquiridos
        a. Trombocitopenia adquirida por quimioterapia
        b. Otras coagulopatías
        c. Sangrado adquirido por transplante
        d. Sangrado inducido por terapia anticoagulante
        e. Hemofilia adquirida
    3. Sangrado de trauma y cirugía
J. Terapias de combinación
K. Artículos de fabricación y kits
L. Ejemplos

A. DEFINICIONES

A menos que se define de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por una persona versada en la materia a la cual la invención pertenece. Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes publicadas y publicaciones, secuencias de banco de genes (Genbank), bases de datos, sitios Web y otros materiales publicados a los que se hace referencia a lo largo de la divulgación completa aquí, a menos que se indique lo contrario, se incorporan por referencia en su totalidad. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos en este documento, los de esta sección prevalecen. Cuando se haga referencia a una URL u otro tales como

identificador o dirección, se entiende que esos identificadores pueden cambiar y la información particular en Internet puede ir y venir, pero la información equivalente se puede encontrar buscando en Internet. Las referencias de allí evidencian la disponibilidad y la difusión pública de dicha información.

Como se usa aquí, la vía de coagulación o cascada de coagulación se refiere a la serie de eventos de activación que conduce a la formación de un coágulo de fibrina insoluble. En la cascada de coagulación o vía, una proteína inactiva de una proteasa de serina (también llamado zimógeno) se convierte en una proteasa activa por la ruptura de uno o más enlaces peptídicos, que luego sirve como activador de la proteasa para la molécula de zimógeno siguiente en la cascada. En el paso proteolítico final de la cascada, el fibrinógeno es proteolíticamente roto por la trombina a fibrina, que luego es vinculado de forma cruzada en el sitio de la lesión para formar un coágulo.

Como se usa aquí, "hemostasia" se refiere a la interrupción de la hemorragia o flujo de sangre en un órgano o parte del cuerpo. El término hemostasia puede abarcar todo el proceso de coagulación de la sangre para prevenir la pérdida de sangre después de una lesión de los vasos sanguíneos posterior a la disolución del coágulo de sangre después de la reparación de tejidos.

Como se usa aquí, "coagulación" se refiere a la formación de un coágulo de fibrina insoluble, o el proceso por el cual los factores de coagulación de la sangre que interactúan en cascada de coagulación, resultando en la formación de un coágulo de fibrina insoluble.

Como se usa aquí, una "proteasa" es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces covalentes peptídicos. Estas designaciones incluyen formas de zimógeno y activado simple, dos y múltiples formas de la cadena de la misma. Para mayor claridad, la referencia a las proteasas se refiere a todas las formas. Las proteasas incluyen, por ejemplo, proteasas de serina, proteasas de cisteína, proteasas aspárticas, treonina y metalo-proteasas en función de la actividad catalítica de su sitio activo y el mecanismo de ruptura de los enlaces peptídicos de un sustrato objetivo.

Como se usa aquí, las proteasas de serina o endopeptidasas de serina se refiere a una clase de peptidasas, que se caracterizan por la presencia de un residuo de serina en el sitio activo de la enzima. Las proteasas de serina participan en un amplio rango de funciones en el cuerpo, incluyendo la coagulación de la sangre e inflamación, así como el funcionamiento de las enzimas digestivas en procariotas y eucariotas. El mecanismo de ruptura por proteasas de serina se basa en el ataque nucleofílico de un enlace peptídico objetivo de una serina. La cisteína, treonina o moléculas de agua asociadas con el aspartato o metales también pueden desempeñar este papel. Las cadenas alineadas de lado de la serina, histidina y aspartato forman una tríada catalítica común a la mayoría de las proteasas de serina. El sitio activo de serina proteasas tiene la forma de una hendidura donde se une el sustrato polipéptido.

Como se usa aquí, el factor VII (FVII, F7, también conocido como Factor 7, factor de coagulación VII, factor de suero FVII, acelerador de conversión de

protrombina de suero, SPCA, proconvertina y eptacog alfa) se refiere a una proteasa de serina que es parte de la cascada de coagulación. FVII incluye un dominio Gla, dos dominios EGF (EGF-1 y EGF-2), y un dominio de la proteasa de serina (o dominio SI peptidasa) que está altamente conservada entre todos los miembros de la familia SI peptidasa de proteasas de serina, como por ejemplo con la quimotripsina. La secuencia de un precursor ejemplar FVII que tiene un péptido señal y propéptido se establece en la SEQ ID NO:1. Un polipéptido FVII maduro ejemplar se establece en la SEQ ID NO:3. El FVII ocurre como un zimógeno de cadena simple, un polipéptido de cadena doble parecido a zimógeno y una forma de cadena doble completamente activada. La activación completa, que se produce al cambio en la conformación de una forma parecida a zimógeno, se produce al unirse a co-factor del factor de tejido. Además, las mutaciones pueden ser introducidas que resultan en el cambio de conformación en la ausencia del factor de tejido. Por lo tanto, la referencia a FVII incluye formas de una cadena simple y cadena doble de la misma, incluyendo formas parecidas a zimógeno cadenas dobles completamente activadas.

La referencia al polipéptido FVII también incluye polipéptidos precursores y polipéptidos FVII maduros en formas de cadena simple y cadena doble, formas truncadas de las mismas que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especies, variantes codificadas por variantes de empalme, y otras variantes, incluyendo los polipéptidos que tienen al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99% o más de secuencia identidad para el polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO:1 o la forma madura de la misma. Se incluyen los polipéptidos FVII modificados, tales como aquellos de las SEQ ID NOS:18-43, 125-150 o 206-150 y variantes de los mismos. También se incluyen aquellos que retienen al menos una actividad de un FVII, tales como TF vinculante, factor X vinculante, fosfolípidos vinculantes, y/o actividad coagulante de un FVII. Al mantener la actividad, la actividad puede ser alterada, tal como reducida o aumentada, en comparación con polipéptido FVII tipo salvaje siempre y cuando el nivel de actividad retenida sea suficiente para producir un efecto detectable. Los polipéptidos FVII incluyen, pero no se limitan a, isoformas de tejidos específicos y variantes alélicas del mismo, moléculas sintéticas preparado por la translación de ácidos nucleicos, proteínas generadas por síntesis química, tales como síntesis que incluyen ligadura de polipéptidos más cortos, mediante métodos recombinantes, proteínas aisladas a partir de tejido y células humano y no humano, polipéptidos FVII quiméricos y formas modificadas de los mismos. Los polipéptidos FVII también incluyen fragmentos o porciones de FVII que son de una longitud suficiente o que incluyen regiones apropiadas para conservar al menos una actividad (tras la activación en caso necesario) de un polipéptido maduro de longitud completa. Los polipéptidos FVII también incluyen aquellos que contienen modificaciones químicas o modificaciones posttranslacionales y los que no contienen modificaciones químicas o posttranslacionales. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albuminación, glicosilación, farnisilación,

carboxilación, hidroxilación, fosforilación, y otras modificaciones de polipéptido conocidas en el arte.

Polipéptidos FVII ejemplares son aquellos de mamíferos, incluidos los de origen humano. Las secuencias de aminoácidos ejemplares de FVII de origen humano están establecidas en las SEQ ID NOS: 1, 2 y 3. Las variantes ejemplares de dichos polipéptidos FVII de humano, incluye cualquiera de los polipéptidos precursores establecidos en las SEQ ID NOS: 44-100. Los polipéptidos FVII también incluyen los de origen no humano incluyendo, pero no limitado a, murino, caninos, felinos, leporino, aviar, bovino, ovino, porcino, equino, piscino, ranino, y polipéptidos factor VII de otro primate. Los polipéptidos FVII ejemplares de origen no humano incluyen, por ejemplo vaca (*Bos taurus*, SEQ ID NO:4), ratón (*Mus musculus*, SEQ ID NO:5), chimpancé pigmeo (*Pan paniscus*, SEQ ID NO:6), chimpancé (*Pan troglodytes*, SEQ ID NO:7), conejo (*Oryctolagus cuniculus*, SEQ ID NO:8), rata (*Rattus norvegicus*, SEQ ID NO:9), macacos rhesus (*Macaca mulata*, SEQ ID NO: 10), cerdo (*Sus scrofa*, SEQ ID NO:11), perro (*Canisfamiliaris*, SEQ ID NO:12), pez cebra (*Brachydanio rerio*, SEQ ID NO:13), pez globo japonés (*Fugu rubripes*, SEQ ID NO:14), pollo (*Gallus Gallus*, SEQ ID NO:15), orangután (*Pongo pygmaeus*, SEQ ID NO:16) y gorila (*Gorilla gorilla*, SEQ ID NO:17).

Alguien experto en la materia reconoce que las posiciones de referencia del polipéptido factor VII maduro (SEQ ID NO:3) difieren por 60 residuos de aminoácidos en comparación con la isoforma de un precursor polipéptido FVII establecidos en la SEQ ID NO:1, que es la isoforma de un factor VII polipéptido

que contiene el péptido señal y las secuencias propéptido. Así, el primer residuo de aminoácido de la SEQ ID NO:3 "corresponde a" al sexagésimo primero (61ª) residuos de aminoácido de la SEQ ID NO:1. Aquellos versados en la materia también reconocen que las posiciones de referencia de los polipéptido de factor VII maduros (SEQ ID NO:3) difieren por 38 residuos de aminoácido en comparación con el polipéptido FVII precursor establecido en la SEQ ID NO:2, que es el polipéptido factor VII de isoforma b que contiene el péptido de señal y las secuencias propéptido. Así, el primer residuo de aminoácido de la SEQ ID NO:3 "corresponde a" el trigésimo noveno (39º) residuo de aminoácido de la SEQ ID NO:2.

Como se usa aquí, los residuos correspondientes a los residuos que se producen en los loci alineados. Los polipéptidos relacionados o variantes se alinean por cualquier método conocido para aquellos expertos en la materia. Estos métodos suelen maximizar las coincidencias, e incluyen métodos tales como el uso de las alineaciones manuales y mediante el uso de los programas de alineación numerosos disponibles (por ejemplo, BLASTP) y otros conocidos para aquellos versados en la materia. Por medio de la alineación de las secuencias de polipéptidos, un experto en la materia puede identificar los residuos correspondientes, utilizando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. Por ejemplo, mediante la alineación de las secuencias de polipéptidos factor VII, un experto en la materia puede identificar los residuos correspondientes, utilizando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. Por ejemplo, la alanina en el aminoácido posición 1 (A1) de la

SEQ ID NO:3 (factor VII maduro) corresponde a la alanina en el aminoácido posición 61 (A61) de la SEQ ID NO:1, y la alanina en el aminoácido posición 39 (A39) de la SEQ ID NO:2. En otros casos, las regiones correspondientes pueden ser identificadas. Por ejemplo, el dominio Gla corresponde a las posiciones de aminoácidos de A1 hasta F45 de la SEQ ID NO:3, a las posiciones de aminoácido A61 a S105 de la SEQ ID NO:1 y a las posiciones de aminoácidos A39 a S83 de la SEQ ID NO:2. Un experto en la materia también puede emplear residuos de aminoácidos conservados como guías para encontrar los correspondientes residuos de aminoácidos entre y dentro de las secuencias de humanos y no humanos. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos S43 y E163 de la SEQ ID NO:3 (humanos) corresponden a S83 y E203 de la SEQ ID NO:4 (bovinos). Las posiciones correspondientes también se pueden basar en las alineaciones estructurales, por ejemplo mediante el uso de las alineaciones simuladas en computador de la estructura de proteínas. En otros casos, las regiones correspondientes pueden ser identificadas.

Como se usa aquí, una "proregión", "propéptido," o "pro secuencia", se refiere a una región o un segmento que se rompe para producir una proteína madura. Esto puede incluir segmentos que funcionan para suprimir la actividad proteolítica enmascarando los mecanismos catalíticos y evitar así la formación de los catalizadores intermedios (es decir, por la oclusión estérica del sitio de unión del sustrato). Un proregión es una secuencia de aminoácidos colocados en el extremo amino de un polipéptido biológicamente activo maduro y pueden

ser tan poco como algunos aminoácidos o pueden ser una estructura de multidominio.

Como se usa aquí, “factor VII maduro” se refiere a un polipéptido FVII que carece de una secuencia de señal y una secuencia de propéptido. Típicamente, una secuencia de señal indica una proteína para la secreción por medio del retículo endoplásmico (ER) vía de Golgi y se corta después de la inserción en el ER durante la translación. Una secuencia de propéptido típicamente funciona en modificaciones post-translacionales de la proteína y se rompe antes de la secreción de la proteína de la célula. Por lo tanto, un polipéptido FVII maduro es típicamente una proteína secretada. En un ejemplo, un polipéptido FVII maduro de humano se expone en la SEQ ID NO:3. La secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:3 difiere de la de los precursores polipéptidos establecidos en las SEQ ID NOS: 1 y 2 en que la SEQ ID NO: 3 carece de secuencia de señales, lo cual corresponde a residuos de aminoácidos 1-20 de las SEQ ID NOS: 1 y 2; y también carece de secuencia de propéptido, lo cual corresponde a residuos de aminoácidos 21-60 de la SEQ ID NO: 1 y residuos de aminoácidos 21-38 de la SEQ ID NO:2. La referencia a un polipéptido FVII maduro abarca la forma de zimógeno de cadena simple y la forma cadena doble.

Como se usa aquí, "tipo salvaje" o "nativo" con referencia a FVII se refiere a un polipéptido FVII codificado por un gen FVII nativo o que ocurre naturalmente, incluyendo variantes alélicas, que está presente en un organismo, incluyendo un humano y otros animales, en la naturaleza. La

referencia al factor VII tipo salvaje sin referencia a una especie, se pretende abarcar cualquier especies de un factor VII tipo salvaje. Incluido entre los polipéptidos FVII tipo salvaje se encuentra el polipéptido precursor codificado, fragmentos del mismo, y formas procesadas del mismo, como una forma madura que carece de señal de péptido así como cualquier forma pre o post-translacionalmente procesada o modificada del mismo. También se incluyen entre los polipéptidos FVII nativos aquellos que son post-translacionalmente modificados, incluyendo pero no limitado a, la modificación por glicosilación, carboxilación e hidroxilación. Los polipéptidos FVII nativos también incluyen formas de cadena simple y de cadena doble. Por ejemplo, los seres humanos expresan FVII nativo. La secuencia de aminoácidos de los ejemplares de tipo salvaje FVII humano establecido en las SEQ ID NOS: 1, 2, 3 y las variantes alélicas establecidas en las SEQ ID NOS:44-100 y las formas maduras de las mismas. Otros animales producen FVII nativas, incluyendo, pero no limitado a, vaca (*Bos Taurus*, SEQ ID NO:4), ratón (*Mus musculus*, SEQ ID NO:5), chimpancé pigmeo (*Pan paniscus*, SEQ ID NO:6), chimpancé (*Pan troglodytes*, SEQ ID NO: 7), conejo (*Oryctolagus cuniculus*, SEQ ID NO: 8), rata (*Rattus norvegicus*, SEQ ID NO: 9), macacos rhesus (*Macaca mulata*, SEQ ID NO: 10), cerdo (*Sus scrofa*, SEQ ID NO: 11), perro (*Canis familiaris*, SEQ ID NO: 12), pez cebra (*Brachydanio rerio*, SEQ ID NO: 13), pez globo japonés (*Fugu rubripes*, SEQ ID NO: 14), pollo (*Gallus gallus*, SEQ ID NO: 15), orangután (*Pongo pygmaeus*, SEQ ID NO: 16) y gorila (*Gorilla gorilla*, SEQ ID NO: 17).

Como se usa aquí, variantes de las especies se refieren a las variantes en polipéptidos entre las diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamíferos, tales como ratón y humano.

Como se usa aquí, las variantes alélicas se refieren a variaciones en las proteínas entre miembros de la misma especie.

Como se usa aquí, una variante de empalme se refiere a una variante producida por el procesamiento diferencial de la transcripción primaria del ADN genómico que resulta en más de un tipo de mRNA.

Como se usa aquí, un zimogén se refiere a una proteasa que es activada por medio de la ruptura proteolítica, incluyendo ruptura de maduración, tal como ruptura de activación, y/o formación de complejo con otras proteínas y/o cofactores. Un simogén es un precursor inactivo de una enzima proteolítica. Dichos precursores son generalmente más grandes, aunque no más grande necesariamente, que la forma activa. Con referencia a las proteasas de serina, los zimogenes son convertidos en enzimas activas por medio de la ruptura específica, incluyendo ruptura catalítica y autocatalítica, o por medio de la unión de un co-factor de activación, el cual genera una enzima activa. Por ejemplo, generalmente, los zimogenes están presentes en una forma de cadena simple. Los zimogenes, generalmente, están inactivos y pueden ser convertidos en polipéptidos activos maduros por medio de la ruptura catalítica o autocatalítica en uno o más sitios proteolíticos para generar un polipéptido de cadena múltiple, tal como una cadena doble. Un zimogén, por lo tanto, es una proteína enzimáticamente inactiva que es convertida en una

enzima proteolítica por medio de la acción de un activador. La ruptura puede ser llevada a cabo por autoactivación. Una pluralidad de proteínas de coagulación son zimogenes; ellas son inactivas, pero se convierten en rotas y son activadas al inicio del sistema de coagulación seguido del daño vascular. Con referencia a los polipéptidos FVII existen en la plasma sanguínea como zimogenes hasta que se produce la ruptura por aproteasas, tales como por ejemplo, factor IX activado (FIXa), factor X activado (FXa) factor XII activado (FXIIa), trombina, o por autoactivación para producir una forma de cadena doble similar a un zimogén, el cual luego requiere cambio de conformación adicional para la actividad completa.

Como se usa aquí, una proteína o polipéptido “similar a zimogén” se refiere a una proteína que ha sido activada por ruptura proteolítica, pero que todavía presenta propiedades que están asociadas con un zimogén, tal como, por ejemplo, baja o sin actividad, o una conformación que se parece a la conformación de la forma de zimogén de la proteína. Por ejemplo, cuando no se une a un factor de tejido, la forma activada de doble cadena de FVII es una proteína similar a un zimogén; esta retiene una conformación similar al zimogén FVII sin ruptura, y, por lo tanto, presenta muy baja actividad. Con la unión al factor de tejido, la forma activada de doble cadena de FVII sufre un cambio de conformación y adquiere si actividad completa como un factor de coagulación.

Como se usa aquí, una secuencia de activación se refiere a una secuencia de aminoácidos en un zimogén que se encuentra en el sitio requerido para la ruptura de activación o ruptura de maduración para formar

una proteasa activa. La ruptura de una secuencia de activación puede ser catalizada autocatalíticamente o por medio de socios de activación.

Como se usa aquí, la ruptura de activación es un tipo de ruptura de maduración, la cual incluye un cambio de conformación que es requerido para el desarrollo de la actividad enzimática completa. Esta es una vía de activación clásica, por ejemplo, para proteasas de serina en las cuales una ruptura genera una nueva N-terminal que interactúa con las regiones conservadas de la proteasa, tales como Asp194 en quimotripsina, para inducir los cambios conformacionales requeridos para la actividad. La activación puede resultar en la producción de formas de cadena múltiple de las proteasas. En algunos casos, las formas de cadena simple de la proteasa pueden presentar actividad proteolítica.

Como se usa aquí, el “Factor VII activado” o “FVIIa” se refiere a cualquier forma de cadena doble de un polipéptido FVII. Una forma de cadena doble típicamente resulta de la ruptura proteolítica, pero puede ser producida sintéticamente. El Factor VII activado, por lo tanto, incluye la forma de cadena doble similar a zimogén con poca actividad de coagulación, una forma activada completamente (aproximadamente 1000-veces más actividad) que ocurre con la unión al factor de tejido, y las formas mutadas que existen en una forma de cadena doble completamente activada o somete el cambio de conformación a una forma completamente activada. Por ejemplo, una forma de cadena simple de polipéptido FVII (ver, por ejemplo, SEQ ID NO:3) es rota proteolíticamente entre residuos de aminoácidos R152 y 1153 del polipéptido FVII maduro. Los

productos de ruptura, cadena pesada de FVII y cadena liviana de FVII, los cuales son mantenidos juntos por medio de unión de disulfuro (entre residuos de aminoácidos 135C y 162C en el FVII de la SEQ ID NO:3), forma la enzima FVII de doble cadena activada. La ruptura proteolítica puede ser llevada a cabo, por ejemplo, por medio de factor IX activado (FIXa), factor X activado (FXa), factor XII activado (FXIIa), trombina, o por autoactivación.

Como se usa aquí, una “propiedad” de un polipéptido FVII se refiere a una propiedad física o estructural, tal como propiedad tridimensional, pl, vida media, conformación y otras características físicas.

Como se usa aquí, una “actividad” de un polipéptido FVII se refiere a cualquier actividad exhibida por un polipéptido de factor VII. Dichas actividades pueden ser probadas *in vitro* y/o *in vivo* e incluyen, pero no se limitan a, coagulación o actividad coagulante, actividad pro-coagulante, actividad proteolítica o catalítica tal como para realizar la activación de factor X (FX) o activación de Factor IX (FIX); antigenicidad (habilidad para unir a o competir con un polipéptido para la unión a un anticuerpo anti-FVII); habilidad para unir factor de tejido, factor X o factor IX; y/o habilidad para unir a fosfolípidos. La actividad puede ser evaluada *in vitro* o *in vivo* utilizando ensayos reconocidos, por ejemplo, por medio de la medición de coagulación *in vitro* o *in vivo*. Los resultados de dichos ensayos indican que un polipéptido exhibe una actividad que puede estar correlacionada a la actividad del polipéptido *in vivo*, en el cual la actividad *in vivo* puede ser referida como actividad biológica. Los ensayos para determinar la funcionalidad o actividad de las formas modificadas de FVII

son conocidos para aquellos versados en la materia. Los ensayos ejemplares para evaluar la actividad de un polipéptido FVII incluyen ensayo de tiempo de protromboplastina (PT) o el ensayo de tiempo de tromboplastina (aPTT) activada parcial para evaluar la actividad coagulantes, o ensayos cromogénicos que usan sustratos sintéticos, tales como los descritos en los ejemplos 4, 5 y 11, para evaluar la actividad catalítica o proteolítica.

Como se usa aquí, “presenta al menos una actividad” o “retiene al menos una actividad” se refiere a la actividad presentada por un polipéptido FVII modificado en comparación con un polipéptido FVII sin modificar de la misma forma y bajo las mismas condiciones. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado en una forma de cadena doble se compara con un polipéptido FVII sin modificar en una forma de cadena doble, bajo las mismas condiciones experimentales, donde la única diferencia entre los dos polipéptidos es la modificación bajo estudio. En otro ejemplo, un polipéptido FVII modificado en una forma de cadena simple es comparado con un polipéptido FVII sin modificar en una forma de cadena simple, bajo las mismas condiciones experimentales, donde la única diferencia entre los dos polipéptidos es la modificación bajo estudio. Típicamente un polipéptido FVII modificado que retiene o presenta al menos una actividad de un polipéptido FVII sin modificar de la misma forma retiene una cantidad suficiente de la actividad de modo tal que, cuando se administra *in vivo*, el polipéptido FVII modificado es terapéuticamente efectivo como un terapéutico pro-coagulante. Generalmente, para que un polipéptido FVII modificado retenga la eficacia terapéutica como un

pro-coagulante, la cantidad de actividad que se retiene es o es aproximadamente 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% , 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más de la actividad de un polipéptido FVII sin modificar de la misma forma que muestra eficacia terapéutica como un pro-coagulante. La cantidad de actividad que se requiere para mantener la eficacia terapéutica como un pro-coagulante puede ser empíricamente determinada, si es necesario. Típicamente, la retención del 0.5% a 20%, 0.5% a 10%, 0.5% a 5% de una actividad es suficiente para retener la eficacia terapéutica como un pro-coagulante *in vivo*.

Se entiende que la actividad que es exhibida o retenida por un polipéptido FVII modificado puede ser cualquier actividad, incluyendo, por no limitado a, coagulación o actividad coagulante, actividad pro-coagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como para llevar a cabo la activación de factor X (FX) o activación de factor IX (FIX); antigenicidad (habilidad para unir a o competir con un polipéptido para la unión a un anticuerpo de anti-FVII); habilidad para unir factor de tejido, factor X o factor IX; y/o habilidad para unir a fosfolípidos. En algunos casos, un polipéptido FVII modificado puede retener una actividad que es aumentada en comparación con un polipéptido FVII sin modificar. En algunos casos, un polipéptido FVII modificado puede retener una actividad que es reducida en comparación con un polipéptido FVII sin modificar. La actividad de un polipéptido FVII modificado puede ser cualquier nivel del porcentaje de actividad del polipéptido sin modificar, en donde ambos

polipéptidos están en la misma forma, incluyendo pero no limitado a, 1% de la actividad, 2%, 3%, 4%, 5 %, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más actividad en comparación con el polipéptido que no contiene la modificación en cuestión. Por ejemplo, polipéptido FVII modificado puede presentar actividad incrementada o reducida comparado con el polipéptido FVII sin modificar en la misma forma. Por ejemplo, este puede retener al menos aproximadamente o 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50 %, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o al menos 99% de la actividad del polipéptido FVII sin modificar. En otras modalidades, el cambio en actividad es al menos aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces 5 veces 6 veces 7 veces 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces o más veces mayor que el FVII sin modificar. El nivel particular a ser retenido es una función del uso pretendido del polipéptido y puede ser determinada empíricamente. La actividad puede ser medida, por ejemplo, utilizando ensayos *in vitro* o *in vivo* tales como aquellos aquí descritos o en los Ejemplos más adelante.

Como se usa aquí, “actividad de coagulación” o “actividad coagulante” o “actividad pro-coagulante” se refiere a la habilidad de un polipéptido para llevar a cabo la coagulación. Los ensayos para evaluar la actividad coagulante son conocidos por los expertos en la materia, e incluyen ensayo de tiempo de

protromboplastina (PT) o el ensayo de tiempo de tromboplastina (aPTT) parcial activado.

Como se usa aquí, “actividad catalítica” o “actividad proteolítica” con referencia a FVII se refiere a la habilidad de una proteína FVII para catalizar la ruptura proteolítica de un sustrato, y son usadas de forma intercambiable. Los ensayos para evaluar dichas actividades son conocidos en el arte. Por ejemplo, la actividad proteolítica de FVII puede ser medida usando sustratos cromogénicos tales como Espectrozima FVIIa (CH3SO2-D-CHA-But-Arg-pNA), donde la ruptura del sustrato es monitoreada por la absorbencia y la tasa de hidrólisis de sustrato determinada por regresión lineal.

Como se usa aquí, “actividad intrínseca” con referencia a FVII se refiere a la actividad catalítica, proteolítica y/o coagulante de una proteína FVII en la ausencia de factor de tejido.

Como se usa aquí, dominio (típicamente una secuencia de tres o más, generalmente 5 o 7 o más aminoácidos) se refiere a una porción de una molécula, tal como proteínas o los ácidos nucleicos que codifican, que es estructuralmente y/o funcionalmente distinto de otras porciones de la molécula y se puede identificar. Por ejemplo, los dominios incluyen aquellas porciones de una cadena de polipéptido que puede formar una estructura independientemente doblada dentro de una proteína hecha de uno o más motivos estructurales y/o que es reconocida en virtud de una actividad funcional, tal como actividad proteolítica. Una actividad puede tener uno, o más de un, dominio distinto. Por ejemplo, un dominio puede ser identificado,

definido o distinguido por homología de la secuencia allí a miembros de familia relacionados, tales como homología a motivos que definen un dominio de proteasa o un dominio Gla. En otro ejemplo, un dominio puede ser distinguido por su función, tal como por actividad proteolítica, o una habilidad para interactuar con una biomolécula, tal como unión de DNA, unión de ligando, y dimerización. Un dominio puede presentar independientemente una función biológica o actividad de modo tal que el dominio independientemente o fusionado a otra molécula puede desempeñar una actividad, tal como, por ejemplo actividad proteolítica o unión de ligando. Un dominio puede ser una secuencia lineal de aminoácidos o una secuencia no lineal de aminoácidos. Varios polipéptidos contienen una pluralidad de dominios. Dichos dominios son conocidos, y pueden ser identificados por aquellos versados en la materia. A manera de ejemplo, se proporcionan las definiciones, pero se entiende que es bien para el experto en la materia reconocer los dominios particulares por nombre. Si se necesita se puede emplear el programa de computador apropiado para identificar los dominios.

Como se usa aquí, un dominio de proteasa es la porción catalíticamente activa de una proteasa. La referencia a un dominio de proteasa de una proteasa incluye las formas de cadena simple, doble y múltiple de cualquiera de estas proteínas. Un dominio de proteasa de una proteína contiene todos las propiedades requisito de esa proteína requeridas para su actividad proteolítica, tales como por ejemplo, el centro catalítico. Con relación al FVII, el dominio de proteasa comparte homología y característica estructural con los dominios de

proteasa de familia quimotripsina/tripsina, incluyendo la triada catalítica. Por ejemplo, en el polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3, el dominio de proteasa corresponde a las posiciones de aminoácido 153 a 392.

Como se usa aquí, un dominio gama-carboxiglutamato (Gla) se refiere a la porción de una proteína, por ejemplo una proteína dependiente de vitamina K, que contiene modificaciones post-translacionales de residuos de glutamato, generalmente la mayoría, pero no todos los residuos de glutamato, por medio de carboxilación dependiente de K para formar Gla. El dominio Gla es responsable por la unión de alta afinidad de iones de calcio y unir a los fosfolípidos cargados negativamente. Típicamente, el dominio Gla empieza en una extremidad N-terminal de la forma madura de proteínas dependientes de vitamina K y termina con un residuo aromático conservado. En un polipéptido FVII maduro el dominio Gla corresponde a las posiciones de aminoácido 1 a 45 de los polipéptidos ejemplares establecidos en la SEQ ID NO:3. Los dominios Gla son bien conocidos y su lugar puede ser identificado en polipéptidos particulares. Los dominios Gla de las varias proteínas dependientes de vitamina K comparten secuencia, homología estructural y funcional, incluyendo la concentración de residuos hidrofóbicos de N-terminal en un parche hidrofóbico que media en la interacción con los fosfolípidos cargados negativamente en la membrana de superficie de la célula. Otros polipéptidos ejemplares que contienen Gla incluyen, pero no se limitan a, FIX, FX, protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína de matriz Gla, proteína 6 específica para detener crecimiento (Gas6), y proteína Z. Los

dominios Gla de estas y otras proteínas ejemplares están establecidos en cualquiera de las SEQ ID NOS: 110-121.

Como se usa aquí, “nativo” o “endógeno” con referencia a un dominio Gla se refiere al dominio Gla que ocurre naturalmente asociado con todo o una parte de un polipéptido que tiene un dominio Gla. Para efectos de este documento, un dominio Gla nativo es con referencia a un polipéptido FVII. Por ejemplo, el dominio Gla nativo de FVII, establecido en la SEQ ID NO:119, corresponde a aminoácidos 1-45 de la secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO:3.

Como se usa aquí, un dominio Gla heterólogo se refiere al dominio Gla de un polipéptido, a partir de la misma o diferente especie, que no es un dominio Gla de FVII. Los ejemplos de dominios Gla heterólogos son los dominios Gla a partir de polipéptidos que contienen Gla que incluyen, pero no se limitan a, FIX, FX, protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína de matriz Gla, proteína 6 específica para detener crecimiento (Gas6), y proteína Z. Los dominios Gla de estas y otras proteínas ejemplares se establecen en cualquiera de las SEQ ID NOS: 110-118, 120 y 121,

Como se usa aquí, una porción contigua de un dominio Gla se refiere a por lo menos dos o más aminoácidos adyacentes, típicamente 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40 o más hasta todos los aminoácidos que componen un dominio Gla.

Como se usa aquí, “una porción suficiente de un dominio Gla para llevar a cabo la unión de fosfolípidos” incluye al menos un aminoácido, típicamente,

2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 o más aminoácidos del dominio, pero menos que todos los aminoácidos que componen el dominio así como el polipéptido que contiene dicha porción exhibe unión de fosfolípidos.

Como se usa aquí, “reemplazar” con respecto a un dominio Gla o “intercambio de dominio Gla” se refiere al proceso por el cual el dominio Gla endógeno de una proteína es reemplazado, usando recombinante, sintético u otros métodos, con el dominio Gla de otra proteína. En el contexto de un “intercambio de dominio Gla”, un “dominio Gla” es cualquier selección de aminoácidos a partir de un dominio Gla y regiones adyacentes que son suficientes para retener la actividad de unión de fosfolípidos. Típicamente, un intercambio de dominio Gla involucrará el reemplazo de entre 40 y 50 aminoácidos de la proteína endógena con entre 40 y 50 aminoácidos de otra proteína, pero puede involucrar menos o más aminoácidos.

Como se usa aquí, un factor (EGF-1 o EGF-2) de factor de crecimiento epidérmico (EGF) se refiere a la porción de una proteína que comparte la hemología de secuencia a una porción específica de 30 a 40 aminoácidos de la secuencia de factor de crecimiento epidérmico (EGF). El dominio de EGF incluye seis residuos de cisteína que han sido mostrados (en EGF) para ser involucrados en uniones de disulfuro. La estructura principal de un dominio de EGF es una hoja beta de dos cadenas seguido por un bucle a un hoja de dos cadenas corta de C-terminal. El FVII contiene dos dominios de EGF: EGF-1 y EGF-2. Estos dominios corresponden a posiciones de aminoácidos 46-82, y 87-

128, respectivamente, del polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3.

Como se usa aquí, el “polipéptido sin modificar” o “FVII sin modificar” y variaciones gramáticas de los mismos se refieren a un polipéptido de partida que se selecciona por modificación como acá se proporciona. El polipéptido de partida puede ser una forma de tipo salvaje que ocurre naturalmente de un polipéptido. Adicionalmente, el polipéptido de partida puede ser alterado o mutado, de modo tal que difiere de una isoforma de tipo salvaje nativa pero sin embargo se refiere acá como un polipéptido de partida sin modificar relacionado con los polipéptidos subsecuentemente modificados acá producidos. Así, las proteínas existentes conocidas en el arte que han sido modificadas para tener un aumento o decremento deseado en una actividad o propiedad particular en comparación con una proteína de referencia no modificada que se puede seleccionar y usar como el polipéptido de partida sin modificar. Por ejemplo, una proteína que ha sido modificada a partir de su forma nativa por uno o más aminoácidos simples cambia y posee bien sea un aumento o una disminución en una propiedad deseada, tal como un cambio en un residuo o residuos de aminoácido para alterar la glicosilación, puede ser una proteína objetivo, referida acá como sin modificar, para modificación posterior de la misma o de diferente propiedad. Los polipéptidos FVII modificados ejemplares conocidos en la técnica incluyen cualquier polipéptido FVII descrito en, por ejemplo, Patente de EEUU Nos. 5580560, 6017882, 6693075, 6762286 y 6806063, Publicación de Patente de EE.UU. Nos. 20030100506 y

20040220106 y Publicación de Patente Internacional Nos. WO1988010295, WO200183725, WO2003093465, WO200338162, WO2004083361, WO2004108763, WO2004029090, WO2004029091, WO2004111242 y WO2005123916.

Como se usa aquí, los “polipéptidos de factor VII modificados” y “factor VII modificado” se refiere a un polipéptido FVII que tiene una o más diferencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido FVII sin modificar. Las diferencias de aminoácidos puede ser mutaciones de aminoácidos tales como uno o más reemplazos de aminoácidos (sustituciones), inserciones o eliminaciones de dominios completos, y cualquier combinación de los mismos. Típicamente, un polipéptido FVII modificado tiene una o más modificaciones en la secuencia primaria en comparación con un polipéptido FVII sin modificar. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado acá suministrado puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 , 30, 40, 50 o más diferencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido FVII sin modificar. Cualquier modificación está contemplada siempre y cuando el polipéptido resultante exhiba al menos una actividad FVII asociada con un polipéptido FVII nativo, tal como, por ejemplo, actividad catalítica, actividad proteolítica, la habilidad de unir TF o la habilidad para unir plaquetas activadas.

Como se usa aquí, “inhibidores de coagulación” se refiere a proteínas o moléculas que actúan para inhibir o prevenir la coagulación o la formación de coágulos. La inhibición o prevención de coagulación puede ser observada *in vivo* o *in vitro*, y puede ser ensayada usando cualquier método conocido en el

arte incluyendo, pero no limitado a, ensayo de tiempo de protromboplastina (PT) o el ensayo de tiempo de tromboplastina (aPTT) parcial activado.

Como se usa aquí, le inhibidor de vía de factor de tejido (TFPI, también relacionado como TFPI-1) es un inhibidor tipo Kunitz que está involucrado en la formación de un complejo inhibidor cuaternario de TF/FVIIa/TFPI/FXa en el cual la actividad del FVIIa es inhibida. TFPI es expresado como dos diferentes formas de precursor seguido por empalme alternativo. Los precursores TFPIα (SEQ ID NO:101) y TFPIβ (SEQ ID NO:103), los cuales son rotos durante la secreción para generar una proteína madura de aminoácido 276 (SEQ ID NO:102) y de aminoácido 223 (SEQ ID NO:104), respectivamente. El TFPI contiene 3 dominios Kunitz, de los cuales el dominio Kunitz-1 es responsable por la unión e inhibición de FVIIa.

Como se usa aquí, TFPI-2 (también conocido como proteína placentaria 5 (PP5) e inhibidor de proteasa de serina asociada a matriz (MSPI)) se refiere a un homólogo de TFPI. La proteína TFPI-2 madura de aminoácido 213 (SEQ ID NO:105) contiene tres dominios tipo Kunitz que exhiben 43%, 35% y 53% de identidad de secuencia primaria con dominios tipo Kunitz TFPI-1 1, 2 y 3, respectivamente. El TFPI-2 juega un papel en la regulación de la digestión y remodelación de extracelular de matriz, y no se considera que sea un factor importante en la vía de coagulación.

Como se usa aquí, antitrombina-III (AT-III) es un inhibidor de proteasa de serina (serpina). La AT-III es sintetizada como una proteína precursora que contiene residuos de aminoácido 464 (SEQ ID NO:122) que es roto durante la

secreción para liberar una antitrombina madura de aminoácido 432 (SEQ ID NO:123).

Como se usa aquí, los cofactores se refieren a proteínas o moléculas que se unen a otras proteínas o moléculas específicas para formar un complejo activo. En algunos ejemplos, la unión a un cofactor es requerida para la actividad proteolítica óptima. Por ejemplo, el factor de tejido /TF) es un cofactor de FVIIa. La unión de FVIIa a TF incluye cambios conformacionales que resultan en actividad proteolítica aumentada de FVIIa para sus sustratos, FV y FIX.

Como se usa aquí, el factor de tejido (TF) se refiere a una glicoproteína de transmembrana de aminoácido 263 (SEQ ID NO:124) que funciona como un cofactor para FVIIa. Esto se expresa constitutivamente por células de músculo liso y fibroblastos, y ayuda a iniciar la coagulación por medio de la unión de FVII y FVIIa cuando estas células entran en contacto con el flujo sanguíneo seguido por la lesión de tejido.

Como se usa aquí, la plaqueta activada se refiere a una plaqueta que ha sido activada por la unión de moléculas tales como colágeno, tromboxano A2, ADP y trombina para someter varios cambios en morfología, fenotipo y función que finalmente promueve la coagulación. Por ejemplo, una plaqueta activada cambia en forma a una forma más amorfa con los dedos de proyección. Las plaqueta activadas también someten una “vuelta” de la membrana célula de modo tal que fosfatidilserina y otros fosfolípidos cargados negativamente que están normalmente presentes en la pared interna de la membrana celular son

translocados hacia la superficie exterior orientada al plasma. Estas membranas de las plaquetas activadas proporcionan las superficie sobre la cual se llevan a cabo varias de las reacciones de la cascada de coagulación. Las plaquetas activadas también secretan vesículas que contienen dichos factores pro-coagulantes como vWF, FV, trombina, ADP y tromboxano A2, y se adhieren entre si para formar un tapón de plaqueta el cual es estabilizado por fibrina para convertirse en un coágulo.

Como se usa aquí, la unión y/o afinidad aumentada para plaquetas activadas, y cualquier variación gramatical de las mismas, se refiere a una habilidad mejorada de un polipéptido o proteína, por ejemplo un polipéptido FVII, para unirse a la superficie de una plaqueta activada, en comparación con un polipéptido o proteína de referencia. Por ejemplo, la habilidad de un polipéptido FVII modificado para unirse a las plaquetas activadas puede ser mayor que la habilidad de un polipéptido FVII sin modificar para unirse a las plaquetas activadas. La unión y/ afinidad de un polipéptido para las plaquetas activadas puede ser incrementar por al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20 %, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con la unión o afinidad de un polipéptido sin modificar. Los ensayos para determinar la unión y/o afinidad de un polipéptido para las plaquetas activadas son conocidos en el arte. La unión de un polipéptido FVII a plaquetas activadas es mediada a través de la interacción de aminoácidos en el dominio Gla del polipéptido FVII y los fosfolípidos negativamente cargados, tales como fosfatidilserina, sobre la

plaqueta activada. Como tal, los método para ensayar la unión `de polipéptidos, tales como polipéptidos FVII, a plaquetas activadas usan membranas y vesículas que contienen fosfolípidos, tales como fosfatidilserina. Por ejemplo, la habilidad de un polipéptido para unirse a una plaqueta activada se refleja por la habilidad del polipéptido para unirse a vesículas de fosfolípidos, la cual puede ser medida de dispersión de luz.

Como se usa aquí, la unión o afinidad aumentada para fosfolípidos, y cualquier variación gramatical de las mismas, se refiere a una habilidad mejorada de un polipéptido o proteína para unirse a fosfolípidos en comparación con un polipéptido o proteína de referencia. Los fosfolípidos pueden incluir cualquier fosfolípido, pero particularmente incluye fosfatidilserina. La unión y/o afinidad de un polipéptido para fosfolípidos puede ser incrementada por al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20% , 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con la unión y/o afinidad de un polipéptido no modificado. Los ensayos para determinar la afinidad y/o unión de un polipéptido a fosfolípidos son conocidos en el arte. Por ejemplo, la unión de polipéptido FVII a vesículas de fosfolípidos puede ser determinada por dispersión de luz relativa a 90º hacia la luz incidente. La intensidad de la dispersión de luz con las vesículas de fosfolípidos solas y con las vesículas de fosfolípidos con FVII es medida para determinar la disociación constante. La resonancia de plasma superficial, tal como sobre un instrumento biosensor

BIAcore, también puede ser utilizada para medir la afinidad de los polipéptidos FVII para las membranas de fosfolípidos.

Como se usa aquí, la resistencia aumentada a inhibidores o “resistencia aumentada a TFPI” o “resistencia aumentada a AT-III” se refiere a cualquier cantidad de sensitividad reducida de un polipéptido a los efectos inhibidores de un inhibidor, tal como TFPI o AT-III, en comparación con un polipéptido de referencia, tal como un polipéptido FVII sin modificar. Por ejemplo, TFPI, complejo con FXa, se une al complejo TF/FVIIa. Al hacerlo así, este inhibe la actividad del FVIIa. Así, un polipéptido FVII modificado que reduce o previene la unión de TFPI al complejo TF/FVIIa, y por lo tanto reduce o previene la inhibición mediada por TFPI de la actividad de FVIIa, muestra una resistencia aumentada a TFPI. La resistencia aumentada a un inhibidor, tal como TFPI, puede ser ensayada por medio de la evaluación de la unión de un polipéptido FVII modificado a un inhibidor. La resistencia aumentada a un inhibidor, tal como TFPI, también puede ser ensayada por medio de la medición de la actividad intrínseca o la actividad coagulante de un polipéptido FVII en la presencia de TFPI. Los ensayos para determinar la unión de un polipéptido a un inhibidor, tal como TPFI o AT-III, son conocidos en el arte. Para los inhibidores no covalentes, tales como, por ejemplo, TFPI, se puede medir un k_1. Para inhibidores covalentes, tales como, por ejemplo, AT-III, se puede medir una constante de tasa de segundo orden para la inhibición. Adicionalmente, la resonancia de plasma superficial, tal como en un instrumento de biosensor BIAcore, también puede ser utilizada para medir la unión de polipéptidos FVII a

TFPI, AT-II u otros inhibidores. Sin embargo, para inhibidores covalentes tales como AT-III, sólo se puede medir una tasa usando BIAcore. Los ensayos para determinar el efecto inhibidor de, por ejemplo, TFPI en actividad coagulante de FVII o actividad intrínseca también son conocidos en el arte. Por ejemplo, la habilidad de un polipéptido FVII modificado de romper su sustrato FX en presencia o ausencia de TFPI puede ser medida, y determinar el grado al cual el TFPI inhibe la reacción. Esto puede ser comparado con la habilidad de un polipéptido FVII sin modificar de romper su sustrato FX en presencia o ausencia de TFPI. Un polipéptido modificado que exhibe resistencia aumentada a un inhibidor presenta, por ejemplo, un incremento de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20% , 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más resistencia a los efectos de un inhibidor en comparación con un polipéptido sin modificar.

Como se usa aquí, “actividad biológica” se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o las respuestas fisiológicas que resultan con la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, abarca los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de dichos compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden ser observadas en sistemas *in vitro* diseñados para probar o usar dichas actividades. Así, para propósitos de este documento una actividad biológica de un polipéptido FVII abarca la actividad coagulante.

Como se usa aquí el término “evaluar”, y las variaciones gramaticales del mismo, pretende incluir la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de un polipéptido, y también de obtener un índice, proporción, porcentaje, visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la detección de la ruptura de un sustrato por un polipéptido puede ser por medición directa del producto, o puede ser medida indirectamente determinando la actividad resultante del sustrato roto.

Como se usa aquí, “numeración de quimotripsina” se refiere la numeración de aminoácido de un polipéptido maduro de quimotripsina de la SEQ ID NO:107. La alineación de un dominio de proteasa de otra proteasa, tal como por ejemplo el dominio de proteasa de factor VII, puede ser hecha con quimotripsina. En dicho caso, los aminoácidos del factor VII que corresponden a los aminoácidos de quimotripsina dan la numeración de los aminoácidos de quimotripsina. Las posiciones correspondientes pueden ser determinadas por dicha alineación por un experto en la materia usando alineamientos manuales o mediante el uso de numerosos programas de alineación disponibles (por ejemplo, BLASTP). Las posiciones correspondientes también pueden estar basadas en alineaciones estructurales, por ejemplo por medio del uso de alineamientos simulados en computador de estructura de proteína. La declaración que los aminoácidos de un polipéptido corresponden a aminoácidos en una secuencia divulgada se refiere a aminoácidos identificados en la alineación del polipéptido con la secuencia divulgada para maximizar la

identidad u homología (donde se alinean los aminoácidos conservados) usando un algoritmo estándar de alineación, tal como el algoritmo GAP. Los números de quimotripsina correspondientes de posiciones de aminoácidos 153 a 406 del polipéptido FVII establecido en la SEQ ID NO:3 son proporcionados en la Tabla 1. Las posiciones de aminoácidos relacionadas con la secuencia establecida en la SEQ ID NO:3 están en letra normal, los residuos de aminoácidos en esas posiciones se encuentran en negrita, y los números de quimotripsina correspondientes están en letra cursiva. Por ejemplo, con la alineación del factor VII maduro (SEQ ID NO:3) con quimotripsina madura (SEQ ID NO:107), la isoleucina (I) en la posición de aminoácido 153 en el factor VII da la numeración de quimotripsina de 116. Los aminoácidos subsecuentes son numerados de acuerdo con esto. En un ejemplo, un ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido 210 del factor VII maduro (SEQ ID NO:3) corresponde a la posición de aminoácido E70 con base en la numeración de quimotripsina. Donde existe un residuo en una proteasa, pero no está presente en la quimotripsina, el residuo de aminoácido da una notación de letra. Por ejemplo, los residuos en quimotripsina que son parte de un ciclo con aminoácido 60 basado en numeración de quimotripsina, pero son insertados en la secuencia de factor VII en comparación con la quimotripsina, son referenciados como por ejemplo K60a, 160b, K60c o N60d. Estos residuos corresponden a K197, I198, K199 y N200, respectivamente, por la numeración relativa a la secuencia de factor VII maduro (SEQ ID NO:3).

Tabla 1. Numeración de Quimotripsina de factor VII

153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167
I	**V**	**G**	**G**	**K**	**V**	**C**	**P**	**K**	**G**	**E**	**C**	**P**	**W**	**Q**
16	*17*	*18*	*19*	*20*	*21*	*22*	*23*	*24*	*25*	*26*	*27*	*28*	*29*	*30*
168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182
V	**L**	**L**	**L**	**V**	**N**	**G**	**A**	**Q**	**L**	**C**	**G**	**G**	**T**	**L**
31	*32*	*33*	*34*	*35*	*37*	*38*	*39*	*40*	*41*	*42*	*43*	*44*	*45*	*46*
183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
I	**N**	**T**	**I**	**W**	**V**	**V**	**S**	**A**	**A**	**H**	**C**	**F**	**D**	**K**
47	*48*	*49*	*50*	*51*	*52*	*53*	*54*	*55*	*56*	*57*	*58*	*59*	*60*	*60A*
198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212
I	**K**	**N**	**W**	**R**	**N**	**L**	**I**	**A**	**V**	**L**	**G**	**E**	**H**	**D**
60B	*60C*	*60D*	*61*	*62*	*63*	*64*	*65*	*66*	*67*	*68*	*69*	*70*	*71*	*72*
213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227
L	**S**	**E**	**H**	**D**	**G**	**D**	**E**	**Q**	**S**	**R**	**R**	**V**	**A**	**Q**
73	*74*	*75*	*76*	*77*	*78*	*79*	*80*	*81*	*82*	*83*	*84*	*85*	*86*	*87*
228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242
V	**I**	**I**	**P**	**S**	**T**	**Y**	**V**	**P**	**G**	**T**	**T**	**N**	**H**	**D**
88	*89*	*90*	*91*	*92*	*93*	*94*	*95*	*96*	*97*	*98*	*99*	*100*	*101*	*102*
243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257
I	**A**	**L**	**L**	**R**	**L**	**H**	**Q**	**P**	**V**	**V**	**L**	**T**	**D**	**H**
103	*104*	*105*	*106*	*107*	*108*	*109*	*110*	*111*	*112*	*113*	*114*	*115*	*116*	*117*
258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272
V	**V**	**P**	**L**	**C**	**L**	**P**	**E**	**R**	**T**	**F**	**S**	**E**	**R**	**T**
118	*119*	*120*	*121*	*122*	*123*	*124*	*125*	*126*	*127*	*128*	*129*	*129A*	*129B*	*129C*
273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287
L	**A**	**F**	**V**	**R**	**F**	**S**	**L**	**V**	**S**	**G**	**W**	**G**	**Q**	**L**
129D	*129E*	*129F*	*129G*	*134*	*135*	*136*	*137*	*138*	*139*	*140*	*141*	*142*	*143*	*144*
288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302
L	**D**	**R**	**G**	**A**	**T**	**A**	**L**	**E**	**L**	**M**	**V**	**L**	**N**	**V**
145	*146*	*147*	*149*	*150*	*151*	*152*	*153*	*154*	*155*	*156*	*157*	*158*	*159*	*160*
303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317
P	**R**	**L**	**M**	**T**	**Q**	**D**	**C**	**L**	**Q**	**Q**	**S**	**R**	**K**	**V**
161	*162*	*163*	*164*	*165*	*166*	*167*	*168*	*169*	*170*	*170A*	*170B*	*170C*	*170D*	*170E*

318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332
G	**D**	**S**	**P**	**N**	**I**	**T**	**E**	**Y**	**M**	**F**	**C**	**A**	**G**	**Y**
170F	*170G*	*170H*	*170I*	*175*	*176*	*177*	*178*	*179*	*180*	*181*	*182*	*183*	*184A*	*184*
333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347
S	**D**	**G**	**S**	**K**	**D**	**S**	**C**	**K**	**G**	**D**	**S**	**G**	**G**	**P**
185	*186*	*187*	*188A*	*188*	*189*	*190*	*191*	*192*	*193*	*194*	*195*	*196*	*197*	*198*
348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362
H	**A**	**T**	**H**	**Y**	**R**	**G**	**T**	**W**	**Y**	**L**	**T**	**G**	**I**	**V**
199	*200*	*201*	*202*	*203*	*204*	*205*	*206*	*207*	*208*	*209*	*210*	*211*	*212*	*213*
363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377
S	**W**	**G**	**Q**	**G**	**C**	**A**	**T**	**V**	**G**	**H**	**F**	**G**	**V**	**Y**
214	*215*	*216*	*217*	*219*	*220*	*221A*	*221*	*222*	*223*	*224*	*225*	*226*	*227*	*228*
378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392
T	**R**	**V**	**S**	**Q**	**Y**	**I**	**E**	**W**	**L**	**Q**	**K**	**L**	**M**	**R**
229	*230*	*231*	*232*	*233*	*234*	*235*	*236*	*237*	*238*	*239*	*240*	*241*	*242*	*243*
393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	
S	**E**	**P**	**R**	**P**	**G**	**V**	**L**	**L**	**R**	**A**	**P**	**F**	**P**	
244	*245*	*246*	*247*	*248*	*249*	*250*	*251*	*252*	*253*	*254*	*255*	*256*	*257*	

Como se usa aquí, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo los ácidos nucleicos peptídicos (ANP) y sus mezclas. Los ácidos nucleicos puede ser simples o de doble cadena. Al referirse a las sondas o cebadores, que son etiquetadas opcionalmente, tales como con una etiqueta detectable, tal como fluorescente o de radio, se contemplan las moléculas de cadena de simple. Dichas moléculas son típicamente de una longitud tal que su objetivo es estadísticamente único o de bajo número de copias (normalmente menos de 5, por lo general menos de 3) para probar o cebar una librería. En general, una sonda o cebador contiene al

menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria o idéntico a un gen de interés. Las sondas y cebadores pueden ser de 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de largo.

Como se usa aquí, un péptido se refiere a un polipéptido que es de 2 a 40 aminoácidos en longitud.

Como se usa aquí, los aminoácidos que ocurren en las varias secuencias de aminoácidos acá provistas son identificados de acuerdo con sus abreviaciones conocidas en tres letras o de una letra (Tabla1). Los nucleótidos que ocurren en los varios fragmentos de ácido nucleico son designados con las designaciones estándar de letra sencilla usada en la rutina en el arte.

Como se usa aquí, un “aminoácido” es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para propósitos de este documento, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos que ocurren naturalmente, aminoácidos no naturales y aminoácidos análogos (es decir, aminoácidos donde el carbono α tiene una cadena lateral).

Manteniéndonos con la nomenclatura estándar de polipéptido describa en *J. Biol. Chem.*, 243: 3552-3559 (1969), y adoptada 37 C.F.R. § § 1.821-1.822, las abreviaturas de los residuos de aminoácidos son mostradas en la Tabla 1:

Tabla 2 – Tabla de Correspondencia

SIMBOLO		
1 Letra	**3 Letras**	**AMINOÁCIDO**
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina

F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácido aspártico
N	Asn	Asparaginas
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

Se deberá notar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos tienen por fórmulas una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de amino término a carboxilo término. Adicionalmente, la frase “residuo de aminoácido” está ampliamente definida para incluir los aminoácidos listados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 2) y amonio ácidos modificados e inusuales, tales como aquellos relacionados en el 37 C.F.R. § § 1.821-1.822, e incorporados acá para referencia. Además, se deberá notar que una línea al comienzo o al final de una secuencia de residuo de aminoácido indica un péptido unido a una secuencia adicional de uno más residuos de aminoácidos, a un grupo amino terminal tal como NH_2 o a un grupo carboxilo terminal tal como COOH.

Como se usa aquí, un “aminoácido hidrofóbico” incluye cualquiera de los aminoácidos determinados para ser hidrofóbicos usando la escala de consenso de hidrofobicidad de Eisenberg. Los ejemplos son los aminoácidos hidrofóbicos que ocurren naturalmente, tales como isoleucina, fenilalanina, valina, leucina, triptofan, metionina, alanina, glicina, cisteína y tirosina (Eisenberg *et al.*, (1982) Faraday Symp. Chem. Soc. 17:109-120). Los aminoácidos hidrofóbicos que no ocurren naturalmente también son incluidos.

Como se usa aquí, un “aminoácido acídico” incluye entre los aminoácidos que ocurren naturalmente residuos de ácido aspártico y de ácido glutámico. Los aminoácidos acídicos que no ocurren naturalmente también son incluidos.

Como se usa aquí, “aminoácidos que ocurren naturalmente” se refiere a los aminoácidos 20 L que ocurren en los polipéptidos.

Como se usa aquí, “aminoácido no natural” se refiere a un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico que no es uno de los aminoácidos que ocurren naturalmente indicados en la Tabla 2. Los aminoácidos que no ocurren naturalmente por lo tanto incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos diferentes a los 20 aminoácidos que ocurren naturalmente e incluyen, pero no se limitan al, los isostereómeros D de aminoácidos. Los ejemplos de los aminoácidos no naturales son conocidos para aquellos expertos en la materia y pueden ser incluidos en un polipéptido factor VII modificado.

Como se usa aquí, una construcción de ADN es una molécula de ADN circula, lineal o de cadena simple o doble que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos en una manera no encontrada en la naturaleza. Las construcciones de ADN existen como un resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

Como se usa aquí, un segmento de ADN es una porción de una molécula de ADN más grande que tiene atributos específicos. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido específico es una porción de una molécula de ADN más larga, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, el cual, cuando se lee desde la dirección 5’ o 3’, codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.

Como se usa aquí, el término polinucleótido significa un polímero de cadena simple o dobel de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos con base en la lectura del extremo 5’ al 3’. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se puede aislar de fuentes naturales, que se sintetizan *in vitro*, o elaborados a partir de una combinación de moléculas sintéticas y naturales. La longitud de una molécula de polinucleótido se da acá en términos de nucleótidos (abreviado "nt") o de pares de bases (abreviado "bp"). El término nucleótidos se utiliza para moléculas de cadena simple y doble donde el contexto lo permita. Cuando el término se aplica a las moléculas de doble cadena que se utilizan para denotar la longitud total y se entenderá como equivalente al término pares de base. Será reconocido por los expertos en la materia que las dos hebras de un polinucleótido de doble cadena pueden variar ligeramente en longitud y que

sus extremos puede ser fraccionados; por lo tanto todos los nucleótidos dentro de una molécula de doble cadena de polinucleótidos no pueden estar vinculados. Estos extremos impares, en general, no exceden a 20 nucleótidos de longitud.

Como se usa aquí, “secuencia primaria” se refiere a la secuencia de residuos de aminoácidos en un polipéptido.

Como se usa aquí, “similitud” entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótido de los ácidos nucleicos. La similitud puede estar basada en el grado de identidad y/o homología de secuencias de residuos y los residuos allí contenidos. Los métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas y ácidos nucleicos son conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, en un método para evaluar la similitud de secuencia, dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos son alineados en una manera que alcanzan un nivel máximo de identidad entre las secuencias. “Identidad” se refiere a la medida en la cual las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son invariantes. La alineación de las secuencias de aminoácidos, y algunas secuencias de nucleótidos, también puede tener en cuenta las diferencias conservativas y/9 sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservativas son aquellas que preservan las propiedades fisicoquímicas de los residuos involucrados. Las alineaciones pueden ser globales (alineación de las secuencias comparadas sobre la longitud total de las secuencias y que incluyen todos los residuos) o locales (la alineación de

una porción de las secuencias que incluyen únicamente la región o regiones más similares).

Como se usa aquí, los términos “homología” e “identidad” son usados de forma intercambiable, pero homología puede incluir cambios conservativos de aminoácidos. En general para identificar las posiciones correspondientes las secuencias de aminoácidos son alineadas de modo tal que se obtiene el orden más alto de coincidencia (ver, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991 ; Carillo *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math 48*:1073).

Como se usa aquí, “identidad de secuencia” se refiere al número de aminoácidos idénticos (o bases de nucleótidos) en una comparación entre una prueba y un polipéptido o polinucleótido referencia. Los polipéptidos homólogos se refieren al número predeterminado de residuos de aminoácidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones conservativas de aminoácidos así como los residuos idénticos. La identidad de secuencia puede ser determinada por medio de programas de algoritmo estándar de alineación usados con penalidades de espacio por defecto establecidas por cada proveedor. Las moléculas homólogas de ácido nucleico se refieren a un

número predeterminado de nucleótidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones que no cambian al aminoácido codificado (es decir, "sustituciones silenciosas") así como los residuos idénticos. Las moléculas sustancialmente homólogas de ácido nucleico hibridan típicamente a tirantez moderada o a una alta tirantez todo a lo largo de la longitud del ácido nucleico o a lo largo de al menos aproximadamente 70%, 80% o 90% de la molécula de ácido nucleico de longitud completa de interés. También se contemplan las moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula hibridada de ácido nucleico. (Para la determinación de la homología de proteínas, los aminoácidos conservativos pueden ser alineados así como los aminoácidos idénticos; en este caso, el porcentaje de identidad y el porcentaje de homología varía). Si dos moléculas de ácido nucleico tienen secuencias de nucleótido (o cualquier dos polipéptidos tienen secuencias de aminoácidos) que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% "idénticas" pueden ser determinadas usando algoritmos conocidos de computador tales como el programa "FAST A", usando por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988) (otros programas incluyen el paquete de programa GCG (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., *et al.*, *J. Molec. Biol.* 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994), y Carillo *et al. SIAM J Applied Math* 48: 1073 (1988)). Por ejemplo, la function BLAST de la base de datos del Centro Nacional para Información de

Biotecnología puede ser utilizada para determinar la identidad. Otros programas disponibles comercialmente o públicamente incluyen el programa DNAStar "MegAlign" (Madison, WI) y el programa "Gap" del Grupo de Computadores Genéticos de Wisconsin (UWG) (Madison WI)). La homología o identidad porcentual de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico puede ser determinada, por ejemplo, por medio de la comparación de información de secuencia usando un programa de computador GAP (por ejemplo, Needleman *et al. J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), como se revisó por Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)). Brevemente, un programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineado (es decir, nucleótidos o aminoácidos) los cuales son similares, divididos por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación urinaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación pesada de Gribskov *et al. Nucl. Acids Res*. 14: 6745 (1986), como se describió por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, Fundación Nacional de Investigación Biomédica, pp. 353-358 (1979); (2) una penalidad de 3.0 para cada separación y una penalidad adicional de 0.10 para cada símbolo en cada separación; y (3) sin penalidad para separaciones de extremo.

Por lo tanto, como se usa aquí, el término "identidad" representa una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de prueba y una referencia. En un ejemplo no limitante, "al menos 90% idéntico a" se refiere a las

identidades porcentuales desde 90% hasta 100% con relación a los polipéptidos de referencia. La identidad a un nivel de 90% o más es indicativa del hecho que, asumiendo para propósitos de ejemplificación una prueba y una longitud de polinucleótido de referencia de 100 aminoácidos son comparados, no más de 10% (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos en los polipéptidos de prueba difieren de aquellos de los polipéptidos de referencia. Las comparaciones similares pueden ser hechas entre una prueba y polinucleótidos de referencia. Dichas diferencias pueden ser representadas como mutaciones de punto aleatoriamente distribuidas en la longitud total de una secuencia de aminoácido o pueden ser agrupadas en una o más ubicaciones de la longitud variable hasta el máximo permitido, por ejemplo, 10/100 diferencia de aminoácidos (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias son definidas como sustituciones, inserciones o supresiones de ácido nucleico o aminoácido. En el nivel de homologías o identidades por encima de aproximadamente 85-90%, el resultado debería independiente del programa y los parámetros de separación establecidos; dichos niveles altos de identidad pueden ser evaluados fácilmente, a medida sin depender del software.

Como se usa aquí, también se entiende que los términos “sustancialmente idéntico” o “similar” varían con el contexto como puede ser entendido por aquellos expertos en la materia relevante, pero que aquellos expertos pueden evaluar.

Como se usa aquí, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud y/o identidad) para alinear las posiciones correspondientes

en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Típicamente, se alinean dos o más secuencias que están relacionadas por 50% o más de identidad. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que son alineadas en posiciones correspondientes y pueden incluir secuencias de alineación derivadas de ARNs, tales como ESTs y otros cADNs, alineados con la secuencia genómica de ADN.

Como se usa aquí, “hibrida específicamente” se refiere al recocido, por medio del emparejamiento de base complementaria, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) a una molécula de ácido nucleico objetivo. Aquellos expertos en la materia son familiares con los parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan la hibridación específica, tal como la longitud y la composición de la molécula particular. Los parámetros particularmente relevantes a hibridación *in vitro* además incluyen recocido y temperatura de lavado, composición de amortiguamiento y la concentración de sal. Las condiciones ejemplares de lavado para remover las moléculas de ácido nucleico no específicamente unidas a una alta tirantez son 0.1x SSPE, 0.1% SDS, 65ºC, y a tirantez media son de 0.2 x SSPE, 0.1% SDS, 50ºC. Las condiciones equivalentes de tirantez son conocidas en el arte. El experto en la materia puede ajustar fácilmente estos parámetros para lograr la hibridación específica de una molécula de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico objetivo apropiada para una aplicación particular.

Como se usa aquí, el polipéptido o proteína aislada o purificada o la porción biológicamente activa de la misma es sustancialmente libre de material

celular u otras proteínas contaminantes de la célula de tejido a partir de la cual se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando es sintetizada químicamente. Las preparaciones pueden ser determinadas para ser sustancialmente libres y éstas aparecen libres de impurezas detectables fácilmente como se determina por métodos estándar de análisis, tales como cromatografía de capa delgada (TLC), electroforesis de gel y cromatografía de líquido de alto desempeño (HPLC), utilizadas por aquellos expertos en la materia para evaluar dicha pureza, o suficientemente puro de modo tal que la purificación adicional no alteraría detectablemente las propiedades físicas y químicas, tales como actividades proteolíticas y biológicas, de la sustancia. Los métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros son conocidos por aquellos expertos en la materia. Un compuesto sustancialmente químicamente puro, sin embargo, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En dichos casos, la purificación adicional puede aumentar la actividad específica del compuesto.

El término sustancialmente libre de material celular incluye las preparaciones de proteínas en las cuales la proteína se separa de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de forma recombinante. En una modalidad, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas de proteasa que tienen menos de aproximadamente 30% (por peso seco) de proteínas no proteasa (también referencias como una proteína contaminante), generalmente

menor que aproximadamente 20% de proteínas no proteasa o 10% de proteínas no proteasa o menor que aproximadamente 5% de proteínas no proteasa. Cuando la proteína de proteasa o porción activa de la misma es producida de forma recombinante, esta es también sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, medio de cultivo representa menos de, aproximadamente, o igual a 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína de proteasa.

Como se usa aquí, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos incluye las preparaciones de proteínas de proteasa en las cuales la proteína se separa de los precursores químicos u otros químicos que están involucrados en la síntesis de la proteína. El término incluye las preparaciones de proteínas de proteasa que tienen menos de aproximadamente 30% (por peso seco), 20%, 10% 5% o menos de precursores químicos o químicos no proteasa o componentes.

Como se usa aquí, la producción por métodos de recombinante por medio del uso de métodos de ADN recombinante se refiere al uso de métodos bien conocidos de biología molecular para expresar las proteínas codificadas por el ADN clonado.

Como se usa aquí, vector (o plásmido) se refiere a los elementos discretos que son usados para introducir ácido nucleico heterólogo en células para la expresión o replicación de los mismos. Los vectores típicamente se permanecen episomal, pero pueden ser diseñados para llevar a cabo la integración de un gen o una porción del mismo en un cromosoma del genoma.

También se contemplan los vectores que son cromosomas ratifícales, tales como cromosomas ratifícales de bacteria, cromosomas artificiales de levadura y cromosomas ratifícales de mamíferos. La selección y el uso de dichos vehículos son bien conocidos por aquellos expertos en la materia.

Como se usa aquí, la expresión se refiere al proceso por el cual el ácido nucleico es transcrito en mARN y traducido en péptidos, polipéptidos, o proteínas. Si el ácido nucleico se deriva del ADN genómico, la expresión puede, si se selecciona una célula huésped u organismo eucariótica apropiado, incluye procesar, tal como el empalme del mARN.

Como se usa aquí, un vector de expresión incluye los vectores capaces de expresar ADN que está vinculado operativamente con las secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de llevar a cabo la expresión de fragmentos de ADN. Dichos segmentos adicionales pueden incluir las secuencias promotoras o terminadoras, y opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un mejorador, una señal de poliandenilación, y similares. Los vectores de expresión son generalmente derivados de ADN plásmido o viral, o pueden contener elementos de ambos. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otros vectores que, con la introducción en una célula huésped apropiada, resultan en la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por aquellos expertos en la materia e incluyen aquellos que son replicables en células eucarióticas y/o

células procarióticas y aquellos que permanecen episomal o aquellos que se integran en el genoma de la célula huésped.

Como se usa aquí, el vector también incluye “vectores de virus” o “vectores virales”. Los vectores virales son virus diseñados que están vinculados operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o transportes) los genes exógenos en células.

Como se usa aquí, un adenovirus se refiere a cualquier grupo de virus que contienen ADN que causan conjuntivitis e infecciones de tractor respiratorio superior en humanos.

Como se usa aquí, el ADN desnudo se refiere al ADN libre de histona que puede ser utilizado para vacunas y terapia de genes. El ADN desnudo es el material genético que se pasa de célula en célula durante una transferencia de genes procesada llamada transformación o transfección. En la transformación o transfección, el ADN purificado o desnudo que es tomado por la célula recipiente dará a la célula recipiente una nueva característica o fenotipo.

Como se usa aquí, vinculado operablemente u operativamente cuando se refiere a segmentos de ADN significa que los segmentos son arreglados de modo tal que funcionan en concierto para sus propósitos pretendidos, por ejemplo, la transcripción inicia en el promotor y procede a través del segmento de codificación hacia el terminador.

Como se usa aquí, un agente que modula la actividad de una proteína o expresión de un gen o ácido nucleico reduce o aumenta o altera de otra forma

la actividad de la proteína o, en alguna manera, regula arriba o abajo o altera la expresión del ácido nucleico en una célula.

Como se usa aquí, una “proteína quimérica” o “proteína de fusión” se refiere a un polipéptido vinculado operativamente a un polipéptido diferente. Una proteína quimérica o de fusión acá proporcionada puede incluir uno o más polipéptidos FVII, o una porción de los mismos, y uno o más polipéptido para cualquiera o más señales de control transcripcional/translacional, secuencias de señal, una etiqueta para localización, una etiqueta para purificación, parte de un dominio de una inmunoglobulina G, y/o un agente de orientación. Un polipéptido FVII quimérico también incluye aquellos que tienen sus dominios o regiones endógenas del polipéptido intercambiado con otro polipéptido. Estas proteínas quiméricas o de fusión incluyen aquellas producidas por medios recombinantes como proteínas de fusión, aquellas producidas por medios químicos, tales como por medio de acoplamiento químico, a través de, por ejemplo, acoplamiento a grupos sulfhídricos, y aquellas producidas por cualquier otro método por el cual se vincula al menos un polipéptido (es decir, FVII) o una porción del mismo, directamente o indirectamente por medio de vinculadores a otro polipéptido.

Como se usa aquí, vinculado operativamente cuando se refiere a una proteína de fusión se refiere a un polipéptido de proteasa y un polipéptido de no proteasa que son fusionados en marco entre si. El polipéptido de no proteasa puede ser fusionado al terminal N o terminal C del polipéptido de proteasa.

Como se usa aquí, un agente de selección, en cualquier porción, tal como una proteína o una porción efectiva de la misma, que proporciona la unión específica a una molécula de superficie de célula, tal como un receptor de superficie de célula, el cual en algunos casos puede internalizar un conjugado atado o una porción del mismo. Un agente de selección también puede ser uno que promueve o facilita, por ejemplo, el aislamiento de afinidad o purificación del conjugado; adjunto del conjugado a una superficie; o detección del conjugado o complejos que contienen el conjugado.

Como se usa aquí, el derivado o análogo de una molécula se refiere a una porción derivada de o una versión modificada de la molécula.

Como se usa aquí, “enfermedad o desorden” se refiere a una condición patológica en un organismo que resulta de la causa o condición que incluye, pero no se limita a, infecciones, condiciones adquiridas, condiciones genéticas, y caracterizado por los síntomas identificables. Las enfermedades y desórdenes de interés son aquellas que involucran la coagulación, incluyendo aquellas mediadas por las proteínas de coagulación y aquellas en las cuales las proteínas de coagulación juegan un papel en la etiología o patología. Las enfermedades y desórdenes también incluyen aquellas que son causadas por la ausencia de una proteína tal como en hemofilia, y de particular interés son aquellos desórdenes en donde la coagulación no ocurre debido a una deficiencia o defecto en la proteína de coagulación.

Como se usa aquí, “procoagulante” se refiere a cualquier sustancia que promueve la coagulación sanguínea.

Como se usa aquí, “anticoagulante” se refiere a cualquier sustancia inhibe la coagulación sanguínea.

Como se usa aquí, “hemofilia” se refiere a un desorden de sangrado causado por una deficiencia en los factores de coagulación sanguínea. La hemofilia puede ser el resultado, por ejemplo, de la ausencia, expresión reducida, o función reducida de un factor de coagulación. El tipo más común de hemofilia es hemofilia A, la cual resulta de una deficiencia en el factor VIII. El segundo tipo más común de hemofilia es la hemofilia B, la cual resulta de una deficiencia en el factor IX. La hemofilia C, también llamada deficiencia FXI, es una forma más suave y menos común de hemofilia.

Como se usa aquí, “hemofilia congénita” se refiere a tipos de hemofilia que son heredadas. La hemofilia congénita resulta de la mutación, supresión, inserción, u otra modificación de un gen de factor de coagulación en el cual la producción del factor de coagulación está ausente, reducida o no funcional. Por ejemplo, las mutaciones hereditarias en los genes de factor de coagulación, tales como factor VIII y factor IX resultan en las hemofilias congénitas, Hemofilia A y B, respectivamente.

Como se usa aquí, “hemofilia adquirida” se refiere a un tipo de hemofilia que se desarrolla en la adultez a partir de la producción de anticuerpos que inactivan el FVIII.

Como se usa aquí, “desorden de sangrado” se refiere a una condición en la cual el sujeto tiene una habilidad reducida para controlar el sangrado. Los desórdenes de sangrado pueden ser heredados o adquiridos, y pueden resultar

de, por ejemplo, defectos o deficiencias en la vía de coagulación, defectos o deficiencias en la actividad de plaquetas, o defectos vasculares.

Como se usa aquí, “desorden de sangrado adquirido” se refiere a los desórdenes de sangrado que resultan de las deficiencias de coagulación causadas por las condiciones tales como enfermedad de hígado, deficiencia de vitamina K, o coumadin (warfarina) u otra terapia anticoagulante.

Como se usa aquí, “tratar” un sujeto que tiene una enfermedad o condición significa que un polipéptido, composición u otro producto suministrado acá es administrado al sujeto.

Como se usa aquí, un agente terapéutico, un régimen terapéutico, radioprotector, o quimioterapéutico significa medicamento convencional y terapias de medicamento, incluyendo vacunas, las cuales son conocidas para aquellos expertos en la materia. Los agentes radioterapéuticos son bien conocidos en el arte.

Como se usa aquí, tratamiento significa cualquier manera en la cual los síntomas de una condición, desorden o enfermedad son mejorados o de otra forma alterado benéficamente. Así el tratamiento abarca profilaxis, terapia y/o cura. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones de acá. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de un FVII modificado y composiciones acá proporcionadas.

Como se usa aquí, la mejora de los síntomas de una enfermedad o desorden particular por medio de un tratamiento, tal como por medio de la administración de una composición farmacéutica u otra terapia, se refiere a

cualquier disminución, bien sea permanente o temporal, que dura o que transciende, de los síntomas que pueden ser atribuidos a o asociados con la administración de la composición o de la terapia.

Como se usa aquí, la prevención o profilaxis se refiere a métodos en los cuales el riesgo de desarrollar enfermedad o condición se reduce. La profilaxis incluye la reducción en el riesgo de desarrollar una enfermedad o condición y/o prevención del empeoramiento de los síntomas o progresión de una enfermedad o reducción en el riesgo de empeoramiento de los síntomas o progresión de una enfermedad.

Como se usa aquí, una cantidad efectiva de un compuesto o composición para tratar una enfermedad particular en una cantidad que suficiente para mejorar, o en alguna manera reducir los síntomas asociados con la enfermedad. Dicha cantidad puede ser administrada como una dosis simple o puede ser administrada de acuerdo con un régimen, por el cual este sea efectivo. La cantidad puede curar la enfermedad pero, típicamente, es administrada con el fin de mejorar los síntomas de la enfermedad. Típicamente, la administración repetida es requerida para lograr una mejora deseada de los síntomas.

Como se usa aquí, “cantidad terapéuticamente efectiva” o “dosis terapéuticamente efectiva” se refiere a un agente, compuesto, material, o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Una cantidad efectiva es la cantidad de un

agente terapéutico necesario para prevenir, curar, mejorar, arrestar o parcialmente arrestar un síntoma de una enfermedad o desorden.

Como se usa aquí, “paciente” o “sujeto” a ser tratado incluye humanos y/o animales no humanos, incluyendo mamíferos. Los mamíferos incluyen primates, tales como humanos, chimpancés, gorilas y monos; animales domesticados, tales como perros, caballos, gatos, cerdos, cabras, vacas; y roedores tales como ratones, ratas, hamsters y jerbos.

Como se usa aquí, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o entre más elementos. La asociación puede ser espacial o se refiere al uso de dos o más elementos para un propósito común.

Como se usa aquí, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos o compuestos (Por ejemplo, agentes, moduladores, reguladores, etc.). Esta puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, formulaciones acuosas o no acuosas o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa aquí, un “artículo de fabricación” es un producto que está hecho y vendido. Como se usa a lo largo de esta solicitud, el término pretende abarcar los polipéptido de proteasas modificados y los ácidos nucleicos contenidos en los artículos de empaque.

Como se usa aquí, el fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Los fluidos por tanto abarcan las composiciones que se encuentran en la forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, gel, lociones, cremas y otras composiciones como tal.

Como se usa aquí, un “kit” se refiere a una combinación empacada, que opcionalmente incluye reactivos y otros productos y/o componentes para practicar métodos que usan los elementos de la combinación. Por ejemplo, los kits contienen un polipéptido de proteasa modificado o molécula de ácido nucleico acá suministrado y otro elemento para un propósito incluyendo, pero no limitado a, administración, diagnóstico, y evaluación de una actividad o propiedad biológica. Los kits opcionalmente incluyen instrucciones para su uso.

Como se usa aquí, un anticuerpo incluye fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab, los cuales están compuestos de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada.

Como se usa aquí, un receptor se refiere a una molécula que tiene una afinidad por un ligando particular. Los receptores pueden ser moléculas de ocurrencia natural o sintética. Los receptores también pueden estar relacionados en el arte como anti-ligandos.

Como se usa aquí, un animal incluye cualquier animal, tales como, pero no limitado a: primates incluyendo humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves, tales como pollos; rumiantes, tales como cabras, vacas, venado, oveja; ovinos, tales como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyendo los humanos como el animal contemplado. Las proteasas que acá se suministran son de cualquier fuente, animal, planta, procariótica o de hongos.

Como se usa aquí, la terapia de gen involucra la transferencia de ácido nucleico heterólogo, tales como ADN, en ciertas células, células objetivo, de un

mamífero, particularmente un humano, con un desorden o condición para la cual se busca dicha terapia. El ácido nucleico, tal como ADN, se introduce en las células objetivo seleccionadas, bien sea directamente o en un vector u otro vehículo de entrega, en una manera tal que el ácido nucleico heterólogo, tal como el ADN, se expresa y se produce un producto terapéutico allí codificado. Alternativamente, el ácido nucleico heterólogo, tal como el ADN, puede en alguna manera mediar la expresión de ADN que codifica el producto terapéutico, o este puede codificar un producto, tal como un péptido o ARN que en alguna manera media, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. La terapia genética también puede ser utilizada para entregar el ácido nucleico que codifica un producto de gen que reemplaza un gen defectuoso o complementa un producto de gen producido por el mamífero o la célula en la cual este es introducido. El ácido nucleico introducido puede codificar un compuesto terapéutico, tal como una proteasa o proteasa modificada, que no es normalmente producida en el mamífero huésped o que no es producida en cantidades terapéuticamente efectivas o en un tiempo terapéuticamente útil. El ácido nucleico heterólogo, tal como el ADN, que codifica el producto terapéutico puede ser modificado antes de la introducción en las células del huésped afligido con el fin de mejorar o de alguna forma alterar el producto o la expresión del mismo. La terapia genética también puede involucrar la entrega de un inhibidor o represor u otro modulador de expresión de gen.

Como se usa aquí, el ácido nucleico heterólogo es ácido nucleico que no es normalmente producido *in vivo* por la célula en la cual se expresa o que es producido por la célula pero está en una posición o expresado de forma diferente o que media o codifica los mediadores que alteran la expresión del ácido nucleico endógeno, tal como el ADN, por medio de la llevada a cabo de transcripción, traducción, u otro proceso bioquímico regulable. El ácido nucleico heterólogo es generalmente no endógeno a la célula en la cual es introducido, pero ha sido obtenido a partir de otra célula o preparado de forma sintética. El ácido nucleico heterólogo puede ser endógeno, pero es ácido nucleico que está expresado a partir de una posición diferente o alterado en su expresión. Generalmente, aunque no necesariamente, dicho ácido nucleico codifica ARN y proteínas que no son normalmente producidas por la célula o en la misma forma en la célula en la cual se expresa. El ácido nucleico heterólogo, tal como el ADN, también puede ser relacionado como ácido nucleico extranjero, tal como el ADN. Así, el ácido nucleico heterólogo o el ácido nucleico extranjero incluye una molécula de ácido nucleico no presente en la orientación o posición exacta como la molécula de ácido nucleico de la contraparte, tal como el ADN, es encontrada en el genoma. También se puede referir a la molécula de ácido nucleico a partir de otro organismo o especie (es decir, exógeno).

Cualquier ácido nucleico, tal como el ADN, que un experto en la materia reconocería o consideraría como heterólogo o extranjero a la célula en la cual se expresa el ácido nucleico es abarcado acá por el ácido nucleico heterólogo; el ácido nucleico heterólogo incluye ácido nucleico adicionado de forma

exógena que también es expresada de forma endógena. Los ejemplos de ácido nucleico heterólogo incluyen, pero no se limitan a, ácido nucleico que codifica las proteínas de marcador rastreable, tales como una proteína que confiere resistencia al medicamento, ácido nucleico que codifica sustancias terapéuticamente efectivas, tales como agentes anticancerígenos, enzimas y hormonas, y ácido nucleico, tal como el ADN, que codifica otros tipos de proteínas, tales como anticuerpos. Los anticuerpos que son codificados por el ácido nucleico heterólogo pueden ser secretados o expresados en la superficie de la célula en la cual el ácido nucleico heterólogo ha sido introducido.

Como se usa aquí, un producto terapéuticamente efectivo para la terapia de gen es un producto que se codifica por el ácido nucleico heterólogo, típicamente ADN, que, con la introducción del ácido nucleico en un huésped, se expresa un producto que mejora o elimina los síntomas, manifestaciones de una enfermedad heredada o adquirida o que cura la enfermedad. También se incluyen moléculas de ácido nucleico biológicamente activas, tales como ARNi y antisentido.

Como se usa aquí, la declaración que un polipéptido “consisten esencialmente” de una secuencia de aminoácidos indicada significa que únicamente la porción indicada, o un fragmento de la misma, del polipéptido de longitud completa está presente. El polipéptido puede opcionalmente, y generalmente lo hará, incluir aminoácidos adicionales de otra fuente o pueden ser insertados en otro polipéptido.

Como se usa aquí, las formas singulares “un”, “una” y “el” o “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia al compuesto que comprende “un dominio extracelular” incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

Como se usa aquí, los rangos y cantidades pueden ser expresados como “aproximadamente” un valor o rango particular. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Así, “aproximadamente 5 bases” significa “aproximadamente 5 bases“ y también “5 bases”.

Como se usa aquí, “opcional” u “opcionalmente” significa que el evento o circunstancia descrita a renglón seguido ocurre o no, y que la descripción incluye casos donde dicho evento o circunstancia ocurre y casos donde este no ocurre. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo es no sustituido o sustituido.

Como se usa aquí, las abreviaciones para cualquier grupo de protección, aminoácidos y otros compuestos, son, a menos que se indique lo contrario, de acuerdo con su uso común, abreviaciones reconocidas, o el IUPAC-IUB Comisión en Nomenclatura Bioquímica (ver, (1972) Biochem. 11:1726).

B. Información General de Hemostasia

Acá se suministran polipéptidos factor VII (FVII) modificados. Dichos polipéptidos FVII están diseñados para tener actividad coagulante incrementada. De acuerdo con esto, estos polipéptidos tienen una variedad de usos y aplicaciones, por ejemplo, como terapéuticos para modular hemostasia,

y otros procesos biológicos relacionados. Para apreciar las modificaciones acá suministradas y el uso de dichas moléculas de FVII modificadas, un entendimiento del sistema hemostático y de la cascada de coagulación sanguínea es una ventaja. La siguiente discusión proporcionan dichos antecedentes, preliminares a una discusión de factor VII, y modificaciones del mismo.

La hemostasia es el mecanismo fisiológico que se deriva del sangrado que resulta de una lesión vascular. La hemostasia normal depende de componentes celulares y proteínas de plasma soluble, que involucra una serie de eventos de señalización que finalmente llevan a la formación de un coágulo de sangre. La coagulación es rápidamente iniciada luego de que la lesión ocurre al vaso sanguíneo y las células endoteliales son dañadas. En la fase primaria de la coagulación, las plaquetas son activadas para formar un tapón hemostático en el sitio de la lesión. La hemostasia secundaria continúa involucrando factor de coagulación de plasma, los cuales actúan en una cascada proteolítica que resulta en la formación de filamentos de fibrina que fortalecen el tapón de plaqueta.

Con la lesión del vaso, el flujo de sangre fluye al área lesionada es restringido por la constricción vascular permitiendo a las plaquetas adherirse al colágeno fibrilar recientemente expuesto en el tejido conectivo subendotelial. Esta adhesión depende del factor de von Willebrand (vWF), el cual se une al endotelio dentro de tres segundo después de la lesión, facilitando así la adhesión de la plaqueta y la agregación. La activación de las plaquetas

agregadas resulta en la secreción de una variedad de factores, incluyendo ADP, ATP, tromboxano y serotonina. También se libera la adhesión de moléculas, fribinogen, vWF, trombospondina y fibronectina. Dicha secreción promueve la adhesión y agregación adicional de plaquetas, la activación de plaqueta y la constricción del vaso sanguíneo aumentadas, y la exposición de fosfolípidos aniónicos en la plaqueta de superficie que sirve como plataforma para el ensamble del los complejos de enzima de la coagulación sanguínea. Las plaquetas cambian de forma seguido de la formación de seudopodia, la cual además facilita la agregación a otras plaquetas resultando en un tapón de plaqueta suelto.

Una cascada de coagulación de peptidasas (la cascada de coagulación) se inicia de forma simultánea. La cascada de coagulación involucra una serie de eventos de activación que involucran la ruptura proteolítica. En dicha cascada, una proteína inactiva de una proteasa de serina (también llamada zimogén) se convierte en una proteasa activa por ruptura de una o más uniones de péptidos, lo cual luego sirve como la proteasa de activación para la siguiente molécula de zimogén en la cascada, resultando finalmente en la formación de coágulo por medio de vinculación cruzada de fibrina. Por ejemplo, la cascada genera las moléculas activadas tales como trombina (a partir de la ruptura de protombrina), la cual además activa las plaquetas, y también genera fibrina a partir de la ruptura de fibrinógeno. La fibrina luego forma un polímero de vínculo cruzado alrededor del tapón de plaqueta para estabilizar el coágulo. Con la reparación de la lesión, la fibrina es digerida por el sistema fibrinolítico,

los componentes principales de los cuales son plasminógeno y activador plasminógeno de tipo tejido (tPA). Ambas de estas proteínas son incorporadas en la fibrina de polimerización, donde ellas interactúan para generar plasmita, la cual, a su vez, actúa en la fibrina para disolver el coágulo preformado. Durante la formación del coágulo, los inhibidores de factor de coagulación también circulan a través de la sangre para prevenir la formación de coágulo más allá del sitio de la lesión.

La interacción del sistema, a partir de la lesión hasta la formación del coágulo y la fibrinólisis, se describe más adelante.

1. Adhesión y agregación plaquetaria

La coagulación de sangre es aludida activamente bajo condiciones normales. El endotelio vascular soporta la vasodilación, inhibe la adhesión y activación de plaquetas, suprime la coagulación, mejora la ruptura de fibrina y es antiinflamatorio en carácter. Las células vasculares endoteliales secretan moléculas tales como óxido nitroso (NO) y prostacilina, lo cual inhibe la agregación de plaquetas y dilata los vasos sanguíneos. La liberación de estas moléculas activa las ciclases de guanilato soluble (sGC) y la cinasa I de proteína dependiente de cGMP (cGKI) e incrementa los niveles de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), lo cual causa la relajación de los músculos lisos en las paredes de los vasos. Además, las células endoteliales expresan las ADPasas de superficie de célula, tales como CD39, la cual controla la activación agregación de plaquetas por medio de la conversión de ADO liberado de las plaquetas en inhibidores de plaquetas de nucleótido de adenina.

El endotelio también juega un papel importante en la regulación de las enzimas en la cascada fibrinolítica. Las células endoteliales promueven directamente la generación de plasmina a través de la expresión de receptores de plasminógeno (anexina II) y de la uroquinasa, así como la secreción de los activadores de plasminógeno de tipo tejido y de la uroquinasa, los cuales promueven la amplitud del coágulo. En una capa final de regulación protrombótica, las células endoteliales juegan un papel activo en inhibir la cascada de coagulación por medio de la producción del sulfato de heparan, lo cual aumenta la cinética de la inhibición de la antitrombina III de trombina y de otros factores de coagulación.

Bajo el trauma vascular agudo, sin embargo, los mecanismos vasoconstrictores predominan y el endotelio llega a ser pro-trombótico, procoagulante y pro-inflamatorio en naturaleza. Esto es conseguido por una reducción de agentes dilatadores endoteliales: adenosina, NO y prostaciclina; y la acción directa del ADP, serotonina y tromboxano en las células vasculares de músculo liso para provocar su contracción (Becker, Heindl *et al.* 2000). El principal activador para el cambio en la función endotelial que conduce a la formación de trombo hemostático es la pérdida de la barrera de célula endotelial entre la sangre y los componentes de la matriz extracelular (ECM) (Ruggeri (2002) Nat Med 8:1227 - 1234). Las plaquetas circulantes identifican y discriminan áreas de lesiones endoteliales y se adhieren al endotelio secundario expuesto. Su interacción con los diferentes sustratos trombogénicos y los resultados generados localmente o liberados de agonistas en la activación

de plaquetas. Este procedimiento es descrito como que posee dos etapas, 1) adhesión: el atado inicial a una superficie, y 2) agregación: la cohesión de plaqueta-plaqueta (Savage *et al.* (2001) Curr Opin Hematol 8:270 - 276).

La adhesión de plaquetas se inicia cuando las plaquetas circulantes se unen al colágeno expuesto a través de la interacción con las proteínas de unión de colágeno en la superficie celular, y a través de la interacción con el vWF, también presente en el endotelio. La proteína vWF es una estructura multimérica de tamaño variable, secretada en dos direcciones por el endotelio; basolateralmente y en la corriente sanguínea. El vWF también se une al factor VIII, lo cual es importante en la estabilización del factor VIII y su supervivencia en la circulación.

La adhesión de la plaqueta y la activación subsiguiente se logra cuando el vWF se une por medio de su dominio A1 al GPIb (parte del complejo receptor de glicoproteína de plaqueta GPIb-IX-V). La interacción entre el vWF y el GPIb es regulada por la fuerza de cizallamiento de modo tal que un aumento en los resultados del esfuerzo de cizallamiento en un aumento correspondiente en la afinidad del vWF para el GPIb. La integrina α1β2, también conocida en leucocitos como VLA-2, es el receptor principal del colágeno en plaquetas, y el engrane a través de este receptor genera las señales intracelulares que contribuyen a la activación de plaquetas. La unión a través de α1β2 facilita el engrane del receptor del colágeno de baja afinidad, GP VI. Esto es parte de la superfamilia de la inmunoglobulina y es el receptor que genera las señales intracelulares más potentes para la activación de plaquetas. La activación de

plaquetas resulta en la liberación del difosfato de adenosina (ADP), que se convierte en tromboxano A2.

La activación de plaquetas también resulta en la expresión de la superficie de los receptores de la glicoproteína IIb-IIIa de plaqueta (GP IIb-IIIa), los receptores de GP Ilb-IIIa permiten la adherencia de plaquetas entre si (es decir, agregación) en virtud de las moléculas de fibrinógeno que ligan las plaquetas a través de estos receptores. Esto resulta en la formación de un tapón de plaqueta en el sitio de la lesión para ayudar a prevenir la pérdida de sangre adicional, mientras que el tejido vascular dañado libera factores que inician la cascada de coagulación y la formación de una malla de fibrina estabilizadora alrededor del tapón de plaqueta.

2. Cascada de coagulación

La vía de coagulación es una vía proteolítica donde cada enzima está presente en el plasma como un zimógeno, o forma inactiva. La ruptura del zimógeno se regula para liberar la forma activa de la molécula precursora. Los cofactores de las proteasas activadas, tales como las glicoproteínas FVIII y FV, también son activadas en la reacción de cascada juegan un papel en la formación de coágulo. Las funciones de la vía como una serie de bucles de retroalimentación positiva y negativa la cual controla el procedimiento de activación, donde el objetivo final es producir trombina, lo cual puede luego convertir fibrinógeno soluble en fibrina para formar un coágulo. Los factores en la coagulación son típicamente debido a un número romano, con una minúscula “a” adjunta para indicar una forma activada. La tabla 3 abajo

establece una lista ejemplar de los factores, incluyendo su nombre común, y su papel en la cascada de coagulación. Generalmente, estas proteínas participan en la coagulación de la sangre a través de una o más de las vías intrínseca, extrínseca o común de la coagulación (ver Figura 1). Como se discutirá más adelante, estas vías están interconectadas, y la coagulación de la sangre se cree que ocurre a través de un modelo a base de célula de activación con el factor VII (FVII) siendo el iniciador primario de la coagulación.

Tabla 3

Factores de Coagulación

Factor	Nombre Común	Vía	Característica
I	Fibrinógeno	Ambos	-
II	Protrombina	Ambos	Contiene dominio Gla terminal N
III	Factor de Tejido	Extrínseca	-
IV	Calcio	Ambos	-
V	Proacelerina, factor lábil, globulina aceleradora	Ambos	Cofactor de proteína
VI (Va)	Acelerina	-	(Redundante al factor V)
VII	Proconvertina, cotromboplastina aceleradora de conversión de protrombina de suero (SPCA)	Extrínseca	Endopeptidasa con dominio Gla
VIII	Factor A antihemofílico, globulina antihemofílica (AHG)	Intrínseca	Cofactor de proteína
IX	Factor de navidad, factor B antihemofílico, componente de tromboplastina de plasma (PTC)	Intrínseca	Endopeptidasa con dominio Gla
X	Factor de poder de Stuart	Ambos	Endopeptidasa con dominio Gla
XI	Antecedente de tromboplastina de plasma (PTA)	Intrínseca	Endopeptidasa
XII	Factor de Hageman	Intrínseca	Endopeptidasa
XIII	Protransglutamidasa, factor	Ambos	Transpeptidasa

	estabilizante de fibrina (FSF), fibrinoligasa		

*Tabla adaptada de M.W. King (2006) en med.unibs.it/~marchesi/blood.html

La generación de trombina se ha dividido históricamente en tres vías, la intrínseca (que sugiere que todos los componentes del la vía sean intrínsecos al plasma) y la extrínsecas (que sugiere uno o más componentes del la vía sean extrínsecos al plasma) que proporcionan las vías alternativas para la generación del factor X activado (FXa), y la vía común final que resulta en la formación de trombina (Figura 1). Estas vías participan juntas en un procedimiento interconectado e interdependiente para llevar a cabo la coagulación. Un modelo basado en células de coagulación fue desarrollado que describe estas vías (Figura 2) (Hoffman *et al.* (2001) Thromb Haemost 85:958-965). En este modelo, las vías "extrínseca" e "intrínseca" son llevadas a cabo en las diferentes superficies celulares, la célula que tiene factor de tejido (TF) y la plaqueta, respectivamente. El proceso de coagulación se separa en fases características, iniciación, amplificación y propagación, durante las cuales las vías extrínseca e intrínseca funcionan en diferentes etapas para producir la grande ráfaga de trombina requerida para convertir cantidades suficientes de fibrinógeno en fibrina para la formación de coágulos.

a. Iniciación

El FVII se considera para ser el factor de coagulación responsable para iniciar la cascada de la coagulación, en donde la iniciación es dependiente en su interacción con el TF. El TF es una glicoproteína de transmembrana expresada por una variedad de células tales como células de músculo liso,

fibroblastos, monocitos, linfocitos, granulocitos, plaquetas y células endoteliales. Las células mieloide y las células endoteliales expresan solamente el TF cuando ellas son estimuladas, por ejemplo por citosinas pro-inflamatorias. Las células de músculo liso y los fibroblastos, sin embargo, expresan el TF constitutivamente. Por consiguiente, una vez que estas células entran en contacto con el flujo sanguíneo seguido a la lesión del tejido, la cascada de la coagulación es iniciada rápidamente por la unión del TF con el factor VII o FVIIa en el plasma.

Como se discute más adelante, la mayoría de FVII en la sangre está en la forma de zimógeno con una pequeña cantidad, aproximadamente 1%, presente como FVIIa. En la ausencia de unión de TF, sin embargo, incluso FVIIa tiene características similares a zimógeno y no muestra actividad significativa que es complejado con el TF. Así, el plasma FVII requiere la activación por ruptura proteolítica, y cambio conformacional adicional a través de la interacción con el TF, para actividad completa. Un rango de proteasas, incluyendo los factores IXa, Xa, XIIa, y la trombina, ha sido mostrado que es capaz de la ruptura de FVII *in vitro*, un procedimiento que es acelerado en presencia de TF. El FVIIa solo también puede activar FVII en presencia de TF, un proceso denominado autoactivation. Las pequeñas cantidades de FVIIa en la sangre son probables debido a la activación por FXa y/o FIXa (Wildgoose *et al.* (1992) Blood 80:25 - 28, y Butenas *et al.* (1996) Bioquímica 35:1904-1910). Los complejos de TF/FVIIa pueden así ser formados por la unión directa de FVIIa a TF, o por la unión de FVII a TF y luego la activación subsiguiente de

FVII a FVIIa por una proteasa de plasma, tal como FXa, FIXa, FXIIa, o FVIIa por si solos. El complejo de TF/FVIIa permanece anclado a la célula que tiene TF donde ésta activa pequeñas cantidades de FX en FXa en lo que se conoce como la “vía extrínseca” de la coagulación.

El complejo de TF/FVIIa también se rompe en pequeñas cantidades de FIX en FIXa. El FXa se asocia a su cofactor FVa para también formar un complejo en la célula que tiene TF que puede luego convertir protrombina en trombina. La pequeña cantidad de trombina producida es, sin embargo, inadecuada para soportar la formación necesaria de fibrina para la coagulación completa. Adicionalmente, cualquier FXa y de FIXa activo es inhibido en la circulación por la antitrombina III (AT-III) y otras serpinas, las cuales son discutidas más detalladamente abajo. Esto evitaría normalmente la formación de coágulos en la circulación. En presencia de lesión, sin embargo, el daño vascular resulta en la agregación de plaquetas y la activación en este sitio de la formación de trombina, permitiendo de este modo la amplificación de la señal de coagulación.

b. Amplificación

La amplificación ocurre cuando la trombina se une y activa las plaquetas. Las plaquetas activadas liberan FV de sus gránulos alfa, lo cual es activado por la trombina a FVa. La trombina también libera y activan FVIII a partir del complejo de FVIII/vWF en la membrana de la plaqueta, y rompe FXI en FXIa. Estas reacciones generan plaquetas activadas que tienen FVa, FVIIIa y FIXa

en su superficie, las cuales establecen la etapa para una ráfaga grande de generación de trombina durante la etapa de la propagación.

c. Propagación

La propagación de la coagulación ocurre en la superficie de una gran cantidad de plaquetas en el sitio de la lesión. Como se describió anteriormente, las plaquetas activadas tienen FXIa, FVIIIa y FVa en su superficie. Es aquí que la vía extrínseca es efectuada. El FXIa activa FIX a FIXa, la cual puede ser luego una con FVIIIa. Este procedimiento, además de las pequeñas cantidades de FIXa que son generadas por la ruptura de FIX por el complejo de TF/FVIIa en la célula que tiene TF, genera una gran cantidad de complejos de FXIa/FVIIIa que alternadamente pueden activa cantidades significativas de FX a FXa. Las moléculas de FXa se unen a FVa para generar los complejos de protrombinasa que activan protrombina a trombina. La trombina actúa en un bucle de realimentación positiva para activar aún más plaquetas e inician otra vez los procedimientos descritos para la fase de amplificación.

Muy pronto, hay números suficientes de plaquetas activadas con los complejos apropiados para generar la ráfaga de trombina que es bastante grande para generar cantidades suficientes de fibrina a partir de fibrinógeno para formar un coágulo hemostático de fibrina. El fibrinógeno es un dímero soluble en plasma que, cuando se rompe por la trombina, libera fibrinopéptido A y fibrinopéptido B. El Fibrinopéptido B es luego roto por la trombina, y los monómeros de la fibrina formados por esta segunda ruptura proteolítica forma espontáneamente un gel insoluble. La fibrina polimerizada es ligada por fuerzas

no covalentes y electrostáticas y es estabilizada por el factor transamidante XIIIa de enzima (FXIIIa), producido por la ruptura de FXIII por la trombina. La trombina también activa TAFI, la cual inhibe la fibrinólisis por medio de la reducción de la generación de plasmina en la superficie del coágulo. Adicionalmente, la trombina sola se incorpora en la estructura del coágulo para estabilización adicional. Estos agregados de fibrina insoluble (coágulos), junto con las plaquetas agregadas (trombos), bloquean el vaso sanguíneo dañado y previenen el sangrado adicional.

3. Regulación de la Coagulación

Durante la coagulación, la cascada es regulada por procedimientos constitutivos y estimulados para inhibir la formación de coágulos adicionales. Existen distintas razones para tales mecanismos reguladores. Primero, la regulación es requerida para limitar la isquemia de tejidos por la formación de coágulos de fibrina. En segundo lugar, la regulación previene expandir la trombosis mediante la localización de la formación de coágulos solamente al sitio de la lesión del tejido.

La regulación es conseguida por los cationes de distintas moléculas inhibitorias. Por ejemplo, la antitrombina III (AT-III) y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) trabajan constitutivamente para inhibir factores en la cascada de coagulación. La AT-III inhibe trombina, FIXa, y FXa, mientras que el TFPI inhibe FXa y el complejo de FVIIa/TF. Un factor adicional, la proteína C, que es estimulada por medio de la activación de plaquetas, regula la coagulación por ruptura proteolítica y la inactivación de FVa y FVIIIa. La

proteína S mejora la actividad de la proteína C. Además, otro factor que contribuye a la inhibición de la coagulación es la trombomodulina integral de la proteína de membrana, que es producida por las células endoteliales vascular y sirve como receptor para la trombina. La unión de trombina a trombomodulina inhibe actividades procoagulantes de la trombina y también contribuye a la activación de la proteína C.

La fibrinólisis, la descomposición del coágulo de fibrina, también proporciona un mecanismo para regular la coagulación. Los multímeros entrecruzados de fibrina en un coágulo son quebrados a polipéptidos solubles por plasmina, una serina proteasa. La plasmina puede ser generada de su plasminógeno inactivo del precursor y se recluta al sitio de un coágulo de fibrina en dos modos: por la interacción con el activador de plasminógeno tisular (tPA) en la superficie de un coágulo de fibrina, y por la interacción con el activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA) en una superficie celular. El primer mecanismo parece ser el principal responsable para la disolución de coágulos dentro de los vasos sanguíneos. El segundo, aunque es capaz de mediar la disolución del coágulo, puede jugar un papel principal en la remodelación del tejido, la migración de célula, y la inflamación.

La disolución del coágulo también se regula en dos modos. Primero, la activación de plasmina eficiente y la fibrinólisis ocurren solamente en los complejos formados en la superficie del coágulo o en una membrana celular, mientras que las proteínas libres en la sangre son catalizadores ineficaces y son inactivados rápidamente. Segundo, los activadores de plasminógeno y

plasmina son inactivados por las moléculas tales como inhibidor activador tipo 1 de plasminógeno (PAI-1) y PAI-2 que actúan en los activadores de plasminógeno, y α2-antiplasmina y α2-macroglobulina que inactivan la plasmina. Bajo circunstancias normales, balance oportuno entre la coagulación y la fibrinólisis resulta en la formación eficiente y la limpieza de los coágulos que siguen a la lesión vascular, mientras que evitan simultáneamente episodios indeseados trombóticos o de sangrado.

Un resumen de factores de coagulación ejemplares, cofactores y proteínas reguladoras, y sus actividades, se establecen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Zimógenos y Cofactores de Factor de Coagulación

Nombre del Factor	Actividad
Zimógenos de Serina Proteasas	
Factor XII	Une el colágeno expuesto en el sitio de la lesión de pared de vaso, activado por alto MW quininógeno y calicreína
Factor XI	Activado por el factor XIIa
Factor IX	Activado por el factor Xia + Ca^{2+}
Factor VII	Activado por trombina, factor X, factor IXa o factor XIIa + Ca^{2+}, o autoactivación
Factor X	Activado en la superficie de la plaqueta por complejo de tenasa (FIXa/FVIIIa); también activado por el factor VIIa + factor de tejido + Ca^{2+}, o factor VIIa + Ca^{2+}
Factor II	Activado en la superficie de la plaqueta por el complejo de protrombinasa (FXa/FVa)
Cofactores	
Factor VIII	Activado por trombina; el factor VIIIa actúa como cofactor para el factor IXa

	en la activación del factor X
Factor V	Activado por trombina; el factor Va actúa como cofactor para el factor Xa en la activación de protrombina
Factor III (Factor de tejido)	Actúa como cofactor para el factor VIIa
Fibrinógeno	
Factor I (Fibrinógeno)	Ruptura por trombina para formar fibrina
Transglutaminasa	
Factor XIII	Activado por trombina + Ca^{2+}; promueve la vinculación cruzada covalente de fibrina
Reguladoras y otras proteínas	
Factor von Willebrand (vWF)	Actúa como puente entre el complejo GPIb-V-IX y colágeno
Proteína C	Activado por trombina unida a trombomodulina; el Ca degrada los factores VIIIa y Va
Proteína S	Actúa como cofactor de proteína C
Trombomodulina	Proteína de superficie de célula endotelial; une trombina, la cual activa la proteína C
Antitrombina III	Inhibidor de coagulación, principalmente de trombina y factor Xa, pero también los factores IXa, Xia, y XIIa, y el factor VIIa en complejo con TF
Inhibidor de Vía de Factor de Tejido (TFPI)	Une FXa y luego forma una estructura cuaternaria con TF/FVIIa para inhibir la actividad de TF/FVIIIa

*Tabla adaptada de M.W. King (2006) en med.unibs.it/~marchesi/blood.html

C. Factor VII (FVII)

El factor VII (FVII) es una glicoproteína de serina proteasa dependiente de vitamina K que se sintetiza en animales, incluyendo mamíferos, como zimógeno de cadena simple en el hígado y se secreta en la corriente sanguínea. Como se describió anteriormente, FVII es la proteasa de coagulación responsable para iniciar la cascada de eventos proteolíticos que

conducen a la generación de trombina y a la deposición de fibrina. Esto es parte de la vía extrínseca, aunque los efectos descendentes de su actividad también impactan grandemente en la vía intrínseca. Este papel integral en la formación de coágulos ha atraído interés significativo en FVII como un objetivo para terapias clínicas anticoagulante y hemostáticas. Por ejemplo, FVII activado recombinante (rFVIIa) se ha desarrollado como un agente hemostático para el uso en sujetos hemofílicos, y sujetos con otras condiciones de de sangrado. Acá se suministran polipéptidos FVII modificados que son diseñados tener actividad de coagulación aumentada con la activación, y que pueden servir como terapéuticos mejorados para tratar las enfermedades y condiciones susceptibles a la terapia del factor VII.

1. Estructura y organización del FVII

El gen FVII (F7) humano está localizado en el cromosoma 13 en 13q34 y es 12.8kb de largo con 9 exones. El gen FVII comparte similitud organizacional significativa con los genes que codifican otras proteínas dependientes de vitamina K, tales como protrombina, factor IX, factor X y proteína C. El mARN para FVII somete un empalme alternativo para producir dos transcritos: variante 1 (Acceso de Genbank No. NM_000131, establecido en la SEQ ID NO: 108) y variante 2 (Acceso de Genbank No. NM_019676, establecido en la SEQ ID NO: 109). La variante de transcrito 2, la cual es la forma más abundante en el hígado, no incluye exón 1b y por lo tanto codifica un polipéptido precursor más corto de 444 aminoácidos (isoforma FVII precursor b; SEQ ID NO:2), en comparación con el polipéptido precursor de 466 aminoácidos codificado por la

variante de transcrito 1 (isoforma FVII precurso a; SEQ ID NO:1). Los aminoácidos que no están presentes en el polipéptido de isoforma FVII precursor b corresponden a las posiciones de aminoácido 22 a 43 de la isoforma FVII precursor a. Estos aminoácidos son parte de la secuencia de propéptido, que resulta en una isoforma FVII de propéptido b truncada. Los polipéptidos precursores son hechos de los siguientes segmentos y dominios: un péptido de señal hidrofóbica (aa 1-20 de la SEQ ID NO:1 y 2), un propéptido (aa 21-60 de la SEQ ID NO:1, y aa 21-38 de la SEQ ID NO:2), un dominio Gla (aa 39-83 de la SEQ ID NO:1, y aa 61-105 de la SEQ ID NO:2), un dominio de factor de crecimiento epidérmico tipo B (Similar a EGF 1, aa84-120 de la SEQ ID NO: 1, y aa 106-142 de la SEQ ID NO: 2), un dominio de factor de crecimiento epidérmico tipo A (Similar a EGF 2, aa 125-166 de la SEQ ID NO: 1, y aa 147-188 de la SEQ ID NO: 2), y un dominio de serina proteasa (aa 191-430 de la SEQ ID NO: 1, y aa 213-452 de la SEQ ID NO: 2).

La forma madura del aminoácido 406 del polipéptido FVII (SEQ ID NO: 3) carece de las secuencias del péptido señal y del propéptido, y es idéntico en longitud y secuencia sin importar del precursor de la isoforma del cual se originó. En la forma madura del polipéptido de FVII las posiciones de aminoácido correspondientes para los dominios anteriormente mencionados son las siguientes: dominio Gla (aa 1-45 de la SEQ ID NO: 3), EGF-similar 1 (aa 46-82 de la SEQ ID NO: 3), EGF-similar 2 (aa 87-128 de la SEQ ID NO: 3), y dominio de serina proteasa (aa 153-392 de la SEQ ID NO: 3).

El dominio GIa de FVII es una membrana que une un motivo el cual, en presencia de iones de calcio, interactúa con las membranas del fosfolípido que incluyen la fosfatidilserina. El dominio Gla también juega un papel en la unión al cofactor de FVIIa, factor tisular (TF). Complejado con el TF, el dominio GIa de FVIIa es cargado con siete iones de Ca^{2+} los iones, proyecta tres cadenas laterales hidrofóbicas en la dirección de la membrana celular para la interacción con los fosfolípidos en la superficie celular, y tienen contacto significativo con el dominio de la C-terminal del TF. El dominio GIa se conserva entre las proteínas dependientes de vitamina K, tales como protrombina, los factores de coagulación VII, IX y X, las proteínas C, S, y Z. Estas proteínas requieren la vitamina K para la síntesis postranslacional de ácido γ-carboxiglutámico, un aminoácido agrupado en el dominio GIa de N-terminal de estas proteínas. Todos los residuos glutámicos presentes en el dominio son potenciales sitios de carboxilación y varios de ellos son por lo tanto modificados por medio de carboxilación.

Además del dominio GIa, la proteína madura de FVII también contiene dos dominios similares de EGF. El primer dominio EGF-similar (EGF-similar 1 o EGF1) es un dominio de EGF de unión de calcio, en el cual seis cisteínas de núcleo conservadas forman tres de puentes de disulfuro. El dominio de EGF1 de FVII une únicamente un ion de Ca^{2+} el ion, pero con una afinidad perceptiblemente más alta que la observada con el dominio GIa (Banner *et al.* (1996) Naturaleza 380:41-46). Esta unión de ion de Ca^{2+} promueve la fuerte interacción entre el dominio de EGF1 de FVII y TF (Osterbund *et al.* (2000) Eur

J Biochem 267:6204-6211). El segundo dominio EGF-similar (EGF-similar 2 o EGF2) no es un dominio de unión de calcio, sino también formas 3 puentes de disulfuro. Similar a los otros dominios en FVII, el dominio EGF2 interactúa con el TF. También es disulfuro unido junto con el dominio de proteasa, con el cual comparte una interfaz del contacto grande.

Finalmente, el dominio de serina proteasa de FVII es el dominio responsable por la actividad proteolítica de FVIIa. La secuencia de aminoácidos de FVII en su dominio catalítico muestra identidad de alta secuencia y similitud de estructura terciaria con otras serinas proteasa tales como tripsina y quimotripsina (Jin *et al.* (2001) J Mol Biol, 307: 1503-1517). Por ejemplo, estas serinas proteasa comprante una triada catalítica común H57, D102, S195, basado en la enumeración de quimotripsina. Diferente a otras serinas proteasa, sin embargo, la ruptura de FVIIa no es suficiente para completar la conversión del zimógeno a una enzima completamente activa. Por el contrario, como se discutirá más adelante, FVIIa es activada alostéricamente en su función catalítica por medio de la unión de al receptor TF de la superficie celular, lo cual induce un cambio conformacional en el dominio de la proteasa de FVIIa cambiándola de un estado inactivo zimógeno-similar a una enzima catalíticamente activa. Una región del ciclo de hélice entre el sitio de unión del cofactor y el sitio activo (es decir, las posiciones de los residuos de aminoácidos 305-321, correspondientes a los residuos 163-170 basado en la enumeración de quimotripsina) de FVIIa son importantes para el alosterismo y la zimogenicidad de FVIIa (Persson *et al.* (2004) Biochem J., 379: 497-503).

Esta región está compuesta de una hélice α corta (posiciones 307 a 312 de los residuos de aminoácidos) seguida por un bucle. La porción N-terminal de la hélice forma parte de la interfaz entre el dominio de proteasa y el TF, y contiene un número de residuos que son importantes para la función proteolítica y la unión óptima a TF. Una comparación de la estructura cristalina de FVIIa solo y de FVIIa complejo con TF indica que la hélice α experimenta cambio conformacional significativo cuando FVIIa une TF. La hélice α de FVIIa sola aparece distorsionada, acortada y orientada diferentemente. Esto afecta las estructuras de bucle adyacentes, moviéndolas lejos del sitio activo. En contraste, la hélice α de FVIIa cuando es complejada con el TF se estabiliza, y los bucles circundantes son ubicados más cerca al sitio activo. Esta estabilización es efectuada a través de mecanismos que implican por lo menos la metionina en la posición del aminoácido 306 (residuos de aminoácidos Met^{164} por enumeración de la quimotripsina) de FVII (Pike *et al.* (1999) PNAS 8925-8930).

2. Modificaciones Post-Traslacionales

El polipéptido precursor de FVII (cualquier isoforma del gen del factor VII) es dirigido a la vía secretoria celular por el péptido señal hidrofóbico, el cual inserta en el retículo endoplásmico (ER) para iniciar la translocación a través de la membrana. Mientras la proteína se desplaza a través ER de la membrana, el péptido señal del aminoácido 20 es roto por una peptidasa de señal dentro del lumen del ER, después de lo cual el polipéptido experimenta otras modificaciones post-traslacionales, incluyendo glicosilación N y O,

carboxilación dependiente de vitamina K de ácidos glutámicos N-terminal a ácidos γ-carboxiglutámicos, e hidroxilación de ácido aspártico a ácido β-hidroxiaspártico.

El propéptido proporciona un sitio de unión para un carboxilato dependiente de vitamina K el cual reconoce una hélice α de residuo 10 amfipática en el polipéptido FVII. Después de la unióin, los residuos de ácido glutátmico 10 de carboxilasa γ-carboxilato dentro del dominio Gla del polipéptido FVII, produce residuos γ-carboxiglutámicos en las posiciones E66, E67, E74, E76, E80, E85, E86, E89 y E95 con creación a la secuencia de aminoácido del precursor de FVII establecida en la SEQ ID NO:3. Para la actividad óptima, la molécula de FVII requiere calcio, el cual une el polipéptido y facilita los cambios conformacionales necesitados para la unión de FVIIa con TF y lípidos. El dominio de Gla γ-carboxilatado une siete iones de Ca^{2+} con afinidad variable, lo cual reduce el cambio conformacional que habilita al dominio Gla interactuar con el dominio C-terminal de TF, y también fosfatidilserinas u otros fosfolípidos cargados negativamente en la membrana de la plaqueta.

La glicosilación N-vinculada es llevada a cabo por la transferencia de Glc_3Man_9 (GlcNAc) o dos residuos de asparagina en el polipéptido FVII, en las posiciones que corresponden a los residuos de aminoácido 45 y 262 de la proteína madura (SEQ ID NO:3). La glicosilación O-vinculada ocurre en los residuos de aminoácido 52 y 60 del polipéptido maduro, y la hidroxilación a un ácido β-hidroxiaspártico ocurre en el residuo de ácido aspártico en la posición

63. Estos residuos de serina O-glicosilatada y el residuo de ácido aspártico β-hidroxilatado están en el dominio EGF-1 de FVII. Estas modificaciones son llevadas a cabo en el ER y el complejo de Golgi antes del procesamiento final del polipéptido en su forma madura.

3. Procesamiento de FVII

El polipéptido pro-FVII modificado es transportado a través del lumen de Golgi al compartimiento *trans*-Golgi donde el propéptido es roto por una propeptidasa justo antes de la secreción de la proteína a partir de la célula. PACE/furin (en donde PACE es un acrónimo para Enzima de Ruptura de Aminoácido Básico Emparejado) en una endopeptidasa localizada a la membrana de Golgi que rompe varias proteínas en el lado carboxiterminal del motivo de secuencia Arg-[cualquier residuo]-(Lys o Arg)-Arg. Esta peptidasa rompe las glicoproteínas dependientes de vitamina K tales como el pro-factor IX y polipéptidos pro-vWF (Himmelspach *et al.* (2000) Thromb Research 97; 51-67), liberando el propéptido de la proteína madura. La inclusión de un sitios de reconocimiento PACE/furin apropiado en precursores recombinantes de Factor VII facilita el correcto procesamiento y secreción del polipéptido recombinante (Margaritas *et al.* (2004) Clin Invest 113(7): 1025-1031). PACE/furin, u otra enzima propeptidasa similar subtilizante, responsable por el procesamiento proteolítico de pro-FVII a FVII. Esta puede reconocer y unir al motivo de consenso –Arg-Arg-Arg-Arg- en las posiciones de aminoácido 35-38 de las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:1, y 57-60 de la secuencia

establecida en la SEQ ID NO:2, con la ruptura de propéptido y la liberación de la proteína madura para la secreción.

4. Activación de FVII

La gran mayoría de FVII en la sangre se encuentra en la forma de un zimogén inactivado de cadena simple, aunque una pequeña cantidad está presente en una forma activada de cadena doble. La activación de FVII ocurre con la ruptura proteolítica del enlace Arg^{152}-Ile^{153} (posiciones con relación al polipéptido FVII maduro, establecido en la SEQ ID NO:3), dando salida a un polipéptido de cadena doble que contiene una cadena ligera de aminoácido 153 (aproximadamente 20 kDa) vinculada por un puente de disulfuro a una cadena pesada de aminoácido 254 (aproximadamente 30 kDa). La cadena ligera de FVIIa contiene el dominio Gla y dominios EGF-similares, mientras que la cadena pesada contiene la porción catalítica o de serina proteasa de la molécula. La conversión del FVII de cadena simple en FVIIa de cadena doble es mediado mediante la ruptura por FIXa, FXa, FXIIa, trombina, o en una forma autocatalítica por el FVIIa endógeno (Butenas *et al.* (1996) Biochem 35:1904-1910; Nakagaki *et al.* (1991) Biochem 30:10819-10824). La cantidad de rastreo de FVIIa que ocurre en circulación probablemente se presenta de la acción de FXa y FIXa.

Como se discutió anteriormente, la ruptura de FVII de su forma de zimogén a FVIIa no suficiente para la actividad completa. El FVIIa requiere asociación con TF para la actividad completa (Higashi *et al.* (1996) J Biol Chem 271:26569-26574). Debido a este requerimiento, el FVIIa solo ha sido ascrito

con caracterísicas similares a zimogén, visualizando el plegamiento y forma del zimogén, y exhibiendo relativamente baja actividad. Esta característica similar a zimogén del FVIIa en la ausencia de su asociación con TF la hace relativamente resistente a la antitrombina III (AT-III) y otras serpinas, las cuales generalmente actúan principalmente sobre las formas activas de serina proteasa en lugar de la forma de zimogén. Adicionalmente, el TFPI, el inhibidor principal de la actividad de TF/FVIIa, tampoco se une de forma suficiente a la forma no completa “inactiva” de FVIIa.

Con el complejo con TF, el FVIIa se somete a un cambio conformacional que permite la actividad completa de la molécula. Todos los dominios de FVII están involucrados en la interacción con TF, pero los cambios conformacionales que ocurren son localizados al dominio de proteasa de FVIIa. Por ejemplo, los cambios conformacionales que ocurren con la interacción alostérica de FVIIa y TF incluyen la creación de un sustrato extendido macromolecular que une exosita. Este sitio de unión extendido mejora considerablemente la activación proteolítica mediada por FVII del factor X.

La actividad de FVIIa es además incrementada (es decir, un doblez mil) cuando la interacción de FVIIa es con TF expresado en la superficie celular. Esto se debe a que las membranas de fosfolípidos que contienen fosfolípidos cargados negativamente, tales como fosfatidilserina, son un sitio de interacción de otros factores de coagulación dependientes de vitamina K tales como FIX y FX, los cuales se unen por medio de sus dominios Gla. Por lo tanto, la

concentración local de estas proteínas dependientes de vitamina K es alta en la superficie de la célula promoviendo su interacción con el complejo de TF/FVIIa.

5. Función del FVII

Aunque el FVIIa exhibe actividad aumentada seguida a la activación alostérica por TF, existe evidencia que los mecanismos existen en los cuales el FVIIa solo puede iniciar la coagulación. Así, el FVII puede funcionar en una manera dependiente de TF y una manera independiente de TF. Esta última vía puede jugar un papel más pequeño en la hemostasia normal, aunque podría ser significativo cuando es considerado en el contexto de los desórdenes de sangrado, y los tratamientos de los mismos.

a. Actividad de FVIIa dependiente del factor de tejido

El FVII circulante une la TF de superficie de célula y es activado por FIXa, FXa, trombina, o en una forma automática por medio de FVIIa endógeno como se describió anteriormente. Alternativamente, la muy pequeña cantidad de FVIIa circulante puede unir directamente TF. El complejo TF/FVIIa luego une una pequeña fracción de la FX de plasma y el dominio catalítico de FVIIa rompe FX para producir FXa. La trombina es así formada por medio de la vía extrínseca en la superficie de la célula que contiene TF, cuando el FXa se compleja con FVa y activa protrombina a trombina (Figura 3). El FIX también es activado por el complejo TF/FVIIa, suministrando un vínculo a la vía intrínseca que opera en la superficie de la plaqueta activada. Los sistemas de realimentación positiva en la casada de coagulación descrita anteriormente

suministran los medios por los cuales se producen grandes cantidades de trombina, las cuales rompen fibronogen en fibrina para formar un coágulo.

b. Actividad de FVIIa independiente del factor de tejido

Adicional al mecanismo dependiente de TF para la activación de FX a FXa, existe evidencia que el FVIIa también puede activar FX en la ausencia de TF. Las plaquetas activadas desplazan fosfatidilserinas y otros fosfolípidos negativamente cargados a la superficie exterior orientada al plasma (Hemker *et al.* (1983) Blood Cells 9:303-317). Estos proporcionan “receptores” alternos a través de los cuales el FVIIa se puede unir, aunque con una afinidad relativamente baja que es 1000 dobleces menos que la afinidad de unión de FVIIa a TF (Monroe *et al.* (1997) Br J Haematol 99:542-7). Esta interacción es mediada a través de los residuos en el dominio Gla (Harvey *et al.* (2003) 278:8363-8369). El FVIIa luego puede convertir FX a FXa y FIX a FIXa en la superficie activada de plaquea (Hoffman *et al.* (1998) Blood Coagul Fibrinolysis 9:S61-S65). El FXa permanece asociado con la superficie de plaqueta, donde se puede unir con FVa y generar suficiente trombina a partir de protrombina, mientras que el FIXa recientemente formado se ensambla con FVIIa para catalizar la activación de más FX a FXa (Figura 3). La hemostasia en la ausencia de TF puede luego ser lograda por la realimentación positiva y los mecanismos de propagación descritos anteriormente. Se nota, sin embargo, que mientras que la FVIIa puede contribuir al proceso de coagulación en la plaqueta activada, su presencia no es requerida para la generación de trombina en el mecanismo independiente de TF (Figura 3). Así, en la ausencia de FVIII,

tal como en pacientes con hemofilia, existe evidencia que el FVIIa puede iniciar y/o amplificar la generación de trombina a través de su mecanismo secundario, y llevar a cabo la formación de coágulo.

6. FVII como un biofarmacéutico

El FVII funciona para iniciar la coagulación sanguínea. El FVIIa recombinante (NovoSeven®; rFVIIa) es aprobado para el tratamiento de episodios de sangrado o prevención de sangrado en procedimientos quirúrgicos o invasivos en pacientes que tienen hemofilia A o B con inhibidores al Factor VIII o Factor IX, y en pacientes con deficiencia congénita del Factor VII. El NovoSeven® es una preparación genéticamente diseñada y modificada del factor VIIa que es producido en el sistema de expresión de mamíferos usando células de riñón de hámster bebé (BHK). El agente es casi idéntico al factor VIIa derivado de plasma en su estructura y función (Ratko *et al.* (2004), P & T, 29: 712-720).

La administración de FVIIa recombinante (rFVIIa) ha sido mostrado para promover el coágulo sanguíneo en pacientes que sufren de hemofilia, y el tratamiento con dosis de FVIIa ha sido encontrado para ser seguro y bien tolerado en sujetos humanos. Típicamente, el uso de rFVIIa ha sido en pacientes que han desarrollado inhibidores (es decir, aloanticuerpos) al Factor VIII o Factor IX. El uso de rFVIIa como un coagulante ha sido extendido al tratamiento de otros desórdenes de sangrado, por ejemplo trombastenia de Glanzmann; otros eventos asociados con el sangrado extensivo, tales como un resultado de trauma o cirugía concluyen, pero no se limitan a, transplante de

hígado, cirugía de próstata y trauma de hemorragia; coagulopatías neonatales, enfermedad hepática severa; transplante de médula ósea, trombocitopenias y desórdenes de función de las plaquetas; inversión urgente de anticoagulación oral; deficiencias congénitas de factores V, VII, X, y XI; y enfermedad de von Willebrand con inhibidores al factor de von Willebrand.

Una alta dosis de rFVII es requerida para lograr un efecto terapéutico. La dosis y el régimen de dosis requerido para la administración de rFVII varían dependiendo de la indicación clínica. Por ejemplo, la dosis típica de rFVII para episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A o hemofilia B que tienen anticuerpos es 90 µg/kg administrado por inyección intravenosa (IV). Dado que el rFVII tiene una vida media de 2 horas, la repetición de la dosis es requerida. La dosis adicional puede ser dada cada dos horas hasta que la hemostasia sea lograda. El rango de dosis puede ser alterado dependiendo de la severidad de la condición. Por ejemplo, el rango de dosis de 35 – 120 µg/kg ha sido eficaz. También, la dosis y el régimen de dosis pueden variar con otras indicaciones. Por ejemplo, los pacientes con hemofilia A o hemofilia B sometidos a cirugía pueden ser administrados con una dosis inicial de 90 µg/kg inmediatamente antes de la cirugía, con dosis repetida dada cada dos horas durante y seguido a la cirugía. Dependiendo de la severidad de la cirugía y el episodio de sangrado, la infusión de IV de bolo puede continuar cada dos a seis horas hasta que se logre la curación. En pacientes con deficiencia de FVII congénita, el rFVII es típicamente administrado para prevenir el sangrado en la cirugía u

otros procedimientos invasivos a 15 – 30 µg/kg cada 4 a 6 horas hasta que se logre la hemostasia.

El mecanismo de acción del rFVIIa para iniciar la hemostasia explica el requerimiento de altas dosis. Los pacientes con hemofilia tienen una fase de iniciación normal de coagulación, donde el complejo TF/FVIIa activa FX a FXa y lleva a la producción de trombina en el sitio de la célula que tiene TF. Después de esto, sin embargo, el proceso de coagulación se rompe a medida que los pacientes con hemofilia carecen de FVIII (hemofilia A) o FIX (hemofilia B), y por lo tanto no son capaces de formar los complejos de FVIIIa/FIXa en la superficie de la plaqueta activada, lo cual normalmente sirve para activar grandes cantidades de FX a FXa en las fases de amplificación y propagación descritas previamente. Debido a la presencia de inhibidores, tales como TFPI y AT-III, el FXa que es producido en la célula que tiene TF seguido a la ruptura por TF/FVIIa no es capaz de difundirse fácilmente entre las superficies celulares. Como resultado, la generación de trombina a alta escala en la superficie de la plaqueta activada no ocurre, y se forma un coágulo.

Existe evidencia que el efecto hemostático de dosis altas de rFVIIa puede ser logradas usando la generación dependiente de TF y/o independiente de TF de FXa por rFVIIa en las plaquetas activadas (Figura 3). La generación de trombina dependiente de TF puede ser maximizada muy rápidamente con la saturación de moléculas de TF con FVIIa endógeno y rFVIIa. En algunos casos, la alta dosis de rFVIIa puede unir las plaquetas activadas y convertir FX a FXa. El FXa asociado a la superficie activa FVa para generar suficiente

trombina para hemostasia. Dado que el rFVII se une a la superficie de plaqueta con baja afinidad, se puede requerir una dosis más alta de rFVII para generación de trombina. La activación de FXa en las plaquetas activadas asegura que la hemostasia mediada por rFVIIa se localiza al sitio de la lesión.

Un medio para lograr la dosis reducida de rFVII puede mejorar su utilidad y eficiencia como un medicamento. Acá se suministrar los polipéptidos FVII modificados. Entre estos se encuentran lo polipéptidos FVII modificados que exhiben resistencia aumentada al TFPI, resistencia aumentada a la AT-III, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media incrementada, actividad catalítica aumentada en la presencia y/o ausencia de TF, y/o unión aumentada a plaquetas activadas. Estos polipéptidos FVII pueden exhibir actividad coagulante incrementada. Los polipéptidos FVII acá suministrados pueden ser utilizados en los tratamientos para iniciar hemostasia en un mecanismo dependiente de TF y/o independiente de TF de modo tal que se produce FXa y se genera trombina.

D. Polipéptidos FVII modificados

Acá se proporcionan polipéptidos FVII modificados. Los polipéptidos FVII exhiben alteraciones en una o más actividades o propiedades en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Las actividades o propiedades que pueden ser alteradas como resultado de la modificación incluyen, pero no se limitan a, coagulación o actividad coagulante; actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tales como para afectar la activación de factor X (FX) o activación de Factor IX (FIX); antigenicidad (habilidad para unir o

competir con un polipéptido para unir a un anticuerpo anti-FVII); habilidad parar unir factor de tejido, factor X o factor IX; habilidad para unirse a la superficie celular de las plaquetas activadas; habilidad para unirse a fosfolípidos; vida media; estructura tridimensional; pl; y/o conformación. Típicamente, los polipéptidos FVII modificados exhiben actividad procoagulante. Acá se proporcionan polipéptidos FVII modificados que exhiben actividad coagulante aumentada con la activación de su forma de zimogén de cadena simple. Dichos polipéptidos FVII modificados pueden ser utilizados en el tratamiento de desórdenes o eventos de sangrado, tales como hemofilias o lesiones, donde los polipéptidos FVII pueden funcionar para promover la coagulación de sangre. Incluidos dentro de dichos polipéptidos FVII modificados están aquellos que tienen resistencia aumentada a inhibidores tales como el inhibidor de vía de factor de tejido (TFPI) y antitrombina III (AT-III), aquellos que tienen actividad catalítica aumentada en la presencia y/o ausencia de TF, aquellos que tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media aumentada y aquellos que tienen unión y/o afinidad aumentada para la superficie de plaqueta. En partícula, dichos polipéptidos FVII modificados pueden ser utilizados en enfermedades o condiciones para suministrar la actividad coagulante mientras que al mismo tiempo pasan por alto los requerimientos para FVIIIa y FIXa. En un ejemplo, los polipéptidos FVII modificados suministrados acá pueden ser utilizados en pacientes hemofílicos que tienen anticuerpos a FVIIIa y FIXa. Así, los polipéptidos FVII modificados acá suministrados ofrecen ventajas que incluyen una disminución en la

cantidad de FVII administrado que es requerido para mantener una concentración suficiente de FVII activo en el suero para la hemostasia. Esto puede llevar a, por ejemplo, dosis más bajas y/o frecuencia de dosis necesaria para lograr efectos biológicos comparables, inicio más rápido de beneficio terapéutico, mejoría más rápida de los episodios de sangrado agudo, comodidad mayor y aceptación por sujetos, y atenuación de efectos secundarios no benéficos.

Las modificaciones en un polipéptido FVII puede ser hecha a cualquier forma de un polipéptido FVII, incluyendo variaciones alélicas y de especies, variantes de empalme, variantes conocidas en el arte, o moléculas híbridas o quiméricas de FVII. Por ejemplo, las modificaciones acá suministradas pueden ser hechas en un polipéptido FVII precursor establecido en las SEQ ID NOS:1 o 2, un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3, cualquier especie, variantes alélicas o de especies y fragmentos activos de las mismas, que tiene 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 90%, 91%, 92% 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de los polipéptidos establecidos en las SEQ ID NO: 1-3. Las variantes alélicas de FVII incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de aquellos polipéptidos precursores que tienen una secuencia de aminoácidos establecido en cualquiera de las SEQ ID NOS: 18-74. Las variantes de especies ejemplares para la modificación de acá incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de humanos y no humano incluyendo polipéptidos FVII a partir de polipéptidos FVII de vaca, ratón, chimpancé pigmeo, chimpancé, conejo, rata, macaco, cerdo, perro, pez cebra,

pez globo, pollo, orangután y gorila, cuyas secuencias se establecen en las SEQ ID NOS: 4-17 respectivamente. Las modificaciones en un polipéptido FVII puede ser hecho a un polipéptido FVII que también contiene otras modificaciones, tales como aquellas descritas en el arte, incluyendo modificaciones de la secuencia primaria y modificaciones no en la secuencia primaria del polipéptido.

La modificación de polipéptidos FVII también incluyen la modificación de polipéptidos que son híbridos de polipéptidos FVII diferentes y también polipéptidos FVII sintéticos preparados de forma recombinante o sintetizado o construido por otros métodos conocidos en el arte con base en la secuencia de polipéptidos conocidos. Por ejemplo, con base en la alineación de FVII con otros miembros de la familia del factor de coagulación, tales como factor IX (FIX) o factor X (FX), los dominios homólogos entre los miembros de familia son fácilmente identificados. Las variantes quiméricas de polipéptidos FVII pueden ser construidas donde uno o más aminoácidos o dominios enteros son reemplazados en la secuencia de aminoácido FVII usando la secuencia de aminoácido del miembro de familia correspondiente. Adicionalmente, los polipéptidos FVII quiméricos incluyen aquellos donde uno o más aminoácidos o dominios enteros son reemplazados en la secuencia de aminoácido FVII de humano usando la secuencia de aminoácido de una especie diferente (ver por ejemplo, Williamson *et al.* (2005) J Thromb Haemost 3:1250-6). Dichas proteínas quiméricas pueden ser utilizadas como el polipéptido FVII inicial no modificado de acá.

Las modificaciones acá suministradas de un polipéptido de referencia no modificado inicial incluye reemplazos de aminoácido o sustitución, adiciones o supresiones de aminoácidos, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados incluyen aquellos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más posiciones modificadas. También se suministran acá polipéptidos FVII modificados con dos o más modificaciones en comparación un polipéptido FVII inicial de referencia. Los polipéptidos FVII modificados incluyen aquellos con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más posiciones modificadas. Cualquier modificación acá suministrada puede ser combinada con cualquier otra modificación conocida por los expertos en la materia siempre y cuando el polipéptido FVII modificado resultando exhiba actividad de coagulación aumentada cuando se encuentre en su forma de cadena doble o activada. Típicamente, los polipéptidos FVII modificados exhiben actividad coagulante incrementada. Las actividades o propiedades que pueden ser alteradas como resultado de una modificación incluyen, pero no se limitan a, coagulación o actividad coagulante; actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como para afectar la activación del factor X (FX) o la activación del Factor IX (FIX); antigenicidad (habilidad para unirse a o competir con un polipéptido para la unión a un anticuerpo anti-FVII); habilidad para unir factor de tejido, factor inhibidor de factor de tejido (TFPI), antitrombina III, factor X o factor IX; habilidad a la superficie de plaquetas activadas; habilidad para unirse a fosfolípidos; vida media de suero; estructura tridimensional; pl; y/o

conformación. Incluidos dentro de los polipéptidos FVII modificados acá suministrados se encuentran aquellos que tienen resistencia aumentada al inhibidor de vía de factor de tejido (TFPI), resistencia aumentada a antitrombina III (AT-III), actividad catalítica incrementada en la presencia y/o ausencia de TF, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media de suero aumentada, actividad intrínseca aumentada y/o afinidad aumentada y/o unión para plaquetas activadas.

En algunos ejemplos, una modificación puede afectar dos o más propiedades o actividad de un polipéptido FVII. Por ejemplo, una modificación puede resultar en resistencia aumentada a TFPI y actividad catalítica aumentada del polipéptido FVII modificado en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Los polipéptidos FVII no modificados suministrados acá pueden ser ensayados para cada propiedad y actividad para identificar el rango de efectos de una modificación. Dichos ensayos son conocidos en el arte y descritos más adelante. Los polipéptidos FVII modificados acá suministrados también incluyen polipéptidos FVII que son modificados adicionalmente por maquinaria celular e incluyen, por ejemplo, polipéptidos glicosilatados, γ-carboxilatados y β-hidroxilatados.

Las modificaciones acá proporcionadas a un polipéptido FVII son hechas para aumentar la resistencia TFPI, aumentar la resistencia a AT-III, mejorar las propiedades farmacocinéticas, tales como para aumentar la vida media del suero, aumentar la actividad catalítica en la presencia y/o ausencia de TF y/o aumentar la afinidad y/o unión para las plaquetas activadas. Por ejemplo, un

polipéptido FVII puede incluir modificaciones que aumentan uno o ambos de la resistencia TFPI u la unión a las plaquetas. En otros ejemplos, cualquier modificación acá proporcionada puede ser combinada con cualquier otra modificación conocida para los expertos en la materia siempre y cuando el polipéptido FVII modificado resultante exhiba actividad coagulante aumentada cuando se encuentra en una forma de cadena doble. Típicamente, dicha actividad de coagulación aumentada se desde a la resistencia incrementada a TFPI, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media de suero aumentada, resistencia aumentada a AT-III, glicosilación alterada, actividad catalítica aumentada, y/o unión y/o afinidad aumentada para los fosfolípidos. En algunos ejemplos, las modificaciones que son introducidas en un polipéptido FVII para alterar una actividad o propiedad específica también, o de forma contrario, pueden afectar otra actividad o propiedad. Por lo tanto, las modificaciones acá proporcionadas pueden afectar la propiedad o actividad que fueran diseñadas para afectar y una o más de otras propiedades o actividades. Por ejemplo, las modificaciones hechas a un polipéptido FVII para aumentar la resistencia a TFPI también pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas, tales como vida media de suero. En algunos ejemplos, una modificación simple, tal como una sustitución de aminoácido simple, altera 2, 3, 4 o más propiedades o actividades de un polipéptido FVII. Los polipéptidos FVII modificados acá suministrados pueden ser ensayados por cada propiedad y actividad para identificar el rango de efectos de una modificación. Dichos ensayos son conocidos en el arte y descritos más adelante. Los polipéptido

FVII modificados acá proporcionados incluyen polipéptidos FVII que son modificados adicionalmente por la maquinaria celular e incluyen, por ejemplo, polipéptidos glicosilatados, γ-carboxilatados y β-hidroxilatados.

Las modificaciones acá suministradas pueden ser hechas por medio de técnicas de ADN recombinante estándar tales como lo son rutina para un experto en la materia. Cualquier método conocido en el arte para efectuar la mutación de cualquiera o de más aminoácidos en una proteína objetivo puede ser empleado. Los métodos incluyen mutagénesis estándar dirigidas en sitio (utilizando por ejemplo, un kit, tales como kits como QuikChange disponibles de Stratagene) de moléculas de ácido nucleico codificado, o por métodos de síntesis de polipéptido de fase sólida. Adicionalmente, las proteínas quiméricas modificadas acá proporcionadas (es decir, intercambio de dominio Gla) pueden ser generadas por técnicas de rutina de ADN recombinante. Por ejemplo, los polipéptidos quiméricos pueden ser generados usando enzimas de restricción y metodologías de clonación para sub-clonación de rutina de los componentes de polipéptido quimérico deseado.

Otras modificaciones que están o que no están en la secuencia primaria del polipéptido también pueden ser incluidas en un polipéptido FVII modificado, o conjugados de los mismos, incluyendo, por no limitado a, la adición de restos de carbohidrato, la adición de un resto de polietilenglicol (PEG), la adición de un dominio Fc, etc. Por ejemplo, dichas modificaciones adicionales pueden ser hechas para aumentar la estabilidad o vida media de la proteína.

Los polipéptidos FVII modificados resultantes incluyen aquellos que son zimogén de cadena simple o polipéptidos activos o aquellos que son polipéptidos similares a zimogén de cadena simple o de cadena doble. Por ejemplo, cualquier polipéptido modificado acá suministrado que es un polipéptido de zimogén de cadena simple puede ser autoactivado o activado por otros factores de coagulación para generar un FVII modificado que es una forma de cadena doble (es decir, FVIIa). Las actividades de un polipéptido FVII modificado son típicamente exhibidas en su forma de cadena doble.

Los polipéptidos FVII modificados acá suministrados pueden exhibir resistencia a TFPI aumentada, resistencia a AT-II aumentada, actividad catalítica aumentada en la presencia y/o ausencia de TF, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media de suero aumentada, y/o unión y/o afinidad aumentada para los fosfolípidos. Típicamente, dichas propiedades y/o actividades de los polipéptidos FVII modificados acá proporcionados son hechos mientras retienen otras actividades o propiedades de FVII, tales como, pero no limitado a, unión a TF y/O unión y activación a FX. Así, los polipéptidos FVII modificados acá suministrados retienen la unión de TF y/o unión de FX y activación en comparación con una forma de tipo salvaje o de inicio del polipéptido FVII. Típicamente, dicha actividad es sustancialmente no cambiada (menos de 1%, 5%, 10%, 20% o 30· cambiada) en comparación con una proteína tipo salvaje o de inicio. En otros ejemplos, la actividad de un polipéptido FVII modificado se aumenta o se disminuye en comparación con un polipéptido FVII tipo salvaje o de inicio. La actividad puede ser evaluada *in*

vitro, ex vivo o *in vivo* y puede ser comparada al del polipéptido FVII no modificado, tales como por ejemplo, el polipéptido FVII maduro nativo tipo salvaje (SEQ ID NO:3), el polipéptido FVII precursor de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1 o 2), o cualquier otro polipéptido FVII conocido para aquellos expertos en la materia y usado como el material de inicio.

Así, en virtud de las modificaciones acá suministradas, los polipéptidos FVII modificados pueden exhibir actividad de coagulación aumentada en una forma dependiente de TF y/ independiente de TF. Típicamente, la actividad de coagulación de TF aumentada de los polipéptidos FVII modificados acá suministrados pueden ser observados *in vitro* en ensayos apropiados, o *in vivo*, tales como con la administración a un sujeto, tal como un sujeto humano o no humano. La actividad aumentada de los polipéptidos FVII modificados puede ser mejorada en al menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 1 10%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, el 300%, el 400%, el 500%, o más en comparación con la actividad del polipéptido FVIIa de inicio o no modificado.

1. Resistencia aumentada a los inhibidores

Como la mayoría de los sistemas biológicos, la cascada de coagulación es regulada por los mecanismos positivos o negativos. Estos mecanismos actúan a menudo por la inhibición o mejoramiento de la actividad de uno o más factores involucrados en la cascada, bien sea de forma directa o indirecta.

Así, son de interés los factores de coagulación terapéuticos que son resistentes a los mecanismos inhibidores que regulan negativamente su actividad. En particular, son de interés los polipéptidos FVII modificados que son resistentes a las moléculas inhibidores que normalmente exhiben actividad FVII. El regulador primaria del complejo TF/FVIIa es el inhibidor de vía de factor de tejido (TFPI). También es inhibidor a la actividad FVIIa, aunque en una medida menor, la antitrombina III (AT-III).

a. TFPI

El inhibidor de vía de factor de tejido es un polipéptido de cadena simple codificado por 9 exones localizados en el cromosoma 2q31-q32.1. EL TFPI (también relacionado como TFPI-1) es un inhibidor tipo Kunitz que es sintetizado principalmente por células endoteliales y contiene una región terminal de amino cargada negativamente, tres dominios de inhibidor tipo Kunitz tándem y una cola terminal de carboxilo altamente básica (Wun *et al.* J. Biol. Chem. 263:6001 (1988)). A través del empalme alternativo de mARN, dos formas diferentes de TFPI son generadas: TFPIα y β. TFPIα es una proteína secretada con un peso molecular de aproximadamente 46 kDa. El polipéptido precursor es 304 aminoácidos en longitud (SEQ ID NO:101), y es procesado por la ruptura del péptido de señal de aminoácido 28, resultando en la secreción de una glicoproteína madura de aminoácido 276 (SEQ ID NO:102). La proteína madura contiene 18 residuos de cisteína y forma 9 puentes de disulfuro cuando se dobla correctamente. La secuencia primaria también contiene tres sitios de consenso de glicosilación N-vinculados Asn.X.Ser/Thr,

los residuos de asparagina localizados en las posiciones 145, 195 y 256. Los dominios Kunitz-1 y 2 son responsables por la unión y la inhibición del complejo TF/FVIIa y FXa, respectivamente (ver por ejemplo, Figura 4). El dominio Kunitz-3, el cual carece de actividad inhibidora de proteinasa, y el término C de TFPIα han sido mostrados para estar involucrados en su localización de superficie celular (Piro *et al.* (2004) Circulation 110:3567-3572).

TFPIβ es una forma alternativamente empalmada de TFPI en la cual el dominio Kunitz-3 y la región C-terminal de TFPIα es reemplazada con una región C-terminal no relacionada que dirige la unión de un ancla de glicosilfosfatidilnositol (GPI). El polipéptido precursor (SEQ ID NO:103) es procesado a una proteína madura que es 223 aminoácidos (SEQ ID NO:104). Basado en la masa de proteína, el TFPIβ (28 kDa) es considerablemente más pequeño que el TFPIα (36 kDa). Ambos migran con la misma masa molecualr aparente (46 kDa) en electroforesis de gel de dodecilculfato poliacrilamida de sodio (SDS-PAGE), sugiriendo una diferencia en las modificaciones post-translacionales. Los TFPIα y β son unidos a la superficie de la célula de una forma dependiente de GPI. El TFPIβ contiene un ancla GPI es su término C, considerando que el TFPIα está aparentemente unido a una proteína vinculada a GPI no identificada aún. Aunque el TFPIβ representa únicamente el 20% de la superficie total TFPI, este cuenta para la mayoría de la actividad anti TF/FVIIa, sugiriendo un papel alternativo potencial para la TFPIα de la superficie celular, tal como la unión y el aclaramiento de FXa (Piro *et al.* (2005) J Thromb Haemost 3:2677-2683).

EL TFPI inhibe la cascada de coagulación en al menos dos vías; por medio de la unión al sitio activo de FXa, y por medio de la desactivación del complejo TF/FVIIa (ver por ejemplo, Figura 4). El primer dominio Kunitz se une a FVIIa, mientras que el segundo dominio se una a FXa (Girard *et al.* (1989) Nature 338:518-520). El TFPI libre se une a FVIIa muy lentamente in comparación con su unión de FXa. Una vez está unido a FXa sin embargo, el complejo TFPI/FXa muestra una afinidad fuerte por el complejo TF/FVIIa. Su interacción resulta en la formación de un complejo heterotetramérico en una superficie de célula endotelial en la cual el FVIIa está catalíticamente inactivo (Figura 4). Esta estructura cuaternaria por lo tanto previene la iniciación de TF/FVIIa de la cascada de coagulación.

Al menos otro homólogo de TFPI existe en los humanos, TFPI-2, también conocido como proteína 5 placentaria (PP5) e inhibidor de serina proteasa asociado a matriz (MSPI). El TFPI-2 es un inhibidor de serina proteasa tipo Kunitz asociado a matriz de 32 kDa el cual exhibe actividad inhibidora hacia un amplio espectro de proteinasas, incluyendo tripsina, plasmita, quimotripsina, catepsina G, calicreína de plasma, y el complejo de fator de tejido-factor VIIa. La proteína TFPI-2 madura de aminoácido 213 (SEQ ID NO:105) contiene tres dominios tipo Kunitz que exhiben 43%, 35% y 53% de identidad de secuencia primaria con dominios tipo Kunitz de TFPI 1, 2 y 3, respectivamente. El primer dominio tipo Kunitz de TFPI-2 humando contiene todos los elementos estructurales para la inhibición de la serina proteasa, aunque los estudios cinéticos y moleculares indican que el TFPI-2 e un

inhibidor de plasmita más efectivo que varias serinas proteasas, incluyendo TF/FVIIa (Chand *et al.* (2004) J Biol Chem 279:17500-17507). Se cree que juega un papel importante en la regulación de digestión de matriz extracelular y la remodelación. En este contexto, la síntesis reducida de TFPI-2 ha estado relacionada con numerosos procesos patofisiológicos tales como inflamación, angiogenesis, aterosclerosis, degeneración retinal y crecimiento de tumor o metástasis (Chand *et al.* (2005) Thromb Haemost 94:1122-30). Por lo tanto, mientras que los homólogos a TFPI, el TFPI-2 no se cree que sea un factor importante en la vía de coagulación. La alineación de secuencia de la secuencia de dominio Kunitz-1 de TFPI-1 y TFPI-2 se establece en la Figura 6b.

El inmuno agotamiento del TFPI en un modelo de conejo mejoró la coagulación (Warn-Cramer *et al.* (1993) Arteriosel Thromb 13:1551-1557, Ragni *et al.* (200) Circulation 102:113-117), indicando que la disrupción de la formulación del complejo cuaternario TF/FVIIa-TFPI/FXa puede inhibir la regulación negativa de la iniciación de coagulación. Adicionalmente, la disrupción de la interacción de FVIIa con TFPI puede disminuir el aclaramiento de FVIIa. El aclaramiento reducido puede ser manifestado como vida media aumentada. También, el FVIIa unido al TF de superficie celular puede ser internalizado y degradado sin agotar el TF en la superficie celular. Esta forma de internalización y degradación es aumentada significativamente en la presencia de TFPI/FXa, lo cual forma una un complejo cuaternario con la superficie de célula TF/FVIIa. La internalización y degradación que sigue la

unión es mediada a través de una vía de pozo dependiente de proteína relacionada de receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP) (Iakhiaev *et al.*, (1999) J. Biol. Chem 274:36995-37003). El TFPI también puede ayudar a mediar el aclaramiento FVIIa a través de otros mecanismos, tales como mecanismos de aclaramiento hepático o renal.

Modificaciones para llevar a cabo mayor resistencia a TFPI

Acá se proporcionan polipéptidos FVII modificados que exhiben una resistencia a TFPI aumentada. Dicha resistencia a TFPI puede ser lograda, por ejemplo, por la mutación de uno o más residuos en el FVII involucrado en la interacción y unión con TFPI para reducir o prevenir dicha unión, de este modo haciendo a los polipéptidos FVII modificados resistentes a los efectos naturalmente inhibidores de TFPI con respecto a la iniciación de la coagulación. Cuando se evalúa en un ensayo *in vitro* apropiado, o *in vivo*, tal como seguido a la administración a un sujeto como un procoagulante terapéutico, los polipéptidos FVII modificados resistentes a TFPI pueden mostrar actividad coagulante aumentada en comparación con los polipéptidos no modificados. Entre los mutantes de FVIIa que exhiben resistencia a TFPI aumentada, están los mutantes que tienen vida media aumentada. Por ejemplo, el mutante descrito en el Ejemplo 9 exhibe vida media incrementada.

Acá se suministran polipéptidos FVII modificados que tienen una o dos mutaciones en los residuos de contacto FVII/TFPI o residuos en cercanías a la interfaz de interacción. Dichos residuos de contacto incluyen el residuo de ácido aspártico en la posición 196 (D196, Asp^{196}), el residuo de lisina en la

posición 197 (K197, Lys^{197}), el residuo de lisina en la posición 199 (K199, Lys^{199}), el residuo de treonina en la posición 239 (T239, Thr^{239}), el residuo de arginina en la posición 290 (R290, Arg^{290}), y el residuo de lisina en la posición 341 (K341, Lys^{341}), con la numeración relativa a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3. Cuando se identifican usando numeración de quimotripsina, estos residuos corresponden a D60, K60a, T99, R147 y K192 (Figura 7). Un residuo que se encuentra en cercanías a la interfaz FVII/TFPI, y el cual puede ser modificado para causar el obstáculo estérico, es el residuo de glicina en la posición 237 (G237, Gly^{237}) por medio de la numeración de FVII maduro, el cual corresponde a G97 (Gly^{97}) mediante la numeración de quimotripsina.

Los residuos identificados pueden ser modificados tal como por reemplazo de aminoácido, supresión o sustitución. Alternativamente, las inserciones de aminoácidos pueden ser utilizadas para alterar la conformación de un residuo de aminoácido objetivo o la estructura de proteína en la vecindad de un residuo de aminoácido objetivo. Por ejemplo, los residuos identificados pueden ser reemplazados o sustituidos con otro aminoácido con el fin de perturbar la interacción entre FVII y TFPI e inhibir la unión eficiente de las dos proteínas, generando así un polipéptido FVII modificado resistente a TFPI. Por ejemplo, la sustitución de un aminoácido que obstaculiza estéricamente la interacción de FVII y TFPI es contemplado (es decir, sustitución de Gly^{237} (Gly^{97}) con otro aminoácido más grande). En otras modalidades, los polipéptidos FVII modificados resistentes a TFPI pueden ser generados por el

reemplazo de un residuo de contacto con un aminoácido alterno de modo tal que inversión de carga o neutralización de carga es lograda en la posición identificada. Estos tipos de mutaciones pueden afectar significativamente las contribuciones electrostáticas del aminoácido FVII sustituido y perturbar la interacción normal del residuo de contacto con los residuos de contacto de TFPI correspondientes. Por ejemplo, un residuo de ácido aspártico cargado negativamente en FVII, el cual puede interactuar normalmente de forma favorable con un residuo de arginina cargado positivamente en TFPI, puede ser reemplazado con una lisina cargada positivamente para no sólo eliminar la interacción electrostática favorable original sino también para crear una fuerza repulsiva entre los residuos e interferir con la unión eficiente de las proteínas. Esta mutación, por lo tanto, interfiere con la unión eficiente de las proteínas. Así, un aminoácido cargado negativamente (es decir, un aminoácido acídico) tal como ácido aspártico (Asp, D) o ácido glutámico (Glu, E) puede ser sustituido con un aminoácido cargado positivamente (es decir, un aminoácido básico) tal como lisina (Lys, K), arginina (Arg, R), o histidina (His, H). Por el contrario, un aminoácido básico tal como lisina (Lys, K), arginina (Arg, R), o histidina (His, H) puede ser sustituido con un aminoácido acídico, tal como ácido aspártico (Asp, D) o ácido glutámico (Glu, E). También, cualquier residuo de contacto puede ser sustituido con un aminoácido neutro tal como alanina (Ala, A), tirosina (Tyr, Y), metionina (Met, M) o leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), valina (Val, V), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P) o glicina (Gly, G), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), asparagina (Asn, N), glutamina (Gln, Q), triptófano

(Trp, W) y cisteína (Cys, C). Ejemplos de aminoácidos neutros son aminoácidos hidrofóbicos, los cuales incluyen isoleucina (Ile, I), fenilalanina (Phe, F), valina (Val, V), leucina (Leu, L), triptófano (Trp, W), metionina (Met, M), alanina (Ala, A), glicina (Gly, G), cisteína (Cys, C) y tirosina (Tyr, Y).

En lagunas modalidades, la glicina en la posición 237 por numeración de FVII maduro es reemplazada de modo tal que el nuevo aminoácido causa el obstáculo estérico e inhibe la interacción entre FVII y TFPI. La glicina es la más pequeña y la más simple de los aminoácidos, conteniendo sólo un átomo de hidrógeno simple en su cadena lateral. Debido a su pequeño tamaño, la glicina puede encajar en pequeños lugares y puede adoptar conformaciones particulares que otros aminoácidos no pueden. La sustitución de la glicina en la posición 237 con un aminoácido con una cadena lateral más grande podría causar el obstáculo estérico con otros aminoácidos en la proteína FVII, alterando así la conformación de la interfaz de unión de TFPI, y/o causar el obstáculo estérico con aminoácidos en la proteína TFPI. Ambas situaciones podrían resultar en interacción y unión deteriorada de FVII y TFPI, incrementado así la resistencia del polipéptido FVII modificado a los efectos inhibitorios del TFPI. Cualquiera de los 19 aminoácidos naturales contiene cadenas laterales más grandes que la glicina, y pueden ser utilizados para modificar el polipéptido FVII. Los ejemplos de estos son triptófano (Trp, W), isoleucina (Ile, I), valina (Val, V) y treonina (Thr, T).

En otros ejemplos, las inserciones de aminoácidos son incorporadas en el polipéptido FVII cerca de los residuos identificados para interferir con la

interacción entre TFPI y FVII. Uno o más residuos de aminoácidos pueden ser insertados en una o más posiciones en el polipéptido FVII. Por ejemplo, un residuo de tirosina puede ser insertado entre D196 y K197 (correspondiente a D60 y K60a, respectivamente, mediante la numeración de quimotripsina). Esta modificación es D196K197insY (es decir, D196 y K197 son las posiciones entre las cuales una tirosina ha sido insertada (insY)). En otro ejemplo, dos residuos de aminoácidos son insertados en una posición identificada ya que es importante para la interacción con el TFPI. Por ejemplo, una alanina y una serina puede ser insertada entre G237 y T238 (correspondiente a G97 y T98, respectivamente, mediante numeración de quimotripsina), resultando en la modificación G237T238insAS. Dichas mutaciones de inserción podrían resultar en la interacción y unión deterioradas de FVII y TFPI, incrementando así la resistencia del polipéptido FVII modificado a los efectos inhibitorios del TFPI.

La Tabla 5 proporciona ejemplos no limitantes de reemplazos de aminoácidos ejemplares en los residuos identificados, correspondientes a las posiciones de aminoácidos de un polipéptido FVII maduro como se establece en la SEQ ID NO:3. Como se nota, dichos polipéptidos FVII son diseñados para aumentar la resistencia a TFPI mediante la inhibición de la unión FVII/TFPI, y por lo tanto tienen actividad coagulante aumentada. Con referencia a dichas mutaciones, el primer aminoácido (abreviación de una letra) corresponde al aminoácido que es reemplazado, el número corresponde a la posición en la secuencia de polipéptido FVII maduro con referencia a la SEQ ID NO:3, y el segundo aminoácido (abreviación de una letra) corresponde al aminoácido

seleccionado que reemplaza el primer aminoácido en esa posición. Las posiciones de aminoácidos para la mutación también son relacionadas por el esquema de numeración de quimotripsina. En la Tabla 5, el identificador de secuencia (SEQ ID NO) es identificado en el cual las secuencias de aminoácidos ejemplares del polipéptido FVII modificado son establecidas, y también cualquier número de identificación de polipéptido.

Tabla 5

Modificación – numeración de FVII maduro	Modificación – numeración de quimotripsina	Número ID de Polipéptido	SEQ ID NO
D196K	D60K	CB554	18
D196R	D60R	CB555	19
D196A	D60A	CB556	20
D196Y	D60Y	CB601	125
D196F	D60F	CB600	126
D196W	D60W	CB602	127
D196L	D60L	CB603	128
D196I	D60I	CB604	129
K197Y	K60aY	CB561	21
K197A	K60aA	CB559	22
K197E	K60aE	CB558	23
K197D	K60aD	CB557	24
K197L	K60aL	CB560	25
K197M	K60aM	CB599	26
K197I	K60aI	CB595	130
K197V	K60aV	CB596	131
K197F	K60aF	CB597	132
K197W	K60aW	CB598	133
K199A	K60cA	CB564	27
K199D	K60cD	CB562	28
K199E	K60cE	CB563	29
G237W	G97W	CB605	134
G237T	G97T	CB606	135
G237I	G97I	CB607	136
G237V	G97V	CB608	137
T239A	T99A	CB565	30
R290A	R147A	CB568	31
R290E	R147E	CB567	32

R290D	R147D	CB566	33
R290N	R147N	CB697	206
R290Q	R147Q	CB698	207
R290K	R147K	CB699	208
R290M	R147M	CB700	209
R290V	R147V	CB701	210
K341E	K192E		34
K341R	K192R	CB569	35
K341Q	K192Q	CB609	138
K341N	K192N	CB733	211
K341M	K192M	CB734	212
K341D	K192D	CB735	213
G237T238insA	G97T98insA	CB853	214
G237T238insS	G97T98insS	CB854	215
G237T238insV	G97T98insV	CB855	216
G237T238insAS	G97T98insAS	CB856	217
G237T238insSA	G97T98insSA	CB857	218
D196K197insK	D60K60ainsK	CB858	219
D196K197insR	D60K60ainsR	CB859	220
D196K197insY	D60K60ainsY	CB860	221
D196K197insW	D60K60ainsW	CB861	222
D196K197insA	D60K60ainsA	CB862	223
D196K197insM	D60K60ainsM	CB863	224
K197I198insE	K60aI60binsE	CB864	225
K197I198insY	K60aI60binsY	CB865	226
K197I198insA	K60aI60binsA	CB866	227
K197I198insS	K60aI60binsS	CB867	228

En una modalidad adicional, los mutantes de combinación pueden ser generados. Incluidos entre dichos mutantes de combinación están aquellos que tienen dos o más mutaciones de los residuos D196, K197, K199, G237, T239, R290 o K341 con base en la numeración de un FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3 (correspondiente a D60, K60a, K60c, K97, T99, R147 y K192, respectivamente, con base en la numeración de quimotripsina). Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede poseer sustituciones de aminoácido en 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de las posiciones identificadas. Como se notó anteriormente, los

residuos son reemplazados de modo tal que las interacciones favorables entre FVIIa y TFPI son eliminadas, y las interacciones no favorables son introducidas, o el obstáculo estérico es introducido, en una o más posiciones. Así, un polipéptido modificado puede mostrar 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 mutaciones que proporcionan uno o más obstáculos estéricos, inversión de cambio, neutralización de cambio, u otra interacción no favorable, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, dos o más mutaciones pueden ser hechas por lo tanto los aminoácidos cargados negativamente tales como ácido aspártico (asp, D) o ácido glutámico (Glu, E) puede ser sustituido con un aminoácido cargado positivamente tal como lisina (Lys, K), arginina (Arg, R), o histidina (His, H), o viceversa, o sustituciones neutras pueden ser hechas por medio del reemplazo de cualquier aminoácido con, por ejemplo, alanina (Ala, A), tirosina (Tyr, Y), metionina (Met, M) o leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), valina (Val, V), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P) o glicina (Gly, G), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), asparagina (Asn, N), glutamina (Gln, Q), triptófano (Trp, W) y cisteína (Cys, C) o cualquier combinación de las mismas. Ejemplos de aminoácidos neutros son aminoácidos hidrofóbicos, los cuales incluyen isoleucina (Ile, I), fenilalanina (Phe, F), valina (Val, V), leucina (Leu, L), triptófano (Trp, W), metionina (Met, M), alanina (Ala, A), glicina (Gly, G), cisteína (Cys, C) y tirosina (Tyr, Y). En otro ejemplo, doso más mutaciones pueden ser hechas donde al menos una es una inversión de carga o neutralización de carga y otra es una sustitución que reemplaza glicina con aminoácidos que contienen una cadena lateral más grande, tal como triptófano (Trp, W), isoleucina (Ile, I), valina (Val,

V) y treonina (Thr, T). En otros ejemplos, una mutación de inserción puede ser incluida en el polipéptido FVII modificado con otras mutaciones de inserción, o con una o más sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos que introducen interacciones no favorables o obstáculo estérico entre FVII y TFPI. Cualquier permutación de combinaciones puede ser incluida en un polipéptido FVII modificado usando las modificaciones establecidas en la Tabla 5. Por ejemplo, los polipéptidos FVII acá suministrados pueden contener D196K y una o más modificaciones de reemplazos adicionales en la posición de aminoácido D196, K197 y/o G237. Un experto en la materia puede fácilmente generar todas las posibles combinaciones usando las modificaciones establecidas en la Tabla 5.

Por ejemplo, las variantes de FVII incluyen aquellas que incluyen como una de sus mutaciones una sustitución de aminoácido en la posición 197, con base en la numeración de un FVII maduro establecida en la SEQ ID NO:3. Cualquier residuo de aminoácido puede ser sustituido por el residuo de lisina que ocupa la posición 197 en un polipéptido FVII no modificado. En algunas modalidades, la lisina es reemplazada por residuo de una tirosina (Y), una alanina (A), un ácido glutámico (E), un ácido aspártico (D), una leucina (L), una metionina (M), una isoleucina (I), una valina (V), una fenilalanina (F) o un triptófano. Por ejemplo, un ejemplo de un polipéptido FVII modificado es aquel que contiene la sustitución K197L o K197E. En otro ejemplo, un polipéptido FVII que contiene una modificación en la posición 197 (tal como un reemplazo, supresión o adición) también puede incluir otra modificación en otra posición.

Generalmente dicha otra modificación está en una posición que es contemplara para modular la interacción de FVII con TFPI, tal como mediante la remoción de una interacción favorable, creación de una interacción no favorable, introducción de un obstáculo estérico, o una combinación de los mismos. Incluidas dentro de dichas modificaciones adicionales están las modificaciones en las posiciones de aminoácido que corresponden a D196, K199, G237, T239, R290 o K341, tal como se describió anteriormente. Otras modificaciones adicionales conocidas en el arte, tal como se describen más adelante, también están contempladas. Así, adicional a la modificación en la posición 197, un polipéptido FVII puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más modificaciones de aminoácido. Por ejemplo, las variantes de FVII ejemplares que tienen al menos una modificación en la posición 197 incluyen aquellas que contienen 2 sustituciones, tales como D196F y K197E, aquellas que contienen 4 sustituciones, tales como D196R, K197E, K199E y R290E, aquellas que contienen 5 sustituciones, tales como K197L, K199D, G237T, R290D y K341Q, aquellas que contienen 6 sustituciones, tales como D196F, K197L, K199E, G237V, T239A y R290D, y aquellas que contienen 7 sustituciones, tales como D196Y, K197L, K199A, G237T, T239A, R290D y K341R. Los mutantes de combinación de FVII ejemplares que incluyen como una de sus mutaciones una sustitución de aminoácido en la posición 197, con base en la numeración de un FVII maduro establecidas en la SEQ ID NO:3, están incluidas en la Tabla 6.

Los polipéptidos FVII ejemplares que contienen dos o más reemplazos de aminoácido en uno o más residuos de aminoácido de D196, K197, K199,

G237, T239, R290 o K341, correspondientes a las posiciones de aminoácido de un polipéptido FVII maduro como se establecen en la SEQ ID NO:3, son aquellas suministradas en la Tabla 6. En la tabla, las posiciones de aminoácido para la mutación también se relacionan por el esquema de numeración de quimotripsina. Dichas modificaciones son diseñadas para aumentar la resistencia a TFPI por medio de la inhibición de la unión de FVII a TFPI, y por lo tanto mejoran la actividad de coagulación.

Tabla 6

Modificación – numeración de FVII maduro	**Modificación – numeración de quimotripsina**	**Número ID de Poli-péptido**	**SEQ ID NO**
D196R/R290E	D60R/R147E	CB579	36
D196K/R290E	D60K/R147E	CB580	37
D196R/R290D	D60R/R147D	CB581	38
D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/K60cE	CB586	39
D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/K60cE	CB587	40
D196R/ K197E/K199E/ R290E	D60R/K60aE/K60cE/ R147E	CB588	41
D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/K60cE	CB589	42
D196R/K197M/K199E/ R290E	D60R/K60aM/K60cE/ R147E	CB590	43
D196K/K197L	D60K/K60aL	CB610	139
D196F/K197L	D60F/K60aL	CB612	140
D196L/K197L	D60L/K60aL	CB611	141
D196M/K197L	D60M/K60aL	CB613	142
D196W/K197L	D60W/K60aL	CB614	143
D196F/K197E	D60F/K60aE	CB615	144
D196W/K197E	D60W/K60aE	CB616	145
D196V/K197E	D60V/K60aE	CB617	146
K197E/K341Q	K60aE/K192Q	CB637	229
K197L/K341Q	K60aL/K192Q	CB638	230
G237V/K341Q	G97V/K192Q	CB670	231
K197E/G237V/K341Q	K60aE/G97V/K192Q	CB671	235
K197E/K199E	K60aE/K60cE	CB688	232
K197E/G237V	K60aE/G97V	CB689	233
K199E/K341Q	K60cE/K192Q	CB694	234
K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	CB691	250

Los polipéptidos FVII que contienen una o más sustituciones de aminoácido en los residuos anteriormente identificados también pueden contener mutaciones adicionales, tales como aquellas descritas en la Publicación de Patente Internacional No. WO2004/083361, Neuenschwander *et al.*, (1995) Biochemistry 34:8701-8707, Chang *et al.*, (1999) Biochemistry 38:10940-10948, e Iakhiaev *et al.*, (2001) Thromb. Haemost. 85:458-463. Por lo tanto, en una modalidad, los polipéptidos FVII suministrados acá pueden contener una o más sustituciones de aminoácido en uno o más residuos de aminoácido de Q176, D196, K197, K199, G237, T239, R290, E296, K341 y Q366, que corresponden a las posiciones de aminoácido de un polipéptido FVII maduro como se establece en la SEQ ID NO:3. Por ejemplo, las una o más mutaciones adicionales pueden incluir, pero no se limitan a, cualquiera o más de Q176A, D196N, G237L, E296A, K341N, K341Q, K341E, Q366A, Q366E y Q366G.

b. Antitrombina III (AT-III)

La antitrombina II (también conocida como antitrombina o AT-III) es una serpina anticoagulante importante (inhibidor de serina proteasa). La AT-III es sintetizada como una proteína precursora que contiene 464 residuos de aminoácido (SEQ ID NO:122). En el curso de la secreción un péptido de señal de residuo 32 es roto para generar una antitrombina humana madura de aminoácido 432 (SEQ ID NO:123). La glicoproteína AT-III de 58 kDa circula en la sangre y funciona como un inhibidor de serina proteasa (serpina) para inhibir

un número grande de serina proteasas del sistema de coagulación. Los objetivos principales de la AT-III son la trombina y factor Xa, aunque la AT-III también ha sido mostrada para inhibir las actividades de FIXa, FXIa, FXIIa y, para en menor cantidad, FVIIa. La acción de la AT-III es mejorada en gran medida por los glicosaminoglicanos, tales como los sulfato de heparan que ocurren naturalmente o las varias heparinas derivadas de tejido que son ampliamente utilizadas como anticoagulantes en la práctica clínica. El At-II se une en una manera altamente específica a una secuencia única de pentasacárido en heparina que incluye un cambio conformacional en el ciclo reactivo central. En dicha conformación, el ciclo reactivo central de la AT-III puede interactuar más eficientemente con el sitio reactivo de la serina proteasa, y efectuar la inhibición.

La AT-III no es normalmente inhibitoria para liberar FVIIa de plasma, aún en la presencia de heparina, probablemente debido a la conformación similar a zimogén de FVIIa lo cual previene la interacción eficiente con AT-III. Los efectos inhibitorios de la AT-III aumentan, sin embargo, una vez que el FVIIa se compleja con TF. La unión de AT-III al complejo TF/FVIIa puede liberar FVIIa de TF y lo mantiene en un complejo inactivo con AT-III. La afinidad aumentada de AT-III para la unión de TF con FVIIa en comparación con el FVIIa solo refleja presumiblemente la maduración del sitio activo de FVIIa cuando este se compleja con TF, por lo tanto lo hace susceptible a la unión de AT-III (Rao *et al.* (1993) Blood 81:2600-2607). Así, el impacto de la AT-III sobre FVIIa es proporcional a la actividad intrínseca de la molécula FVIIa. Mientras que el

FVIIa retiene su conformación similar a zimogén, la AT-III tiene poco efecto. Si, sin embargo, el FVIIa cambia la conformación a una forma más activa, tal como por la unión de TF, o por las modificaciones *in vitro* específicas, la inhibición de AT-III aumenta significativamente. Los polipéptidos FVIIa que son modificados para tener actividad intrínseca aumentada a menudo muestran aumentos simultáneos en la susceptibilidad la inhibición de AT-III. Por ejemplo, la modificación de uno o más aminoácidos en el bolsillo de activación de FVIIa, tal como por los reemplazos de aminoácido correspondientes a sustituciones de K337A, L305V, M298Q, V158 y E296V (con relación a la secuencia de FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3), resulta en sensibilidad aumentada del polipéptido FVIIa a AT-III inhibiendo así la actividad de FVIIa por hasta el 90% (Persson *et al.* (2001) PNAS 98:13583-13588). En otro ejemplo, la inducción a una conformación más parecida a zimogén por medio de la modificación de aminoácidos involucrado en una α-hélice de FVIIa, mientras que incrementa la actividad de la proteína de FVIIa modificada, también aumenta su susceptibilidad a AT-III (Persson *et al.* (2004) Biochem J 379:497-503).

Modificaciones para efectuar una mayor resistencia a AT-III

Las modificaciones pueden ser hechas a un polipéptido FVII que incrementa su resistencia para la inhibición por AT-III. Generalmente, dichos polipéptidos FVII modificados retienen al menos una actividad de un polipéptido FVII. Típicamente, dichas modificaciones incluyen una o más sustituciones de aminoácido en cualquier posición del polipéptido FVII que están involucrados directamente en la interacción de FVIIa (o el complejo TF/FVIIa) con AT-III o en

otros residuos que afectan la posición o conformación de residuos que están directamente involucrados en interacciones entre FVIIa (o el complejo TF/FVIIa) y AT-III. Los polipéptidos FVII modificados que tienen resistencia aumentada para AT-III pueden exhibir una reducción en la medida de inhibición bajo condiciones específicas o en la constante de tasa de segundo orden para la inhibición por AT-III por al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más comparado con la medida de inhibición o la constante de tasa de segundo orden para la inhibición de polipéptido FVII tipo salvaje o no modificado bien sea *in vivo, ex vivo,* o *in vitro*. Los polipéptidos FVII modificados son por lo tanto resistentes a los efectos naturalmente inhibitorios de AT-III con respecto a iniciación de coagulación. Cuando se evalúa en un ensayo apropiado *in vitro* o *ex vivo*, o *in vivo*, tal como después de la administración a un sujeto de un terapéutico procoagulante, los polipéptidos FVII resistentes a AT-III modificados muestran actividad coagulante aumentada en comparación con los polipéptidos FVII no modificados.

Como se describe acá más adelante, una persona versada en la materia puede diseñar empírica o racionalmente los polipéptidos FVII modificados que muestran resistencia mejorada a AT-III. Dichos polipéptidos FVII modificados pueden ser probados en ensayos conocidos para los expertos en la materia para determinar si dichos polipéptidos FVII modificados muestran resistencia aumentada a la AT-III. Por ejemplo, la constante de tasa de segundo orden de inhibición por AT-III puede ser medida por dichos polipéptidos FVIIa

modificados. Generalmente, un polipéptido FVII modificado que tiene resistencia aumentada a la AT-III exhibirá unión reducida bajo condiciones específicas (por ejemplo, después de la inyección de una cantidad fija de proteína en un paciente) y/o inhibición reducida por AT-III. Típicamente, dichos ensayos son llevados a cabo en un a forma de cadena doble de FVII, tal como la forma activada de FVII (FVIIa). Además, en ensayos para determinar los efectos de la AT-III son generalmente desarrollados en la presencia de heparina y la presencia de factor de tejido, aunque dichos ensayos también pueden ser llevados a cabo en la ausencia de uno o ambos cofactores.

Los polipéptidos FVII modificados que tienen resistencia aumentada para la AT-III pueden exhibir una reducción en la medida de la inhibición bajo condiciones específicas o en la constante de tasa de segundo orden para la inhibición por AT-III por al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con la medida de inhibición o la constante de tasa de segundo orden para la inhibición de polipéptido FVII no modificado o de tipo salvaje bien sea *in vivo* o *in vitro*. Dichos polipéptidos FVII modificados resultantes que tienen resistencia aumentada para la AT-III pueden exhibir una reducción en la unión y/o afinidad para AT-III por al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con la unión y/o afinidad del polipéptido FVII no modificado o tipo salvaje bien sea *in vivo* o *in vitro*. La resistencia aumentada a la AT-III por

dichos polipéptidos FVII modificados también pueden ser manifestados como actividad de coagulación aumentada en la presencia de AT-III. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados de AT-III puede ser aumentada por al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o de tipo salvaje bien sea *in vivo, ex vivo* o *in vitro*.

2. Unión a Plaquetas Activadas

Las modificaciones también pueden ser hechas a un polipéptido FVII que aumenta su actividad de coagulación durante la iniciación de coagulación dependiente de TF y/o independiente de TF. Este mecanismo propuesto de iniciación de coagulación independiente de TF involucra la activación directa de FX y FIX por FVIIa (que no está en un complejo con TF), el cual es efectuado en la superficie de una plaqueta activada. El FVIIa se une a las plaquetas activadas a través de una interacción entre los residuos en el dominio Gla del polipéptido FVIIa, y fosfatidilserinas y otros fosfolípidos cargados negativamente expresados en la superficie de la plaqueta. Esta interacción es relativamente débil, y probablemente no juega un papel significativo en la ráfaga inicial de producción de trombina normalmente observada durante la coagulación, la cual es muy probablemente un resultado la actividad dependiente de TF. Como se discutió anteriormente, la iniciación independiente de TF de coagulación y la interacción relativamente débil de FVIIa con la

superficie de plaqueta podría contar para el requerimiento para la administración altas dosis de rFVIIa para lograr la eficacia en la clínica. Por ejemplo, únicamente aproximadamente 1% del 10nM FVII en el plasma está presente como TF/FVIIa, pero la dosis terapéutica de rFVIIa es 90 μg/kg o aproximadamente 50nM en plasma, muy por encima de este nivel. Por lo tanto, las latas dosis de rFVIIa compensan por la unión de afinidad baja de rFVIIa a las plaquetas activadas, que resulta en la actividad de coagulación suficiente del terapéutico durante el tratamiento. Por lo tanto, de interés terapéutico son los polipéptidos FVII modificados que pueden ser administrados como dosis menores debido a la unión aumentada y/o afinidad para las plaquetas activadas, suficiente para llevar a cabo la iniciación de la coagulación. Los polipéptidos FVII modificados acá suministrados son diseñados para exhibir unión y/o afinidad aumentada para las plaquetas activadas a través de la modificación del dominio Gla.

La interacción de residuos en el dominio Gla γ-carboxilatado de proteínas de plasma dependientes de vitamina K, tales como FVII, FIX, FX, protrombina, proteína C y proteína S, fosfolípidos cargados negativamente en la superficie de membrana es importante para la hemostasia. Los dominios Gla de las proteínas de plasma dependientes de vitamina K típicamente contienen aproximadamente 45 aminoácidos, de los cuales 9 a 12 residuos de ácido glutámico son post-translacionalmente modificados por la carboxilación dependiente de vitamina K para formar γ-carboxiglutamato (Gla). Los aminoácidos que forman el dominio Gla están posicionados inmediatamente

después de aquellos que forman el péptido señal y propéptido de las proteínas, y son por lo tanto situados en el término N seguido al procesamiento y ruptura de los polipéptidos precursores a las proteínas maduras. Por ejemplo, los aminoácidos que forman el dominio Gla en FVII están en las posiciones 39-83 del polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO:1, posiciones 61-105 del polipéptido precursor establecido en la SEQ ID NO:2, y posiciones 1 a 45 del polipéptido maduro establecido en la SEQ ID NO:3. De estos, los residuos de ácido glutámico 10 en las posiciones E6, E7, E14, E19, E20, E25, E26, E29 y E35 del polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3 son modificados por la carboxilación para generar residuos de γ-carboxiglutamato (Gla).

Debido a que el ácido glutámico es sólo un quelante de Ca^{2+} débil y el γ-carboxiglutamato es uno mucho más fuerte, este paso de modificación por la carboxilasa de vitamina K incrementa significativamente la afinidad de unión del Ca^{2+} del dominio Gla de la proteína. El calcio también se une al dominio de proteasa de FVIIa, donde este facilita los cambios conformacionales requeridos para la actividad óptima. A través de la unión a sitios en ambos dominios Gla y de proteasa de FVIIa, el calcio mejora la unión a TF y fosfolípidos así como la eficiencia catalítica para la activación de FX. El dominio Gla γ-carboxilatado une siete iones Ca^{2+} con afinidad variable, lo cual induce el cambio conformacional que habilita el dominio Gla para interactuar con el dominio C-terminal de TF. La unión de Ca^{2+} también promueve la interacción de FVIIa con fosfolípidos cargados negativamente en la membrana de plaqueta, cuya masa

son fosfatidilserinas. La fosfatildiserina (PS) es un componente clave en la membrana negativamente cargada que soporta la coagulación sanguínea. En la mayoría de las células, la PS está presente en la hojuela interior de la membrana celular, y por lo tanto no está expuesta al plasma. Los procesos celulares específicos, tales como activación de plaquetas, resulta en translocación de PS a la superficie exterior orientada al plasma, que presenta un sitio de unión para el dominio de Gla de proteínas dependientes de vitamina K (Hemker *et al.* (1983) Blood Cells 9:303-317).

Adicional a su involucramiento en las interacciones de FVIIa con TF y plaquetas activadas, el dominio Gla de FVIIa también está implicado en la unión y activación de FX. Esto puede ser a través de un mecanismo indirecto, en el cual el dominio Gla de FVIIa ayuda a linear Lys^{165} y Lys^{166} de TF con el dominio Gla de FX, un paso importante en la activación de FX a FXa. Alternativamente, el dominio Gla de FVIIa interactúa directamente con el dominio Gla de FX para alinear correctamente la enzima y el sustrato antes de la activación (Neuenschwander *et al.* (1994) J Biol Chem 269:8007-8013, Huang *et al.* (1996) J Biol Chem 271:21752-21757). La arginina en la posición 36 del FVIIa ha sido mostrada para ser importante para el acoplamiento efectivo del dominio Gla de FX en la ausencia de fosfolípidos, demostrando que el dominio Gla de FVIIa participa en las interacciones de proteína-proteína con FX (Ruf *et al.* (1999) Biochemistry 38:1957-1966).

Aunque los dominios Gla de las diferentes proteínas de plasma dependientes de vitamina K muestran homología dignificante, ellas se unen a

las membranas de fosfolípidos cargados negativamente con afinidad muy diferente, con constantes de disociación (K_d's) que varían por más de 1000 dobleces. El FVII humano muestra una de las afinidades más bajas para las membranas de fosfolípidos entre estas proteínas (McDonald *et al.* (1997) Biochemistry 36:5120-5127). Las interacciones precisas responsables de la unión del dominio Gla al PS no son completamente entendidas, aunque parece que los residuos de aminoácido individuales dentro de este dominio contribuyen a las afinidades diferentes observadas. Estudios tempranos indicaron que hubo una correlación entre los aminoácidos en las posiciones 10, 32 y 33 (con relación a la proteína de FVII madura) y afinidad total de membrana (McDonal *et al,* (1997) Biochemistry 36:5120-5127). El análisis de la mutación subsecuente también ha revelado que los residuos específicos contribuyen a la afinidad de unión. Por ejemplo, el reemplazo de la histidina en la posición 10 de la forma madura de proteína C con una prolina resultó en una reducción de 3 dobleces en la afinidad de membrana (Shen *et al.* (1997) Biochemistry 36:16025-16031). Inversamente, la mutación de residuos específicos en el dominio Gla de las proteínas de plasma dependientes de vitamina K puede producir las proteínas con afinidad de membrana mayor, y funciones mejoradas. Los efectos de la mutación en ciertas posiciones dentro del dominio Gla, sin embargo, no son necesariamente conservados entre las diferentes proteínas. Por ejemplo, la mutación de proteína C bovina por sustitución de Q32E y N33D medió un incremento amplio en la unión de membrana, mientras que las mutaciones correspondientes en la proteína C de

humano mostraron cambios mínimos en la unión. La mutación análoga de FVII humano (K32E) resultó en un incremento de 13 dobleces en la afinidad de unión en comparación con la proteína de FVII de tipo salvaje (Harvey *et al.* (2003) J Biol Chem 278:8363-8369).

a. Modificación por medio de la introducción de un dominio Gla heterólogo

Debido a su afinidad a la unión relativamente baja para las plaquetas activadas, el dominio Gla de FVII es un objetivo para la modificación, con el propósito de mejorar la interacción entre el FVII modificado y la membrana de fosfolípidos, incrementando así la actividad de coagulación. La modificación puede ser efectuada por la sustitución de aminoácidos específicos que están involucrados en esta interacción (ver por ejemplo, Shah *et al.* PNAS 95: 4429-4234, Harvey *et al.* (2003) J Biol Chem 278:8363-8369). Alternativamente, la modificación puede ser efectuada por medio de la sustitución de todo el dominio Gla con el dominio Gla de otra proteína dependiente de vitamina K, es decir, un intercambio de dominio Gla. Este tipo de modificación resulta en una proteína quimérica, tal como aquella que resultó cuando el dominio Gla de proteína C fue reemplazado con el dominio Gla de FVII (Geng *et al.* (1997) Thromb Haemost 77:926-933).

Típicamente, dicha modificación incluye la introducción, tal como por adición o sustitución, de un dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo para efectuar la unión de fosfolípidos en una región del polipéptido FVII para generar un polipéptido FVII modificado quimérico. Generalmente, dicho

polipéptido FVII quimérico retiene al menos una actividad de FVII. La unión y/o afinidad de polipéptidos FVII de Gla modificado para las plaquetas activadas puede ser aumentada por al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con la unión y/o afinidad del polipéptido FVII no modificado o tipo salvaje bien sea *in vivo* o *in vitro*. La unión y/o afinidad por las plaquetas activadas por los polipéptidos FVII modificados también puede ser manifestado como actividad de coagulación aumentada. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados de Gla puede ser aumentada por al menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o tipo salvaje bien sea *in vivo* o *in vitro*.

Un dominio Gla, o una porción suficiente del mismo, contenido dentro de cualquier polipéptido puede ser utilizado como una fuente de un dominio Gla heterólogo para la introducción o reemplazo de una región de un polipéptido FVII. Típicamente, dicho dominio Gla heterólogo exhibe afinidad de unión para fosfolípidos, por ejemplo, fosfolípidos presentes en la superficie de una plaqueta activada. Generalmente, la selección de un dominio Gla heterólogo es una en la cual se exhiba afinidad más alta por fosfolípidos en comparación con la afinidad del dominio Gla de FVII. El dominio Gla exacto, o una porción suficiente del mismo, utilizado como un dominio heterólogo para la modificación de un polipéptido FVII puede ser racionalmente o empíricamente determinado.

Los ejemplos de otros polipéptidos que contienen Gla incluyen, pero no se limitan a, FIX, FX, protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína Gla de matriz, proteína 6 específica de detención del crecimiento (Gas6), y proteína Z. Los dominios Gla de estas proteínas ejemplares se establecen en cualquiera de las SEQ ID NOS:110-118, 120 y 121. Por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o más aminoácidos contiguos, o el dominio Gla completo, de un dominio Gla heterólogo que puede ser introducido en un polipéptido FVII. Adicionalmente, la introducción del dominio Gla en un polipéptido FVII también puede incluir aminoácidos adicionales que no son parte del dominio Gla del polipéptido heterólogo siempre y cuando los aminoácidos adicionales no debiliten significativamente la habilidad de unión de fosfolípidos del dominio Gla introducido.

En algunos ejemplos, la introducción es por medio de la adición del dominio Gla al polipéptido FVII de modo tal que el dominio Gla heterólogo es insertado en el dominio Gla endógeno o en otra región o dominio del polipéptido FVII siempre y cuando el polipéptido FVII modificado retenga al menos una actividad del FVII. En dichos ejemplos, el dominio Gla nativo del polipéptido FVII es retenido en el polipéptido, aunque en algunos casos la secuencia de aminoácido que hace el dominio Gla nativo es interrumpida. En otros ejemplos, el dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo, es insertado adyacente a, bien sea en el término N o C, del dominio Gla nativo de modo tal que el dominio Gla nativo no es interrumpido. En un ejemplo

adicional, el dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo, es insertado en otro dominio del polipéptido FVII.

Acá también se suministran los polipéptidos FVII de dominio Gla modificado donde todo o una porción contigua del dominio Gla endógeno de FVII es removido con un dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo para efectuar la unión de fosfolípidos, siempre y cuando el polipéptido FVII modificado retenga al menos una actividad de FVII. Dicha modificación también es referida como intercambio de dominio Gla. Por ejemplo, todo o una porción del dominio Gla de FVII, tal como se establece en la SEQ ID NO:119, que corresponde a los aminoácidos 1-45 de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:3, puede ser removida de un polipéptido FVII y reemplazado con un dominio Gla heterólogo, o una porción suficiente del mismo. La porción heteróloga incluye cualquier dominio Gla conocido para el experto en la materia que une a fosfolípidos, incluyendo, pero no limitado a, un dominio Gla que tiene la secuencia de amino ácidos establecidos en cualquiera de las SEQ ID NOS: 110-118, 120 y 121. En algunos casos, una porción suficiente de un dominio Gla, tal como una porción suficiente de cualquiera de las SEQ ID NO:110-118, 120 y 121 para efectuar la unión de fosfolípidos, puede reemplazas el dominio Gla endógeno, o una porción del dominio Gla endógeno, de FVII. Por ejemplo, el dominio Gla de FVII puede ser intercambiado con el dominio Gla de la Proteína C establecida en la SEQ ID NO:113. El polipéptido FVII modificado resultante contiene un dominio Gla de la proteína C seguida por su propia dominio de EGF-1, EGF-2 y serina proteasa.

En algunos ejemplos, el dominio Gla heterólogo contiene mutaciones que además efectúan la unión aumentada para las plaquetas activadas, debido la unión aumentada de fosfolípidos. Por ejemplo, si el dominio Gla de la proteína C es introducido para generar un polipéptido FVII modificado, el dominio Gla de la proteína C puede contener mutaciones de aminoácido que confieren unión aumentada a fosfolípidos.

En otros ejemplos, el dominio Gla heterólogo puede contener mutaciones adicionales que confieren funciones similares a FVII al dominio Gla. Por ejemplo, como se notó anteriormente, el R36 del dominio Gla de FVII establecido en la SEQ ID NO:119 puede estar involucrado en las interacciones con FX. Así, el dominio Gla heterólogo puede contener modificaciones adicionales, tales como cualquiera requerida para mantener una arginina en la posición 36 del polipéptido FVII maduro, como se establece en la SEQ ID NO:3, o cualquier otra modificación requerida para mantener las propiedades de activación de FX del polipéptido FVII modificado (Ruf *et al.* (1999) Biochem 38:1957-1966). Por lo tanto, en algunos ejemplos, una mutación que corresponde a R36 puede ser hecha en el dominio Gla heterólogo. La posición correspondiente puede ser determinada por una persona versada en la materia, tal como mediante la alineación de secuencias de aminoácidos.

Como se describió acá anteriormente, un experto en la materia puede empírica o racionalmente diseñar polipéptidos FVII modificados que contienen un dominio Gla heterólogo de modo tal que el polipéptido FVII resutante retiene al menos una actividad de FVII. Típicamente, dichos polipéptidos FVII

modificados retienen su habilidad para unir y activar FX. En algunos casos, dichos polipéptidos FVII modificados también retienen su habilidad para unir y activar FIX. Los polipéptidos FVII modificados de Gla incluyen aquellos que retienen su habilidad para unirse a TF. Los polipéptidos FVII modificados de Gla intercambiado también incluyen aquellos que tienen actividad intrínseca aumentada en la ausencia de TF: Así, los polipéptidos FVII modificados de Gla resultantes incluyen aquellos que no unen TF o que unen TF de forma pobre en comparación con el FVIIa de tipo salvaje. Típicamente, dichos polipéptidos FVII modificados muestran una unión a fosfolípidos aumentada. En particular, dichos polipéptidos FVII modificados exhiben una unión aumentada a la fosfatidilserina. La unión aumentada a fosfolípidos puede ser ensayada en fosfolípidos aislados o en la superficie de las plaquetas activadas. Dichos ensayos son típicamente llevados a cabo en una forma de cadena doble de FVII, tal como la forma activada de FVII (FVIIa).

Acá se suministran polipéptidos FVII modificados que contienen un dominio Gla heterólogo. Los ejemplos de dichos polipéptidos FVII modificados son aquellos en los cuales el dominio Gla heterólogo es reemplazado con todo o una porción del dominio Gla de cualquiera de FIX (SEQ ID NO:110), FX (SEQ ID NO:111), trombina (SEQ ID NO:112), proteína C (SEQ ID NO:113) o proteína S (SEQ ID NO:114). Dichos polipéptidos FVII modificados pueden exhibir unión aumentada a las plaquetas activadas, resultando en una actividad coagulante aumentada. La Tabla 7 establece modificaciones ejemplares que pueden ser hechas a un polipéptido FVII para reemplazar el dominio Gla

endógeno con aquel de FIX, FX, proteína C, proteína S o trombina. La tabla proporciona el nombre de la modificación (por ejemplo Gla Intercambio FX) y los detalles de la modificación, incluyendo las posiciones de aminoácido en las cuales el dominio Gla exógeno es insertado en el polipéptido FVII, y la secuencia del dominio Gla exógeno. El identificador de secuencia (SEQ ID NO) también se proporciona en el cual las secuencias de aminoácido ejemplares del polipéptido FVII modificado son establecidas, y también cualquier número de identificación de polipéptido. Por ejemplo, la modificación “Gla Intercambio FIX” (A1Y44delinsYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWK QY) involucra la eliminación del dominio Gla endógeno mediante la eliminación de los residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII modificado maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de residuos de aminoácido 45 que corresponden a los residuos de aminoácido Y1 a Y45 del dominio Gla establecido en la SEQ ID NO:110. De forma similar, la modificación Gla Intercambio FX involucra la eliminación de residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de residuos de aminoácido 44 que corresponden a A1 a Y44 del dominio Gla FX establecido en la SEQ ID NO:111. La modificación Gla Intercambio Trombina involucra la eliminación de residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de residuos de aminoácido 44 que corresponde a los residuos de aminoácido Y1 a Y44 del dominio Gla de Trombina establecido en la SEQ ID NO:112. La

modificación Gla Intercambio Proteína C involucra la eliminación de residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de residuos de aminoácido 44 que corresponde a los residuos de aminoácido A1 a H44 del dominio Gla de Proteína C establecido en la SEQ ID NO:113. La modificación Gla Intercambio Proteína S involucra la eliminación de residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de residuos de aminoácido 44 que corresponde a los residuos de aminoácido Y1 a Y44 del dominio Gla de Proteína S establecido en la SEQ ID NO:114.

Tabla 7

Nombre de la Modificación	Numeración de la Modificación – FVII maduro	Numeración de la Modificación - quimotripsina	No. De ID de poli-péptido	SEQ ID NO
Gla Intercambio FIX	A1Y44delinsYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQY	A[1]Y[44]delinsYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQY	CB728	236
Gla Intercambio FX	A1Y44delinsANSFLEEMKKGHLERECMEETCSYEEAREVFEDSDKTNEFWNKY	A[1]Y[44]delinsANSFLEEMKKGHLERECMEETCSYEEAREVFEDSDKTNEFWNKY	CB729	237
Gla Intercambio	A1Y44delinsANSFLEELRHSS	A[1]Y[44]delinsANSFLEELR	CB730	238
Prot C	LERECIEEICDFEEAKEIFQNVDDTLAFWSKH	HSSLERECIEEICDFEEAKEIFQNVDDTLAFWSKH		
Gla Intercambio Prot S	A1Y44delinsANSLLEETKQGNLERECIEELCNKEEAREVFENDPETDYFYPKY	A[1]Y[44]delinsANSLLEETKQGNLERECIEELCNKEEAREVFENDPETDYFYPKY	CB731	239
Gla Intercambio Trombina	A1Y44delinsANTFLEEVRKGNLERECVEETCSYEEAFEALESSTATDVFWAKY	A[1]Y[44]delinsANTFLEEVRKGNLERECVEETCSYEEAFEALESSTATDVFWAKY	CB732	240

Los polipéptidos FVII modificados que contienen un dominio Gla heterólogo pueden exhibir actividad coagulante aumentada en dosis más bajas en comparación con una molécula de FVII de tipo salvaje, tal como NovoSeven®, debido a la unión y/o afinidad aumentada para las plaquetas

activadas. La actividad de coagulación de los polipéptidos FVII modificados de Gla puede ser aumentada por al menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con la actividad de coagulación del polipéptido FVII no modificado o tipo salvaje bien sea *in vivo, ex vivo* o *in vitro*.

3. Combinaciones y Modificaciones Adicionales

Adicional a la modificación de los polipéptidos FVII para tener resistencia a TFPI aumentada, resistencia aumentada a AT-III, actividad catalítica aumentada dependiente de TF y/o independiente de TF, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media aumentada, y/o afinidad y/o unión aumentada para membranas de fosfolípidos, los polipéptidos FVII modificados acá suministrados también incluyen aquellos que exhiben más de una de las propiedades anteriormente mencionadas. Por ejemplo, un polipéptido FVII puede ser modificado de modo tal que el polipéptido resultante muestra unión y/o afinidad aumentada para fosfolípidos y también muestra resistencia incrementada a TFPI. De acuerdo con esto, un polipéptido FVII puede ser modificado por la introducción de un dominio Gla heterólogo de otra proteína de plasma dependiente de vitamina K y por sustitución de uno o más de los aminoácidos en las posiciones 196, 197, 199, 237, 239, 290 o 342 con relación al polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3.

Además, cualquier polipéptido FVII modificado suministrado acá también puede contener una o más modificaciones descritas en el arte. Típicamente,

dichas modificaciones adicionales son aquellas que resultan por si solas en una actividad coagulante aumentada del polipéptido modificado y/o estabilidad aumentada del polipéptido. De acuerdo con esto, los polipéptidos FVII modificados resultantes exhiben una actividad coagulante aumentada. Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, cualquier sustitución, supresión o inserción de aminoácido conocida en el arte, típicamente cualquiera que aumente la actividad y/o estabilidad coagulante del polipéptido FVII. Cualquier polipéptido FVII modificado suministrado acá puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más modificaciones adicionales de aminoácido, siempre y cuando el polipéptido FVII modificado retenga una actividad FVII del polipéptido tipo salvaje o no modificado.

En un ejemplo, la modificación adicional puede ser hecha a la secuencia de polipéptido FVII de modo tal que su interacción con otros factores, moléculas y proteínas se altera. Por ejemplo, los residuos de aminoácido que están involucrados en la interacción con el factor de tejido (TF) pueden ser reemplazados de modo tal que la afinidad del polipéptido FVII modificado para el TF se aumenta. Otras modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificación de aminoácidos que están involucrados en interacciones con el factor X, factor IX, TFPI y AT-III.

Las modificaciones adicionales también pueden ser hechas a un polipéptido FVII modificado acá suministrado que altera la conformación o doblez del polipéptido. Estos incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más

aminoácidos con una cisteína de modo tal que una nueva unión de disulfuro se forma, o modificaciones que estabilizan una conformación de hélice α, impartiendo así la actividad aumentada al polipéptido FVII modificado.

Las modificaciones adicionales también pueden ser hechas al polipéptido FVII para llevar a cabo las modificaciones postranslacionales. Por ejemplo, el polipéptido puede ser modificado para incluir sitios de glicosilación adicionales de modo tal que el polipéptido FVII modificado resultante tiene glicosilación aumentada en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Las modificaciones también pueden ser hechas para introducir residuos de aminoácido que puedan ser subsecuentemente vinculadas a una porción química, tal como una que actúa para aumentar la estabilidad del polipéptido FVII modificado. Un polipéptido FVII también puede ser alterado mediante la modificación de los sitios de ruptura potenciales para las proteasas endógenas, disminuyendo así la degradación del variante de FVIIa y aumentando la estabilidad del polipéptido FVII modificado.

Adicionalmente, las sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos pueden ser hechas en el dominio Gla endógeno o heterólogo de modo tal que el polipéptido FVII modificado muestra unión y/o afinidad aumentada por las membranas de fosfolípidos. En otros ejemplos, los polipéptidos FVII modificados acá suministrados pueden mostrar eliminaciones en lel dominio Gla endógeno, o sustituciones en las posiciones que son normalmente gama-carboxiladas (US20070037746).

Las siguientes secciones describen ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en el arte para efectuar la estabilidad y/o actividad coagulante mejorada de un polipéptido FVII. Como se discutió anteriormente, dichas modificaciones también pueden ser incluidas adicionalmente en cualquier polipéptido FVII modificado acá suministrado. Las posiciones de aminoácido que se relacionan más adelante corresponden al polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3. Las mutaciones correspondientes pueden ser hechas en otros polipéptidos FVII, tales como variantes alélicas, especies o empalmes del polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3.

a. Modificaciones que aumentan la actividad intrínseca

En un ejemplo, modificaciones adicionales pueden hechas al polipéptido factor VII modificado acá suministrado que resulta en actividad catalítica aumentada hacia el factor X y/o factor IX. Por ejemplo, las modificaciones pueden ser hechas a los aminoácidos que están involucrados en la interacción con su cofactor, TF, de modo tal que el polipéptido FVII modificado resultante tiene afinidad aumentada para TF, y por lo tanto muestra actividad aumentada hacia FX y/o FIX. Las modificaciones también pueden ser hechas al bolsillo de activación del polipéptido FVII, de modo tal que la actividad intrínseca del polipéptido FVII modificado hacia FX y/o FIX se aumenta en comparación con la actividad del polipéptido no modificado. Otra estrategia de modificación que resulta en actividad aumentada involucra la modificación del polipéptido FVII de modo tal que el doblez y conformación de la proteína se altera a una forma más

activa o un equilibrio entre conformaciones altamente activas e inactivas (o menos activas) se cambia en favor de las conformaciones altamente activas. Un polipéptido más activo también puede ser logrado por medio de la modificación de los aminoácidos involucrados en las cadenas β del polipéptido FVII. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácido pueden ser hechas para introducir nuevos pares de cisteína que pueda formar nuevas uniones de disulfuro el cual funciona para “bloquear” al polipéptido FVII modificado en una forma más activa.

Los ejemplos de modificaciones adicionales que pueden ser incluidas en los polipéptidos FVII modificados suministrados acá para aumentar la actividad intrínseca del polipéptido FVII modificado incluyen, pero no se limitan a, aquellas descritas en Persson *et al.* (2004) Biochem J. 379:497-503, Maun *et al.* (2005) Prot Sci 14:1171-1180, Persson *et al.* (2001) PNAS 98:13583-13588, Persson *et al.* (2002) Eur J Biochem 269:5950- 5955, Soejima *et al.* (2001) J Biol Chem 276:17229-17235, Soejima *et al.* (2002) J Biol Chem 277:49027-49035, WO200183725, WO2002022776, WO2002038162, WO2003027147, WO200338162, WO2004029090, WO2004029091, WO2004108763 y WO2004111242. Los ejemplos no limitantes de las modificaciones ejemplares de aminoácido descritas en el arte que pueden resultar en actividad intrínseca aumentada del polipéptido FVII modificado incluyen cualquiera de S278C/V302C, L279C/N301C, V280C/V301C, S281C/V299C, S314E, L39E, L39Q, L39H, I42R, S43Q, S53N, K62E, K62R, K62D, K62N, K62Q, K62T, L65Q, L65S, F71D, F71Y, F71E, F71Q, F71N, P74S, P74A, A75E, A75D,

E77A, E82Q, E82N, T83K, El 16D, K157V, K157L, K157I, K157M, K157F, K157W, K157P, K157G, K157S, K157T, K157C, K157Y, K157N, K157E, K157R, K157H, K157D, K157Q, V158L, V158I, V158M, V158F, V158W, V158P, V158G, V158S, V158T, V158C, V158Y, V158N, V158E, V158R, V158K, V158H, V158D, V158Q, A274M, A274L, A274K, A274R, A274D, A274V, A274I, A274F, A274W, A274P, A274G, A274T, A274C, A274Y, A274N, A274E, A274H, A274S, A274Q, F275H, E296V, E296L, E296I, E296M, E296F, E296W, E296P, E296G, E296S, E296T, E296C, E296Y, E296N, E296K, E296R, E296H, E296D, E296Q, M298Q, M298V, M298L, M298I, M298F, M298W, M298P, M298G, M298S, M298T, M298C, M298Y, M298N, M298K, M298R, M298H, M298E, M298D, R304Y, R304F, R304L, R304M, L305V, L305Y, L305I, L305F, L305A, L305M, L305W, L305P, L305G, L305S, L305T, L305C, L305N, L305E, L3O5K, L305R, L305H, L305D, L305Q, M306D, M306N, D309S, D309T, S314A, S314V, S3141, S314M, S314F, S314W, S314P, S314G, S314L, S314T, S314C, S314Y, S314N, S314E, S314K, S314R, S314H, S314D, S314Q, D334G, D334E, D334A, D334V, D334I, D334M, D334F, D334W, D334P, D334L, D334T, D334C, D334Y, D334N, D334K, D334R, D334H, D334S, D334Q, S336G, S336E, S336A, S336V, S336I, S336M, S336F, S336W, S336P, S336L, S336T, S336C, S336Y, S336N, S336K, S336R, S336H, S336D, S336Q, K337L, K337V, K337I, K337M, K337F, K337W, K337P, K337G, K337S, K337T, K337C, K337Y, K337N, K337E, K.337R, K337H, K337D, K337Q, F374P, F374A, F374V, F374I, F374L, F374M, F374W, F374G, F374S, F374T, F374C, F374Y, F374N, F374E, F374K, F374R,

F374H, F374D, F374Q, y sustituciones de las posiciones 300-322, 305-322, 300-312, o 305-312 con los aminoácidos correspondientes de tripsina, trombina o FX, y sustituciones de las posiciones 310-329, 311-322 o 233-329 con los aminoácidos correspondientes de tripsina.

b. Modificaciones que aumentan la resistencia a proteasas

Los polipéptidos FVII modificados acá suministrados también pueden contener modificaciones adicionales que resultan en resistencia aumentada del polipéptido a proteasas. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácido pueden ser hechas para remover uno o más sitios potenciales de ruptura proteolítica. Los polipéptidos FVII modificados pueden así estar hechos más resistentes a proteasas, incrementando así la estabilidad y vida media al polipéptido modificado.

Los ejemplos de modificaciones adicionales que pueden ser incluidas en los polipéptidos FVII modificados acá suministrados para aumentar la resistencia a proteasas incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en la Patente de Estados Unidos No. US5580560 o en las Solicitudes Internacionales Publicadas Nos. WO1988010295 y WO2002038162. Los ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en el arte que pueden resultar en resistencia aumentada del polipéptido FVII modificado a los inhibidores y/o proteasas incluyen uno o más de: K32Q, K32E, K32G, K32H, K32T, K32A, K32S, K38T, K38D, K38L, K38G, K38A, K38S, K38N, K38H, I42N, I42S, I42A, I42Q, Y44N, Y44S, Y44A, Y44Q, F278S, F278A, F278N,

F278Q, F278G, R290G, R290A, R290S, R290T, R290K, R304G, R304T, R304A, R304S, R304N, R315G, R315A, R315S, R315T, R315Q, Y332S, Y332A, Y332N, Y332Q, Y332G, K341E, K341Q, K341G, K341T, K341A y K341S.

c. Modificaciones que aumentan la afinidad por fosfolípidos

La actividad coagulante de FVII puede ser mejorada por el aumento de la unión y/o afinidad del polipéptido por los fosfolípidos, tal como aquellos expresados en la superficie de las plaquetas activadas. Por ejemplo, las sustituciones adicionales de aminoácido pueden ser hechas en posiciones particulares en el dominio Gla endógeno de un polipéptido FVII que resulta en un polipéptido FVII modificado con habilidad aumentada para unir fosfatidilserina y otros fosfolípidos cargados negativamente. Por lo tanto, dichas modificaciones también pueden ser incluidas en un polipéptido FVII modificado suministrado acá, dichos polipéptidos FVII modificados poseen un dominio Gla endógeno, es decir, no han sido todavía sujetos a modificación que resulta en la sustitución del dominio Gla endógeno con otra proteína dependiente de vitamina K.

Los ejemplos de modificaciones adicionales para aumentar la unión y/o afinidad de fosfolípidos y que pueden ser hechas a un polipéptido FVII modificado acá suministrado que contiene un dominio Gla endógeno, incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Harvey *et al.* (2003) J Biol Chem 278:8363-8369, US20030100506, US20040220106, US20060240526,

US6017882, US6693075, US6762286, WO200393465 y WO2004111242. Ejemplos de dichas modificaciones incluyen uno o más de; una inserción de una tirosina en la posición 4, o modificación de uno o más de P10Q, P10E, P10D, P10N, R28F, R28E, K32E, K32D, D33F, D33E, D33K A34E, A34D, A34I, A34L, A34M, A34V, A34F, A34W, A34Y, R36D, R36E, K38E y K38D.

d. Modificaciones que alteran la glicosilación

La alteración de los niveles de glicosilación de una proteína ha sido descrita en el arte como un medio parea reducir la inmunogenicidad, aumentar estabilidad, reducir la frecuencia de la administración y/o reducir los efectos secundarios adversos tales como inflamación. Normalmente, esto es llevado a cabo por el aumento de los niveles de glicosilación. Los sitios de glicosilación suministran un sitio para la unión de una porción de carbohidrato en el polipéptido, de modo tal que cuando el polipéptido es producido en una célula eucariótica capaz de la glicosilación, este es glicosilado.

Existen cuatro sitios de glicosilación que ocurren normalmente en el FVII; dos sitios de N-glicosilación en N145 y N322, y dos sitios de O-glicosilación en S52 y S60, que corresponden a las posiciones de aminoácido en el polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3. En una modalidad, las modificaciones adicionales pueden ser hechas a un polipéptido FVII modificado suministrado acá de modo tal que la glicosilación en los sitios anteriores se perturba. Esto puede resultar en un polipéptido FVII modificado con actividad coagulante aumentada (ver, por ejemplo, WO2005123916). Los ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en el arte que

pueden resultar en glicosilación reducida y actividad aumentada del polipéptido FVII modificado en comparación con un polipéptido FVII no modificado incluyen, pero no se limitan a; N145 Y, N145G, N145F, N145M, N145S, N145I, N145L, N145T, N145V, N145P, N145K, N145H, N145Q, N145E, N145R, N145W, N145D, N145C, N322Y, N322G, N322F, N322M, N322S, N322I, N322L, N322T, N322V, N322P, N322K, N322H, N322Q, N322E, N322R, N322W y N322C.

En otra modalidad, las modificaciones adicionales pueden ser hechas a la secuencia de aminoácido de los polipéptidos FVII modificados acá suministrado de modo tal que los sitios adicionales de glicosilación son introducidos, aumentando así el nivel de glicosilación del polipéptido FVII modificado en comparación con un polipéptido FVII no modificado. El sitios de glicosilación puede ser un sitio de glicosilación N-vinculado o O-vinculado. Los ejemplos de las modificaciones que pueden ser hechas a un polipéptido FVII que introduce uno o más nuevos sitios de glicosilación incluyen, pero no se limitan a, aquellos que son descritos en US6806063 y WO200393465. Los ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares descritas en el arte que pueden resultar en glicosilación aumentada del polipéptido FVII modificado en comparación con un polipéptido FVII no modificado incluyen, pero no se limitan a; F4S, F4T, P10N, Q21N, W41N, S43N, A51N, G58N, L65N, G59S, G59T, E82S, E82T, N95S, N95T, G97S, G97T, Y101N, D104N, T106N, K109N, G117N, G124N, S126N, T128N, A175S, A175T, G179N, I186S, I186T, V188N, R202S, R202T, I205S, I205T, D212N, E220N, I230N, P231N, P236N, G237N,

V253N, E265N, T267N, E270N, R277N, L280N, G291N, P303S, P303ST, L305N, Q312N, G318N, G331N, D334N, K337N, G342N, H348N, R353N, Y357N, I361N, V376N, R379N, M391N, K32N/A34S, K32N/A34T, F31N/D33S, F31N/D33T, I30N/K32S, I30N/K32T, A34N/R36S, A34N/R36T, K38N/F40S, K38N/F40T, T37N/L39S, T37N/L39T, R36N/K38S, R36N/K38T, L39N/W41 S, L39N/W41T, F40N/I42S, F40N/I42T, I42N/ Y44S, I42N/ Y44T, Y44N/D46S, Y44N/ D46T, D46N/D48S, D46N/D48T, G47N/Q49S, G47N/Q49T, K143N/ N145S, K143N/N145T, E142N/R144S, E142N/R144T, L141N/K143S, L141N/K143T, I140N/E142S/, I140N/E142T, R144N/A146S, R144N/A146T, A146N/K148S, A146N/K148T, S147N/P149S/, S147N/P149T, R290N/A292S, R290N/A292T, D289N/G291S, D289N/G291T, L288N/R290S, L288N/R290T, L287N/D289S, L287N/D289, A292N/A294S, A292N/A294T, T293N/L295S, T293N/L295T, R315N/V317S, R315N/V317T, S314N/ K316S, S314N/ K316T, Q313N/ R315S, Q313N/ R315T, K316N/G318S, K316N/G318T, V317N/D319S, V317N/D319T, K341 N/ D343S, K341N/ D343T, S339N/K341S, S339N/K341T, D343N/G345S, D343N/G345T, R392N/E394S, R392N/E394T, L390N/ R392S, L390N/ R392T, K389N/M391S, K389N/M391T, S393N/P395S, S393N/P395T, E394N/R396S, E394N/R396T, P395N/P397S, P395N/P397T, R396N/G398S, R396N/G398T, P397N/V399S, P397N/V399T, G398N/L400S, G398N/L400T, V399N/L401S, V399N/L401T, L400N/R402S, L400N/R402T, L401N/A403S, L401N/A403T, R402N/P404S, R402N/P404T, A403N/F405S, A403N/F405T, P404N/P406S y P404N/P406T.

e. Modificaciones para facilitar la vinculación deL grupo químico

Las modificaciones adicionales de un polipéptido FVII modificado acá suministrado también pueden ser hechas para facilitar la vinculación subsecuente de un grupo químico. Una o más sustituciones o inserciones de aminoácido pueden ser hechas de modo tal que un grupo químico puede ser vinculado a un polipéptido FVII modificado por medio del aminoácido sustituido. Por ejemplo, una cisteína puede ser introducida a un polipéptido FVII modificado, al cual se puede vincular una porción de polietilenglicol (PEG) para conferir estabilidad y vida media de suero aumentadas. Otros residuos de unión incluyen lisina, ácido aspártico y residuos de ácido glutámico. En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos son reemplazados para reducir el número de posiciones de vinculación potencial. Por ejemplo, el número de lisinas puede ser reducida. Los ejemplos de modificaciones que pueden ser hechas a la secuencia de aminoácido de un polipéptido FVII el cual puede facilitar la vinculación subsecuente con un grupo químico incluye, pero no se limita a, aquellos que se describen en US20030096338, US20060019336, US6806063, WO200158935 y WO2002077218. Los ejemplos no limitantes de modificaciones ejemplares de polipéptidos FVII que pueden facilitar la vinculación subsecuente con un grupo químico incluyen, pero no se limitan a; Q250C, R396C, P406C, I42K, Y44K, L288K, D289K, R290K, G291K, A292K, T293K, Q313K, S314K, R315K, V317K, L390K, M391K, R392K, S393K, E394K, P395K, R396K, P397K, G398K, V399K, L400K, L401K, R402K, A403K,

P404K, F405K, I30C, K32C, D33C, A34C, T37C, K38C, W41C, Y44C, S45C, D46C, L141C, E142C, K143C, R144C, L288C, D289C, R290C, G291C, A292C, S314C, R315C, K316C, V317C, L390C, M391C, R392C, S393C, E394C, P395C, R396C, P397C, G398C, V399C, L401C, R402C, A403C, P404C, I30D, K32D, A34D, T37D, K38D, W41D, Y44D, S45D, D46C, L141D, E142D, K143D, R144D, L288D, R290D, G291D, A292D, Q313D, S314D, R315D, K316D, V317D, L390D, M391D, R392D, S393D, P395D, R396D, P397D, G398D, V399D, L401D, R402D, A403D, P404D, 130E, K32E, A34E, T37E, K38E, W41E, Y44E, S45E, D46C, L141E, E142E, K143E, R144E, L288E, R290E, G291E, A292E, Q313E, S314E, R315E, K316E, V317E, L390E, M391E, R392E, S393E, P395E, R396E, P397E, G398E, V399E, L401E, R402E, A403E, P404E, K18R, K32R, K38R, K62R, K85R, K109R, K137R, K143R, K148R, K157R, K161R, K197R, K199R, K316R, K337R, K341R, K389R, K18Q, K32Q, K38Q, K62Q, K85Q, K109Q, K137Q, K143Q, K148Q, K157Q, K161Q, K197Q, K199Q, K316Q, K337Q, K341Q, K389Q, K18N, K32N, K38N, K62N, K85N, K109N, K137N, K143N, K148N, K157N, K161N, K197N, K199N, K316N, K337N, K341N, K389N, K18H, K32H, K38H, K62H, K85H, K109H, K137H, K143H, K148H, K157H, K161H, K197H, K199H, K316H, K337H, K341H y K389H.

f. Ejemplos de modificaciones de combinación

Acá se suministrar polipéptidos FVII modificados que tienen dos o más modificaciones diseñadas para afectar una o más propiedades o actividades de un polipéptido FVII no modificado. En algunos ejemplos, las dos o más

modificaciones alteran dos o más propiedades o actividades del polipéptidos FVII. Las modificaciones pueden ser hechas a los polipéptidos FVII de modo tal que una o más de resistencia a TFPI, resistencia a AT-III, actividad intrínseca, actividad amidolítica, activiada catalítica (en la presencia o ausencia de TF), unión y/o afinidad a fosfolípidos, glicosilación, resistencia a proteasas, vida media e interacción con y/o activación de otros factores o moléculas, tales como FX y FIX, es alterado. Típicamente, las dos o más modificaciones son combinadas de modo tal que el polipéptido FVII modificado resultante tiene actividad coagulante aumentada, duración reducida de la actividad de coagulación, y/o un índice terapéutico mejorado en comparación con un polipéptido FVII no modificado. El polipéptido FVIIa modificado puede exhibir un inicio más rápido de actividad coagulante bien sea *in vitro, ex vivo,* o *in vivo*. Las modificaciones pueden incluir sustitución, inserción o eliminación de aminoácido. La actividad coagulante mejorada, duración aumentada de actividad coagulante, inicio incrementado de actividad coagulante, y/o índice terapéutico mejorado del polipéptido FVII modificado que contiene dos o más modificaciones puede ser aumentada por al menos o aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 1 10%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 300%, 400%, 500%, o más en comparación con la actividad del polipéptido FVIIa iniciador o no modificado.

Acá se suministran polipéptidos FVII modificados que contienen dos o más modificaciones que son introducidas en un polipéptido FVII no modificado

para alterar dos o más actividades o propiedades. Los polipéptidos FVII modificados pueden contener 2, 3, 4, 5, 6 o más modificaciones. Además, cada modificación puede involucrar uno o más residuos de aminoácido. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede contener dos modificaciones cada una de las cuales es una sustitución simple de aminoácido. En otro ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede contener dos modificaciones, una de las cuales es una sustitución simple de aminoácido y la otra involucra la eliminación de más de un residuo de aminoácido y luego la inserción de más de un residuo de aminoácido. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado acá suministrado puede contener la sustitución de aminoácido M298Q (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) para aumentar la actividad intrínseca y una modificación Gla Intercambio FIX, la cual involucra la eliminación del dominio Gla de FVII endógeno mediante la eliminación de los residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de 45 residuos de aminoácido que corresponden a los residuos de aminoácido Y1 a Y45 del dominio Gla de FIX establecido en la SEQ ID NO:110.

Los polipéptidos FVII modificados acá suministrados pueden tener dos o más modificaciones seleccionadas únicamente de aquellas establecidas en las Tablas 5 a 8. En otros ejemplos, el polipéptido FVII modificado contiene dos o más modificaciones donde una o más modificaciones se seleccionan de aquellas establecidas en las Tablas 5 a 8 y una o más modificaciones son modificaciones adicionales que no se establecen en las Tablas 5 a 8, tales

como, por ejemplo, modificaciones descritas en el arte. En algunos ejemplos, las modificaciones adicionales pueden ser seleccionadas de aquellas establecidas en la Sección D.3.a-e arriba. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede contener una modificación en uno o más residuos de aminoácido D196, K197, K199, G237, T239, R290 o K341 con base en la numeración de un FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3 (que corresponde a D60, K60a, K60c, G97, T99, R147 y K192, respectivamente, con base en numeración de quimotripsina), la cual puede aumentar la resistencia al TFPI, y una modificación de uno más residuos de aminoácido que afectan la actividad intrínseca, tal como, por ejemplo, V158 y M298, (V21 y M156, respectivamente, con base en la numeración de quimotripsina). Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado puede contener dos sustituciones de aminoácido que aumentan la resistencia a TFPI, tal como K197E y G237V, y una sustitución de aminoácido que aumenta la actividad intrínseca, tal como M298Q, que resulta en un polipéptido FVII con actividad coagulante incrementada.

Las modificaciones de combinación ejemplares no limitantes se suministran en la Tabla 9. Estas modificaciones de combinación ejemplares incluyen dos o más modificaciones que son diseñadas para alterar dos o más actividades o propiedades de un polipéptido FVII, incluyendo, pero no limitado a, resistencia a TFPI, resistencia a AT-III, actividad intrínseca, actividad amidolítica, activiada catalítica (en la presencia y/o ausencia de TF), unión o afinidad a fosfolípidos, glicosilación, resistencia a proteasas, vida media e

interacción con y/o activación de otros factores o moléculas, tales como FX y FIX. Los polipéptidos FVII modificados que contienen dichas modificaciones de combinación pueden tener actividad coagulante aumentada, duración aumentada de actividad coagulante, inicio aumentado de actividad coagulante y/o un índice terapéutico mejorado. Las modificaciones establecidas en la Tabla 8 a continuación usan los mismos sistemas de nomenclatura y numeración como se describen en las Tablas 5 a 7, anteriores. Por ejemplo, la modificación “Gla Intercambio FIX) involucra la eliminación del dominio Gla de FVII endógeno mediante la eliminación de residuos de aminoácido A1 a Y44 (residuos que corresponden a un polipéptido FVII maduro establecido en la SEQ ID NO:3) y la inserción de 45 residuos de aminoácido que corresponden a los residuos de aminoácido Y1 a Y45 del dominio Gla de FIX establecido en la SEQ ID NO:100, como se describió anteriormente. Las posiciones de aminoácido corresponden a posiciones de aminoácido de un polipéptido FVII maduro como se establece en la SEQ ID NO:3 y también están relacionadas por el esquema de numeración de quimotripsina. En la Tabla 9 más adelante, el identificador de secuencia (SEQ ID NO) es identificado en el cual las secuencias de aminoácido ejemplares del polipéptido FVII modificado se establecen, y también cualquier número de identificación de polipéptido.

Tabla 8

Modificación – numeración de FVII maduro	Modificación – numeración de quimotripsina	Número ID de Poli-péptido	SEQ ID NO
V158D/G237V/E296V/M298Q	V21D/G97V/E154V/M156Q	CB669	241
K197E/G237V/M298Q	K60aE/G97V/M156Q	CB690	242
K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	CB692	243
K197E/K199E/G237V/M298Q/ K341Q	K60aE/K60cE/G97V/M156Q/ K192Q	CB693	244
G237V/M298Q	G97V/M156Q	CB695	245
G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	CB696	246
M298Q/Gla Swap FIX	M156Q/Gla Swap FIX	CB850	247
K197E/M298Q	K60aE/M156Q	CB902	248
M298Q/K341D	M156Q/K192D	CB945	249

E. Diseño y Métodos para Modificar FVII

Acá se suministran polipéptidos FVII modificados. Los polipéptidos FVII son modificados de modo tal que ellos exhiben alteraciones en una o más actividades o propiedades en comparación con un polipéptido FVII no modificado. Las actividades y propiedades que pueden ser alteradas como resultado de la modificación incluyen, pero no se limitan a, coagulación o actividad coagulación; actividad procoagulante; actividad proteolítica o catalítica tal como actividad que efectúa la activación del factor X (FX) o la activación del factor IX (FIX); antigenicidad, tal como la evaluada por la habilidad de unirse o competir con un polipéptido para unirse a un anticuerpo anti-FVII; habilidad para unir factor de tejido, factor X o factor IX; habilidad para unir a fosfolípidos; vida media; estructura tridimensional; pl; y/o conformación. Entre los polipéptidos FVII modificados acá suministrados se encuentran aquellos que tienen actividad coagulante aumentada. Entre estos se encuentran aquellos cuyo incremento en la actividad coagulante resulta de o involucra resistencia aumentada del FVII modificado a TFPI, resistencia aumentada a AT-III,

propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media aumentada, actividad catalítica aumentada, y/o unión aumentada a plaquetas activadas. Los métodos ejemplares para identificar dichos polipéptidos FVII modificados y los polipéptidos modificados se suministran acá. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado que exhibe resistencia aumentada a TFPI, resistencia aumentada a AT-III y/o unión aumentada a las plaquetas activadas puede ser generado racional o empíricamente por: (a) orientación de forma racional de sitios que son contemplados para estar involucrados en dichas propiedades o, (b) probar empíricamente los polipéptidos FVII modificados en ensayos funcionales para la resistencia a TFPI, resistencia a AT-III, propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media aumentada, y/o unión mejorada a fosfolípidos o plaquetas activadas. En varios casos, una combinación de aproximaciones de diseño racionales y empíricas puede ser utilizada para generar polipéptidos FVII modificados.

Una vez se identifica un dominio, región o aminoácido para la modificación usando una aproximación racional o empírica, cualquier método conocido en el arte para llevar a cabo la mutación de cualquier aminoácido en una proteína objetivo puede ser empleado. Los métodos incluyen mutagénesis estándar dirigida a sitio (que usa por ejemplo, un kit, tal como un kit tal como QuikChange disponible de Stratagene) de moléculas de ácido nucleico codificador, o por métodos de síntesis de polipéptido de fase sólida. Adicionalmente, las proteínas quiméricas modificadas acá suministradas (es decir, intercambio de dominio Gla) pueden ser generadas por técnicas de ADN

recombinante de rutina. Por ejemplo, los polipéptidos quiméricos pueden ser generados usando enzimas de restricción y metodologías de coagulación para la subclonación de rutina de los componentes de polipéptido quimérico deseados. Una vez identificados y generados, los polipéptidos FVII modificados pueden luego ser evaluados para actividad, tal como actividad catalítica o actividad coagulante, que usan uno o más de varios ensayos conocidos en el arte o descritos más adelante.

1. Racional

En algunos ejemplos, los polipéptidos FVII modificados acá suministrados son diseñados por modificación racional para aumentar la actividad coagulante. En dicho método, los dominios, regiones o aminoácidos responsables por la actividad de un polipéptido son conocidos o pueden ser determinados racionalmente. Por ejemplo, varias bases de datos en el dominio público suministran información de secuencia y de dominio relacionada con el FVII tipo salvaje (ver, por ejemplo, el servidor ca.expasy.org de ExPASy Proteomics). Otra información en el dominio público puede ser accedida para determinar los aminoácidos, regiones y/o dominios en un polipéptido FVII que están involucrados en una interacción o actividad específica. Dichas fuentes incluyen, por ejemplo, revistas científicas, bases de datos de secuencia y función, o bases de datos de patentes. En algunos casos, la evidencia directa puede ser utilizada para determinar la influencia de uno o más aminoácidos en una interacción o actividad dada. En otros ejemplos, esto es extrapolado de, por ejemplo, evidencia o información relacionada con las proteínas que

muestran actividades y/o interacciones similares. En dichos ejemplos, esos aminoácidos que son responsables por la actividad o interacción en las proteínas relacionada pueden ser utilizados para determinar cuales son los aminoácidos correspondientes en el polipéptido FVII mediante la alineación del polipéptido relacionado con el polipéptido FVII, con base en las similitudes de secuencia y/o estructurales. Por lo tanto, los aminoácidos en el polipéptido FVII que están involucrados en la actividad o interacción dada pueden ser determinados. Adicionalmente, el modelo de homología puede ser utilizado para pronosticar residuos que juegan papeles importantes en la formación y/o estabilización de interacciones de proteína/proteína, y esta información puede ser utilizada para diseñar variantes con propiedades mejoradas.

Una vez se determinan los dominios, regiones y/o aminoácidos responsables por la actividad de un polipéptido FVII, ellos pueden ser modificados de modo tal que las modificaciones son pronosticadas para resultar en actividad coagulante aumentada del polipéptido. Esto puede ser llevado a cabo de varias formas dependiendo de la actividad o interacción que está dirigida. En algunos ejemplos, una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácido pueden ser hechas para incrementar la afinidad del FVII modificado por otras proteínas o moléculas.

En un ejemplo, las modificaciones pueden ser hechas para cualquier dominio, región o aminoácido de modo tal que la afinidad o interacción del FVII modificado por otras proteínas es alterado, es decir aumentado o disminuido dependiendo en la interacción objetivo a ser modificada. Para llevar a cabo

dicha modificación, los dominios, regiones y/o aminoácidos involucrados o contemplados a estar involucrados en dicha interacción son conocidos o pueden ser determinados racionalmente. Por ejemplo, un FVII modificado puede ser diseñado racionalmente para tener una interacción reducida con una proteína inhibitoria, tal como TFPI o AT-III, para aumentar la actividad coagulante del polipéptido FVII modificado. Un método para diseñar racionalmente un polipéptido FVII para tener una interacción reducida con FTPI se establece en el Ejemplo 1. Aproximaciones similares pueden ser desarrolladas para incrementar o reducir la interacción de FVII con cualquier otro polipéptido para el cual el FVII es conocido para interactuar o unirse.

Por ejemplo, el FVII fue modificado para mostrar resistencia aumentada al TFPI. El TFPI, en un complejo con FXa, se une al complejo TF/FVIIa para formar un complejo cuaternario en el cual la actividad catalítica del FVIIa se inhibe. El primer dominio de Kunitz de TFPI-1 (TFPI-1 K1) es el dominio que es responsable por la interacción con, e inhibición de, FVIIa. La identificación de los residuos de aminoácido de FVII que están involucrados en esta interacción facilita el diseño de polipéptidos FVII que son resistentes al TFPI. Varias aproximaciones pueden ser utilizadas para determinar cuales residuos de aminoácidos en FVII están involucrados en esta interacción, incluyendo, pero no limitado a, mutagénesis, aproximaciones de escaneado, y diseño racional tal como modelado por computador. La estructura de cristal del FVIIa en complejo con TFPI puede ser utilizada como base para determinar los residuos de contacto. Alternativamente, y como está descrito en el Ejemplo 1, donde no hay

disponible una estructura de cristal, el modelado por computador puede ser generado a través de una serie de alineaciones y extrapolaciones de estructuras y secuencias conocidas de proteínas relacionadas y sus interacciones entre sí.

Los resultados del modelado por computador pueden ser utilizados para identificar los residuos que están involucrados directamente con una proteína objetivo deseada, tal como por ejemplo, TFPI, y/o aquellos residuos que están involucrados directamente en la interacción, por ejemplo, debido a la proximidad a los residuos de contacto. Por ejemplo, usando los resultados del modelado por computador como se establecen en el Ejemplo 1, una alineación de los primeros dominios de Kunitz de TFPI-1 y TFPI-2 fue realizado para determinar cuales eran los residuos de “contacto” correspondientes en el TFPI-1 (Figura 5b). Los aminoácidos de reemplazo pueden ser identificados con el fin de alterar la interacción del polipéptido FVII con la proteína objetivo. Los aminoácidos de reemplazo pueden ser hasta 19 otros aminoácidos que ocurren naturalmente, así como aminoácidos “no naturales”. Alternativamente, dichos aminoácidos de reemplazo pueden ser identificados por mutagénesis *in silico* con base en hipótesis racionales de la interacción. El ejemplo 1 establece una aproximación *in silico* para la identificación de aminoácidos de reemplazo por los cuales el análisis del modelado por computador reveló residuos involucrados en electrostática complementaria entre el Factor FVII y el TFPI-1 K1. Por ejemplo, el D60 cargado negativamente de FVII (por numeración de quimotripsina) parece estar involucrado en una interacción electrostática con el

R20 cargado negativamente de TFPI-1. Este residuo es por lo tanto un candidato para la mutagénesis de modo tal que la complementariedad electrostática con R20 de TFPI es abolida, generando así un polipéptido FVII modificado que tiene resistencia aumentada a TFPI. Esto puede ser efectuado por las sustituciones de inversión de cambio o neutralización de cambio. Por ejemplo, una sustitución de aminoácido puede ser hecha para reemplazar el ácido aspártico cargado negativamente con una lisina cargada positivamente. Dicha sustitución de inversión de cambio establece una interacción repulsiva carga-carga en este sitio, e interfiere con la unión e interacción de TFPI con FVIIa. En otro ejemplo, el D60 cargado negativamente de FVII puede ser reemplazado con una arginina básica para negar la complementariedad electrostática positiva con R20 de TFPI e introducir una interacción desfavorable. Dichas modificaciones diseñadas racionalmente pueden ser hechas a uno o más residuos de FVII que son determinados para estar involucrados en contacto directo o indirecto y la interacción con residuos de TFPI.

En otro ejemplo, las modificaciones racionales de un polipéptido FVII pueden ser hechas con base en funciones conocidas de dominios o regiones del polipéptido. Por ejemplo, el dominio Gla de FVII es conocido por ser responsable por la unión de FVIIa a fosfolípidos, tales como aquellos mostrados en las plaquetas activadas, aunque muy débilmente. Otras proteínas dependientes de vitamina K, tales como por ejemplo, FIX, FX, protrombina, proteína C y proteína S, también poseen dominios Gla para efectuar la unión

de la proteína a los fosfolípidos cargados negativamente, en varios casos con una afinidad mucho mayor que la del dominio Gla del FVII. La introducción de un dominio Gla heterólogo en un polipéptido FVII es contemplada para aumentar la afinidad del FVII por los fosfolípidos, en comparación con aquel de FVII (y FVIIa). Por lo tanto, en un ejemplo, el dominio Gla de FX, o una porción suficiente del dominio Gla de FX para efectuar la unión de fosfolípidos, puede ser introducida en un polipéptido FVII para generar un polipéptido FVII modificado quimérico.

Si es necesario, una combinación de métodos racionales y empíricos puede ser utilizada para diseñar un polipéptido FVII. Por ejemplo, la unión de polipéptidos que contiene dominio Gla puede ser probada y controlada para identificar cuales polipéptidos exhiben la más alta unión y/o afinidad a fosfolípidos, tal como por ejemplo, en superficies de plaquetas. Alternativamente o adicionalmente, una serie de polipéptidos FVII que contienen introducción de varios dominios Gla heterólogos, o porciones suficientes de los mismos, pueden ser probados para determinar cuales polipéptidos quiméricos exhiben la más alta afinidad y/o unión a fosfolípidos.

2. Empírico (es decir, proyección)

Los polipéptidos FVII modificados también pueden ser generados empíricamente y luego probados o controlados para identificar aquellos que tienen la actividad o propiedad particular contemplada. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados pueden ser generados por medio la mutación de uno o más residuos de aminoácido de un polipéptido FVII usando cualquier

método comúnmente conocido en el arte (ver también la solicitud de EEUU publicada No. 2004/0146938). Dichos polipéptidos FVII modificados pueden ser probados en ensayos funcionales de coagulación para determinar si ellos son "Éxitos" para aumentar la actividad coagulante. Los éxitos pueden ser además probados para determinar si ellos muestran resistencia aumentada a inhibidores tales como TFPI o AT-III y/o visualizar unión aumentada a fosfolípidos o propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como vida media aumentada, usando cualquiera de los ensayos acá descritos o conocidos para los expertos en la materia.

Los ejemplos de métodos para mutar FVII incluyen métodos que resultan en una mutagénesis aleatoria a lo largo de toda la secuencia o métodos que resultan en mutagénesis enfocada de una región o dominio selecto de la secuencia de FVII. En un ejemplo, el número de mutaciones hechas al polipéptido es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 o más.

a. Mutagénesis Aleatoria

Cualquier variedad de las aproximaciones generales para la evolución de la proteína dirigida con base en mutagénesis puede ser empleada. Cualquiera de estas, sola o en combinación puede ser utilizada para modificar un polipéptido tal como FVII para lograr una propiedad deseada. Dichos métodos incluyen mutagénesis aleatoria, donde los aminoácidos en la secuencia de proteína inicial son reemplazados por todos (o un grupo) de 20 aminoácidos naturales (así como amino ácidos no naturales) bien sea en

reemplazos simples o múltiples en diferentes posiciones de aminoácido en la misma molécula, al mismo tiempo. Otro método, mutagénesis aleatoria restringida, introduce bien sea todos o algunos de los 20 aminoácidos naturales (así como aminoácidos no naturales) o residuos parciales de ADN. La parcialidad se basa en la secuencia del ADN y no en la de la proteína en una forma estocástica o semi-estocástica, respectivamente, dentro de regiones restringidas o predefinidas de la proteína conocida en avance para estar involucrada en la actividad biológica que es "evolucionada". Métodos ejemplares para modificar una proteasa se describen en la Solicitud de EEUU No. 10/677,977, incorporada acá por referencia es su totalidad. Adicionalmente, cualquier método conocido en el arte puede ser utilizado para modificar o alterar una secuencia de polipéptido de proteasa, tal como un polipéptido FVII de proteasa.

Los métodos de mutagénesis aleatoria incluyen, por ejemplo, el uso de *E. coli* XL1red, radiación UV, modificación química tal como por desaminación, alquilación, o mutágenos análogos base, o métodos PCR tales como arrastramiento de ADN, mutagénesis de cinta, mutagénesis aleatoria dirigida de sitio, o propenso al error PCR (ver por ejemplo, la Solicitud de EEUU No.: 2006-0115874). Dichos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, modificación química por hidroxilamina (Ruan, H., *et al.* (1997) *Gene* 188:35-39), el uso de dNTP análogos (Zaccolo, M., *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 255:589-603), o el uso de kits de mutagénesis aleatoria disponibles comercialmente tales como, por ejemplo, kits GeneMorph de mutagénesis aleatoria basados en PCR

(Stratagene) o kits de mutagénesis aleatoria de Diversificación (Clontech). Los kits de mutagénesis aleatoria de Diversificación permiten la selección de una tasa de mutación deseada para una secuencia de ADN dada (desde 2 hasta 8 mutaciones/1000 pares base) mediante la variación de las cantidades de manganeso (Mn^{2+}) o dGTP en la mezcla de reacción. Elevar los niveles de manganeso inicialmente aumenta la tasa de mutación, con un incremento adicional de tasa de mutación suministrado mediante el aumento de la concentración de dGTP. Se pueden alcanzar tasas de mutación aún más altas mediante el desarrollo de rondas adicionales de PCR.

b. Mutagénesis Enfocada

La mutación enfocada puede ser lograda haciendo una o más mutaciones en una región predeterminada de una secuencia de gen, por ejemplo, en regiones del dominio de proteasa que media la actividad catalítica, las regiones del dominio Gla que se unen a los fosfolípidos, las regiones del polipéptido FVII que unen inhibidores o moléculas tales como TFPI, AT-III o Zn^{2+}, tales como aquellos acá suministrados, o regiones de la proteína que interactúa con los factores o receptores involucrados en el aclaramiento de FVIIa, tales como aquellos acá suministrados. En un ejemplo, uno o más aminoácidos de un polipéptido que son mutados usando cualquier kit de mutagénesis estándar simple o múltiple dirigida a sitio tal como por ejemplo QuikChange (Stratagene). En otro ejemplo, uno o más aminoácidos de una proteasa son mutados por medio de la mutagénesis de saturación (Zheng *et al.* (2004) *Nucl. Acids Res.,* 32:115). En una modalidad ejemplar, una técnica de

mutagénesis de saturación es usada en la cual los residuos de una región o dominio son mutados a cada uno de los 20 posibles aminoácidos naturales (así como los aminoácidos no naturales) (ver por ejemplo el método Kunkle, Protocolos Actuales en Biología Molecular, John Wiley e Hijos, Inc., Media Pa.). En dicha técnica, un primer oligonucleótido mutagénico degenerado puede ser sintetizado el cual contiene la aleatorización de nucleótidos en los codones deseados que codifican los aminoácidos seleccionados. Los esquemas de aleatorización ejemplares incluyen aleatorización NNS o NNK, donde N representa cualquier nucleótido, S representa guanina o citosina y Ka representa guanina o timina. El primer mutagénico degenerado es recocido a la plantilla de ADN de cadena simple y la polimerasa de ADN es adicionada para sintetizar la cadena complementaria de la plantilla. Después de la ligadura, la plantilla de ADN de cadena doble es transformara en *E. coli* para la amplificación.

En un ejemplo adicional, la mutagénesis enfocada puede ser restringida a aminoácidos que son identificados como puntos clave en las rondas iniciales de proyección. Por ejemplo, después de la selección de polipéptidos FVII modificados de librerías combinatoriales mutagenizadas aleatoriamente, un número desproporcionado de mutaciones puede ser observado en posiciones o regiones específicas. Estos son designados como “puntos clave”, y pueden ser observados a través de más de una ronda de mutagénesis y proyección. Los ensayos funcionales pueden luego ser llevados a cabo en los polipéptidos FVII modificados para determinar si las mutaciones en los puntos clave se

correlacionan con una o más propiedades o actividades deseadas. Si la correlación entre los puntos clave y la actividad o propiedad deseada se verifica, la mutagénesis enfocada puede entonces ser utilizada para centrarse específicamente en estos puntos clave para la mutagénesis adicional. Esta estrategia permite una mutagénesis más diversa y profunda en posiciones específicas particulares, opuesto a la mutagénesis menos profunda que ocurre después de la mutagénesis aleatoria de una secuencia de polipéptido. Por ejemplo, la mutagénesis de saturación puede ser utilizada para mutar los "puntos clave" tales como mediante el uso de oligos que contienen NNt/g o NNt/c en estas posiciones.

c. Proyección

`Los polipéptidos modificados pueden ser probados en ensayos de proyección de forma individual, o pueden ser probados como colecciones tales como en librerías. En un ejemplo, los polipéptidos variante FVII son generados aleatoriamente por mutagénesis, y clonados individualmente. La evaluación de actividad es luego llevada a cabo de forma individual en cada molécula mutante de proteína individual, seguido a la expresión de proteína y la medición de la actividad apropiada. En algunos ejemplos, los clones individuales pueden ser evaluados en un arregle direccionable, de modo tal que ellos están físicamente separados entre sí de modo que la identidad de cada polipéptido individual es conocida con base en su ubicación en el arreglo. Por ejemplo, si cada uno es un producto simple o una reacción de mutagénesis independiente, la mutación específica puede ser determinada fácilmente sin la necesidad de secuenciar.

Alternativamente, la secuencia puede ser llevada a cabo en los polipéptidos modificados resultantes para determinar esas mutaciones que confieren una actividad.

En otro ejemplo, los polipéptidos FVII modificados pueden ser controlados como colecciones o en una librería. Por ejemplo, una librería de polipéptidos FVII puede ser mostrada en un paquete genético para la proyección, incluyendo, pero no limitado a cualquier vector replicable, tal como un fago, virus, o bacteria, que puede mostrar una porción de polipéptido. La pluralidad de polipéptidos mostrados es mostrada por un paquete genético en una forma tal que permite al polipéptido unirse y/o interactuar con un polipéptido objetivo. Los paquetes genéticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos (ver, por ejemplo, Clackson et al. (1991) Making Antibody Fragments Using Phage Display Libraries, *Nature*, 352:624-628; Glaser et al. (1992) Antibody Engineering by Condon-Based Mutagenesis in a Filamentous Phage Vector System, *J. Immunol*., 149:3903 3913; Hoogenboom *et al*. (1991) Multi-Subunit Proteins on the Surface of Filamentous Phage: Methodologies for Displaying Antibody (Fate) Heavy and 30 Light Chains, *Nucleic Acids Res*., 19:4133-41370), baculoviruses (see, *e.g*., Boublik et al. (1995) Eukaryotic Virus Display: Engineering the Major Surface Glycoproteins of the Autographa California Nuclear Polyhedrosis Virus (ACNPV) for the Presentation of Foreign Proteins on the Virus Surface, *Bio/Technology*, 13:1079-1084), bacterias y otros vectores adecuados para la visualización de una proteína, tal como una proteasa visualizada de fago. Por ejemplo, los

bacteriófagos de interés incluyen, pero no se limitan a, fago T4, fago M13 y fago H1. Los paquetes genéticos son amplificados opcionalmente tal como en una bacteria huésped.

La visualización de fago es conocida para aquellos expertos en la materia y se describe, por ejemplo en Ladner *et al*., Solicitud de Patente de EEUU No. 5,223,409; Rodi *et al*. (2002) *Curr. Opin. Chem. Biol*. 6:92-96; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; de Haard *et al.* (1999) *J. Biol. Chem* 274:18218-30; Hoogenboom *et al.* (1998) Immunotechnology 4:1-20; Hoogenboom e*t al.* (2000) Immunol Today 2:371-8; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Rebar *et al.* (1996) *Methods Enzymol*. 267:129-49; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982. Los ácidos nucleícos adecuados para la visualización de fago, por ejemplo, vectores de fago, son conocidos en el arte (ver, por ejemplo, Andris-Widhopf *et al.* (2000) *J Immunol Methods*, 28: 159-81, Armstrong *et al.* (1996) Academic Press, Kay *et al.,* Ed. pp.35-53; Corey *et al.* (1993) *Gene* 128(1):129-34; Cwirla *et al.* (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87(16):6378-82; Fowlkes *et al.* (1992) *Biotechniques* 13(3):422-8; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19(15):4133-7;

McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348(6301):552-4; McConnell *et al.* (1994) *Gene* 151(1-2):115-8; Scott y Smith (1990) *Science* 249(4967):386-90).

Las librerías de polipéptidos FVII variantes para la proyección también pueden ser expresadas en las superficies de células, por ejemplo, células procarióticas y eucarióticas. Células ejemplares para la expresión de superficie celular incluyen, pero no se limitan a, bacteria, levadura, células de insecto, células de aves, células de plantas, y células de mamíferos (Chen y Georgiou (2002) *Biotechnol Bioeng* 79: 496-503). En un ejemplo, las células bacteriales para la expresión son *Escherichia coli*.

Los polipéptidos variantes pueden ser expresados como una proteína de fusión con una proteína que está expresada en la superficie de la célula, tal como una proteína de membrana o una proteína asociada a la superficie celular. Por ejemplo, una proteasa variante puede ser expresada en *E. coli* como una proteína de fusión con una proteína de membrana externa de *E. coli* (por ejemplo OmpA), una molécula híbrida manipulada o modificada genéticamente de la lipoproteína principal de *E. coli* (Lpp) y la OmpA de proteína de membrana externa o una proteína asociada a la superficie celular (por ejemplo subunidades pili y flagelar). Generalmente, cuando las proteínas de membrana externa bacterial son usadas para la visualización de péptidos heterólogos o proteínas, esto se logra a través de la inserción genética en sitios permisivos de las proteínas portadoras. La expresión de un péptido heterólogo o proteína es dependiente de las propiedades estructurales del dominio de proteína insertada, toda vez que el péptido o proteína es más limitado cuando

se inserta en un sitio permisivo en comparación con la fusión en el término N o C de una proteína. Las modificaciones a la proteína de fusión pueden ser hechas para mejorar la expresión de la proteína de fusión, tal como la inserción del vinculador flexible de péptido o secuencias espaciadoras o modificación de la proteína bacterial (por ejemplo, por mutación, inserción o supresión, en la secuencia de aminoácido). Las enzimas, tales como β-lacatamasa y la exoglucanasa Cex de *Cellulomonas fimi*, han sido expresadas exitosamente como proteínas de fusión Lpp-OmpA en la superficie de *E. coli* (Francisco J.A. y Georgiou G. *Ann N Y Acad Sci.* 745:372–382 (1994) y Georgiou G. *et al. Protein Eng.* 9:239–247 (1996)). Otros péptidos de 15-514 aminoácidos han sido mostrados en el segundo, tercero, y cuarto bucle externo en la superficie de OmpA (Samuelson et al. *J. Biotechnol.* 96: 129-154 (2002)). Por lo tanto, las proteínas de membrana externa pueden llevar y mostrar los productos heterólogos de genes en la superficie exterior de la bacteria.

También es posible usar otros formatos de visualización para controlar librerías de polipéptidos variantes. Los ejemplos de otros formatos de visualización incluyen fusiones de proteína de ácido nucleico, visualización de ribozima (ver por ejemplo, Hanes and Pluckthun (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 13:4937-4942), visualización de cordón (Lam, K. S. *et al.* Nature (1991) 354, 82-84; , K. S. *et al.* (1991) *Nature*, 354, 82-84; Houghten, R. A. *et al.* (1991) *Nature*, 354, 84-86; Furka, A. *et al*. (1991) *Int. J. Peptide Protein Res*. 37, 487-493; Lam, K. S., *et al.* (1997) *Chem. Rev*., 97, 411-448; Solicitud de Patente de EEUU Publicada 2004-0235054) y arreglos de proteína (ver por

ejemplo, Cahill (2001*) J. Immunol. Meth.* 250:81-91, WO 01/40803, WO 99/51773, y US2002-0192673-A1).

En otros casos específicos, puede ser ventajoso adjuntar de forma contraria los polipéptidos variantes o librerías de fagos o células que expresan polipéptidos variantes a un soporte sólido. Por ejemplo, en algunos ejemplos, las células que expresan polipéptidos FVII variantes pueden ser absorbidas naturalmente a un cordón, de modo tal que una población de cordones contiene una célula simple por cordón (Freeman *et al*. Biotechnol. Bioeng. (2004) 86:196-200). Seguido a la inmovilización a un soporte de vidrio, las microcolonias pueden ser crecidas y controladas con un sustrato cromogénico o fluorogénico. En otro ejemplo, los polipéptidos FVII variantes o librerías de fago o células que expresan proteasas variantes pueden ser arreglados en placas de título e inmovilizados.

Para identificar esos polipéptidos FVII modificados que exhiben actividad coagulante aumentada, los polipéptidos FVII modificados son controlados individualmente o en una librería y probados en ensayos funcionales para identificar aquellos que muestran resistencia aumentada a los inhibidores tales como TFPI y AT-III, unión aumentada a las plaquetas activadas de fosfolípidos, vida media aumentada y/o mostrar actividad catalítica aumentada. Dichos ensayos son acá descritos o son conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificados son probados para actividad proteolítica. Los polipéptidos FVII, solos o en presencia de TF, son incubados con concentraciones variantes de sustrato cromogénico, tal como el sustrato

peptidil Spectrozima FVIIa (CH_3SO_2-D-CHA-But-Arg-pNA.AcOH). La ruptura del sustrato es monitoreada mediante la absorbencia y la tasa de hidrólisis de sustrato determinada por la regresión lineal usando un programa de computador disponible fácilmente. En un ejemplo adicional, la resistencia de polipéptidos FVII modificados a TFPI o AT-III es evaluada por la incubación del inhibidor con polipéptidos FVII que, en algunos casos, han sido preincubados con TF. La actividad de FVII es luego medida usando uno o más de los ensayos de actividad o coagulación de polipéptidos FVII incubados con el inhibidor, con la actividad de polipéptidos FVII que no fueron incubados con el inhibidor.

La mutación específica del polipéptido candidato puede ser determinada usando técnicas de rutina de ADN recombinante, tal como la secuencia. En una modalidad, las combinaciones de “Aciertos” pueden ser hechas para incrementar las propiedades y/o actividades coagulantes del polipéptido FVII modificado.

3. Selección de variantes FVII

Las variantes de polipéptido FVII diseñadas e identificadas por una o más de las aproximaciones descritas anteriormente, pueden ser seleccionadas para identificar aquellos polipéptidos FVII candidatos que exhiben las propiedades o actividades deseadas. La selección de los polipéptidos FVII variantes se basa en 1) primero, probar el polipéptido variante para la actividad o propiedad específica que es modificada (es decir, resistencia a TFPI, resistencia a AT-III, unión de Zn^{2+}, actividad catalítica, vida media, unión y/o

afinidad por fosfolípidos; y 2) segundo, probar el polipéptido variante para la retención de un a actividad de FVII requerida para la hemostasia y la coagulación. Incluidas entre las actividades de FVII que son requeridas para la coagulación se incluye, por ejemplo, actividad enzimática, proteolítica o catalítica tal como para efectuar la activación de factor X (FX) o la activación de factor IX (FIX). Otras actividades de FVII que pueden ser evaluadas incluyen, pero no se limitan a, antigenicidad, la habilidad para unir factor de tejido, factor X o factor IX, y la habilidad para unirse a fosfolípidos. Por lo tanto, un polipéptido FVII modificado, tal como cualquiera acá suministrado o identificado en los métodos acá proporcionados, debe retener algún nivel, bien sea aumentado o disminuido, de una actividad de FVII requerida para la actividad coagulante. Los ensayos estándar conocidos en el arte o descritos acá a continuación pueden ser llevados a cabo *in vitro* o *in vivo* con el fin de desarrollar cada una de las dos evaluaciones anteriores. Por ejemplo, la actividad proteolítica o catalítica del FVII puede ser evaluada usando varios métodos, incluyendo la medición de la ruptura de un sustrato sintético, la medición de la activación del factor X (ver, por ejemplo, los Ejemplos 4, 5 y 11 más adelante), y la resistencia a TFPI o AT-II puede ser evaluada mediante el ensayo para la inhibición por TFPI o AT-II, respectivamente (ver, por ejemplo, los Ejemplos 7, 12 y 6). Adicionalmente, los ensayos *in vivo* para la actividad procoagulante, tal como se ha descrito, por ejemplo, en los Ejemplos 8 y 14 también puede ser empleada.

El efecto total de cualquier variante de polipéptido FVII candidato es para exhibir una actividad procoagulante. Por ejemplo, un polipéptido variante puede ser aumentado en su resistencia a TFPI, resistencia a AT-III, vida media y/o unión y/o afinidad por fosfolípidos, mientras que también exhibe un incremento en la actividad catalítica. Dicho polipéptido FVII sería seleccionado como una variante de FVII candidata para aumentar la actividad coagulante.

En algunos casos, sin embargo, un polipéptido FVII modificado para tener actividad coagulante mejorada debido a una o más de resistencia aumentada a TFPI, resistencia aumentada a AT-III, vida media aumentada o unión y/o afinidad aumentada por fosfolípidos, puede también exhibir una reducción en la actividad catalítica u otra actividad requerida para la coagulación como resultado de la modificación particular. Estos efectos podrían resultar de, por ejemplo, los cambios conformacionales en los polipéptidos FVII modificados que interfieren con la unión a otra molécula, los cambios conformacionales que resultan en un sitio activo alterado, o sustituciones de aminoácido que involucran directamente uno o más residuos de aminoácido que son responsables por la interacción con otra molécula.

Por lo tanto, en otro ejemplo, un polipéptido variante que es incrementado en su resistencia TFPI, resistencia a AT-III, vida media aumentada y/o afinidad por fosfolípidos puede exhibir una reducción concomitante en su actividad catalítica. El nivel de reducción en una actividad de FVII, tal como una actividad catalítica, que sería aceptable para asegurar la actividad coagulante mejorada es dependiente del incremento concomitante en

la propiedad que está siendo modificada para la mejora (es decir, la resistencia aumentada a TFPI), y puede ser determinada empíricamente. Por lo tanto, los resultados de dichas evaluaciones establecidas anteriormente pueden ser balanceados para identificar esos polipéptidos variantes que exhiben propiedades mejoradas, mientras que al mismo tiempo retienen al menos una actividad FVII suficiente, es decir actividad catalítica, para efectuar la coagulación. Típicamente, entre más grande es el incremento en la propiedad contemplada para la modificación (es decir, mayor que sea el incremento en la resistencia a TFPI), mayor será la reducción aceptable en la actividad proteolítica catalítica.

Por ejemplo, un polipéptido FVII que exhibe un aumento en 100 dobleces en la resistencia a TFPI o AT-III puede exhibir una reducción en la actividad proteolítica o catalítica que es reducida en o aproximadamente 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dobleces o más en comparación con la actividad de un polipéptido FVII no modificado, y seguiría siendo un candidato viable para aumentar la actividad coagulante. Al contrario, si la resistencia a TFPI o AT-III se aumenta por 10 dobleces, el nivel de reducción en la actividad catalítica para mantener una actividad procoagulante total sería típicamente una reducción de o aproximadamente 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más dobleces en comparación con la actividad catalítica de un polipéptido no modificado. Un experto en la materia puede evaluar los cambios concomitantes en la resistencia de TFPI, resistencia de AT-III, unión de plaquetas activadas, vida media y actividad proteolítica o catalítica, o cualquier

otra actividad o propiedad, para determinar si el polipéptido FVII modificado sería útil como un terapéutico procoagulante, tal como, por ejemplo, para tratar episodios de sangrado en pacientes con hemofilia.

F. Producción de polipéptidos FVII

Los polipéptidos FVII, incluyendo los polipéptidos FVII modificados, o dominios de los mismos de FVII u otros polipéptidos de vitamina K, pueden ser obtenidos por métodos bien conocidos en el arte por purificación de proteína y expresión de proteína recombinante. Cualquier método conocido por los expertos en la materia para la identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados pueden ser utilizados. Cualquier método disponible en el arte puede ser utilizado para obtener un cADN de longitud completa (es decir, que mantiene la totalidad de la región codificante) o clon de ADN genómico que codifica un polipéptido FVII u otro polipéptido de vitamina K, tal como a partir de células o fuente de tejido, tal como por ejemplo de hígado. Los polipéptidos FVII modificados pueden ser manipulados o modificados como acá se describe, tal como por mutagénesis dirigida de sitio.

El FVII puede ser clonado o aislado usando cualquier método disponible conocido en el arte para la clonación y asilamiento de moléculas de ácido nucleico. Dichos métodos incluyen amplificación de PCR de ácidos nucleicos y control de librerías, incluyendo proyección de hibridación de ácido nucleico, proyección con base en anticuerpo y proyección con base en la actividad.

Los métodos para la amplificación de ácidos nucleicos pueden ser utilizados para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido

FVII, incluyendo, por ejemplo, métodos de reacción de cadena de polimerasa (PCR). Un material que contiene ácido nucleico puede ser utilizado como un material de inicio a partir del cual una molécula de ácido nucleico que codifica FVII puede ser aislado. Por ejemplo, las preparaciones de ADN y mARN, extractos de célula, extractos de tejido (por ejemplo, de hígado), muestras de fluido (por ejemplo, sangre, suero, saliva), muestras de sujetos sanos y/o enfermos pueden ser utilizados en métodos de amplificación. Las librerías de ácido nucleico también pueden ser utilizadas como una fuente de material de inicio. Los primeros pueden ser diseñados para amplificar una molécula codificante de FVII. Por ejemplo, los primeros pueden ser diseñados con base en una traducción posterior de una secuencia de aminoácido de FVII. Las moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación pueden ser secuenciadas y confirmadas para codificar un polipéptido FVII.

Las secuencias de nucleótido adicionales pueden ser unidas a una molécula de ácido nucleico que codifica FVII, que incluye secuencias vinculadoras que contienen sitios de endonucleasa de restricción para el propósito de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteína o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias funcionales de ADN de proteína de núcleo. Además, las secuencias adicionales de nucleótido que especifican los elementos de ADN funcional pueden estar vinculadas operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica FVII. Ejemplos de dichas secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de proteína

intracelular, y la secreción de secuencias diseñadas para facilitar la secreción de proteína. Secuencias adicionales de nucleótido tales como las secuencias que especifican las regiones de unión de proteína pueden ser vinculadas a las moléculas de ácido nucleico que codifica FVII. Dichas regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias para facilitar la captación de FVII en células específicas objetivo, o de otra forma para mejorar la farmacocinética del gen sintético.

Los ácidos nucleicos identificados y aislados pueden luego ser insertados en un vector de clonación apropiado. Un gran número de sistemas de vector huésped conocidos en el arte pueden ser utilizados. Los posibles vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula huésped utilizada. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como derivados plásmidos de pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). La inserción en un vector de clonación puede, por ejemplo, ser ejecutado mediante la ligación del fragmento de ADN en un vector de clonación el cual tiene Termini de cohesión complementario. La inserción puede ser efectuada usando vectores de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios utilizados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden ser modificados de forma enzimática. Alternativamente, cualquier sitio deseado puede ser producido mediante la ligación de secuencias (vinculadotes) de

nucleótidos en el Termini de ADL; estos vinculadotes ligados pueden contener oligonucleótidos específicos sintetizados químicamente que codifican secuencias de restricción de reconocimiento de endonucleasa. En un método alterno, el vector roto y el gen de proteína de FVII puede ser modificado mediante la terminación de ADN homopolimérica. Las moléculas recombinantes pueden ser introducidas en células huésped por medio de, por ejemplo, la transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo tal que se generan varias copias de la secuencia de gen.

En modalidades específicas, la transformación de las células huésped con las moléculas recombinantes de ADN que incorporan el gen de proteína de FVII aislado, cADN, o la secuencia de ADN sintetizado habilita la generación de múltiples copias del gen. Por lo tanto, el gen puede ser obtenido en grandes cantidades mediante el crecimiento de transformantes, aislamiento de las moléculas de ADN recombinante a partir de los transformantes y, cuando sea necesario, la recuperación del gen insertado a partir del ADN recombinante aislado.

1. Vectores y Células

Para la expresión recombinantes de una o más de las proteínas de FVII, el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia de nucleótido que codifica la proteína de FVII puede ser insertada en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia que codifica la proteína insertada.

Ejemplo de dicho vector es cualquier vector mamífero de expresión tal como, por ejemplo, pCMV. Las señales de transcripción y traducción necesarias también pueden ser suministradas por el promotor nativo para un gen FVII, y/o sus regiones de acompañamiento.

También se proporcionan vectores que contienen ácido nucleico que codifica el FVII o el FVII modificado. Las células que contienen los vectores también son suministradas. Las células incluyen células procarióticas y eucarióticas, y los vectores son cualquier adecuado para su uso allí.

Se suministran las células procarióticas y eucarióticas, incluyendo las células endoteliales, que contienen los vectores. Dichas células incluyen células bacteriales, células de levadura, células de hongos, Archea, células de plantas, células de insectos y células animales. Las células son utilizadas para producir un polipéptido FVII o polipéptido FVII modificado del mismo por medio del crecimiento de las células anteriormente descritas bajo condiciones en las cuales la proteína FVII codificada se expresa por la célula, y la recuperación de la proteína FVII expresada. Para propósitos de acá, el FVII puede ser secretado en el medio.

En una modalidad, los vectores que contienen una secuencia de nucleótidos del polipéptido FVII que tiene actividad de FVII y contiene todo o una porción del polipéptido FVII, o múltiples copias del mismo, son suministrados. Los vectores pueden ser seleccionados para la expresión del polipéptido FVII o polipéptido FVII modificado del mismo en la célula o de modo tal que la proteína FVII se expresa como una proteína secretada. Cuando el

FVII es expresado el ácido nucleico es vinculado al ácido nucleico que codifica una señal de secreción, tal como la secuencia de señal de factor de apareamiento α *Saccharomyces cerevisiae* o una porción del mismo, o la secuencia de señal nativa.

Una variedad de los sistemas de vector huésped puede ser utilizada para expresar la secuencia que codifica la proteína. Estos incluyen pero no se limitan a sistemas de células mamíferas infectadas con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus u otros virus); sistemas de células de insectos infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levadura que contiene vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN plásmido, o ADN cósmico. Los elementos de expresión de vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiente del sistema de vector huésped utilizado, cualquier número de elementos adecuados de transcripción y traducción puede ser utilizado.

Cualquier método conocido para aquellos expertos en la materia para la inserción de fragmentos de ADN en un vector puede ser utilizado para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico que contiene señales de control apropiadas de transcripción/traducción y secuencias que codifican la proteína. Estos métodos pueden incluir ADN recombinante *in vitro*, y técnicas de síntesis y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifica un polipéptido FVII o polipéptido FVII modificado, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos del mismo, pueden ser regulados por una segunda secuencia de ácido nucleico para que los genes

o fragmentos de los mismos se expresen en una serie transformada con la o las moléculas de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede ser controlada por un promotor/potenciador conocido en el arte. En una configuración particular, el promotor no es nativo de los genes para una proteína FVII. Los promotores que pueden utilizarse incluyen pero no se limitan al promotor temprano SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), el promotor contenido en el terminal largo 3 del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al de la célula 22:787-197 (1980)), el promotor de la timidina quinasa del herpes (Wagner et al, Proc. Natl.. Acad. EE.UU. 75:1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster, et al., Nature 296:39-42 (1982)), los vectores de expresión procarióticos como el promotor de β-lactamasas (Jay et al., (1981) Proc. Natl.. Acad. EE.UU. 75:5543) o el promotor tac (DeBoer et al, Proc. Natl.. Acad. EE.UU. 50:21-25 (1983)), véase también "proteínas útiles de bacterias recombinantes": en la revista Scientific American 242:79-94 (1980)), los vectores de expresión de plantas que contienen el promotor de la nopalina sintetasa (Herrar-Estrella et al, Nature 303:209-213 (1984)) o el virus promotor del mosaico de la coliflor 35S del RNA (Garder et al, Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la fotosintética de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al, Nature 370:115-120 (1984)); elementos promotores de levaduras y otros hongos, como el promotor Gal4, el promotor del alcohol deshidrogenasa, el promotor de la cinasa fosfoglicerol, el promotor de fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de transcripción de animales de control que muestran la

especificidad tisular y se han utilizado en animales transgénicos: la elastasa I región de control del gen que actúa en las células acinares pancreáticas (Swift et al, Cell 35:639-646 (1984); Ornitz et al, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.. 50:399-409 (1986); MacDonald, Hepatología 7:425-515 (1987)); genes de la región de control de la insulina que actúa en las células beta pancreáticas (Hanahan et al, Nature 375:1 15-122 (1985)), la región del gen de la inmunoglobulina de control que está activo en las células linfoides (Grosschedl et al, Cell 35:647-658 (1984), Adams et al, Nature 375:533-538 (1985), Alexander et al, Ministerio del Interior Cell Biol. 7:1436-1444 (1987)), la región del tumor mamario del ratón de control de virus que está activo en las células testuculares, de mama, linfoide y mastocitas (Leder et al., Cell 45:485-495 (1986)), la región del gen de la albúmina de control que está activo en el hígado (Pinckert et al, Genes y Desarrollo. 7:268-276 (1987)), la región de control del gen de alfa-fetoproteína que está activo en el hígado (Krumlauf et al, Ministerio del Interior Cell Biol 5:1639-1648 (1985) ; Hammer et al, Science 235:53-58 1987)), la región de control de los genes alfa-1 antitripsina que está activa en el hígado (Kelsey et al, Genes y Desarrollo 7:161-171 (1987)), la región de control de los genes de la globina beta que está activa en las células mieloides (Mogram et al, Nature 375:338-340 (1985); Kollias et al, Cell 45:89-94 (1986)), la región de control del gen de mielina básica que está activa en las células de oligodendrocitos del cerebro (Readhead et al, Cell 48:703-112 (1987)), la región de control de la cadena de genes ligera de la miosina-2 que está activa en el músculo esquelético (Sani, Nature 314:283-286 (1985)), y la región de

control del gen de liberación de las hormonas gonadotropinas que está activa en los gonadotrofos del hipotálamo (Mason et al, Science 234:1372-1378 (1986)).

En una configuración particular, se utiliza un vector que contiene un promotor unido operativamente a los ácidos nucleicos que codifica un polipéptido FVII o polipéptido FVII modificado, o un dominio, fragmento, homólogo o derivados del mismo artículo, uno o varios orígenes de replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a los antibióticos). Los vectores y sistemas para la expresión de polipéptidos FVII incluyen los vectores *Pichia* (disponibles, por ejemplo, en Invitrogen, San Diego, CA), en particular los destinados a la secreción de las proteínas codificadas. Los vectores ejemplares del plásmido de expresión en células de mamíferos, por ejemplo, pCMV. Los vectores ejemplares del plásmido para la transformación de células de *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión PQE (disponible en Qiagen, Valencia, CA, véase también la literatura publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores PQE tienen un promotor de fago T5 (reconocido por *E. coli* RNA polimerasa) y un modulo doble de represión del operador lac para proporcionar una expresión estrictamente regulada y de alto nivel de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión de síntesis ribosomal (RBS II) para una traducción eficaz, una secuencia de codificación de etiqueta 6XHis, t_0 y terminaciones de transcripción T1, origen de replicación CoIEI, y un gen de beta-lactamasas que confiere resistencia a la ampicilina. Los vectores de PQE

permiten la colocación de una etiqueta 6xHis en cualquiera de las terminales N- o C de las proteínas recombinantes. Dichos plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30, y pQE 31 que proveen múltiples sitios de clonación para los tres marcos de lectura y facilitan la expresión de las proteinas N-terminal 6xHis. Otros vectores ejemplares de plásmido para la transformación de células de *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la patente de EE.UU. 4.952.496, disponible desde Novagen, Madison, WI, véase también la bibliografía publicada por Novagen de la descripción del sistema). Dichos plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T71ac, el terminador T7, el operador inducible *E. coli*, y el gen represor lac pET; el pET 12a-c, que contiene el promotor T7, el terminador T7, y la señal de secreción *E. coli* ompT, y el pET 15b y el pET19b (Novagen, Madison, WI), que contienen una secuencia líder His-Tag ™ para su uso en la depuración con una columna y un sitio de su disociación de la trombina, que permite la división de purificación sobre la columna, la región T7 del promotor lac y el terminador T7.

2. Sistemas de expresión

Los polipéptidos FVII (modificados y sin modificar) pueden ser producidos por cualquier método conocido en el arte de producción de proteínas en particular en los métodos *in vitro* e *in vivo*, como, por ejemplo, la introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican al FVII en una célula hospedadora, animal huésped y la expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican al FVII *in vitro*. Los polipéptidos FVII y FVII modificados pueden expresarse en cualquier otro organismo adecuado para producir las cantidades

requeridas y las formas de un polipéptido FVII necesario para la administración y el tratamiento. Los anfitriones de expresión incluyen organismos procariotas y eucariotas, como la *E. coli*, la levadura, plantas, células de insecto, células de mamíferos, incluyendo líneas de células humanas y animales transgénicos. Los anfitriones de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas, así como los tipos de modificaciones post-traduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. La elección del huésped de expresión se puede hacer sobre la base de estos y otros factores, como las consideraciones de regulación y de seguridad, los costes de producción y de la necesidad y los métodos de purificación.

La expresión en anfitriones eucariotas puede incluir la expresión en levaduras, como Saccharomyces cerevisiae y Pichia Pastoría, células de insecto como las células de la Drosophila y células de lepidópteros, las plantas y células de las plantas como el tabaco, maíz, arroz, algas y Lemna. Las células eucariotas de expresión también incluyen las líneas de células de mamíferos como el de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón de hámster bebé (BHK). Los anfitriones de expresión eucariotas también incluyen la producción de animales transgénicos, por ejemplo, incluyendo la producción en el suero, leche y huevos. Los animales transgénicos para la producción de polipéptidos de tipo salvaje FVII son conocidos en el arte (Patente EE.UU. N º 20020166130 y 20040133930 de publicación) y pueden ser adaptados para la producción de polipéptidos FVII modificados proporcionados en este documento.

Muchos vectores de expresión están disponibles y son conocidos por aquellos de habilidad en el arte de la expresión de FVII. La elección del vector de expresión está influida por la elección del sistema de acogida de expresión. Esta selección está dentro del nivel de habilidad de los artesanos calificados. En general, los vectores de expresión pueden incluir los promotores de la transcripción y, opcionalmente, potenciadores, señales de traducción, y señales de terminación de la transcripción y traducción. Los vectores de expresión que se utilizan para la transformación estable suelen tener un marcador de selección que permite la selección y el mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, un origen de replicación se puede utilizar para ampliar el número de copias de los vectores en las células. Los polipéptidos FVII o modificados también pueden ser utilizados o se expresan como la fusión de proteínas. Por ejemplo, una fusión se puede generar para agregar funcionalidad adicional a un polipéptido. Ejemplos de proteínas de fusión incluyen, pero no se limitan a, la fusión de una señal de secuencia, una etiqueta, como para la localización, por ejemplo, una etiqueta his_6 o una etiqueta myc, o una etiqueta para la purificación, por ejemplo, una fusión de GST, y una secuencia de la dirección de la secreción de proteínas y/o asociación de la membrana.

En una configuración, los polipéptidos FVII o modificados pueden expresarse en una forma activa, la cual la activación se logra por medio de una auto activación de la secreción siguiente de polipéptido. En otra configuración, la proteasa se expresa en una forma inactiva, zimógeno.

Los métodos de producción de los polipéptidos FVII pueden incluir coexpresión de uno o más polipéptidos heterólogos adicionales que pueden ayudar en la generación de los polipéptidos FVII. Por ejemplo, los polipéptidos pueden contribuir al post-procesamiento de la traducción de los polipéptidos FVII. Los polipéptidos ejemplares incluyen, pero no limitan a, peptidasas que ayudan a cortan secuencias de FVII precursores, tales como la secuencia propéptido, y las enzimas que participan en la modificación del polipéptido FVII, como por glicosilación, hidroxilación, carboxilación, o fosforilación. Un peptidasa ejemplar que puede ser coexpresada con FVII es PACE/furina (o PACE-SOL), que ayuda en la ruptura de la secuencia del propéptido FVII. Un ejemplo de la proteína que ayuda en la carboxilación del polipéptido FVII es la enzima sensible a la warfarina-K 2,3-reductasa de la vitamina epóxido (VKOR), que produce reducción de la vitamina K para su utilización como un cofactor por la vitamina K-dependiente-γ carboxilasa (Wajih et al., J. Biol. Chem.. 280 (36) 31,603 a 31,607). Una subunidad de esta enzima, VKORCl, puede ser coexpresada con el polipéptido FVII modificado para aumentar la γ-carboxilación de uno o varios polipéptidos adicionales que se pueden expresar desde el mismo vector de expresión como el polipéptido FVII o de un vector diferente.

a. Expresión procariota

Las procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema de producción de grandes cantidades de FVII (véase, por ejemplo, Platis et al. (2003) Protein Exp. Purif. 31 (2): 222-30, y Khalizzadeh et al. (2004) J. Ind.

Microbiol. Biotechnol. 31 (2): 63-69). La transformación de *E. coli* es una técnica sencilla y rápida conocida por aquellos de habilidad en el arte. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles que son útiles para inducir altos niveles de expresión de la proteína y para expresar proteínas que presentan cierta toxicidad para las células huéspedes. Ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor lac, el promotor de punta, el promotor tac híbrido, la T7 y los promotores SP6 de ARN y el promotor de temperatura regulada λP_L.

El FVII puede expresarse en el medio ambiente citoplasmático de *E. coli*. El citoplasma es un entorno de reducción y de algunas moléculas, esto puede resultar en la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Los agentes reductores como el mercaptoetanol ditiotreitol y β-y desnaturalizante (por ejemplo, como guanidina-HCl y urea) pueden ser usados para resolubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de FVII en el espacio periplásmico de bacterias que proporcionan un ambiente oxidante y chaperoninas similares y disulfuro de isomerasas que conducen a la producción de la proteína soluble. Típicamente, una secuencia líder se fusiona con la proteína a ser expresa que dirige la proteína a la periplasma. El líder se retira por señales peptidasas dentro del periplasma. Ejemplos de secuencias líderes de periplásmico objetivo incluyen el líder pelB del gen Pectatoliasa y el líder de derivados del gen alcalino de fosfatasa. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la salida de la proteína expresada en el medio de cultivo. La secreción de las proteínas permite la purificación rápida y sencilla desde el

sobrenadante del cultivo. Las proteínas que no son secretadas pueden obtenerse en el periplasma por lisis osmótica. Similar a la expresión citoplasmática, en algunos casos pueden llegar a ser las proteínas insolubles y los desnaturalizantes y los agentes reductores se pueden utilizar para facilitar la solubilización y replegado. La temperatura de la inducción y el crecimiento también puede influir en los niveles de expresión y de solubilidad. Normalmente, se utilizan temperaturas de 250ºC y 370ºC. Las mutaciones también pueden ser utilizadas para aumentar la solubilidad de las proteínas expresadas. Normalmente, las bacterias producen proteínas aglicosilatadas. Así, si las proteínas requieren de glicosilación de la función, se puede añadir glicosilación *in vitro* después de la purificación de las células del huésped.

b. Levadura

Las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Yarrowia lipolytica, Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son huéspedes de expresión útiles para FVII (véase, por ejemplo, Skoko et al. (2003) Biotechnol. Appl. Biochem. 38 (Pt3) :257-65). La levadura puede ser transformada con vectores episomales de replicación o integración cromosómica estable por recombinación homóloga. Normalmente, los promotores inducibles se utilizan para regular la expresión génica. Ejemplos de los promotores son, entre otros GAL1, GAL7, y GAL5 y promotores de metalotioneína como CUP1. Los vectores de expresión a menudo incluyen un marcador de selección, como LEU2, TRP1, HIS3, y URA3 para la selección y el mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en la levadura

son a menudo solubles y co-expresan con caperoninas, como Bip y la proteína disulfuro isomerasa, pueden mejorar los niveles de expresión y de solubilidad. Además, las proteínas expresadas en la levadura puede ser dirigidas por la secreción de la señal mediante la fusión de la secreción de péptidos como la señal de la secreción del factor de la levadura alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de superficie de células de levadura, tales como la adhesión de los receptores de apareamiento Aga2p o el *Arxula adeninivorans* glucoamilasa. Un sitio de corte de la proteasa (por ejemplo, la Kex-2 de la proteasa) puede ser diseñado para eliminar las secuencias de fundido de los polipéptidos en su salida de la vía de secreción. La levadura también es capaz de la glicosilación en motivos Asn-X-Ser/Thr.

c. Insectos y células de insecto

Los insectos y las células de insecto, en particular mediante un sistema de expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos FVII o modificados (véase, por ejemplo, Muneta, et al. (2003) J. Vet. Med. Sci. 65 (2) :219-23). Las células de insectos y larvas de insectos, incluyendo la expresión en la hemolinfa, expresan altos niveles de proteínas y son capaces de la mayor parte de las modificaciones post-traduccionales utilizadas por organismos superiores. Los baculovirus tienen una amplia acogida restrictiva que mejora la seguridad y reduce las preocupaciones de reglamentación de expresión eucariótica. Típicamente, los vectores de expresión para el uso de un promotor como el promotor de polihedrina de baculovirus para la expresión de alto nivel. Los sistemas comunes de baculovirus incluyen baculovirus como virus

nucleares *Autoghapha californica* de la poliedrosis californica (AcNPV), y el virus de la poliedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea de células de insecto como Sf9 derivadas de *Spodoptera frugiperda, Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpNl). Para la expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula que se expresa se funde inmediatamente aguas abajo del codón de la iniciación polihedrina del virus. Las señales de la secreción de los mamíferos están correctamente tratadas en células de insecto y se pueden utilizar para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Además, las líneas celulare*s Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpNl) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a los sistemas de células de los mamíferos.

Un sistema de expresión alternativo en células de insecto es el uso de las células transformadas de forma estable. Las líneas celulares, como la Schnieder 2 (S2) y las células Kc (*Drosophila melanogaster*) y las células C7 (*Aedes albopictus*) se pueden utilizar para la expresión. El promotor de la metalotioneína Drosophila puede ser utilizado para inducir altos niveles de expresión en la presencia de la inducción de metales pesados con el cadmio o el cobre. Los vectores de expresión suelen ser gestionados por el uso de marcadores de selecciones, como la neomicina e higromicina.

d. Células de mamíferos

Los sistemas de expresión de mamíferos pueden ser usados para expresar polipéptidos FVII. La expresión de las construcciones pueden ser transferidas a células de mamíferos por la infección viral como el adenovirus o

por transferencia directa del ADN como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y por medios físicos, tales como la electroporación y la microinyección. Los vectores de expresión de células de mamíferos suelen incluir un sitio ARNm, una caja TATA, una secuencia de inicio de traslación (secuencia de consenso Kozak) y elementos de poliadenilación. Estos vectores incluyen a menudo el promotor de la transcripción potenciador para la expresión de alto nivel, por ejemplo, el promotor SV40-Enhancer, el promotor citomegalovirus humano (CMV), y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores son potenciadores activos en muchos tipos de células. De tejidos y células, los promotores de tipo y potenciadores de las regiones también se pueden utilizar para la expresión. Los promotores/regiones potenciadoras ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los de los genes, como la elastasa 1, la insulina, la inmunoglobulina, virus del ratón del tumor mamario, albúmina, alfa-fetoproteína, la alfa 1-antitripsina, la beta-globina, proteína básica de la mielina, la miosina la luz de la cadena-2, y la liberación de gonadotrofinas del gen de control de la hormona. Los marcadores seleccionables pueden ser utilizados para seleccionar y mantener las células con la expresión de la construcción. Ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, fosfotransferasa B higromicina, adenosina deaminasa, xantina guanina fosforibosiltransferasa, fosfotransferasa aminoglucósidos, dihidro folato reductasa y la timidina quinasa. La fusión con la superficie de las moléculas de señalización celular como TCR-ζ y FcεRI-γ

puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo en la superficie de la célula.

Muchas líneas celulares están disponibles para la expresión de mamíferos incluyendo el ratón, rata, mono, humano y el pollo y células de hámster. Las líneas de células ejemplares incluyen, pero no se limitan a, BHK (es decir, las células BHK-21), 293-F, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, líneas celulares N50 (no secretoras) y otras líneas celulares de mieloma, líneas celulares de hibridoma y heterohibridoma, los linfocitos, los fibroblastos, Sp2/0, COS, N1H3T3, HEK293, 293S, 293T, 2B8, y las células HKB. Las líneas celulares también están disponibles para adaptarse a medios libres de suero que facilitan la purificación de proteínas secretadas por los medios de cultivo celular. Un ejemplo es línea celular libre de suero EBNA-1 (Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42).La expresión de polipéptidos recombinantes FVII que exhiben una estructura similar y modificaciones post-traduccionales como derivados del plasma FVII se conocen en el arte (véase, por ejemplo, Jurlander et al. (2003) Semin Throm Hemost). Los métodos de optimización de la vitamina K-dependiente son la expresión de proteínas conocidas. Por ejemplo, la suplementación de la vitamina K en un medio de cultivo o co-expresión de la vitamina K-dependiente γ-carboxilasas (Wajih, et al, J. Biol. Chem. 280 (36) 31603-31607) puede ayudar a las modificaciones post-traduccionales de la vitamina K-dependiente de las proteínas, tales como polipéptidos FVII.

e. Plantas

Las células de las plantas transgénicas y las plantas se pueden utilizar para la expresión de FVII. La expresión de las construcciones se suelen transferir a las plantas mediante la transferencia directa de ADN como el bombardeo de microproyectiles y la transferencia mediada PEG en protoplastos, y con la transformación mediada por Agrobacterium. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias de promotor y potenciador, elementos de la terminación de la transcripción, y elementos de control de la traducción. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación se dividen entre los receptores dicotiledóneas, como la Arabidopsis y el tabaco, y los anfitriones monocotiledóneas, como el maíz y el arroz. Ejemplos de los promotores de la planta utilizada para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de la nopalina sintasa, la ribosa bifosfato carboxilasa y el promotor de la ubiquitina y de los promotores de UBQ3. Los marcadores seleccionables como la higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa se utilizan a menudo para facilitar la selección y el mantenimiento de las células transformadas. Las células de la planta transformadas se pueden mantener en la cultura como células, agregados (tejido de callos) o regenerado en plantas enteras. Porque las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación de las células de mamíferos, esto puede influir en la elección de producir FVII en estas máquinas. Las células de las plantas transgénicas también pueden incluir las algas modificadas genéticamente para producir proteínas (véase, por ejemplo, Mayfield et al. (2003) PNAS 100:438-442). Porque las plantas tienen diferentes patrones de

glicosilación de las células de mamíferos, esto puede influir en la elección de producir FVII en estas máquinas.

2. Purificación

Los métodos para la purificación de polipéptidos FVII de las células del huésped dependen de las células del huésped elegido y los sistemas de expresión. Para las moléculas secretadas, las proteínas suelen ser purificadas de los medios de cultivo después de la eliminación de las células. Para la expresión intracelular, las células pueden ser lisis y las proteínas purificadas de los extractos. Cuando los organismos transgénicos, como las plantas y animales transgénicos se utilizan para la expresión, los tejidos u órganos pueden ser utilizados como material de partida para hacer un extracto de lisis celular. Además, la producción de animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en la leche o los huevos, que pueden ser recogidos, y si es necesario las proteínas pueden extraerse y purificarse mediante los métodos estándar en el arte.

El FVII puede ser purificado mediante técnicas estándar de purificación de proteínas conocidas en el arte, incluyendo pero no limitado a, SDS-PAGE, la fracción de tamaño y cromatografía de exclusión de tamaño, la precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de quelato y cromatografía de intercambio iónico. Por ejemplo, los polipéptidos FVII pueden ser purificados por cromatografía de intercambio aniónico. Un método ejemplar para purificar los polipéptidos FVII está utilizando una columna de intercambio iónico que permite la unión de los polipéptidos que tiene un dominio GIa funcional, seguida de

elución en presencia de calcio (Véase, por ejemplo, ejemplo 3). Las técnicas de purificación de afinidad también se pueden utilizar para mejorar la eficiencia y la pureza de los preparativos. Por ejemplo, los anticuerpos, los receptores y otras moléculas que se unen a FVII pueden ser utilizadas en la purificación de la afinidad. En otro ejemplo, la depuración también se puede mejorar con una columna de afinidad soluble TF (STF) (Maun et al. (2005) Prot. Sci. 14:1171-1180). Los constructos de expresión también puede ser diseñados para añadir una etiqueta de afinidad, tales como un epítopo myc, la fusión GST o His6 y purificado por afinidad con anticuerpos myc, la resina de glutatión, y Ni-resina, respectivamente, a una proteína. La pureza puede ser evaluada por cualquier método conocido en el arte como la electroforesis en gel y tinción y técnicas espectrofotométricas.

La proteasa FVII puede ser expresada y purificada para estar en una forma inactiva (formulario zimógeno) o, alternativamente, la proteasa expresada puede ser purificada en una forma activa, como por autocatálisis. Por ejemplo, los polipéptidos FVII que han sido activados a través de rotura proteolítica de Arg^{152}-Ile^{153} se pueden preparar *in vitro* (es decir, FVIIa, dos forma de cadena). Los polipéptidos FVII pueden ser primero preparados por cualquiera de los métodos de producción descritos en este documento, incluyendo pero no limitado a, la producción de células de mamíferos, seguido de la depuración. La escisión de los polipéptidos FVII en la forma activa de la proteasa, FVIIa, se puede lograr por diversos medios. Por ejemplo, autoactivation durante la incubación con vesículas de fosfolípidos en la

presencia de calcio que se puede alcanzar en 45 minutos (Nelsestuen et al. (2001) J Biol Chem 276:39825-31). Los polipéptidos FVII también se pueden activar a la terminación de la incubación con el factor Xa, el factor XIIa o de FT en la presencia de calcio, con o sin fosfolípidos (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 y Broze et al. (1980) J Biol Chem 255:1242--1247, Higashi et al. (1996) J Biol Chem. 271 :26569-26574, Harvey et al. J Biol Chem 278:8363-8369).

3. Proteínas de Fusión

Las proteínas de fusión que contienen un polipéptido modificado de FVII y son de uno o más distinto polipéptidos también fueron proporcionados. Composiciones farmacéuticas que contienen tales proteínas de fusión formuladas para la administración por una vía adecuada son proporcionadas. Las proteínas de fusión son formadas al ligar en cualquier orden el polipéptido modificado de FVII y un agente, tal como un anticuerpo o un fragmento de éste, factor de crecimiento, receptor, ligando, y otro agente distinto para facilitar la purificación de un polipéptido de FVII, alterando las propiedades farmacodinámicas de un polipéptido de FVII por dirección, por ejemplo, al dirigir el polipéptido a una célula o a un tejido, y/o aumentando la expresión o la secreción del polipéptido de FVII. Cualquier proteína de fusión de FVII retiene típicamente actividad del coagulante por lo menos cerca del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o del 95% comparada con un polipéptido de la no-fusión FVII, incluyendo el 96%, 97%, 98%, 99% o una actividad más grande del coagulante comparados con un polipéptido de no fusión.

El enlace de un polipéptido de FVII con otro polipéptido puede ser afectado directamente o indirectamente vía un enlazador. En un ejemplo, el enlace puede ser un enlace químico, por ejemplo vía agentes del heterobifuncional o enlaces tiol o otros enlaces similares. La fusión también puede ser efectuada por medio de un recombinante. La fusión de un polipéptido de FVII a otro polipéptido puede ser de terminal N- ó C- del polipéptido de FVII. No limitando ejemplos de los polipéptidos que pueden ser utilizados en proteínas de fusión con un polipéptido de FVII proporcionado aquí incluye, por ejemplo, un polipéptido del GST (S-transferasa del glutatión), el dominio de Fc de la inmunoglobulina G, o una secuencia de una señal heteróloga. Las proteínas de fusión pueden contener componentes adicionales, tales como la proteína de unión *E. coli* maltosa (MBP) la cual ayuda en la absorción de la proteína por las células {vea, la aplicación PCT internacional. No. WO 01/32711).

La proteína de fusión puede ser producida por técnicas estándares de recombinantes. Por ejemplo, los códigos de fragmentos de ADN de las diferentes secuencias polipeptídicas se pueden unir en-el-marco-de ligado de acuerdo con las técnicas convencionales, ejemplo, utilizando extremos romos o escalonado de Termini para la ligadura, restricción de la enzima de digestión para proporcionar el apropiados Termini, relleno de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento de la fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables, y ligación enzimática. En otra realización, el gen de la fusión puede ser sintetizado por las técnicas convencionales, incluyendo los

sintetizadores automatizados del ADN. Alternativamente, la amplificación de PCR de los fragmentos génicos puede ser realizada usando los cebadores del anclaje que dan lugar a voladizos complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que puede ser posteriormente recocidos y reamplificados para generar una secuencia de genes quimérica (véase, ejemplo, a Ausubel *et al*. (eds.) PROTOCOLOS ACTUALES EN LA BIOLOGÍA MOLECULAR, John Wiley y Hijos, 1992). Por otra parte, muchos de los vectores de expresión están disponibles comercialmente ya que codifica una molécula de fusión {ejemplo, un polipéptido del GST). La codificación del ácido nucleico de FVII puede ser clonado en tal vector de expresión tales que la molécula de fusión esta en-el-marco-de unión de la proteína de la proteasa.

4. Modificación de polipéptido

Polipéptidos de los de FVII modificados pueden ser preparados como cadenas polipeptídicas desnudas o como un complejo. Para algunas aplicaciones, puede ser deseable preparar FVII modificado en una forma "desnuda" sin modificaciones químicas pos-traslacionales u otras modificaciones químicas. Cadenas polipeptídicas desnudas pueden ser preparadas en los huéspedes adecuados que no modifiquen pos-traslacionalmente al FVII. Estos polipéptidos también pueden prepararse en sistemas *In Vitro* y usando síntesis química del polipéptido. Para las distintas aplicaciones, modificaciones determinadas pueden ser deseadas incluyendo pegilación, albuminación, glicosilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación u otras modificaciones conocidas. Modificaciones pueden ser hechas *In Vitro* o,

por ejemplo, produciendo el FVII modificado en un huésped adecuado que produzca tales modificaciones.

5. Secuencias de nucleótidos

Las moléculas de ácido nucleico que codificaban polipéptidos de FVII o de FVII modificado son proporcionados aquí. Las moléculas de ácido nucleico incluyen variantes alélicas o variantes de empalme de cualquier polipéptido codificado de FVII. Ejemplares de las moléculas de ácido nucleico proporcionaron aquí, son cualquiera que codifique un polipéptido modificado de FVII proporcionado aquí; por ejemplo cualquier codificación que un polipéptido establecido en cualquiera de SEQ ID NOS.: 18-43, 125-150 ó 206-250. En una realización, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas aquí tienen por lo menos 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, o 99% de la secuencia de identidad o hibridan bajo condiciones, de media o alta severidad a lo largo por lo menos del 70% de cualquier ácido nucleico completo que codifica un polipéptido de FVII proporcionado aquí. En otra realización, Una molécula de ácido nucleico puede incluir ésos con secuencias degeneradas del codón que codifican los polipéptidos de FVII proporcionados aquí.

G. Evaluando las actividades modificadas del polipéptido FVII

Las actividades y las propiedades de los polipéptidos de FVII pueden ser evaluadas *In Vitro* y/o *In Vivo*. Ensayos para tal evaluación son conocidos por los especialistas en esta técnica y el son conocido para correlacionar actividades ensayadas y resultados de las actividades terapéuticas *In Vivo*. En un ejemplo, variantes de FVII pueden ser evaluadas con respecto a FVII sin

modificar y/o del tipo salvaje. En otro ejemplo, la actividad de polipéptidos FVII modificados pueden ser evaluados seguidos por la exposición *In Vitro* o *In Vivo* a TFPI o a AT-III y se compara con la de los polipéptidos modificados de FVII que no han sido expuestos a TFPI o a AT-III. Los ensayos *In Vitro* incluyen cualquier ensayo del laboratorio conocido por un especialista en la técnica, como por ejemplo, los ensayos basados en la célula que incluyen ensayos de la coagulación, los ensayos de unión, los ensayos de la proteína, y los ensayos de la biología molecular. Los ensayos *In Vitro* incluyen ensayos de FVII en modelos animales así como la administración a los seres humanos. En algunos casos, la actividad *In Vivo* de FVII sea determinada evaluando sangre, suero, u otro fluido corporal para los determinantes del ensayo. Las variantes de FVII también pueden ser ensayadas *In Vivo* para evaluar una actividad o una propiedad, tal como el efecto terapéutico.

Típicamente, el ensayos descritos aquí son con respecto a la forma activa de dos cadenas de FVII, es decir. FVIIa. Tales ensayos también pueden ser realizados con la forma de cadena sencilla, por ejemplo para proporcionar un control negativo puesto que tal forma no contiene típicamente actividad proteolítica o catalítica, requeridas para la actividad coagulante de FVII. Además, tales ensayos también pueden realizarse en presencia de cofactores, tales como TF, que a veces aumenta la actividad de FVII.

1. Ensayos *In Vitro:*

Los *ensayos In Vitro* ejemplares incluyen ensayos para evaluar la modificación y la actividad del polipéptido. Las modificaciones pueden ser

evaluadas usando los ensayos *In Vitro* que evalúan carboxilación γ- u otras modificaciones pos-traslacionales, ensayos de la proteína y ensayos conformacionales conocidos en la técnica. Los ensayos para la actividad incluyen, pero no están limitados a, la medición de la interacción de FVII con distintos factores de coagulación, tales como TF, factor X y factor IX, ensayos proteolíticos para determinar la actividad proteolítica de los polipéptidos de FVII, ensayos para determinar la unión y/o la afinidad de los polipéptidos de FVII para las fosfatidilserinas y los distintos fosfolípidos, y de los ensayos basados en la célula para determinar el efecto de los polipéptidos de FVII en la coagulación.

Las concentraciones de los polipéptidos de FVII modificados pueden ser evaluadas por los métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitados a, los ensayos de inmunoanálisis de la cuasi-enzima (ELISA), SDS-PAGE; Bradford, Lowry, métodos de BCA; Absorbancia UV, y otros métodos de etiquetado de la proteína cuantificable, por ejemplo, pero no limitado a, métodos inmunológicos, radiactivos y fluorescentes y métodos relacionados.

La evaluación de productos de escisión de las reacciones de la proteólisis, incluyendo la escisión de los polipéptidos de FVII o de los productos producidos por actividad de la proteasa de FVII, pueden ser realizados usando los métodos que incluyen, pero no están limitados a, la división del substrato cromogénico, HPLC, análisis de SDS-PAGE, ELISA, secado occidental, inmunohistoquímica, la inmunoprecipitación, la secuenciación de NH2-terminal, y el etiquetado de la proteína.

Las propiedades estructurales de los polipéptidos de FVII modificado también pueden ser evaluadas. Por ejemplo, la cristalografía de la radiografía, la resonancia magnética nuclear (NMR), y la microscopía del crioelectrón (crio-EM) de los polipéptidos de FVII modificado pueden ser realizados para evaluar la estructura tridimensional de los polipéptidos de FVII y/o de las distintas propiedades de los polipéptidos de FVII, tales como CA^{2+} o la unión del cofactor.

Además, la presencia y la extensión de la degradación de FVII pueden ser medidas por técnicas estándares tales como la electroforesis en gel de poliacrilamida del dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), y el secado occidental de electroforesis de las muestras que contenían FVII. Los polipéptidos de FVII que se han expuesto a las proteasas también pueden ser sometidos a la secuenciación de la N-terminal para determinar la posición o cambios en los sitios de escisión de los polipéptidos modificados de FVII.

a. Modificación pos-traslacional

Los polipéptidos de FVII también pueden ser evaluados para la presencia de modificaciones pos-traslacionales. Tales son los ensayos conocidos en la técnica e incluyen ensayos para medir el glicosilación, la hidroxilación, y la carboxilación. En un ensayo ejemplar para el glicosilación, el análisis del carbohidrato puede ser realizado, por ejemplo, con el análisis SDS de las páginas de los polipéptidos de FVII expuestos a la hidrazinólisis o al tratamiento de la endoglicosidasa.

La hidrazinólisis libera glicanos vinculados N y O de glicoproteínas mediante la incubación con anhidro hirazina, mientras que la liberación de endoglicosidasa involucra PNGasa F, la cual libera la mayoría de glicanos N de las glicoproteínas. La hidranólisis o tratamiento de endoglicosidasa de polipéptidos FVII genera un terminal de reducción que puede ser etiquetado con una etiqueta de fluoróforo o cromóforo. Los polipéptidos FVII etiquetados pueden ser analizados mediante electroforesis de carbohidrato asistido de fluoróforo (FACE). La etiqueta fluorescente para glicanos también puede ser utilizada para el análisis, perfilamiento o huella de monosacáridos de patrones de glicosilación compleja mediante HPLC. Los métodos HPLC ejemplares cinlueyn cromatografía de interacción hidrofílica, interacción electrónica, intercambio de iones, interacción hidrofóbica, y cromatografía de exclusión de tamaño. Las sondas de glicano ejemplares incluyen, pero no se limitan a, 3-(acetilamino)-6-aminoacridina (AA-Ac) y 2-ácido aminobenzoico (2-AA). Las mitados de carbohidrato también pueden ser detectadas a través del uso de anticuerpos específicos que reconocen el polipéptido FVII glicosilado. Un ensayo ejemplar para medir la hidroxilación β comprende el análisis de HPLC de fase reversa de polipéptidos FVII que han sido sujetos a hidrólisis alcalina (Przysiecki *et al.* (1987) PNAS 84:7856-7860). La carboxilación y carboxilación γ de polipéptidos FVII puede ser evaluada usando espectrometría de masa con análisis de tiempo de vuelo de ionización de deserción de láser asistida por matriz (MALDI-TOF), como se describe en el arte (ver por ejemplo, Harvey *et al.* J Biol Chem 278:8363-8369, Maum *et al.* Prot Sci 14:1171-1180). La

interacción de un polipéptido FVII que contiene el propéptido (pro-FVII) con la carboxilasa responsable por la modificación pos-translacional de carboxilato γ también puede ser evaluada. La constante de disociación (K_d) seguida a la incubación de carboxilasa con polipéptidos pro-FVII etiquetados con fluorescina puede ser medida mediante la determinación de la cantidad de carboxilasa unida por anisotropía (Lin *et al.* (2004) J Biol Chem 279:6560-6566).

b. Actividad proteolítica

Los polipéptidos FVII modificados pueden ser probados para actividad proteolítica. La actividad proteolítica del FVII puede ser medida usando sustratos cromogénicos tales como Cromozim t-Pa ($MeSO_2$-D-Phe-Gly-Arg-pNA), S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA), S-2266 (H-D-Val-Leu-Arg-pNA), S-2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), Espectrozima FXa y Espectrozima FVIIa (CH3SO2-D-CHA-But-Arg-pNA). Los polipéptidos FVII, solos o en presencia de TF, son incubados con concentraciones variantes de sustrato cromogénico. La ruptura del sustrato puede ser monitoreada mediante la absorbencia y la tasa de hidrólisis de sustrato determinada por regresión lineal usando un programa de computador fácilmente disponible.

La activación de sustratos de factor de coagulación, tales como FX, por polipéptidos FVII también puede ser evaluada. Los polipéptidos FVII, con o sin preincubación con TF, pueden ser incubados con FX purificado (disponible comercialmente). La cantidad de FXa activo producido como consecuencia de la incubación con polipéptidos FVII es medida como actividad de FXa para un sustrato cromogénico, tal como S-2222 o FXa Spectrafluor (CH3SO2-D-CHA-

Gly-Arg.AMC.AcOH), el cual es monitoreado por medio de los cambios de absorbencia (Harvey *et al.* J Biol Chem 278:8363-8369, ver también el Ejemplo 5 más adelante). Una fuente de fosfolípidos también puede se incluida en la incubación de FVII y FX (Nelsestuen *et al.* (2001) J Biol Chem 276:39825-31).

c. Actividad de coagulación

Los polipéptidos FVII pueden ser probados para actividad de coagulación mediante el uso de ensayos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, algunos de los ensayos incluyen, pero no se limitan a, un ensayo de coagulación de dos etapas (Leibman *et al.* (1985) PNAS 82:3879-3883); el ensayo de tiempo de protrombina (PT, el cual puede medir la actividad dependiente de TF del FVIIa); tiempo de coagulacióin activado (ACT); tiempo de coagulación activada recalcificada; el tiempo de coagulación de Lee-White; o tromboelastografía (TEG) (Pusateri *et al.* (2005) Critical Care 9:S15-S24). Por ejemplo, la actividad de coagulación de un polipéptido FVII modificado puede ser determinada por un ensayo a base de PT en donde el FVII es diluido en plasma deficiente de FVII, y mezclado con reactivo de tiempo de protrombina (recombinante TF con fosfolípidos y calcio), tal como el disponible como Innovin™ de Dade Behring. La formación del coágulo es detectada ópticamente y el tiempo de coagulación es determinado y comparado contra el plasma deficiente de FVII solo.

d. Unión y/o inhibición por otras proteínas

Los ensayos de inhibición pueden ser utilizados para medir la resistencia de los polipéptidos FVII modificados a inhibidores de FVII, tal como, por

ejemplo, TFPI y AT-III, o moléculas tales como Zn^{2+}. Las evaluaciones de inhibición de otros inhibidores también pueden ser probadas e incluyen, pero no se limitan a, otros inhibidores de serina proteasa, y anticuerpos específicos de FVII. La inhibición puede ser evaluada mediante la incubación de, por ejemplo, TFPI, AT-III o Zn^{2+} con polipéptidos FVII que han sido preincubados con TF. La actividad del FVII puede luego ser medida utilizando una o más ensayos de actividad de coagulación descritos anteriormente, y la inhibición por TFPI, AT-III o Zn^{2+} puede ser evaluada mediante la comparación de la actividad de los polipéptidos FVII incubados con el inhibidor, con la actividad de polipéptidos FVII que no fueron incubados con el inhibidor.

Los polipéptidos FVII pueden ser probados para la unión a otros factores de coagulación e inhibidores. Por ejemplo, las interacciones directas o indirectas de FVII con cofactores, tales como TF, sustratos, tales como FX y FIX, e inhibidores, tales como TFPI, antitrombina III y heparina pueden ser evaluados usando cualquier ensayo de unión conocido en el arte, que incluye, pero no se limita a, inmunoprecipitación, purificación de columna, SDS-PAGE no reductor, ensayos de BIAcore®, resonancia de plasma de superficie (SPR), transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), polarización de fluorescencia (FP), calorimetría de titulación isotérmica (ITC), dicroísmo circular (CD), ensayos de complementación de fragmento de proteína (PCA), espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR), dispersión ligera, equilibrio de sedimentación, cromatografía de filtración de gel de zona pequeña, retardación de gel, secante de lejano oeste, polarización de

fluorescencia, huella de proteína de radical hidroxilo, visualización de fago, y varios sistemas de híbridos dobles. En un ejemplo la unión de Zn^{2+} es evaluada usando análisis de equilibrio (Petersen *et al.,* (2000) Protein Science 9:859-866).

e. Afinidad de fosfolípidos

La unión y/o afinidad del polipéptido FVII modificado por fosfotidilserina (PS) y otros fosfolípidos puede ser determinada usando ensayos bien conocidos en el arte. Los fosfolípidos altamente puros (por ejemplo, concentraciones conocidas de PS bovina y fosfatidilcolina (PC) de huevo, las cuales se encuentran disponibles comercialmente, tales como de Sigma, en solvente orgánico que puede ser utilizado para preparar vesículas de fosfolípidos unilaminar pequeñas. La unión del polipéptido FVII a estas vesículas PS/PC puede ser determinada por la dispersión de luz relativa a 90º de la luz incidente. La intensidad de la dispersión de luz con PC/PS solo y con PC/PS7FVII es medida para determinar la disociación constante (Harvey *at al.* J Biol Chem 278:8363-8369). La resonancia de plasma de superficie, tal como en un instrumento biosensor BIAcore, también puede ser utilizado para medir la afinidad de polipéptidos FVII para las membranas de fosfolípidos (Sun *et al*. Blood 101:2277-2284).

2. Modelos animales no humanos

Los modelos de animales no humanos pueden ser utilizados para evaluar la actividad, eficacia y seguridad de polipéptidos FVII modificados. Por ejemplo, los animales no humanos pueden ser utilizados como modelos para

una enfermedad o condición. Los animales no humanos pueden ser inyectados con enfermedad y/o sustancias que inducen fenotipo antes de la administración de variantes de FVII, tal como cualquier variante de FVII establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 18-43, 125-150 o 206-250, para monitorear los efectos en la progresión de enfermedad. Los modelos genéticos también son útiles. Los animales, tales como ratones, pueden ser generados los cuales imitan una enfermedad o condición por la sobre-expresión, bajo expresión o eliminación de uno o más genes, tales como, por ejemplo, ratones de eliminación de factor VIII que muestran hemofilia A (Bi *et al.* (1995) Nat Gen 10:19-121). Dichos animales pueden ser generados por medio de técnicas transgénicas de producción de animal bien conocidas en el arte o usando cadenas de mutante inducidas u que ocurren de forma natural. Los ejemplos de modelos de animales no humanes útiles de enfermedad asociada con FVII incluyen, pero no se limitan a, modelos de desórdenes de sangrado, en particular hemofilia, o enfermedad trombótica. Los modelos de animales no humanos para lesión también pueden ser utilizados para evaluar una actividad, tal como la actividad de coagulación, de polipéptidos FVII. Estos modelos de animales no humanos pueden ser utilizados para monitorear la actividad de las variantes de FVII en comparación con un polipéptido FVII tipo salvaje.

Los modelos de animales también pueden ser utilizados para monitorear la estabilidad, vida media, y aclaración de los polipéptidos FVII modificados. Dichos ensayos son útiles para comparar los polipéptidos FVII modificados y para calcular dosis y regimenes de dosis para las pruebas adicionales de

animales no humanos y de humanos. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado, tal como cualquier variante de FVII suministrado acá incluyendo, por ejemplo, cualquiera establecido en cualquiera de las SEQ ID NOS: 18-43, 125-150 o 206-250, puede ser inyectado en la vena de la cola de los ratos. Las muestras de sangre son luego tomadas en puntos de tiempo después de la inyección (tales como minutos, horas y días después) y luego el nivel de los polipéptidos FVII modificados en las muestras corporales incluye, pero no se limita a, suero o plasma pueden ser monitoreados en puntos de tiempo específicos por ejemplo por ELISA o radioinmunoensayo. Las muestras de sangre de varios puntos de tiempo seguidos a la inyección de los polipéptidos FVII también pueden ser probadas para la actividad de coagulación utilizando varios métodos, tal como se describe en los Ejemplos 9 y 14. Estos tipos de estudios farmacocinéticas pueden suministrar información con relación a la vida media, aclaramiento y estabilidad de los polipéptidos FVII, los cuales pueden asistir en la determinación de dosis adecuadas para la administración como un procoagulante.

Los polipéptidos FVII modificados, tales como cualquiera de los establecidos en cualquiera de las SEQ ID NOS:18-43, 125-150 o 206-250, pueden ser probados para efectividad terapéutica usando modelos de animales para hemofilia. En un ejemplo no limitante, un modelo animal tal como un ratón puede ser utilizado. Los modelos ratones de hemofilia están disponibles en el arte y pueden ser empleados para probar los polipéptidos FVII modificados. Por ejemplo, un modelo ratón de hemofilia A que es producida por inyección con

anticuerpos anti-FVIII pueden ser utilizados para evaluar la actividad coagulante de los polipéptidos FVII (ver por ejemplo, Ejemplos 8 y 14, y Tranholm *et al*. Sangre (2003) 102:3615-3620). Un modelo de ratón de hemofilia B también puede ser utilizado para probar los polipéptidos FVII (Margaritis *et al.* (2004) J Clin Invest 113:1025-1031). Los modelos no ratón de desórdenes de sangrado también existen. La actividad de polipéptido FVII puede ser evaluada en ratas con sangrado inducido de warfarina o sanragdo inducido de melagatran (Diness *et al.* (1992) Throm Res 67:233-241, Elg *et al.* (2001) Thromb Res 101:145-157), y conejos con sangrado inducido de heparina (Chan *et al.* (2003) J Thromb Haemost 1:760:765). Los perros con hemofilia A, hemofilia B y enfermedad de von Willebrand consanguíneas que muestran sangrado severo también pueden ser utilizados en estudios animales no humanos con polipéptidos FVII (Brinkhous *et al.* (1989) PNAS 86:1382-1386). La actividad de los polipéptidos FVII también puede ser evaluada en un modelo de ratón de sangrado en el cual se induce trombocitopenia mediante una combinación de radiación gama y el uso de anticuerpos de plaquetas (Tranholm *et al.* (2003) Thromb Res 109:217-223).

Adicional a los animales con desórdenes de sangrado generalizados, lesión y modelos de trauma pueden ser utilizados para evaluar la actividad de los polipéptidos FVII, y su seguridad y eficacia como un coagulante terapéutico. Los ejemplos no limitantes de dichos modelos incluyen modelo de estenosis coronaria en conejo (Fatorutto *et al.* (2004) Can J Anaesth 51:672-679), un modelo de lesión de hígado grado V en cerdos (Lynn *et al.* (2002) J Trauma

52:703-707), un modelo de lesión de hígado grado V en cerdos (Martinowitz *et al.* (2001) J Trauma 50:721-729) y modelo de aortotomía en cerdo (Sondeem *et al.* (2004) Shock 22:163-168).

3. Ensayos Clínicos

Varios ensayos están disponibles para evaluar la actividad del FVII para uso clínico. Dichos ensayos pueden incluir la evaluación de la coagulación, estabilidad de proteína y vida media *in vivo*, y ensayos fenotípicos. Los ensayos fenotípicos y los ensayos para evaluar el efecto terapéutico del tratamiento de FVII incluyen evaluaciones de los niveles de la sangre de FVII (por ejemplo, medición del FVII de suero antes de la administración y los puntos de tiempo seguidos a las administraciones incluyendo, después de la primera administración, inmediatamente después de la última administración, y puntos de tiempo entre estos, que corrigen para el índice de masa corporal (BMI)), evaluación de la coagulación sanguínea *in vivo* usando los métodos descritos anteriormente seguido al tratamiento con FVII (por ejemplo, ensayo PT), y respuesta fenotípica al tratamiento de FVII que incluye la mejora de los síntomas sobre el tiempo en comparación con los sujetos tratados con un FVII no modificado y/o tipo salvaje o placebo. Los pacientes tratados con polipéptidos FVII pueden ser monitoreados para pérdida de sangre, requerimiento de transfusión, y hemoglobina. Los pacientes pueden ser monitoreados regularmente por un periodo de tiempo para administraciones de rutina o repetidas, o seguido a la administración en respuesta a eventos agudos, tales como hemorragia, trauma, o procedimientos quirúrgicos.

H. Formulación y Administración

Las composiciones para el uso en el tratamiento de desórdenes de sangrado se suministran acá. Dichas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido factor VII como se describe acá. Las concentraciones efectivas de polipéptidos FVII o derivados farmacéuticamente aceptados de los mismos son mezcladas con un portador o vehículo farmacéutico adecuado para la administración sistémica, tópica o local. Los compuestos son incluidos en una cantidad efectiva para el tratamiento del desorden seleccionado. La concentración de compuesto activo en la composición dependerá de la absorción, inactivación, tasas de excreción del compuesto activo, cronograma de dosis, y cantidad administrada así como otros factores conocidos para aquellos expertos en la materia.

Los portadores o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos acá suministrados incluyen cualquier portador conocido para los expertos en la materia para ser adecuado para el modo particular de administración. Las composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido FVII descrito acá también pueden ser suministradas como un polvo liofilizado que es reconstituido, tal como con agua estéril, inmediatamente antes de la administración.

1. Formulaciones

Las composiciones farmacéuticas que contienen FVII pueden formularse en cualquier forma convencional por la mezcla de una cantidad selecta de

polipéptido con uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. La selección de la portador o excipiente está dentro de la habilidad de la profesión de la administración y puede depender de una serie de parámetros. Estos incluyen, por ejemplo, el modo de administración (es decir, sistémica, oral, nasal, pulmonar, locales, tópicos, o de cualquier otro modo) y el trastorno tratado. Las composiciones farmacéuticas aquí contenidas puede ser formuladas para la dosis única (directo), la administración o para la dilución o la modificación de otros. Las concentraciones de los compuestos en las formulaciones son eficaces para la entrega de una cantidad, de la administración, que es eficaz para el tratamiento previsto. Normalmente, las composiciones están formuladas para la administración de dosis única. Para formular una composición, la fracción del peso de un compuesto o mezcla de este producto se disuelve, suspendida, dispersa o mezclada en un vehículo seleccionado en una concentración efectiva de tal manera que la condición del tratado sea aliviada o mejorada.

Los polipéptidos modificados FVII del presente documento pueden ser formulados para la administración a un sujeto como una proteína de dos cadenas FVIIa. Los polipéptidos modificados FVII pueden ser activados por cualquier método conocido en el estado de la técnica a la formulación. Por ejemplo, el FVII puede ir bajo activación durante la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico (Jurlander et al. (2001) Semin Thromb Hemost 27:373-384). Los polipéptidos modificados FVII también pueden ser activados mediante la incubación con FXa inmovilizados en cuentas (Kemball-

Cook et al. (1998) J Biol Chem 273:8516-8521), o cualquier otro método conocido en el arte (véase también el ejemplo 3). La inclusión de calcio en estos procesos, asegura la plena activación y correcto plegamiento de la proteína FVIIa modificada. Los polipéptidos modificados FVII del presente documento también pueden ser formulados para la administración como una proteína de cadena única. Los polipéptidos de cadena única FVII pueden ser purificados de forma que se evite su degradación (véase, por ejemplo, US6677440). Los polipéptidos modificados FVII del presente documento pueden ser formulados de tal manera que las formas de cadena única y dos cadenas se encuentran en la composición farmacéutica, en cualquier proporción por la selección adecuada del medio para eliminar o controlar la auto activación.

El compuesto puede ser suspendido en forma micronizada u otra forma adecuada, o puede ser derivatizada para producir un producto activo más soluble. La forma de la mezcla resultante depende de una serie de factores, incluyendo el modo previsto de la administración y la solubilidad del compuesto en el portador o vehículo elegido. Las mezclas resultantes son soluciones, suspensiones, emulsiones y otros mezclas, y pueden ser formuladas como una mezcla no acuosa o acuosa, cremas, geles, cremas, emulsiones, soluciones, jarabes, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, aerosoles, supositorios, vendajes, o cualquier otra fórmula adecuada para administración sistémica, tópica o local. Para la administración interna local, como por ejemplo, intramuscular, parenteral o la administración

intra-articular, los polipéptidos pueden ser formulados como una suspensión acuosa de solución en un medio básico, como la solución salina isotónica o se combinan con un apoyo biocompatible o bioadhesivo destinado a la administración interna. La concentración efectiva es suficiente para mejorar la condición específica y puede ser determinada empíricamente. Para formular una composición, la fracción del peso del compuesto que se disuelva, suspendido, dispersos o mezclados en un vehículo seleccionado en una concentración efectiva de tal manera que la condición objetiva sea aliviada o mejorada.

En general, las composiciones farmacéuticamente aceptables son preparados a la vista de la aprobación de un organismo regulador o de otro preparado de conformidad con la farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y en seres humanos. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores tales como diluyentes, coadyuvantes, excipientes o vehículos con los que se administran una isoforma. Estos portadores farmacéuticos de líquidos pueden ser estériles, como el agua y aceites, incluyendo los de petróleo, animales, vegetales o de origen sintético, como el aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un portador típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Soluciones salinas y dextrosa y soluciones acuosas de glicerol también se pueden emplear como portadores de líquidos, especialmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener un ingrediente activo: un diluyente como la lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, o

carboximetilcelulosa, un lubricante, como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco, y un aglutinante, como el almidón, gomas naturales, tales como goma de mascar acaciagelatin, glucosa, melaza, polinilporrolidina, celulosas y sus derivados, povidona, crospovidones y otros aglutinantes tales como los que se conocen en el arte. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, diatomita, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerina, propileno glicol, agua y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener pequeñas cantidades de mojar o agentes emulsionantes, o agentes amortiguadores de pH, por ejemplo, el acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, sorbitol, acetato de sodio trietanolamina, oleato de trietanolamina, y otros agentes. Estas composiciones pueden adoptar la forma de las soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, y las formulaciones de liberación sostenida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, la gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse con una mezcla de polvo de un compuesto terapéutico y una base de polvo adecuado, tal como la lactosa o almidón. Una composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como los triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar, como los grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, y otros dichos agentes. Los preparativos para la administración oral, también pueden ser

adecuadamente formulados con inhibidores de la proteasa, como un inhibidor de Bowman-Birk, un inhibidor de Bowman-Birk conjugado, la aprotinina y camostat. Ejemplos de los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por EW Martin. Estas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, generalmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada del portador para proporcionar una forma adecuada de administración a un sujeto o paciente.

La formulación debe adaptarse a la modalidad de administración. Por ejemplo, el FVII modificado puede ser formulado para la administración parenteral por inyección (por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua). Las composiciones inyectables pueden adoptar diversas formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o una suspensión en un tóxico por vía parenteral aceptable de diluyente o disolvente, por ejemplo, como una solución de 1-4, butanodiol. Los aceites fijos estériles son convencionalmente empleados como disolventes o medio de suspensión. Para este fin, cualquier aceite fijo suave puede ser empleado, incluyendo pero no limitado a, mono-sintéticos o diglicéridos, ácidos grasos (incluyendo el ácido oleico), aceites vegetales naturales como el aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, y otros aceites sintéticos o los vehículos grasos como oleato de etilo. Los intermediarios, conservantes, antioxidantes, y los ingredientes adecuados, se

pueden incorporar como se necesite o alternativamente, pueda comprender la formulación.

Los polipéptidos pueden ser formulados como los ingredientes activos farmacéuticos únicos en la composición o se pueden combinar con otros ingredientes activos. Los polipéptidos pueden ser objeto de entrega, tales como la conjugación de un agente de selección, como un anticuerpo. Las suspensiones liposomal, incluidos los tejidos de orientación liposomas, también puede ser adecuados como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden ser preparados de acuerdo a los métodos conocidos por los expertos en el arte. Por ejemplo, las formulaciones de liposomas pueden ser preparadas como se describe en la Patente de EE.UU. nº 4.522.811. La entrega liposomal también puede incluir formulaciones de liberación lenta, como las matrices de productos farmacéuticos, tales como geles de colágeno y liposomas modificados con fibronectin (véase, por ejemplo, Weiner et al. (1985) J Pharm Sci. 74 (9): 922-5). Las composiciones aquí contenidas pueden contener uno o más adyuvantes que faciliten la entrega, tales como, pero no están limitados a, los portadores inertes, o sistemas de dispersión coloidal. Los ejemplos representantes y no limitativos de portadores inertes, pueden ser seleccionados de agua, alcohol isopropílico, fluoruros de carbono gaseoso, alcohol etílico, glicol de pirrolidona de vinilo, propileno, gel de producción de material, alcohol estearílico, ácido esteárico, esperma de ballena, sorbitán, metil celulosa , así como combinaciones adecuadas de dos o más de los mismos. El compuesto activo es incluido en el portador farmacéuticamente aceptable en una cantidad

suficiente para ejercer un efecto terapéutico útil en la ausencia de efectos secundarios no deseados sobre el tema tratado. La concentración terapéuticamente efectiva puede ser determinada empíricamente mediante pruebas de los compuestos conocidos in vitro e in vivo en los sistemas, como los ensayos previstos aquí.

a. Dosis

La cantidad exacta o de dosis del agente terapéutico administrado depende del polipéptido FVII particular, la vía de administración, y otras consideraciones, tales como la gravedad de la enfermedad y el peso y el estado general de la materia. La administración local del agente terapéutico normalmente requieren una dosis más pequeña que cualquier modo de administración sistémica, aunque la concentración local del agente terapéutico puede, en algunos casos, ser mayor después de la administración local que se puede lograr con la seguridad en la administración sistémica. Si es necesario, una determinada dosis y la duración y el protocolo de tratamiento puede ser determinados empíricamente o de forma extrapolada. Por ejemplo, las dosis ejemplares de polipéptidos recombinantes y nativas FVII pueden ser utilizados como puntos de partida para determinar las dosis apropiadas. Por ejemplo, un polipéptido FVII recombinante (rFVIIa) que se ha activado para rFVIIa, NovoSeven®, ha sido administrado a pacientes con hemofilia A o hemofilia B, que están experimentando un episodio hemorrágico, con una dosis de 90 µg/kg por infusión de bolo de 2 a 5 minutos, logrando un nivel de efectividad en la circulación de al menos 2 µg/ml. La dosis se repite cada 2 horas hasta que se

logre la hemostasia. Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser eficaces en cantidades de dosis reducida y/o frecuencias comparadas con dicha FVII recombinante. Por ejemplo, en los polipéptidos FVII modificados aquí contenidos pueden ser administrados en una dosis de 80 µg/kg, 70 µg/kg, 60 µg/kg, 50 µg/kg, 40 µg/kg, 30 µg/kg, 20 µg/kg, 15 µg/kg o menos. En algunas realizaciones, la dosis puede ser mayor, como 100 µg/kg, 110 µg/kg, 120 µg/kg, o superior. La duración del tratamiento y el intervalo entre inyecciones variarán según la gravedad de la hemorragia y la respuesta del paciente al tratamiento, y pueden ajustarse en consecuencia a esto. Los factores tales como el nivel de actividad y la vida media del FVII modificado en comparación con el FVII sin modificar puede tenerse en cuenta al tomar decisiones en la dosis. Las dosis y regímenes particulares pueden ser determinados empíricamente.

En otro ejemplo, un polipéptido FVII recombinante (rFVIIa) que se ha activado para rFVIIa, NovoSeven®, ha sido administrado a pacientes con deficiencia congénita FVII que están experimentando un episodio hemorrágico, con una dosis de 15-30 µg/kg en infusión de bolo de 2 a 5 minutos. La dosis se repite cada 4-6 horas hasta conseguir la hemostasia. Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser eficaces en cantidades de dosis reducida y/o frecuencias en comparación con dicho FVII recombinante. Por ejemplo, los polipéptidos FVII modificado aquí contenido puede ser administrado en una dosis de 20 µg/kg, 15 µg/kg, 10 µg/kg, 5 µg/kg, 3 µg/kg o menos. En algunos ejemplos, la dosis puede ser mayor, por ejemplo, 35 µg/kg,

40 µg/kg, 45 µg/kg, o superior. La duración del tratamiento y el intervalo entre inyecciones variará con la gravedad de la hemorragia y la respuesta del paciente al tratamiento, y pueden ajustarse en consecuencia. Los factores como el nivel de actividad y la vida media del FVII modificado en comparación con el FVII sin modificar puede ser utilizado para tomar decisiones en la dosis. Por ejemplo, un polipéptido FVII modificado que presenta una vida media más larga que un polipéptido FVII sin modificar puede administrarse en dosis menores y/o con menor frecuencia que el polipéptido FVII sin modificar. Del mismo modo, las dosis requeridas para el efecto terapéutico utilizando un polipéptido FVII modificado que muestra una mayor actividad coagulante en comparación con un polipéptido FVII sin modificar puede reducirse en frecuencia y cantidad. Las dosis y regímenes particulares pueden ser empíricamente determinados por una persona de habilidad en el arte.

b. Formas de dosificación

Compuestos farmacéuticos terapéuticamente activos y sus derivados se suelen formular y administrar en las formas de dosificación de unidad o formas de dosificación múltiple. Las formulaciones pueden ser asignadas a la administración a los seres humanos y animales en las formas farmacéuticas que incluyen, pero no están limitados a, tabletas, cápsulas, pastillas, polvos, granulados, soluciones parenterales estériles o suspensiones, soluciones orales o suspensiones, y emulsiones de petróleo en aguas que contengan cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo. Cada dosis contiene una cantidad predeterminada de

compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador farmacéutico requerido, vehículo o diluyente. Ejemplos de las formas de dosis unitarias incluyen ampollas y jeringas y empaquetados individuales, tabletas o cápsulas. En algunos ejemplos, la unidad de dosis es un polvo liofilizado que se reconstituye antes de su administración. Por ejemplo, un polipéptido FVII puede proporcionarse en forma de polvo liofilizado que se reconstituye con una solución adecuada para generar una solución de una sola dosis de inyección. En algunas configuraciones, el polvo liofilizado puede contener el polipéptido FVII y componentes adicionales, tales como sales, de tal manera que los resultados de la reconstitución con agua destilada estéril es un polipéptido FVII en una solución tampón o solución salina. La unidad de formas de dosificación puede ser administrada en fracciones o múltiplos de la misma. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación idéntica de unidad envasada en un único contenedor que se administra en forma de dosis unitaria segregada. Ejemplos de las formas de dosis múltiples incluyen viales, frascos de tabletas o cápsulas o botellas de litros o galones. Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es un múltiplo de la unidad de dosis que no es segregado en el empacamiento.

2. Administración de polipéptidos FVII modificados

Los polipéptidos FVII del presente documento (es decir, compuestos activos) pueden ser administrados in vitro, ex vivo o in vivo por el contacto con una mezcla, como un fluido corporal o de otra muestra de tejido, con un

polipéptido FVII. Por ejemplo, cuando se administra un compuesto ex vivo, un fluido corporal o muestra de tejido de un sujeto puede ponerse en contacto con los polipéptidos FVII que están recubiertos por un tubo o filtro, como por ejemplo, un tubo o filtro en un sistema de circulación. Cuando se administra in vivo, los compuestos activos pueden ser administrados por cualquier vía apropiada, por ejemplo, vía oral, nasal, pulmonar, parenteral, por vía intravenosa, por vía intradérmica, subcutánea, intraarticular, intracisternal, intraocular, intraventricular, intratecal, vía intramuscular, intraperitoneal, intratraquealmente o tópica , así como por cualquier combinación de dos o más de los mismos, en estado líquido, semi-líquido o sólido, y están formulados de una manera adecuada para cada vía de administración. Los polipéptidos FVII modificados se pueden administrar una o más de una vez, como dos, tres veces, cuatro veces, o cualquier número de veces que se requieren para lograr un efecto terapéutico. Las administraciones múltiples pueden ser efectuadas por cualquier vía o la combinación de rutas, y puede ser administrada por hora, cada 2 horas, cada tres horas, cada cuatro horas o más.

La ruta más adecuada para la administración variará dependiendo del estado de la enfermedad a tratar, por ejemplo, la localización de la hemorragia. Generalmente, los polipéptidos FVII serán administrado por inyección intravenosa en bolo, con una administración (infusión) de tiempo de aproximadamente de 2-5 minutos. En otros casos, los niveles en sangre deseables de FVII pueden ser gestionados por una infusión continua de los agentes activos, determinados por los niveles de plasma. Cabe señalar que el

médico sabe cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar el tratamiento a dosis más bajas debido a la toxicidad, o de la médula ósea, el hígado o disfunciones renales. Por el contrario, el médico también sabe cómo y cuándo ajustar el tratamiento a los niveles más altos si la respuesta clínica no es adecuada (que excluyen los efectos secundarios tóxicos). En otros casos, la localización de la hemorragia podría indicar que la formulación de FVII se administra a través de rutas alternativas. Por ejemplo, la administración local, incluyendo la administración en el cerebro (por ejemplo, por vía intraventricular) podría llevarse a cabo cuando el paciente experimenta sangrado en esta región. Del mismo modo, para el tratamiento de hemorragias en las articulaciones, la administración local por inyección del agente terapéutico en la articulación (es decir, intraarticular, intravenosa o subcutánea media) pueden ser empleados. En otros casos, la administración tópica del agente terapéutico para la piel, por ejemplo, formulada en forma de crema, gel o pomada, o la administración a los pulmones por inhalación o intratraquealmente, puede ser apropiada cuando el sangrado se localiza en estas áreas.

Los casos en que los polipéptidos FVII modificados son formulados como una preparación de depósito, las formulaciones de tardía acción pueden ser administradas por la implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos terapéuticos se pueden formular con adecuados materiales poliméricos o hidrofóbicos (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o

resinas de intercambio iónico, o como derivados, poco solubles, por ejemplo, como una sal muy poco soluble.

Las composiciones, si se desea, se pueden presentar en un paquete, en un kit o dispositivo dispensador, que puede contener una o más formas de dosificación de la unidad que contiene el ingrediente activo. El paquete, por ejemplo, contiene hojas de metal o plástico, como un blister. El envase o el dispositivo de distribución puede ir acompañado de instrucciones para su administración. Las composiciones que contengan los agentes activos pueden ser empaquetadas como los artículos de fabricación que contienen material de embalaje, un agente siempre presente, y una etiqueta que indica el trastorno para el que se presta el agente.

3. La administración de ácido nucleico que codifica los polipéptidos FVII modificados (terapia génica)

También se proporcionan composiciones de moléculas de ácido nucleico que codifica los polipéptidos FVII modificados y vectores de expresión de codificación y que sean adecuados para la terapia génica. En lugar de entregar las proteínas, los ácidos nucleicos puede ser administrados en vivo, como sistémica o por otra vía, o ex vivo, como por la eliminación de las células, incluyendo los linfocitos, la introducción de la nucleicos en el mismo, y reintroducción en el receptor o un recipiente compatible.

Los polipéptidos FVII modificados pueden ser entregados a las células y los tejidos por la expresión de moléculas de ácido nucleico. Los polipéptidos FVII modificados se pueden administrar como moléculas de ácido nucleico que

codifican los polipéptidos FVII modificados, incluidas las técnicas ex vivo y directo en la expresión in vivo. Los ácidos nucleicos pueden ser entregados a las células y los tejidos por cualquier método conocido para aquellos de habilidad en el arte. Las secuencias de ácido nucleico aisladas pueden ser incorporadas en vectores para su manipulación posterior. Como se usa aquí, el vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se utilizan para introducir ADN heterólogo en células, ya sea para la expresión o la replicación de la misma. La selección y uso de estos vehículos se encuentra dentro de la habilidad del artesano.

Los métodos para la administración de polipéptidos FVII modificados por la expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican, incluyen la administración de vectores recombinantes. El vector puede ser diseñado para permanecer episomal, como por la inclusión de un origen de replicación, o pueden ser diseñado para integrarse en un cromosoma en la célula. Los polipéptidos FVII modificados también pueden ser utilizados en la terapia génica ex vivo de expresión utilizando vectores no virales. Por ejemplo, las células pueden ser modificadas para expresar un polipéptido FVII modificado, tal como la integración de una codificación de polipéptidos FVII modificados de ácido nucleico en una ubicación de genómica, ya sea operativamente ligada a secuencias reguladoras o de tal manera que se coloca quirúrgicamente vinculando a las secuencias reguladoras en un localización genómica. Estas células pueden ser administradas a nivel local o sistémicamente a un sujeto, como un paciente en necesidad de tratamiento.

Los vectores virales, incluyen, por ejemplo, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), poxvirus, herpesvirus, retrovirus y otros diseñados para la terapia genética pueden ser empleados. Los vectores pueden permanecer episomal o pueden integrarse en los cromosomas del sujeto tratado. Un polipéptido FVII modificado puede ser expresado por un virus, que es administra a un sujeto en necesidad de tratamiento. Los vectores virales para la terapia génica son adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), los retrovirus, los lentivirus, virus vaccinia y otros mencionados anteriormente. Por ejemplo, la expresión del adenovirus es bien conocido en el arte y la producción de adenovirus y los métodos de administración también son bien conocidos. Los serotipos de adenovirus están disponibles, por ejemplo, de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Los adenovirus pueden usarse ex vivo, por ejemplo, se aislaron las células de un paciente en necesidad de tratamiento, y transducidas con un polipéptido FVII modificado que expresan un vector adenovirus. Después de un período de cultivo adecuado, las células transducidas se administran a un sujeto, a nivel local y/o sistémico. Alternativamente, el polipéptido FVII modificado que expresa adenovirus aislados y formulado en un portador farmacéuticamente aceptable, para la entrega de una cantidad terapéuticamente efectiva para prevenir, tratar o aliviar una enfermedad o condición de un sujeto. Normalmente, las partículas de adenovirus se entrega en una dosis que va desde 1 partícula a 1014 partículas por kilogramo de peso del sujeto, por lo general entre 106 o 108 partículas a 1012 partículas por kilogramo de peso del sujeto. En algunas situaciones es

deseable contar con una fuente de ácido nucleico con un agente que ataca las células, como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la célula o la superficie de la célula objetiva, o un ligando para un receptor en la célula objetiva. El FVII también puede ser objeto de entrega en tipos de células específicas. Por ejemplo, los vectores de adenovirus que codifican los polipéptidos FVII pueden ser utilizados para la expresión estable en células que no se dividen, como las células del hígado (Margaritis et al. (2004) J Clin Invest 113:1025-1031). En otro ejemplo, los vectores virales o no virales de codificación de polipéptidos FVII pueden ser transducidos en células aisladas para su entrega posterior. Los tipos de células adicionales para la expresión y la entrega de FVII podrían incluir, pero no están limitados a, los fibroblastos y células endoteliales.

Las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en los cromosomas artificiales y otros vectores virales. Los cromosomas artificiales, tales como ACES (véase, Lindenbaum et al. (2004) Nucleic Acids Res. 32 (21): el72) pueden ser diseñados para codificar y expresar la isoforma. En resumen, los cromosomas artificiales de mamíferos (MACs) proporcionan un medio para introducir grandes cargas de la información genética en la célula en un formato de replicación autónoma, sin integración. Único entre los Macs, el ADN satélite de mamíferos basado en cromosomas artificiales de Expresión (ACE) puede ser reproducible generando de nuevo las líneas celulares de diferentes especies y fácilmente purificado de los cromosomas de las células del huésped. Los ACE purificados de mamíferos pueden ser re-introducidos en una

variedad de líneas celulares de receptores en donde se han mantenido de forma estable por largos períodos en ausencia de presión selectiva mediante un sistema de ECA. Con este enfoque, la carga específica de uno o dos genes objetivos se ha logrado en LMTK (-) y las células CHO. Otro método para la introducción de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos FVII modificados, es un técnica de reemplazamiento de genes en dos pasos en levadura, a partir de un genoma completo de adenovirus (AD2; Ketner et al. (1994) PNAS 91: 6186-6190) clonado en un cromosoma artificial de levadura (YAC) y un plásmido que contiene secuencias de adenovirus para apuntar a una región específica en el clon YAC, un cartucho de expresión para el gen de interés y un marcador de selección positiva y negativa. Los centros de actividades juveniles son de particular interés ya que permite la incorporación de genes más grandes. Este enfoque puede ser usado para la construcción de vectores de virus adeno-basados teniendo ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los polipéptidos FVII modificados descritos de transferencia de genes a las células de mamíferos o todos los animales.

Los ácidos nucleicos se pueden encapsular en un vehículo, como un liposoma o pueden ser introducidos en las células, como una célula bacteriana, en particular, una bacteria atenuada o introducida en un vector viral. Por ejemplo, cuando se emplean los liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de la membrana de la célula de superficie asociada con la endocitosis puede ser utilizada para la orientación y/o para facilitar la captación, por ejemplo, de proteínas de la cápside o fragmentos trópicos de estos de un tipo

de célula en particular, los anticuerpos de las proteínas que se someten a la internalización en el ciclo, y las proteínas que apuntan una localización intracelular y mejoran la semivida intracelular.

Para los métodos ex vivo e in vivo, las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido FVII modificado se introduce en las células que son de un donante adecuado o el sujeto a tratar. Las celdas en las que un ácido nucleico se puede introducir a los efectos de la terapia, por ejemplo, el tipo de células adecuadas para la enfermedad o condición a tratar, incluyendo pero no limitado a las células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos, las células de la sangre como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; las células madre o progenitoras diferentes, en particular, madre hematopoyéticas o las células progenitoras, por ejemplo, como las células madre obtenidas de la médula ósea , la sangre del cordón umbilical, la sangre periférica, hígado fetal, y otras fuentes de la misma.

Para el tratamiento ex vivo, las células de un donante compatible con el sujeto a ser tratado o se remueven las células de sujeto a tratar, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas son administradas al sujeto. El tratamiento incluye la administración directa, como, por ejemplo, encapsulado dentro de las membranas porosas, que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, los números de patentes EE.UU. 4.892.538 y 5.283.187 las cuales están incorporadas en la presente por referencia en su totalidad). Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en

células de mamíferos in vitro incluyen el uso de liposomas catiónicos y los lípidos (por ejemplo, DOTMA, droga y DC-Chol) electroporación, microinyección, la fusión celular, DEAE dextrano, y métodos de precipitación de fosfato de calcio. Los métodos de entrega de ADN pueden ser utilizados para expresar los polipéptidos FVII modificados in vivo. Tales métodos incluyen la entrega de liposomas de los ácidos nucleicos y la entrega de ADN desnudo, como la distribución local y sistémica como el uso de la electroporación, el ultrasonido y la entrega de fosfato de calcio. Otras técnicas incluyen la micro inyección, la fusión celular, los cromosomas de transferencia génica mediada, transferencia génica de micro células mediadas por la fusión esferoplasto.

La expresión in vivo de un polipéptido FVII modificado puede vincularse a la expresión de moléculas adicionales. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido FVII modificado puede vincularse con la expresión de un producto citotóxico, como en un virus de la ingeniería o expresado en un virus de la citotóxicos. Estos virus pueden ser dirigidos a un determinado tipo celular que es un blanco para un efecto terapéutico. El polipéptido FVII modificado expresado puede ser utilizado para mejorar la citotoxicidad de los virus.

La expresión in vivo de un polipéptido FVII modificado puede incluir operativamente la vinculación de un polipéptido FVII modificado que codifica la molécula de ácido nucleico a secuencias específicas de regulación, tales como una célula específica de tejido o promotor específico. Los polipéptidos FVII modificados también pueden expresarse de vectores que infectan específicamente y/o reproducen tipos de células de destino y/o tejidos. Los

promotores inducibles se puede utilizar para regular selectivamente la expresión de los polipéptidos FVII modificados. Un sistema de expresión regulable ejemplar es el sistema de expresión de genes de doxiciclina inducible, que se ha utilizado para regular la expresión de FVII recombinante (Srour et «/. (2003) Thromb Haemost. 90 (3): 398-405).

Las moléculas de ácido nucleico, como los ácidos nucleicos desnudos o en vectores, los cromosomas artificiales, los liposomas y otros vehículos pueden ser administrados a los sujetos mediante la administración sistémica, tópica, local y otras vías de administración. Cuando es sistémica e in vivo, la molécula de ácido nucleico o vehículo que contiene la molécula de ácido nucleico puede ser dirigida a una célula.

La administración también puede ser directa, como por la administración de un vector o de las células que normalmente se dirige a una célula o tejido. Por ejemplo, las células tumorales y la proliferación se puede orientar en la expresión in vivo de polipéptidos FVII modificados. Las células utilizadas para la expresión in vivo de un polipéptido FVII modificado también incluyen las células autólogas para el paciente. Estas células pueden ser removidas de un paciente, luego introducir los ácidos nucleicos para la expresión de un polipéptido FVII modificado, y luego administradas a un paciente, como por inyección o injerto.

I. Usos Terapéuticos

Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser utilizados para el tratamiento de cualquier condición por la que se emplea FVII

recombinante. Por lo general, estos tratamientos son aquellos en los que se desea aumentar la coagulación, como el aumento de las respuestas de la hemostasia. Los polipéptidos FVII modificados tienen una actividad terapéutica sola o en combinación con otros agentes. Los polipéptidos modificados del presente documento están diseñados para mantener la actividad terapéutica, pero presentan propiedades modificadas, en particular una mayor resistencia a TFPI, el aumento de la resistencia a la AT-III, el aumento de la actividad catalítica, el aumento de vida media y/o el aumento obligatorio y/o afinidad por las plaquetas activadas. Estas propiedades modificadas, por ejemplo, puede mejorar la eficacia terapéutica de los polipéptidos debido a la actividad coagulante del aumento de los polipéptidos FVII modificados. Esta sección proporciona ejemplares de los usos y métodos de administración. Estas terapias descritas son ejemplares y no limitan las solicitudes de polipéptidos FVII modificados.

Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser utilizados en diferentes terapéuticas, así como los métodos de diagnóstico en el que se emplea FVII. Estos métodos incluyen, pero no limitado a, los métodos de tratamiento de las condiciones fisiológicas que los médicos describen y enumeran a continuación. Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden exhibir la mejora de las actividades in vivo y efectos terapéuticos en comparación con el tipo salvaje FVII, como la reducción de dosis para lograr el mismo efecto, y otras mejoras en la administración y el tratamiento, como administraciones menores y/o menos frecuentes, la

disminución de la efectos secundarios y el aumento de los efectos terapéuticos. Aunque se entiende que los polipéptidos FVII modificados pueden ser administrados como un zimógeno FVII (es decir, la forma de cadena simple), normalmente los polipéptidos FVII modificados del presente documento son administrados en forma activa de dos cadenas, por ejemplo, auto activación o la activación de factores de la coagulación, tal como durante la purificación. En particular, los polipéptidos FVII modificados están destinados al uso en los métodos terapéuticos en los que FVII se ha utilizado para el tratamiento. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, los métodos de tratamiento de las enfermedades y trastornos, tales como, pero no limitados a, los trastornos de la coagulación sanguínea, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias, tales como la hemofilia A, hemofilia B y deficiencia de factor VII, y trastornos de la sangre adquirida, tales como la deficiencia de factor VII adquirido causado por la enfermedad del hígado. Los polipéptidos FVII modificados también pueden ser utilizados en el tratamiento de las enfermedades y trastornos hemorrágicos, tales como, pero no limitados a, trombocitopenia (por ejemplo, debido a los regímenes de quimioterapia), la enfermedad de Von Willebrand, trastornos hereditarios de plaquetas (por ejemplo, la enfermedad de agrupación de almacenamiento como el síndrome de Chediak-Higashi y síndromes de Hermansky-Pudlak, la disfunción de tromboxano A2, la enfermedad de Glanzmann y el síndrome de Bemard-Soulier), síndrome urémico hemolítico y Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria, también conocida como síndrome de Rendu-Osler-Weber, alergia

púrpura (púrpura de Henoch Schonlein) y coagulación intravascular diseminada.

En algunas configuraciones, los sangrados a ser tratados por los polipéptidos FVII se producen en órganos como el cerebro, la región del oído interno, los ojos, hígado, pulmón, tejido del tumor, el tracto gastrointestinal. En otras configuraciones, el sangrado es difuso, como en la gastritis hemorrágica y la profusa hemorragia uterina. Los pacientes con trastornos de la coagulación, como por ejemplo, la hemofilia A y B, a menudo corren el riesgo de complicaciones de sangrado durante la cirugía o traumatismo. Este sangrado también puede manifestarse como hemartrosis aguda (hemorragias en las articulaciones), la artropatía hemofílica crónica, hematomas, (por ejemplo, musculoso, retroperitoneal, sublingual y retrofaríngeo), hematuria (sangre en el tracto renal), hemorragias del sistema nervioso central, hemorragias gastrointestinales (por ejemplo, hemorragias UGI) y hemorragia cerebral, que también pueden ser tratados con polipéptidos FVII modificados. Además, cualquier sangrado asociado con la cirugía (por ejemplo, la hepatectomía), o dental puede ser tratado con polipéptidos FVII modificados. En una configuración, los polipéptidos FVII modificados pueden utilizarse para tratar episodios de sangrado debido a un traumatismo o cirugía, o disminución del recuento o la actividad de las plaquetas, en un sujeto. Los métodos ejemplares para los pacientes sometidos a cirugía son los tratamientos para prevenir la hemorragia y los tratamientos antes, durante o después de cirugías tales como, pero no limitadas a, la cirugía cardiaca, angioplastia, cirugía de pulmón, la

cirugía abdominal, cirugía espinal, cirugía cerebral, cirugía vascular, cirugía dental, o cirugía de trasplante de órganos, incluyendo el trasplante de médula ósea, corazón, pulmón, páncreas o el hígado.

El tratamiento de las enfermedades y condiciones con polipéptidos FVII modificados pueden efectuarse por cualquier vía de administración idónea mediante formulaciones adecuadas como se describe en este documento, incluyendo pero no limitado a, la inyección, pulmonar, oral y de la administración transdérmica. El tratamiento generalmente se efectúa por la administración en bolo intravenoso. Si es necesario, una determinada dosis y la duración y el protocolo de tratamiento pueden ser determinados empíricamente o de forma extrapolada. Por ejemplo, las dosis ejemplares de recombinantes y polipéptidos FVII nativos pueden ser utilizadas como punto de partida para determinar las dosis apropiadas. Por ejemplo, un polipéptido FVII recombinante (rFVIIa) que se ha activado para rFVIIa, NovoSeven ®, ha sido administrado a pacientes con hemofilia A o hemofilia B, que están experimentando un episodio hemorrágico, con una dosis de 90 µg/kg en infusión de bolo de 2 a 5 minutos, logrando un nivel de efectivo en circulación de al menos 2 µg/ml, con una semivida de 2,7 horas. La dosis se repite cada 2 horas hasta que se logre la hemostasia. Los polipéptidos FVII modificados que tienen una mayor actividad coagulante, debido a una mayor resistencia al TFPI, el aumento de la resistencia a la AT-III, el aumento de la actividad catalítica, el aumento de vida media y/o el aumento obligatorio y/o afinidad por las plaquetas activadas, puede ser eficaz en cantidades de dosis reducida y/o frecuencias en

comparación con el FVII recombinante. Las dosis para el tipo salvaje o sin modificar de polipéptidos FVII pueden ser utilizadas como guía para determinar la dosis de polipéptidos FVII modificados. Los factores como el nivel de actividad y la vida media de los FVII modificados en comparación con el FVII sin modificar pueden ser utilizados en la fabricación de tales determinaciones. Las dosis y regímenes particulares pueden ser determinados empíricamente.

Los niveles de dosificación y regímenes pueden ser determinados con base a las dosis y regímenes conocidos, y si es necesario pueden ser extrapolados basados en los cambios en las propiedades de los polipéptidos modificados y/o pueda ser determinada empíricamente basándose en una variedad de factores. Tales factores incluyen el peso corporal de la persona, la salud general, la edad, la actividad de los compuestos que se emplee, sexo, dieta, tiempo de la administración, la tasa de excreción, la combinación de drogas, la gravedad y la evolución de la enfermedad, la disposición del paciente a la enfermedad, y la sentencia del médico tratante. El ingrediente activo, el polipéptido, por lo general se combina con un portador farmacéuticamente eficaz. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con el material de los portadores para producir una dosis única o multi-forma de dosificación puede variar dependiendo del receptor tratado y el modo particular de administración.

El efecto de los polipéptidos FVII en el tiempo de coagulación de la sangre pueden ser controlados usando alguna de las pruebas de coagulación conocidas en el arte, incluyendo pero no limitado a, todo el tiempo de

protrombina en la sangre (PT), el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), el tiempo de coagulación activado (TCA), el tiempo de recalcificado de coagulación activado, o el tiempo de coagulación de Lee White.

Al mejoramiento de la condición de un paciente, una dosis de mantenimiento de un compuesto o compuestos pueden ser administrados, si es necesario, y la dosificación, la forma de dosificación, o frecuencia de administración, o una combinación de los mismos pueden ser modificados. En algunos casos, un sujeto puede requerir el tratamiento intermitente a largo plazo sobre cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad o se basa en las dosis programadas. En otros casos, las administraciones adicionales pueden ser necesarias en respuesta a los eventos agudos, tales como hemorragia, traumatismo o intervenciones quirúrgicas. Las siguientes son algunas condiciones ejemplares para los que FVII (administrada como FVIIa) se ha utilizado como agente de tratamiento solo o en combinación con otros agentes.

1. Trastornos congénitos de sangrado

a. Hemofilia

La hemofilia congénita es un trastorno recesivo de la sangre en el que hay disminución de los niveles de factores de coagulación en el plasma, lo que lleva a la interrupción de la cascada de coagulación y el aumento de tiempo de coagulación. La hemofilia A, que representa aproximadamente el 85% de los casos de hemofilia, resulta de la mutación o mutaciones en el gen del factor VIII en el cromosoma X, que lleve a una deficiencia o disfunción de la proteína

FVIII. La hemofilia B es causada por una deficiencia o disfunción del factor de coagulación, FIX, generalmente como resultado de mutaciones puntuales o deleciones en el gen FIX en el cromosoma X. La incidencia mundial de la hemofilia A es de alrededor de 1 por cada 5.000 individuos del sexo masculino y 1 caso por cada 25.000 hombres de la hemofilia B. La hemofilia A y B se clasifican como leve, moderada o grave. A nivel plasmático con el 5% -25% del funcionamiento normal del factor VIII o IX se clasifica como leve, 1% -5% es moderada, y menos del 1% es severa. La hemofilia C, conocida a menudo como la deficiencia FXI, es una enfermedad relativamente leve y poco frecuente, que afecta a aproximadamente 1 de cada 100.000 personas en una forma autosómica recesiva.

La hemofilia A y B se manifiestan clínicamente en muchos aspectos. Las heridas y abrasiones pequeñas no resultarán en un sangrado excesivo, pero los traumatismos y cirugías sí. El paciente también tendrá numerosas hemorragias musculares y hematomas. La hemartrosis o hemorragias en las articulaciones es una de las principales complicaciones de la hemofilia, y puede ocurrir de manera espontánea o en respuesta a un trauma. Las articulaciones de bisagra, como la rodilla, el codo y el tobillo, se ven afectadas con mayor frecuencia. La cadera y el hombro se ven afectados con mucha menos frecuencia como la articulación de rótula tienen más musculatura que los rodea, protegiendo así a más de una lesión. La hemorragia puede causar dolor agudo grave, restringir el movimiento, y dar lugar a complicaciones secundarias, incluyendo la hipertrofia sinovial. Además, la hemorragia recurrente en las

articulaciones puede causar sinovitis crónica, que puede causar daño en las articulaciones, destruyendo la membrana sinovial, los cartílagos y los huesos. Las hemorragias de amenaza de vida, como la hemorragia intracraneal y hemorragia en el sistema nervioso central, también afecta a los sujetos con hemofilia. La hemorragia intracraneal se produce en aproximadamente el 10% de los pacientes con hemofilia severa, resultando en un 30% la tasa de mortalidad. En contraste, la hemofilia C es más leve. Las hemorragias espontáneas son raramente vistas, y el sangrado en las articulaciones, los tejidos blandos y músculos, también es poco común. El sangrado es generalmente tratado con transfusión de plasma fresco congelado (PFC), terapia de reemplazo de FXI, o, para el tratamiento tópico, tratamiento de heridas externas o extracciones dentales, cola de fibrina.

El tratamiento más común para la hemofilia A o B es la terapia de reemplazo, en la que el paciente se le administra FVIII o FIX. Las formulaciones están disponibles comercialmente, como derivados del plasma o de productos recombinantes, con proteínas recombinantes, siendo el tratamiento de elección en pacientes no tratados previamente. Aunque estas terapias pueden ser muy exitosas, surgen complicaciones si el paciente desarrolla inhibidores del factor VIII o de nueva administración de factor IX. Los inhibidores son anticuerpos IgG, la mayoría de la subclase IgG4, que reaccionan con FVIII o FIX e interfieren con la función pro-coagulante. Los inhibidores afectan a 1 de cada 5 pacientes con hemofilia severa A. La mayoría de los sujetos desarrollan estos inhibidores poco después de la administración

de las primeras infusiones del factor VIII, que a menudo en la infancia, aunque los sujetos desarrollan más adelante en la vida. Los inhibidores también afectan a aproximadamente 1 de cada 15 personas con insuficiencia renal con hemofilia A leve o moderada. Estos inhibidores se desarrollan generalmente en la edad adulta y no sólo destruyen la administración de exógeno FVIII, sino que también destruyen el endógeno FVIII. Como resultado, los hemofílicos leves y moderados se intensifican. Clínicamente, los pacientes con hemofilia A con inhibidores de la respuesta se clasifican en altas y bajas de acuerdo a la fuerza de la respuesta de memoria que sufren cuando están expuestos a la re-FVIII. Los inhibidores afectan cerca de 1 en 100 pacientes con hemofilia B. En la mayoría de los casos, los inhibidores se desarrollan después de las primeras infusiones del factor terapéutico IX y puede ir acompañado de reacciones alérgicas.

Los polipéptidos FVII modificados aquí presentados pueden ser utilizados para tratar a pacientes con hemofilia, en particular, los pacientes hemofílicos con inhibidores. Un producto de FVIIa recombinante (NovoSeven, Novo Nordisk) ha sido aprobado y autorizado para el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia A o B con inhibidores de FVIII o FIX y para la prevención de hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en la hemofilia A o B de pacientes con inhibidores FVIII o FIX. El tratamiento con rFVIIa aumenta la generación de trombina sin pasar por el requisito de la FVIIIa y/o FIXA. La coagulación se inicia en el sitio de la lesión por la interacción de rFVIIa con TF, lo que resulta en la activación

de FX inicial, la generación de trombina y la activación de las plaquetas. La coagulación completa de rFVIIa puede ser efectuado por la TF-dependiente y mecanismos TF-independientes, donde parte de la trombina generada puede ser el resultado de la activación directa de los FX en las plaquetas activadas por rFVIIa, que a su vez se une a las plaquetas activadas a través de interacciones de baja afinidad con las membranas de fosfolípidos.

Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser utilizados en terapias para la hemofilia, incluyendo el tratamiento de episodios hemorrágicos y la prevención de hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos. Los polipéptidos FVII modificados ofrecen una mayor resistencia a la TF /inhibidor de FVIIa complejo.

El TFPI aumenta la resistencia a la AT-III, aumenta la actividad catalítica, aumenta la vida media y/o aumenta la afinidad de las plaquetas activadas. Los polipéptidos FVII por lo tanto puede mostrar una mayor actividad coagulante en una forma dependiente de TF (como a través de una mayor resistencia al TFPI), y/o una manera de TF independiente (por ejemplo, a través de una mayor unión y/o afinidad por las plaquetas activadas). Así, los polipéptidos FVII modificados se pueden utilizar para ofrecer terapias más activas de la hemofilia. Ejemplos de las mejoras terapéuticas utilizando polipéptidos FVII mejorados incluyen, por ejemplo, pero no están limitadas a, las dosis bajas, administraciones frecuentes menores, disminución de los efectos secundarios, y el aumento de los efectos terapéuticos.

Los polipéptidos FVII modificados normalmente se administran como polipéptidos activos FVII (FVIIa). Los polipéptidos FVII modificados se pueden probar para la eficacia terapéutica, por ejemplo, mediante el uso de modelos animales. Por ejemplo, los anticuerpos inducidos por los ratones hemofílicos, o cualquier otro modelo de la enfermedad conocida por la hemofilia, puede ser tratada con polipéptidos FVII modificados. La progresión de los síntomas de la enfermedad y los fenotipos se monitorea para evaluar los efectos de los polipéptidos FVII modificados. Los polipéptidos FVII modificados también se pueden administrar a personas como en los ensayos clínicos para evaluar la eficacia in vivo en comparación con los controles de placebo y/o los controles utilizando FVII sin modificaciones.

b. Deficiencia de FVII

La deficiencia del factor FVII es un trastorno autosómico recesivo de la coagulación que afecta a aproximadamente a 1 de cada 500.000 personas. La deficiencia de FVII puede ser clínicamente leve, moderada o severa, con deficiencia leve a moderada que se caracteriza por el aumento de la hemorragia después de la cirugía y trauma. Los pacientes con deficiencia de FVII severa (menos del 1% FVII actividad) experimentan síntomas similares a la hemofilia. Por ejemplo, sujetos deficientes de FVII, son propensos a las hemorragias articulares, hemorragias de las articulaciones, sangrado nasal espontáneo, hemorragia gastrointestinal, hemorragia del tracto urinario. La hemorragia intracerebral y hemorragias musculares también han sido reportadas, mientras que las mujeres pueden experimentar graves menorragia

(sangrado menstrual abundante). El tratamiento puede efectuarse mediante la terapia de reemplazo. Un producto FVIIa recombinante (NovoSeven ®, Novo Nordisk) ha sido aprobado y autorizado para el tratamiento de episodios hemorrágicos en pacientes con deficiencia congénita FVII y para la prevención de hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con deficiencia congénita FVII. Por lo tanto, los polipéptidos FVII modificados aquí también se pueden utilizar. Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser utilizados en el tratamiento de episodios hemorrágicos y la prevención de hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con deficiencia de FVII. Por ejemplo, un paciente neonatal que presenta deficiencia de FVII grave con hemorragia intracraneal puede ser administrado con polipéptidos FVII modificados mediante bolo intravenoso para la realizar la coagulación y mantener la hemostasia. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

c. Otros

Otros trastornos de la coagulación pueden ser tratados con los polipéptidos FVII del presente documento para promover la coagulación. Las deficiencias congénitas de los factores V y X también se presentan con mayor tiempo de coagulación en la sangre y potencialmente pueden ser tratados con la administración de dosis terapéuticas de FVII. Por ejemplo, un paciente con deficiencia de factor X puede ser administrado con rFVIIa para controlar la hemorragia asociada con la esplenectomía (Boggio et al. (2001) Br J Haematol

112:1074-1075). Los episodios de sangrado espontáneo y de cirugía asociados con la enfermedad de von Willebrand (VWD) también pueden ser tratados con los polipéptidos FVII modificados aquí facilitados. El VWD es un trastorno de la coagulación causado por un defecto o deficiencia de la proteína que coagula la sangre, factor de Von Willebrand (FVW), y se estima que ocurre en 1% al 2% de la población. Los pacientes con hematoma VWD con facilidad, tienen frecuentes sangrados de nariz, sangrado después de la extracción dental, amigdalectomía u otra cirugía, las mujeres y los pacientes pueden tener un aumento del sangrado menstrual. Los polipéptidos FVII modificados pueden ser utilizados para aliviar las hemorragias espontáneas y de cirugía en pacientes VWD (von Depka et al. (2006) Blood Coagul fibrina 17:311-316). Otros aspectos relacionados con los trastornos de sangrado con relación a las plaquetas, tales como, por ejemplo, Enfermedad de Glanzmann y síndrome de Hermansky-Pudlak, también se asocian con la coagulación de la reducción de la actividad endógena. El exceso de sangrado espontáneo o asociado a la cirugía en pacientes con trastornos de la coagulación relacionados con las plaquetas también puede ser controlado por las dosis terapéuticas de los polipéptidos FVII modificados. Por ejemplo, un paciente con Enfermedad de Glanzmann sometido a cirugía puede ser tratado antes, durante y/o después de la cirugía con los polipéptidos FVII modificados para prevenir la pérdida de sangre importante (Van Buuren, et al. (2002) Dig Dis Sci 47:2134-2136). Generalmente, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

2. Trastornos de sangrado adquiridos

a. Trombocitopenia adquirida por quimioterapia

Los trastornos de sangrado también pueden ser adquiridos, y no solo pueden ser congénitos. Por ejemplo, el tratamiento de quimioterapia, tal como el tratamiento para la leucemia y otros cánceres, puede resultar en trombocitopenia. Esto es probablemente debido a una pérdida de la producción de plaquetas en la médula ósea de los pacientes que reciben quimioterapia, y normalmente se produce de 6-10 días después de la medicación. El tratamiento de la trombocitopenia suele ser adquirido por las plaquetas, glóbulos rojos o la transfusión de plasma, que sirve para prevenir el sangrado espontáneo anormal que puede ser resultado de la deficiencia de plaquetas. El sangrado en pacientes con trombocitopenia inducida por quimioterapia, o cualquier otra adquirida o trombocitopenia congénita, también puede ser controlado por la administración de cantidades terapéuticas de los polipéptidos FVII modificados aquí facilitados. Por ejemplo, un paciente con hemorragia trombocitopénica incontrolada, como en el tracto gastrointestinal, puede administrarse una inyección intravenosa en bolo de una cantidad terapéutica de polipéptido FVII para detener una hemorragia (Gerotziafas et al. (2002) Am J Hematol 69:219 - 222). Generalmente, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa)

b. Otras coagulopatías

Otras coagulopatías adquiridas pueden ser tratadas con los polipéptidos FVII modificados aquí contenidos. La coagulopatía puede ser resultado de

condiciones de, incluyendo pero no limitado a, fallo hepático fulminante (FHF, como la causada por las drogas hepatotóxicas, toxinas, enfermedades metabólicas, enfermedades infecciosas y la isquemia), otras enfermedades del hígado, incluyendo cirrosis y las enfermedades asociadas con la enfermedad de Wilson, la deficiencia en la vitamina K (como la causada por el tratamiento antibiótico o la dieta), el síndrome urémico hemolítico, trombocitopenia trombótica (TTC) y coagulopatía intravascular diseminada (CID). El tratamiento convencional es generalmente por la transfusión de plasma, glóbulos rojos (RBC), o plaquetas, pero puede ser infructuosa. En una configuración, los polipéptidos FVII modificados pueden ser administrados a un paciente con FHF sometido a procedimientos invasivos para prevenir el sangrado. El tratamiento convencional con plasma fresco congelado (PFC) a menudo no tiene éxito y puede requerir grandes cantidades de plasma, produciendo una sobrecarga de volumen y anasarca (una infiltración generalizada de líquido del edema en el tejido conjuntivo subcutáneo). El tratamiento con cantidades terapéuticas de polipéptidos FVII modificados mediante bolo intravenoso durante, antes o después de la cirugía invasiva, como, por ejemplo, la biopsia hepática o trasplante de hígado, pueden prevenir el sangrado y establecer la hemostasia en pacientes con FHF. El paciente puede ser monitoreado por el PT de la sangre para determinar la eficacia del tratamiento (Shami et al. (2003) Liver Transpl 9:138-143). En otra configuración, el FVII puede ser administrado a un paciente con hemorragia grave asociada con coagulopatía, como por ejemplo, la hemorragia intraabdominal grave por cesárea asociadas con disfunción

hepática y la CID, que no respondió a las transfusiones convencionales de infusiones (Moscardo et al. (2001) Br J Haematol 113:174 - 176). Además, los polipéptidos FVII modificados pueden ser utilizados para tratar la coagulopatía en los pacientes neonatales y pediátricos. En una configuración particular, los pacientes neonatales y pediátricos no responden al tratamiento convencional, como la infusión de glóbulos rojos y plaquetas. Por ejemplo, los recién nacidos con hemorragia pulmonar severa asociada con aumento de tramitación que no responden a la transfusión de glóbulos rojos y de plaquetas puede ser administrados con polipéptidos FVII modificados para disminuir el PT y el establecimiento de la hemostasia (Olomu et al. (2002) J Perinatol 22:672-674). Los polipéptidos FVII modificados del presente documento muestran la actividad de coagulación mejorada en comparación con polipéptidos FVII sin modificaciones, por lo que se puede administrar, por ejemplo, en dosis más bajas, con menos frecuencia y con menos reacciones adversas. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

c. Sangrado adquirido por trasplante

El sangrado severo después de un trasplante de médula ósea (BMT) y el trasplante de células madre (SCT) es relativamente común y potencialmente mortal asociado con estos procedimientos, debido a la reducción de las plaquetas. Por ejemplo, la hemorragia alveolar difusa (DAH) es una complicación pulmonar de trasplante de médula ósea, con una incidencia estimada de 1.21% en la población de trasplantes, y una tasa de mortalidad de

60-100%. El tratamiento convencional de episodios de sangrado incluye corticosteroides como tratamiento y transfusión de plasma, plaquetas y/o de glóbulos rojos, aunque estos son en gran parte inservibles con una tasa global de mortalidad de aproximadamente el 50% (Hicks et al. (2002) Bone Marrow Transpl 30:975-978). La administración de FVII mediante bolo intravenoso, con o sin tratamiento concomitante con corticosterioids y/o la infusión de plaquetas, se puede realizar para tratar DAH y establecer la hemostasia (Hicks et al. (2002) Bone Marrow Transpl 30:975-978). Los polipéptidos FVII modificados del presente documento muestran la actividad de coagulación mejorada en comparación con polipéptidos FVII sin modificaciones, por lo que podría ser administrado, por ejemplo, en dosis más bajas, menos frecuentemente, sobre una duración de tratamiento más corto y con menos reacciones adversas para la misma actividad biológica y la eficacia. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

d. Sangrado inducido por terapia anticoagulante

Los pacientes sometidos a tratamientos anticoagulantes para el tratamiento de condiciones, tales como tromboembolismo, pueden presentar episodios de sangrado agudo en la administración de anticoagulantes, como la warfarina, heparina y el fondaparinux, o el desarrollo de trastornos hemorrágicos como resultado del uso a largo plazo de estas terapias. Los tratamientos para los episodios de sangrado típicamente incluyen la administración de procoagulantes, tales como la vitamina K, plasma, exógenos FIX, y protaminas para neutralizar la heparina. La administración de exógenos

FVII también se puede realizar para neutralizar el efecto de los anticoagulantes, el aumento de PT , TTPa, y/o otros marcadores de coagulación y establecer la hemostasia (Deveras et al (2002) Ann Inten Med 137:884-888). Los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser utilizados en los tratamientos para controlar los episodios hemorrágicos en pacientes con trastornos de la coagulación adquiridos debido a los tratamientos anticoagulantes. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

e. Hemofilia adquirida

Los inhibidores del factor VIII pueden desarrollarse de forma espontánea en los individuos sanos, lo que resulta en una condición conocida como "hemofilia adquirida". La hemofilia adquirida es una enfermedad rara, con una incidencia anual de 0,2-1,0 por millón de población. Los anticuerpos son principalmente anticuerpos IgG4, que, cuando se unen a FVIII, inhiben la actividad de FVIII al interferir con la disociación de la trombina, con el factor de interacción de von Willebrand y/o de fosfolípidos vinculantes. Esto da lugar a una hemorragia peligrosa para la vida en aproximadamente el 87% de los pacientes afectados. Los sitios más comunes de sangrado son la piel, mucosas, músculos y retroperitoneo, en contraste con los pacientes con hemofilia hereditaria que sangran principalmente en las articulaciones y los músculos. La hemofilia adquirida puede ser tratada con un concentrado complejo de protrombina activado o de factor VII activado recombinante (NovoSeven ®, Novo Nordisk) para controlar los episodios de sangrado. Los

polipéptidos FVII modificados del presente documento muestran la actividad de coagulación mejorada en comparación con polipéptidos FVII sin modificaciones, por lo que se puede administrar, por ejemplo, en dosis más bajas, menos frecuentemente, sobre una duración de tratamiento más corto y con menos reacciones adversas para la misma actividad biológica y la eficacia. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

3. Sangrado por trauma y cirugía

Los polipéptidos FVII pueden utilizarse como terapia para el tratamiento de hemorragias asociadas con la pérdida de sangre perioperatoria y traumática en los sujetos con los sistemas de coagulación normal. Por ejemplo, los polipéptidos FVII pueden ser administrados a un paciente para promover la coagulación y reducir la pérdida de sangre asociada con la cirugía y, además, reducir la necesidad de transfusión de sangre. En una configuración, los polipéptidos FVII pueden ser administrados a los sujetos sometidos a prostatectomía retropúbica. La prostatectomía retropúbica se asocia a menudo con gran pérdida de sangre y la necesidad posterior de una transfusión. Los sujetos sometidos a cirugía o similares pueden tener un bolo intravenoso de una cantidad terapéutica de FVII en la fase operativa del principio para reducir la pérdida perioperatoria de sangre mediante el aumento de la coagulación en el sitio de la cirugía. La reducción en la pérdida de sangre resulta en la eliminación de la necesidad de transfusión de sangre en estos pacientes (Friederich et al. (2003) Lancet 361 :201-205). Los polipéptidos FVII pueden ser

administrados a pacientes con coagulación normal sometidos a otros tipos de cirugías para realizar una hemostasia rápida y evitar la pérdida de sangre. Ejemplos no limitativos de procedimientos quirúrgicos en los que FVII, por lo general se administra en forma activa, es decir (FVIIa), pueden utilizar una terapia para reducir la hemorragia perioperatoria que incluyen, pero no se limitan a, la cirugía de la válvula cardíaca (Al Douri, et al. (2000) Blood Coag Fibrinol 1 1: S121-S127), el reemplazo de la válvula aórtica (Kastrup et al la cirugía de cáncer. (2002) Ann Thorac Surg 74:910-912), la resección de hemangiopericitoma recurrentes (Gerlach et al. (2002) J Neurosurg 96:946-948), (Sajdak et al. (2002) Eur J Gynecol Oncol 23 :325-326), y la cirugía en las úlceras duodenales (Vlot et al. (2000) Am J Med 108:421-423). El tratamiento con FVII puede promover la hemostasia en el sitio de la cirugía y reducir o prevenir la pérdida de sangre, reduciendo o suprimiendo la necesidad de transfusión. Los polipéptidos FVII modificados del presente documento están diseñados para mostrar la actividad de coagulación mejorada en comparación con polipéptidos FVII sin modificaciones, por lo que podría ser administrado, por ejemplo, en dosis más bajas, con menos frecuencia y con menos reacciones adversas. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

Los polipéptidos del factor VII también pueden ser utilizados para promover la coagulación y prevenir la pérdida de sangre en pacientes con lesiones traumáticas. El trauma se define como una lesión en el tejido vivo por un agente extrínseco, y es la cuarta causa de muerte en los Estados Unidos. El

trauma es clasificado como un traumatismo cerrado (lo que produce la compresión interna, daño de órganos y hemorragia interna) o un traumatismo penetrante (como consecuencia de un agente que penetra en el cuerpo y la destrucción de los tejidos, vasos y órganos, provocando una hemorragia externa). El trauma puede ser causado por varios eventos, incluyendo pero no limitado a, accidentes de tráfico (que causa traumas contundentes y/o traumas penetrantes), heridas de bala (que causa traumatismo penetrante), heridas punzantes (con la penetración causar trauma), accidentes de maquinaria (que causa la penetración y/o un traumatismo cerrado) y caídas desde una altura considerable (que causa la penetración y/o traumatismo cerrado). La hemorragia no controlada como resultado de un trauma es responsable de la mayor parte de la mortalidad asociada. La coagulopatía difusa es una complicación relativamente frecuente asociada a pacientes con trauma, se producen hasta en el 25-36% de los sujetos. La coagulopatía puede desarrollarse poco después de la lesión, como resultado de una variedad de factores tales como la dilución y el consumo de las plaquetas y los factores de coagulación, la fibrinólisis, la acidosis y la hipotermia. El manejo convencional consiste en la terapia de reemplazo de la transfusión de plasma fresco congelado (PFC), plaquetas, glóbulos rojos y/o crioprecipitado, corregir la acidosis, y el tratamiento de la hipotermia. Estos pasos son a menudo insuficientes para detener la hemorragia y prevenir la muerte. El tratamiento mediante la administración de cantidades terapéuticas de FVII puede promover la coagulación y reducir la pérdida de sangre en pacientes con traumatismos.

Por ejemplo, un paciente con una lesión de bala que presenta masivo sangradp, además de la intervención quirúrgica, se administrará FVII para controlar la hemorragia coagulapática (KENET et al. (1999) Lancet 354:1879). La terapia coagulante con FVII puede reducir eficazmente la pérdida de sangre y la hemorragia en pacientes con trauma contuso y penetrante (Rizoli et al. (2006) Crit Care 10: R178). Los polipéptidos FVII modificados del presente documento están diseñados para mostrar la actividad de coagulación mejorada en comparación con polipéptidos FVII sin modificaciones, por lo que podría ser administrado, por ejemplo, en dosis más bajas, con menos frecuencia y con menos reacciones adversas. En general, los polipéptidos FVII modificados se administran como polipéptidos FVII activados (FVIIa).

J. Terapias de Combinación

Cualquiera de los polipéptidos FVII modificados aquí descrito se puede administrar en combinación con, antes de, de manera intermitente o con posterioridad a otros agentes terapéuticos o procedimientos, incluyendo pero no limitado a, productos biológicos de otros compuestos de pequeñas moléculas y la cirugía. Para cualquier enfermedad o condición, incluyendo todos los ejemplos anteriores, para lo cual FVII (incluyendo FVIIa y rFVIIa) se indica o se ha utilizado y que otros agentes y los tratamientos están disponibles, FVII se puede utilizar en combinación con ellos. Por lo tanto, los polipéptidos FVII modificados del presente documento pueden ser igualmente utilizados. Dependiendo de la enfermedad o condición a tratar, las combinaciones incluyen, pero no se limitan a, la combinación con otros factores

de la coagulación plasmática purificada o recombinante, procoagulantes, como la vitamina K, derivado de la vitamina K y los inhibidores de la proteína C, plasma, plaquetas, células rojas de la sangre y los corticosteroides.

K. Artículos de fabricación y equipos (kits)

Los compuestos farmacéuticos de polipéptidos FVII modificados o ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos FVII modificados, o un derivado o una porción biológicamente activa de la misma puede ser empaquetado como artículos de fabricación que contienen material de embalaje, una composición farmacéutica que es eficaz para el tratamiento de una la enfermedad o trastorno hemostático, y una etiqueta que indica el polipéptido FVII modificado o molécula de ácido nucleico se va a utilizar para el tratamiento de la enfermedad o trastorno hemostático.

Los artículos de fabricación, que se proveen en el presente documento contienen materiales de embalaje. Los materiales de embalaje para su uso en el envasado de productos farmacéuticos son bien conocidos por los de habilidad en el arte. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.352, cada una de las cuales se incorporan al presente documento en su totalidad. Ejemplos de materiales de embalaje farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, ampollas, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, frascos, envases, jeringas, botellas, y cualquier material de embalaje adecuado para una formulación y un modo deseado de administración y tratamiento. Una amplia gama de formulaciones de los compuestos y composiciones previstos se contempla como una gran variedad

de tratamientos para cualquier enfermedad o trastorno hemostático. Los polipéptidos FVII modificados y las moléculas de ácido nucleico también se pueden proporcionar como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica que aquí descrita en este documento e incluir un elemento para la administración. Por ejemplo, un FVII modificado puede ser suministrado con un dispositivo para la administración, como una jeringa, un inhalador, un vaso de dosificación, un gotero, o un aplicador. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones para la aplicación, incluyendo las dosis, los regímenes de dosificación y las instrucciones de los modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica aquí descrita y un elemento para el diagnóstico. Por ejemplo, estos kits pueden incluir un elemento para medir la concentración, la cantidad o la actividad de FVII o un sistema regulado de FVII de un sujeto.

Los siguientes ejemplos se incluyen sólo para fines ilustrativos y no tienen por objeto limitar el alcance de la invención.

L. Ejemplos

Ejemplo 1

In silico factor de generación de variantes VII con mayor resistencia a TFPI

A. Modelación de la interacción entre el factor VII y TFPI

Los modelos computarizados de la interacción entre el factor VII y su inhibidor natural, el primer dominio Kunitz (KI) sobre el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPL)-1 (TFPI-1 K1) se realizó para determinar el contacto con

residuos de aminoácidos en la interfaz del sitio de interacción. La información disponible al público desde el banco de datos de proteínas (rcsb.org /pdb/) se utilizó para crear el modelo de homología. Ni la estructura de cristal para TFPI-1 K1 sola, ni el del complejo cuaternario entre TF/FVIIa/TFPI-1/FXa, aún no han sido resueltos. En cambio, se realizaron modelos computarizados usando la estructura cristalina 2.1Å del complejo ternario entre TF, FVII y la variante 5L15 de la especie bovina inhibidora de la tripsina pancreática (BPT1^{5L15}; PDB código 1FAK_1) como modelo de partida del proceso, seguido de información sobre la estructura cristalina del complejo de la tripsina/TFPI-2 (Figura 6). El BPTI$^{5LI\ 5}$ es una serina proteasa tipo dominio de Kunitz, y muestra una homología a TFPI-1 y a TFPI-2. El primer dominio de Kunitz (K1) de BPTI$^{5LI\ 5}$ (NÚMERO SEQ DE ID: 106) muestra una identidad secuencial primaria del 45% en el primer dominio de Kunitz (K1) (figura 5). Las coordenadas para la estructura de cristal de TFPI-2 K1 fueron extraídas del programa de computador de bases de datos (pdb) del archivo 1TFX del banco de datos de la proteína, que representa la estructura de cristal del complejo de la tripsina /TFPI-2. Las coordenadas de TFPI-2 K1 fueron alineadas sobre las coordenadas tridimensionales de BPTI^{5LI5} de la estructura cristalina de TF/ FVIIA/ BPTI^{5LI5} (archivo 1FAK1 del pdb) usando un programa de alineación de la cadena principal del cuerpo rígido c- ∞ en la habitación del programa PyMoI (pymol. sourceforge.net/). El análisis de ajuste de TFPI-2 K1 al modelo por la medición de la pendiente resultante de la desviación de la raíz media cuadrada (RMSD) de menos de 1A. Este indico una alineación precisa entre las dos

estructuras, y la generación de un modelo confiable de un FVII y de un complejo TFPI-2 K1.

Las cadenas laterales en TFPI-2 K1 que fueron mostradas por el modelo de estar en contacto cercano con la superficie de FVII fueron identificadas y mutagenizadas en silico para corresponder a las cadenas laterales presentes en TFPI-1 K1. Los resultados de esta análisis revelaron una complementariedad electrostática entre el factor VII y TFPI-1 K1 en distintos residuos directamente adyacente al sitio activo (es decir.2^{dos} residuos de la esfera). Los residuos en FVII implicados en la interacción con TFPI-I K1 basado en el anterior análisis homológico son D60, K60a, K60c, T99, R147 y K192 de la enumeración de la quimotripsina, que corresponden a D196, a K197, a K199, a T239, a R290 y a K341, respectivamente, a la enumeración madura de FVII (figura 7). Una evaluación de la interacción modelada indicado que los residuos de glicina en la posición 97 por la enumeración de la quimotripsina (G97), que corresponde a G237 por la enumeración madura de FVII, esta en estrecha proximidad a los residuos del contacto. La modificación en esta posición podría dar como resultado un obstáculo estérico, que rompería la interacción de FVII con TFPI.

B. Mutación In silico del factor VII para proporcionar resistencia creciente a TFPI-K1

Los residuos de aminoácidos situados en o cerca de la interfaz de la interacción de FVII/TFPI-1 K1 fueron identificados como se describe anteriormente. Las variantes de FVII con los cambios del aminoácido fueron

diseñadas que tanto a) los reemplazos de los contactos electrostáticos complementarios entre FVII y TFPI-1 con los contactos repelen carga-carga y/o b) nieguen contactos electrostáticos positivos por el reemplazo de los residuos cargados en FVII con residuos neutros y/o c) Causen un obstáculo estérico por el reemplazo de residuos que contienen una pequeña cadena lateral con los residuos que contienen cadenas laterales más grandes. Variantes ejemplares están enunciadas en la tabla 9.

Tabla 9. Variantes ejemplares del factor VII

Variante (Numeración de FVII maduro)	**Variante (Numeración quimotripsina)**	**ID**	**Variante polipéptido SEQ ID NO**
D196K	D60K	CB554	18
D196R	D60R	CB555	19
D196A	D60A	CB556	20
D196Y	D60Y	CB601	125
D196F	D60F	CB600	126
D196W	D60W	CB602	127
D196L	D60L	CB603	128
D196I	D60I	CB604	129
K197Y	K60aY	CB561	21
K197A	K60aA	CB559	22
K197E	K60aE	CB558	23
K197D	K60aD	CB557	24
K197L	K60aL	CB560	25
K197M	K60aM	CB599	26
K197I	K60aI	CB595	130
K197V	K60aV	CB596	131
K197F	K60aF	CB597	132
K197W	K60aW	CB598	133
K199A	K60cA	CB564	27
K199D	K60cD	CB562	28
K199E	K60cE	CB563	29
G237W	G97W	CB605	134
G237T	G97T	CB606	135
G237I	G97I	CB607	136
G237V	G97V	CB608	137

T239A	T99A	CB565	30
R290A	R147A	CB568	31
R290E	R147E	CB567	32
R290D	R147D	CB566	33
K341E	K192E		34
K341R	K192R	CB569	35
K341Q	K192Q	CB609	138
D196R/R290E	D60R/R147E	CB579	36
D196K/R290E	D60K/R147E	CB580	37
D196R/R290D	D60R/R147D	CB581	38
D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/K60cE	CB586	39
D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/K60cE	CB587	40
D196R/ K197E/ K199E/R290E	D60R/K60aE/K60cE/R147E	CB588	41
D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/K60cE	CB589	42
D196R/ K197M/ K199E/R290E	D60R/K60aM/K60cE/R147E	CB590	43
D196K/K197L	D60K/K60aL	CB610	139
D196F/K197L	D60F/K60aL	CB612	140
D196L/K197L	D60L/K60aL	CB611	141
D196M/K197L	D60M/K60aL	CB613	142
D196W/K197L	D60W/K60aL	CB614	143
D196F/K197E	D60F/K60aE	CB615	144
D196W/K197E	D60W/K60aE	CB616	145
D196V/K197E	D60V/K60aE	CB617	146

Ejemplo 2

Reproducción y expresión de FVII

A. Reproduccion de FVII

Los nucleótidos que codifican los 466 isoformas del amino acido humano FVII polipéptidos precursores (P08709; dispuesto en NÚMERO SEQ de ID: 1) fueron clonado en el vector de expresión mamífero, escritura pCMV (Stratagene; NÚMERO SEQ DE ID: 151), que contiene un promotor del citomegalovirus (CMV). Brevemente, el CBO- 125 (NÚMERO SEQ de ID: 152)

y CBO-126 (NÚMERO SEQ de ID: 153) los oligonucleótidos fueron utilizados como cebadores delanteros e inversos, respectivamente, para amplificar la secuencia de FVII por PCR usando el cDNA FVII humano (Invitrogen) como la planta. El cebador CBO-125 contuvo un sitio de restricción BamHI (en negrilla), una secuencia de Kozak (doble subrayado), seguida por 18 nucleótidos con homología de 5 pulgadas en el extremo de la secuencia de FVII c ADN (subrayada), incluyendo el codón de iniciación ATG. El cebador de CBO- 126 contiene un sitio de restricción EcoRI (en negrilla), un codón de parada (doble subrayado) y 21 nucleótidos con homología de 3 pulgadas en el extremo de la secuencia de c ADN de FVII (subrayada).

Cebador delantero de CBO- 125

5 ' gcatcateacgtgacggatccgccaccatggtctcccaggccctc 3 '

Cebador traseri de CBO- 126

5 ' Gatcgtaceatacgtgaattcctaggeaaatggggctcgcapgag 3 '

La reacción estándar PCR y las condiciones termo cíclicas fueron utilizadas conjuntamente con el estuche KoD HiFi PCR (biociencias de EMD), según las recomendaciones del fabricante. El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción de BamH I y de EcoR I y ligado en los sitios de restricción de BamH I y de EcoR I del vector de la escritura pCMV usando las técnicas moleculares estándar. El vector entonces fue transformado en Escherichia coli. Las colonias seleccionadas fueron creciendo y las células bacterianas recogidas para la purificación del plásmido usando las técnicas de la biología molecular de rutina.

B. Generación de variantes de FVII

Las variantes de FVII fueron generadas usando el estuche Sitio-Dirigido de mutagénesis de QuikChangeII XL (Stratagene) según las instrucciones de los fabricantes, con los oligonucleótidos específicamente diseñados que sirvieron como cebadores que incorporaron una mutación concreta en el ADN nuevamente sintetizado. El método de QuikChange implica la amplificación lineal de la platilla de ADN por la polimerasa de alta fidelidad de ADN de PfuUltra. Los cebadores complementarios que incluyen la mutación deseada fueron extendidos durante el uso del ciclo purificador, el vector de escritura pCMV súper enrollado doblemente que contiene la secuencia de cADN clonada de FVII como plantilla. Extensión de los cebadores resultaron en la incorporación de la mutación de interés en las hebras nuevamente sintetizadas, y resultando en un plásmido mutado con las mellas escalonadas. En la siguiente amplificación, el ácido nucleico fue tratado con Dpn I, que digiere las hebras parenterales metiladas del vector de escritura E. coli- derivadas de pCMV. Esto resultó en la “selección” de los plásmidos mutados nuevamente sintetizados, que no eran metilados. El vector del ADN que contenía las mutaciones deseadas fue transformada en el ultra componente de células E. coli XL10-Gold, donde la ligasa bacteriana reparo las mellas y permitió que ocurriera la replicación normal.

Las variantes de FVII con individuales sustituciones de aminoácidos fueron hechas apuntando las posiciones D196, K197, K199, G237, T239, R290 y K341, por la enumeración madura de FVII (correspondiente a D60, a K60a, a

K60c, a G97, a T99, a R147 y a K192 por la enumeración de la quimotripsina). Las variantes de FVII con múltiples mutaciones en las posiciones D196, K197 y K199, o las mutaciones en las posiciones D196 y K197, también fueron generadas. La secuencia de nucleótidos de uno de los oligonucleótidos de cada pareja de cebadores complementaria fue utilizada para generar las variantes de FVII proporcionadas en la tabla 10. La secuencia correspondiente de tipo salvaje también es mostrada como comparación. La secuencia de 3 bases pares que codifica el sustituido del aminoácido es mostrado con negrilla. Por ejemplo, para generar una variante de FVII que contiene la sustitución D196K (D60K por la enumeración de la quimotripsina; CB554, NÚMERO SEQ DE ID: 18), el oligonucleótido de CBO- 157 D60K, y un oligonucleótido que es complementario a CBO- 157 D60K, fue utilizado el estuche Sitio-Dirigido de mutagénesis de QuickChange II XL para sustituir una secuencia de tipo salvaje de 3 bases pares “gac” con una secuencia de 3 bases pares “aag”. El vector mutado que codificaba un polipéptido de la variante de FVII que contenía una sustitución de D196K, luego fue transformado en un ultra componente de células E. coli XL10-Gold.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para generar variantes de FVII

Posicion Dirigida	**Nombre del cebador**	**Secuencia del cebador**	**No SEQ ID**
D196 (D60)	D60 wild-type	gcggcccactgtttc**gac**aaaatcaagaactgg	155
	CBO-157 D60K	gcggcccactgtttc**aag**aaaatcaagaactgg	156
	CBO-158 D60R	gcggcccactgtttc**agg**aaaatcaagaactgg	157
	CBO-159 D60A	gcggcccactgtttc**gcg**aaaatcaagaactgg	158
	CBOLH-59 D60F	gcggcccactgtttc**ttt**aaaatcaagaactgg	186

	CBOLH-60 D60Y	gcggcccactgtttc**ata**aaaatcaagaactgg	187
	CBOLH-61 D60W	gcggcccactgtttc**tgg**aaaatcaagaactgg	188
	CBOLH-62 D60L	gcggcccactgtttc**gag**aaaatcaagaactgg	189
	CBOLH-63 D60I	gcggcccactgtttc**atc**aaaatcaagaactgg	190
K197 (K60a)	K60a wild-type	gcccactgtttcgac**aaa**atcaagaactggagg	159
	CBO-160 K60aD:	gcccactgtttcgac**gac**atcaagaactggagg	160
	CBO-161 K60aE	gcccactgtttcgac**gag**atcaagaactggagg	161
	CBO-162 K60aA	gcccactgtttcgac**gcg**atcaagaactggagg	162
	CBO-163 K60aL	gcccactgtttcgac**ctc**atcaagaactggagg	163
	CBO-164 K60aY	gcccactgtttcgac**tat**atcaagaactggagg	164
	CBOLH-54 K60aI	gcccactgtttcgac**atc**atcaagaactggagg	181
	CBOLH-55 K60aV	gcccactgtttcgac**gtc**atcaagaactggagg	182
	CBOLH-56 K60aF	gcccactgtttcgac**ttc**atcaagaactggagg	183
	CBOLH-57 K60aW	gcccactgtttcgac**tgg**atcaagaactggagg	184
	CBOLH-58 K60aM	gcccactgtttcgac**atg**atcaagaactggagg	185
K199 (K60c)	K60c wild-type	tgtttcgacaaaatc**aag**aactggaggaacctg	165
	CBO-165 K60cD	tgtttcgacaaaatc**gac**aactggaggaacctg	166
	CBO-166 K60cE	tgtttcgacaaaatc**gag**aactggaggaacctg	167
	CBO-167 K60cA	tgtttcgacaaaatc**gcg**aactggaggaacctg	168
G237 (G97)	G97 wild-type	agcacgtacgtcccg**ggc**accaccaaccacgac	191
	CBOLH-64 G97W	agcacgtacgtcccg**tgg**accaccaaccacgac	192
	CBOLH-65 G97T	agcacgtacgtcccg**acg**accaccaaccacgac	193
	CBOLH-66 G97I	agcacgtacgtcccg**atc**accaccaaccacgac	194
	CBOLH-67 G97V	agcacgtacgtcccg**gtc**accaccaaccacgac	195
T239 (T99)	T99 wild-type	tacgtcccgggcacc**acc**aaccacgacatcgcg	169
	CBO-168 T99A	tacgtcccgggcacc**gcg**aaccacgacatcgcg	170
R290 (R147)	R147 wild-type	ggccagctgctggac**cgt**ggcgccacggccctg	171
	CBO-169 R147D	ggccagctgctggac**gac**ggcgccacggccctg	172
	CBO-170 R147E	ggccagctgctggac**gag**ggcgccacggccctg	173
	CBO-171 R147A	ggccagctgctggac**gcg**ggcgccacggccctg	174
K341 (K192)	K192 wild-type	agcaaggactcctgc**aag**ggggacagtggaggc	175
	CBO-172 K192R	agcaaggactcctgc**cgc**ggggacagtggaggc	176
	CBOLH-68	agcaaggactcctgc**cag**ggggacagtggaggc	196

	K192Q		
D196/ K197/ K199 (D60/ K60a /K60c)	D60/ K60a/ K60c wild-type	gtggtctccgcggcccactgtttc**gacaaa**atc**aag**aa ctggaggaacctg atcgcggtg	177
	CBO-177 D60R / K60aE / K60cE	gtggtctccgcggcccactgtttc**agggag**atc**gaa**a actggaggaacctg atcgcggtg	178
	CBO-178 D60K/ K60aE/ K60cE	gtggtctccgcggcccactgtttc**aaggag**atc**gaa**aa ctggaggaacctg atcgcggtg	179
	CBO-179 D60R / K60aM / K60cE	gtggtctccgcggcccactgtttc**aggatg**atc**gaa**aa ctggaggaacctg atcgcggtg	180
D196/ K197 (D60 /K60a)	D60 /K60a wild-type	gcggcccactgtttc**gacaaa**atcaagaactgg	197
	CBOLH-69 D60K/ K60aL	gcggcccactgtttc**aagctc**atcaagaactgg	198
	CBOLH-70 D60L/ K60aL	gcggcccactgtttc**ctcctc**atcaagaactgg	199
	CBOLH-71 D60F/ K60aL	gcggcccactgtttc**tttctc**atcaagaactgg	200
	CBOLH-72 D60M/ K60aL	gcggcccactgtttc**atgctc**atcaagaactgg	201
	CBOLH-73 D60W/ K60aL	gcggcccactgtttc**tggctc**atcaagaactgg	202
	CBOLH-74 D60F/ K60aE	gcggcccactgtttc**tttgag**atcaagaactgg	203
	CBOLH-75 D60W/ K60aE	gcggcccactgtttc**tgggag**atcaagaactgg	204
	CBOLH-76 D60V/ K60aE	gcggcccactgtttc**gtcgag**atcaagaactgg	205

C. Expresión de los polipéptidos de FVII

Para las expresiones iniciales del análisis hecho por ELISA y Western Blot, los polipéptidos de FVII fueron expresados en células BHK-21. Para los ensayos bioquímicos, tales como están descritos mas adelante, los polipéptidos de FVII fueron expresados en las células FreestyleTM 293-F (Invitrogen).

El polipéptido del factor VII de tipo salvaje (CB553-02, NÚMERO SEQ de ID: 3) y los polipéptidos de la variante FVII fueron expresados inicialmente en la línea celular BHK- 21 (ATCC CRL 1632) del riñón de un hámster bebé. Las células BHK-21 fueron cultivadas en un medio mínimo esencial de águila (EMEM, Invitrogen) con 10% suero fetal de ternera (FCS) en 100mm de placas de cultivo a 37ºC y 5% CO_2. Después de crecer en confluencia en aproximadamente 90%, las células fueron transfectadas con 24 µg del ADN plásmido de FVII usando el estuche de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. El medio fue sustituido 6 horas después de la transfección con EMEM sin el suero que contenía 1 µ g/ml de vitamina K1 (Sigma) y las células fueron encubadas por otras 72 horas más. La expresión de FVII en el medio de cultivo celular fue ensayada por ELISA o Western Blot.

Para las análisis subsiguientes usando ensayos bioquímicos, el polipéptido del factor VII de tipo salvaje (CB553-02, NÚMERO SEQ de ID: 3) y los polipéptidos de la variante FVII fueron expresados en las células 293-F del Freestyle™ (Invitrogen). Las células fueron cultivadas en Freestyle™ 293 media (Invitrogen) en 37ºC y 8% CO_2 en frascos Erlenmeyer con las tapas ventiladas. Las células fueron transfectadas usando el protocolo sugerido por el fabricante.

Brevemente, después del crecimiento al 1 x 10^6 células /ml, las células fueron centrifugadas y el medio fue intercambiado. Las células fueron entonces transfectadas con 240 µg del plásmido de ADN de FVII para cada 240 ml de las células que usaban 293fectin (Invitrogen). Además, 50 µl de un 1 mg/ ml de material de la vitamina K1 (Sigma) en etanol fue añadido por cada 240 ml de células. Las células crecieron por 5 días luego el sobrenadante de cultivo fue recogido. La expresión de FVII en el medio de cultivo celular fue ensayada por ELISA.

1. ELISA

Un inmuno-ensayo fue utilizado para cuantificar la cantidad de FVII humano y de FVIIa en una muestra. Los anticuerpos poli-clónales para FVII humano fueron utilizados en la capturar y detección de la proteasa en la solución. El inmuno-ensayo puede ser utilizado para determinar la concentración de proteína de un medio condicionado o de un material purificado o para determinar la concentración de FVII en otra muestra, por ejemplo, una muestra de plasma humana o de ratón. La concentración de la línea de base de FVII en la sangre humana es aproximadamente de 50 nanómetros y enzimáticamente de forma activa, FVIIa, es aproximadamente 1 nanómetro.

Para determinar la cantidad de FVII humano o la proteína de FVIIa en muestras se realizo un emparedado de ELISA. Noventa y seis placas de fondo realmente plano en poso de inmuno Maxisorp (Nunc) fueron revestidas con 100 µl/ poso de 5 ng/ µl de avidina (NeutrAvidin, Pierce Biotech.). Las placas fueron

cubiertas y incubadas con agitación por 1 hora a temperatura ambiente (TEMPERATURA AMBIENTE) luego lavandas cuatro veces en PBS con el 0.01% Tween-20 (PBST). Las placas fueron bloqueadas por un mínimo de 1 hora a TEMPERATURA AMBIENTE con agitación por la incubación de 1% con albúmina de suero bovino (BSA) (peso/volumen) en PBS añadido a cada poso en 200 µl /poso. Las placas bloqueadas fueron entonces almacenadas a 4ºC hasta su uso (hasta por 2 semanas).

Antes de usarlas, las placas fueron lavadas cuatro veces en PBST para eliminar el BSA, y 100 µl/poso de un 1 ng/ µl de solución del anticuerpo biotinilado del contra-Factor VII (sistemas de R&D) fueron añadidos a cada poso y la placa fue incubada a temperatura ambiente por 45 minutos con agitación para permitir la complejación con la avidina revestida. El exceso desatado por el anticuerpo fue eliminado lavando la placa con PBST (cuatro veces).

Diluciones seriales de dos dobleces de FVII estándar (American Diagnostica; diluido en PBST), que van a partir de 50 ng/ µl a 0.8 ng/ µl, fueron añadida a la placa en 100 µl/ poso. Un poso que contenía PBST sin ningún FVII también fue incluido como control de Tampón solamente. Al ensayo de las muestras purificadas (antes y después de la activación, véase en el ejemplo 3) de FVII o de FVIIa, la muestra fue primero diluida 1: 25 en PBST, y luego continuas diluciones de 2 dobleces fueron hechas de modo que se ensayaron diluciones de 25 dobleces, 50 dobleces, 100 dobleces y 200 dobleces. Las muestras diluidas fueron añadidas a las posos en duplicado en 100 µl/ poso. A

las muestras de plasma del ensayo que contenían FVII o FVIIa, la muestra de plasma fue diluida 1: 100 y 1: 400 en PBST y añadidos a las posos en duplicado en 100 µl/ poso. Una muestra de plasma sin FVII o FVIIa también fue incluida para determinar los niveles de los antecedentes. Las placas fueron entonces incubadas por 30 minutos a TEMPERATURA AMBIENTE con agitación que permitiera cualquier FVII o FVIIa en la muestra a mezclarse con el anticuerpo del anti-FVII.

Después de la incubación con la muestra, las placas fueron lavadas 4 veces con PBST. Un anticuerpo secundario, FVII contra-humano equino (American Diagnostica), fue diluido 1: 5000 en PBST y añadidos a cada poso en un volumen de 100 µL. Las placas fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación para permitir al anticuerpo añadido unirse a los complejos de FVII o de FVII en la placa. Para eliminar el exceso del anticuerpo secundario, las placas fueron lavadas con PBST (4 veces). Para detectar el lazo del anticuerpo secundario, fue añadido a cada poso 100 µl HRP contra-equino de cabra conjugado en una dilución de 1: 5000 en PBST. Después de la incubación por 30 minutos en la temperatura ambiente con agitación, las placas fueron lavadas cuatro veces con PBST y fue añadida 100 µl/ poso de una solución que contenía un 1: 1 mezcla de sustrato TMB y de solución de peróxido de hidrógeno (Pierce Biotech). Las placas fueron agitadas para aproximadamente 1 minuto a temperatura ambiente antes de adicionarles 100µl/ poso de 2M de H_2SO_4 para parar la reacción. La densidad óptica en 450 nanómetro fue medida usando un dispositivo molecular de lector de placas

M5 y el valor de los antecedentes de la placa (medida solamente con PBST) que fue tomado del valor de medición de cada poso. Una curva patrón fue generada trazando la concentración del estándar FVII contra la absorbencia. Un intervalo de la curva estándar de aproximadamente 0.2 - 50 ng/ml fue generado típicamente bajo las condiciones antedichas del ELISA. La concentración de cada muestra fue entonces determinada usando la curva patrón y multiplicando por el factor de dilución, y un promedio y una desviación estándar fueron informados.

2. Western Blot

La expresión de FVII en medio de cultivo celular también fue ensayada por la Western Blot. Alícuotas que contenían la muestra no diluida, o dos diluciones seriales de 2 dobleces de PBS, del medio de cultivo celular de FVII-transfectado a las células BHK- 21 fueron marcados Conc.1 (no diluido), Conc.2 (dilución a 2 dobleces) y Conc.3 (dilución a 4 dobleces). Las muestras fueron cargadas en un lamina de gel de SDS al lado de 10, 25, y 50 nanogramo de plasma de control rFVH purificado (American Diagnostica, CB553-01). La proteína de FVII producida por las células BHK- 21 fue detectada por la Western Blot usando un anticuerpo equino policlonado primario del anti-FVII (American Diagnostica; utilizado en la concentración sugerida de fabricación) y un anticuerpo secundario anti-equino IgG conjugado con HRJP (una dilución de 1: 2000 de la solución de 1mg/ml de los laboratorios Zymed). La comparación de niveles de expresión fue hecha con el plasma del control purificado rFVII. Los resultados mostraron que las concentraciones que van de

aproximadamente 20 ng a más de 50 ng de FVII estaban presente en las alícuotas del cultivo celular.

Ejemplo 3

Purificación y activación de los polipéptidos FVII

Los polipéptidos de FVII fueron purificados usando una columna Q Sepharosa de rápido flujo (XK16), al cual los polipéptidos de FVII con funcionamiento de los dominios GIa absorberían, seguida por una etapa de elusión de los calcios. A un volumen de 240 ml del sobrenadante del cultivo de las células transfectadas de FreestyleTM 293-F fueron diluidas a 2 dobleces con una solución que contenía 20 milímetros Tris pH 8.0 y 0.01% entre 20, y luego 1.5 ml de 500 milímetros EDTA pH 8.0 fueron añadidos a la muestra diluida. Las muestras fueron filtradas antes de ser cargadas sobre una columna Q Sepharosa de rápido flujo (XK16) que había sido pre-equilibrada primero con el Tampón B (20 milímetro Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 0.01% Entre 20), luego Tampón A (20 milímetro Tris pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.01% Entre 20) en 8 ml/min. Después del ser cargado, la columna fue lavada con el Tampón A hasta que la absorbencia del flujo a través de 280 nanómetro alcanzó la línea base. El Tampón A fue sustituido con el Tampón C (20 milímetro Tris pH 8, 0.15 M NaCl, 0.01% Entre 20, 5 milímetros $CaCl_2$) y un lavado con bomba fue realizado para sustituir totalmente al Tampón en las líneas. Después de terminar el lavado con la bomba, el Tampón C fue aplicado a la columna en 8 ml/ min para eluir los polipéptidos de FVII, que fueron recogidos en 5 fracciones del ml por 60 minutos. La siguiente elusión, la columna fue lavada con el

Tampón B cuando todavía estaba recogiendo fracciones, hasta que el pigmento rosado (del medio de cultivo) fue lavado de la columna. La columna entonces fue lavada con el Tampón A para prepararlo para la purificación de FVII de la siguiente muestra.

Las fracciones eluidas fueron adicionalmente purificadas usando una columna del mono Q 5/5 (que contiene 1 ml de resina), que estaba preequilibrado inicialmente con el Tampón B, y luego con el Tampón A, en 2 ml/min. De la quinta a la octava fracción de 5m recolectadas con el Tampón C de la parte superior fueron reunidas y diluidas dos dobleces con el Tampón A, antes 1.6 ml de 500 milímetros del EDTA, pH 8.0 fue añadido. Las pequeñas alícuotas (100µl) fueron tomadas opcionalmente en este punto para el análisis, como por ejemplo por ELISA. La muestra combinada fueron cargada sobre la columna del Mono Q en 2 ml/min, luego lavados con el Tampón A. Para eluir los polipéptidos unidos de FVII, un gradiente a partir de 0% hasta 30% del Tampón B fue corrido a través de la columna durante 20 minutos, en 1 ml/min, y 0.5 ml de fracciones fueron recogidas. La columna fue entonces lavada con el Tampón B seguido por el Tampón A en preparación de la purificación de FVII de la siguiente muestra.

Los polipéptidos purificados de FVII fueron activados a FVIIa usando el factor biotinilado XA del estuche de la escisión y de la eliminación del factor XA de la proteasa de restricción (Roche). Normalmente, 7 fracciones de la purificación del Mono Q fueron reunidas en tubos cónicos de 15 ml y 388 µl de 500 milímetros de CaCl2, 38.9 µl de 10% BSA en agua destilada, y 3.2 µg del

factor biotinilado XA fueron añadidos. Después de la incubación por 14-16 horas a 37ºC, 250 µl de avidina inmovilizada (Pierce) fueron añadidos y la muestra fue mezclada en 4ºC por 30 minutos. La solución resultante fue luego filtrada a través de una columna de Econo-pak (bio Rad), y el filtrato fue mezclado con otro 250 µl de avidina inmovilizada por 30 minutos más. La solución fue filtrada otra vez y el filtrato fue concentrado a aproximadamente 300-500 µl usando un filtro centrífugo del Amicon Ultra-4 1OkDa (Millipore). La concentración de FVIIa luego fue analizada por ELISA (como se describió en el ejemplo 2.C.1) y el nivel de activación del factor VII fue controlado por Western Blot. El análisis de Western Blot fue realizado esencialmente como se describió en el ejemplo 2.C.2, pero se uso anticuerpo contra-humano de conejo del factor VIIa (Haematologic Technologies, Inc.) en 1: 2000 por 1 hora como el anticuerpo primario, seguido por HRP-Cabra Contra-Conejo IgG (H+L) (Invitrogen) en 1: 5000 por 30 minutos.

Ejemplo 4

Determinación de la constante cinética de Michaelis Menten de la actividad amidolitica de FVIIa en un sustrato de la molécula pequeña

La actividad amidolitica de las variantes de FVII fue evaluada midiendo la constante cinética de Michaelis Menten del polipéptido de FVIIa en el sustrato peptidil Espectrocima FVIIa (CH_3SO_2-D-CHA-But-Arg-pNA.AcOH). El factor tisular purificado humano Lipidado (Innovin, Dade Behring, VWR Cat # 68100-390) fue incluido en el ensayo para proporcionar una actividad óptima de FVIIa. El TF-FVIIa complejo rompe con la Espectrocima FVIIa como substrato

cromogénico altamente específico liberando una paranitroanilina- cromóforo (pNA), la cual puede ser controlada midiendo la absorción en 405 nanómetro. La actividad enzimática es determinada por el control que la absorbencia en 405 nanómetro del pNA libre generado en una función del tiempo.

Las reacciones fueron realizadas en tres diferentes concentraciones de enzima. Para la reacción, las variantes de FVIIa fueron primero diluidas a 40 nanómetro en 1 x Tampón de ensayo directo (100 milímetros Tris pH 8.4, 100 milímetros de NaCl, 5 milímetros de CaCl2, 0.01% BSA) en un tubo de 1.7 ml (tubos de microcentrífuga de baja adhesión de ISC Bioexpress). FVIIa fue diluido adicionalmente en presencia de TF (Innovin, Dade Behring) diluyendo 2 nanómetro en un depósito del polipropileno de 12 posos (Axygen) como sigue a continuación: 720 µl 5 x Tampón directo (500 milímetro Tris pH 8.4, 500 milímetros de NaCl, 25 milímetros de $CaCl_2$, 0.05% BSA), 180 µl 40 nanómetro FVIIa, y 2700 µl 2 x TF (solución madre de 6 nanómetros reconstituida en 10 ml de agua). La proteasa diluida fue incubada por 5 minutos en temperatura ambiente. El material de 2 nanómetros de FVIIa fue luego diluido en seriales de disolución de 2 dobleces para dar como resultado 1 nanómetro y 0.5 nanómetro de materiales de proteasa, respectivamente, también en presencia de TF. Las reacciones de la dilución en serie fueron como sigue a continuación: primero, 1800 µl de 2 nanómetros del material de FVIIa/TF del diluido arriba en 360 µl 5 x Tampón directo, 900 µl 2 x TF, y 540 µl agua. Este material diluido fue diluido otra vez 1:1 en 1800 µl 1 x TF en Tampón directo.

Una placa de la dilución del sustrato Espectrocima FVIIa (American Diagnostica) fue hecha. La solución madre de Espectrocima FVIIa fue hecha por la reconstitución de 50 µmol de vial en agua destilada a 10 milímetros y almacenada en 4 ºC. Ochenta µl (10 milímetros Espectrocima FVIIa) y 60 µl + 20 µl de agua (7.5 milímetros Espectrocima FVIIa) de los 10 milímetros Espectrocima FVIIa fueron añadidos a los posos en dos columnas adyacentes de una placa de ensayo de polipropileno de 96 posos (Costar). Los dos posos fueron diluidos en seriales dos dobleces hacia abajo cada uno de los 8 posos de la columna respectiva para hacer una serie de 10x de concentraciones de sustrato que van a partir de 10 milímetros a 78 µM de sustrato establecidos para los posos de la primera columna y a partir de 7.5 milímetros a 58.6 µM sustrato establecidos para los posos de la segunda columna.

Cinco µl de cada dilución del sustrato de Espectrocima FVIIa fueron añadidos a la mitad de una placa de ensayo de 96 posos (Costar). Cuarenta cinco µl de cada uno de las tres diluciones de FVIIa/TF fueron añadidos a tres grupos de columnas de las series de diluciones de sustrato. Durante esta etapa, fue tenido cuidado para evitar introducir burbujas en los posos del ensayo. Si se introducían burbujas, eran eliminadas pinchando con una aguja limpia antes de comenzar con cada montaje. Las placas fueron mezcladas con agitación. Antes de la iniciación del ensayo, la longitud del camino de los posos del ensayo fue medida usando un espectrofotómetro lector de placas Spectramax Gemini M5 (Molecular Devices) teniendo una lectura del punto final y usando la característica del Pathcheck del programa de computadores

SoftMax (Molecular Devices). El aumento en absorbencia en 405 nanómetros fue medido cada 30 segundos para una hora en 37ºC.

El programa de computador SoftMax fue utilizado para convertir la velocidad de la absorbencia (milli units/ seg) a la concentración de pNA liberada (µM/sec) usando la longitud del camino y el coeficiente de extinción del grupo saliente del pNA en 405 nanómetros, 9600 M^{-1} cm^{-1}. La ecuación de la conversión es como sigue a continuación: Velocidad x (1/60 x 1000) x (1/ 9600 x longitud del camino) x 100000. Los resultados de cada concentración de proteasa fueron representados gráficamente usando el programa de computador Graph Pad Prism con la concentración de sustrato en el X-axis y las determinadas velocidades µM/sec en el Y-axis. Usando el programa de computador Graph Pad Prism 4 Km y Ymax fueron determinados ajustando los datos a una ecuación de Michaelis Menten como sigue a continuación:

$$Y = ((k_{cat}K_m /1000000)x\ X\ x\ [E])/\ (1+ (X + K_m)$$

Donde; X es la concentración de sustrato (µM)

Y es la actividad enzimática (µM/sec)

$k_{cat}K_m$ es la constante de especificidad (M^{-1} $seg^{-1)}$

K_m es la constante Michaelis (µM)

E es la concentración de enzima (µM)

Los valores iniciales de E=I, Km = X en 0.5 x Y max y $k_{cat}K_m$ = 1000 era en conjunto.

La actividad específica (munits/min/nM) de cada uno de las variantes de FVIIa, tipo salvaje FVIIa (CB553-02) fue determinada con el ensayo descrito

anteriormente usando 420 µM Espectrocima FVIIa (tabla 11). La actividad de las variantes de FVIIa era normalmente mayor que la del tipo salvaje FVIIa (medido en 2.7 munits/min/nM). La actividad de las variantes de FVII fue comparada con la de las variantes descritas en la bibliografía (CB591- CB594), y en la mayoría de las variantes de FVII se encontró que tenían actividad comparable a o mayor que la actividad de las variantes que habían sido previamente descritas en la bibliografía.

Tabla 11. Actividad específica de las variantes de FVIIa

ID	No SEQ ID	Mutación (Numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración quimotripsina)	Actividad especifica (munits/min/nM)
CB553-02	3	ninguno	ninguno	2.7
CB554	18	D196K	D60K	1.7
CB555	19	D196R	D60R	1.9
CB556	20	D196A	D60A	3.2
CB557	24	K197D	K60aD	4.4
CB558	23	K197E	K60aE	4.4
CB559	22	K197A	K60aA	4.6
CB560	25	K197L	K60aL	1.1
CB561	21	K197Y	K60aY	5.2
CB562	28	K199D	K60cD	5.5
CB563	23	K199E	K60cE	5.2
CB564	27	K199A	K60cA	3.8
CB565	30	T239A	T99A	2.0
CB566	33	R290D	R147D	5.5
CB567	32	R290E	R147E	2.9
CB568	31	R290A	R147A	3.9

CB569	35	K341R	K192R	2.9
CB579	36	D196R/R290E	D60R/R147E	2.9
CB580	37	D196K/R290E	D60K/R147E	2.7
CB581	38	D196R/R290D	D60R/R147D	3.1
CB586	39	D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/ K60cE	5.2
CB587	40	D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/ K60cE	4.8
CB588	41	D196R/ K197E/ K199E/R290E	D60R/K60aE/ K60cE/R147E	4.9
CB589	42	D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/ K60cE	5.4
CB590	43	D196R/ K197M/ K199E/R290E	D60R/K60aM/ K60cE/R147E	6.2
CB591	147	L305V/S314E/ L337A/F374Y	L163V/S170bE/ K188A/F225Y	3.9
CB592	148	M298Q	M156Q	3.6
CB593	149	V158D/E296V/ M298Q	V21D/E154V/ M156Q	3.9
CB594	150	V158D/E296V/ M298Q/K337A	V21D/E154V/ M156Q/K188A	5.0

Ejemplo 5

Determinación de la actividad catalítica de FVIIa para su sustrato, factor X

La actividad catalítica de las variantes de FVIIa para sus sustratos, Factor X (FX), fue evaluada indirectamente en un ensayo fluoro génico probando la actividad de FXa, generada sobre la activación de FVIIa, en el sustrato sintético Spectrafluor FXa. Una forma lapidada del factor tisular purificado (TF) fue incluida en el ensayo para proporcionar una actividad óptima de FVIIa. La actividad enzimática de FXa para Spectrafluor FXa (CH3SO2-D-CHA-GIy-Arg-AMC.AcOH) fue determinada midiendo el aumento en la absorbencia del fluoró foro libre generado, AMC (7-amino-4-methilcoumarino), en función de tiempo.

Brevemente, las variantes de FVIIa fueron diluidas inicialmente a 0.5 µM en 1x en un tampón de ensayo directos (100 mM Tris pH 8.4, 100 milímetros de NaCl, 5 milímetros CaC12, y 0.01% BSA), luego diluido nuevamente a 0.1 nanómetros dentro de un tampón de ensayo directo. Lipidado integral TF (Innovin; Dade Behring) fue reconstituido en 20 ml de agua para hacer una solución de 3 nanómetros y diluido en 0.2 nM dentro de 1 x tampón de ensayo directo. Cuatrocientos µl de 0.1 nanómetros FVIIa fueron mezclados con 400 µl 0.2 nanómetro TF e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. La solución fue nuevamente diluida por dos, la diluciones en 2 dobleces en 1x tampón de ensayo directo que contenía 0.2 nanómetros TF para obtener un total de tres diluciones de FVIIa de 0.05 nanómetros, 0.025 nanómetros, o 0.0125 nanómetros de FVIIa cada uno contenían 0.2 nanómetros TF (soluciones de FVIIa/TF).

El sustrato, Factor X (FX; American Diagnostica; 80 µg) fueron reconstituidos en 135.6 µl de agua destilada para dar un material de 10 µM y almacenado en alícuotas a -80 ºC. Las alícuotas no fueron congeladas y descongeladas más de una vez. El material de FX fue diluido a 800 nanómetro en el tampón de ensayo directo, luego diluido en seriales de dos dobleces para obtener soluciones de FX que van a partir del 800 nanómetro a 50 nanómetro.

Spectrofluor XA (American Diagnostica; 10 µmoles) fueron reconstituidos en agua destilada a 5 milímetros y almacenados a 4 ºC. Una placa de ensayo con la mitad del área en negro con 96 posos (Costar), 5 µl Spectrofluor XA (American Diagnostica) fueron añadidos a cada poso. Luego, 25 µl de la

solución de FX fueron añadidos a cada poso. A la última fila de posos de la placa, un control negativo en el cual no fue añadido FX también fue incluido en el ensayo. Dos veces, las tres concentraciones de las soluciones de TF/FVIIa fueron añadidas en 20 µl a los posos de las columnas respectivas de la placa de modo que cada dilución de TF/FVIIa fuera ensayada contra cada dilución de FX, con un conjunto de las columnas que no contenían TF/FVIIa (es decir. FX solo). Las placas fueron mezcladas por agitación. La fluorescencia fue medida con base en el tiempo con un conjunto de espectrafluorometros para leer cada 30 segundos por 1 hora en 37ºC (ex: 380 nanómetro, EM: 450 nanómetro, corte: 435 nanómetro), y el tiempo fue informados en unidades cuadradas de tiempo. Siguiendo con el ensayo, una curva patrón de fluorescencia AMC en el mismo lector de placas fue generada para convertirla a unidades de fluorescencia al sustrato uM liberado en el ensayo. 1 milímetro AMC en DMSO (Invitrogen) fue diluido a 0.02 milímetros en 1 x tampón de ensayo directo. Seis, las diluciones seriales de dos dobleces de AMC fueron hechos para que vayan a partir del 20 nanómetro a 0.625 nanómetros en 1 x tampón de ensayo directo. La fluorescencia de AMC fue medida usando las mismas condiciones de ensayo como se describe anteriormente y un gráfico de la fluorescencia contra la concentración de AMC fue trazado. La pendiente de la línea fue calculada, la cual sirvió como el factor de conversión para RFU µM en cálculos subsiguientes.

Las constantes de la cinética para la activación de FVIIa de FX fueron calculadas realizando un análisis de la regresión lineal en el inverso de la

concentración de sustrato contra el inverso de la velocidad de la división del sustrato (en unidades de segundos^2), con $V_{max,FV][a}$ calculado como el inverso de la interceptación de la y, $K_{m,FV][a}$ como la pendiente en la interceptación de la y, V_{max} / $K_{m,FV][a}$ como el inverso de la pendiente. El valor de k_{cat} fue entonces derivado usando la ecuación;

k_{cat} / $K_{m,FV][a}$ = V_{max} / $K_{m,FV][a}$ x 1 (0.5 x k2 x [FVIIa en µM] x el factor de conversión (RFU/ µM))

donde; k2 = ([S] x $k_{cat,Fxa}$)/($K_{m,Fxa}$+ [S]), donde $k_{cat,Fxa}$ y)/($K_{m,Fxa}$ son las constantes para la división de FXa de SpectrofluorXa determinaron experimentalmente usando las normas estándar de FXa como $k_{cat,Fxa}$ = 117 seg^{-1}, y $K_{m,Fxa}$ = 164 µM.

Usando las condiciones de ensayo antedichas, la constante cinética k2 fue determinada para ser 88.1 el seg^{-1}.

El K_m y el k_{cat} para cada uno de las variantes de FVIIa fueron determinados para evaluar la actividad catalítica, k_{cat} / K_m ($M^{-1}seg^{-1}$) de cada uno de sus sustratos, FX (tabla 12). La proteasa de tipo salvaje de FVIIa (CB553-02) también fue evaluada y se encontró que mostraba una actividad de 1.8 x 10^7 $M^{-1}seg^{-1}$. Activación del factor VIIA del Factor X, según lo medido por Krishnaswamy, y otros. (J. Biol. Quím. (1998) 273:8 4378-86) son 2.9 x 10^7 $M^{-1}seg^{-1}$. Muchas de las variantes mostraron actividad comparable con la de la proteasa sin modificar. En algunas instancias, las variantes de FVIIa exhibieron una actividad catalítica mejorada comparada con la de la proteasa sin

modificar. Por ejemplo, CB558, CB561 y CB563 exhibieron actividades catalíticas de 5.2 x 10^7, 4.3 x 10^7 y 5.9 x 10^7 M^1seg^1.

Tabla 12. Actividad catalítica de las variantes de FVIIa

ID	Mutación (Numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración quimotripsina)	Actividad catalítica k_{cat} / K_m ($M^{-1}seg^{-1}$)	Log_{10} (k_{cat} / K_m)	K_m (mM)	k_{cat} (seg-1)
CB553-02	ninguno	ninguno	1.8×10^7	7.3	0.039	0.71
CB554	D196K	D60K	3.1×10^7	7.5	0.038	1.2
CB555	D196R	D60R	2.6×10^7	7.4	0.036	0.95
CB556	D196A	D60A	2.6×10^7	7.4	0.292	7.4
CB557	K197D	K60aD	2.5×10^7	7.4	0.046	1.2
CB558	K197E	K60aE	5.2×10^7	7.7	0.020	1.1
CB559	K197A	K60aA	3.6×10^7	7.6	0.026	0.94
CB560	K197L	K60aL	9.3×10^5	6.0	0.641	0.60
CB561	K197Y	K60aY	4.3×10^7	7.6	0.041	1.8
CB562	K199D	K60cD	1.4×10^7	7.2	0.070	1.0
CB563	K199E	K60cE	5.9×10^7	7.8	0.041	2.4
CB564	K199A	K60cA	8.4×10^6	6.9	0.103	0.87
CB565	T239A	T99A	6.1×10^5	5.8	0.128	0.078
CB566	R290D	R147D	1.2×10^6	6.1	0.045	0.053
CB567	R290E	R147E	6.8×10^4	4.8	1.9	0.014
CB568	R290A	R147A	4.1×10^6	6.6	0.018	0.074
CB569	K341R	K192R	2.7×10^6	6.4	0.092	0.25
CB579	D196R/R290E	D60R/R147E	1.4×10^6	6.1	0.032	0.044
CB580	D196K/R290E	D60K/R147E	1.9×10^6	6.3	0.025	0.047
CB581	D196R/R290D	D60R/R147D	3.0×10^6	6.5	0.28	0.085
CB586	D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/ K60cE	7.8×10^6	6.9	0.033	0.26

CB587	D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/ K60cE	3.7×10^6	6.6	0.062	0.26
CB588	D196R/ K197E/ K199E/R290E	D60R/K60aE/ K60cE/R147E	5.3×10^4	4.7	0.888	0.047
CB589	D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/ K60cE	1.1×10^7	7.0	0.049	0.54
CB590	D196R/ K197M/ K199E/R290E	D60R/K60aM/ K60cE/R147E	4.6×10^5 ††	5.7	0.030	0.014
CB591	L305V/S314E/ L337A/F374Y	L163V/S170bE/K188A/F225Y	6.3×10^6	6.8	0.235	1.5
CB592	M298Q	M156Q	3.1×10^7	7.5	0.085	2.7
CB593	V158D/E296V / M298Q	V21D/E154V/ M156Q	4.9×10^7	7.7	0.063	3.1
CB594	V158D/E296V / M298Q/K337A	V21D/E154V/ M156Q/K188A	1.2×10^8	8.1	0.035	4.1

††Valores aproximados.

Ejemplo 6.

Determinación de la concentración de proteasa viable catalíticamente en una solución

La concentración de proteasa FVIIa viable catalíticamente en una solución madre fue determinada valorando un complejo del factor VIIa y del factor tisular soluble (sTF) con un inhibidor irreversible de péptido FVIIa, Phe-Phe-Arg-Clorometilquetona (FFR- CMK). El inhibidor adhiere a FVIIa pero no a FVII. La incubación extendida en una alta concentración de FVIIa (50 nanómetro) asegura la valoración completa de la proteasa. La actividad residual del complejo de FVIIa/TF después de incubación con FFR-CMK fue

medida para determinar la concentración de FVIIa viable catalíticamente en la solución madre original.

A. Formato de placa de ensayo de 96 pozos

Una placa de ensayo de media área transparente de 96 posos (Nunc) fue pre tratada añadiendo 150 µl/ poso de 1 x tampón de la placa (100 milímetros Tris pH 8.4, 100 milímetros de NaCl, 0.01% BSA, 0.01% Tween-20) a cada poso e incubada la placa en 37ºC por un mínimo de 1 hora. El tampón fue eliminado totalmente secándolo en una toalla de papel y centrifugando la placa boca abajo para eliminar cualquier tampón restante, y la placa fue secada al aire por 1 hora y almacenado cubierto a temperatura ambiente (TEMPERATURA AMBIENTE).

Para preparar la mezcla de reacción FVIIa/sTF/FFR-CMK, un material de FVIIa (American Diagnostica; diluido a 5 µM en 50% de glicerol (v/v) y almacenado en frío en alícuotas en -20 ºC) o una variante de FVIIa fue la primera diluida en 500 nanómetro en 1 x tampón de ensayo directo de x (100 milímetros Tris pH 8.4, 100 milímetros de NaCl, 5 milímetros de $CaCl_2$, 0.01% BSA). La mezcla de FVIIa/sTF fue hecha entonces mezclando 90 µl de agua destilada con 36 µl 5 x tampón de ensayo directo, 18 µl 500 nanómetro FVIIa, y 18 µl 5 µM sTF de M (Factor humano de coagulación recombinante III/ factor tisular soluble; Sistemas del R&D; la solución madre utilizada fue 19.6 µM en 50% de glicerol y fue diluida a 5 µM en 1 x tampón de ensayo directo y almacenada hasta dos semanas en 4ºC). luego se les permitió ser complejos por 5 minutos a temperatura ambiente.

Una solución madre de 10 milímetros FFR-CMK (Bachem) en DMSO (almacenada a -20 ºC) fue diluida en agua a 3.5 µM. Usando una fila de una placa opaca de almacenamiento de polipropileno (Costar #3363), las diluciones en serie de dos dobleces en agua de FFR-CMK fueron hechas a través de 11 posos de una placa opaca de 96 posos, con la ultima fila de posos que contenía solamente agua como control. Éste es la solución de serie de inhibidores 10x FFR-CMK. En cada poso de la placa de ensayo de media área clara pre tratada de 96 posos, 10.8 µl de la mezcla de FVIIa/sTF fueron añadidos, seguido por 1.2 µl de la serie del inhibidor de 10x FFR-CMK. Las soluciones fueron mezcladas bien y la placa fue centrifugada a <3000 rpm por 5 minutos para eliminar las gotas en los posos. La placa fue cubierta e incubada por 8 horas en 37ºC.

Para ensayar la actividad residual del complejo FVIIa/TF, una mezcla del sustrato Espectrozima FVIIa (American Diagnostica, #217L; material reconstituido de vial µmol 50 en 5 a 10 milímetros de agua destilada y almacenado en 4ºC) y 5X de tampón directo (500 milímetros Tris pH 8.4, 500 milímetros de NaCl, 25 milímetros de $CaCl_2$ y 0.05% BSA) fue primero preparado al mezclar 360 µl 5 x tampón de ensayo directo de 180 µl de una solución de 10 milímetros de Espectrocima FVIIa y 1080 µl de agua. A cada poso de la placa de ensayo, se le añadió 108 µl de la solución de sustrato preparada. Los posos fueron mezclados y la placa fue incubada en 37ºC. El aumento en absorbencia en 405 nm fue medido cada 30 segundos para una

hora a 37ºC con un lector de placas Spectramax Géminis M5 de Molecular Divices.

Usando el programa de computador SoftMax (Molecular Devices), las velocidades de absorbencia fueron medidas y la actividad fraccionada de las proteasas incubadas con un inhibidor fueron determinadas dividiendo la velocidad promedio por la velocidad desinhibida de la proteasa. La actividad fraccionada fue representada gráficamente contra la concentración de FFR-CMK, y los puntos que eran > 90% o <10% de la actividad desinhibida fueron descartados. Una línea fue entonces dibujada a través de los puntos restantes para determinar la interceptación de X, que representa la concentración de la proteasa activa en la solución. Los valores de múltiples ensayos fueron medidos y promediado y la desviación estándar fue determinada.

B. Formato de ensayo de 384 pozos

Con el objetivo de aumentar la precisión y la producción de la valoración, el ensayo previo fue modificado por un formato basado de placas de 384 posos. La incubación fue realizada por siete horas en una concentración alta de proteasa (250 nanómetros) con una serie de concentraciones de FFR-CMK que atravesaban el intervalo a partir del 400 nanómetro a 53 nanómetros. La actividad residual fue medida añadiendo sustrato de FVIIa (Mesil-dFPR-ACUMULADOR) y midiendo el cambio en señal de fluorescencia en el tiempo.

Rápidamente, una placa de ensayo negra de 384 posos (Nunc) fue pre tratada como en el ejemplo 6. Luego, una solución de FVIIa/sTF fue preparada al mezclar 32.5 µl 1 µM FVIIa + 19.5 µl 5 µM sTF + 6.5 µl 5X tampón de AST

(100 milímetros Na Hepes, pH 7.5, 750 milímetros de NaCl, 25 milímetros de CaCl2, 0.5% BSA, 0.5% PEG 8000) y 6.5 µl dH20. Esta reacción fue incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. La mitad de una placa de 384 posos acomoda 5 proteasas medidas en triplicado, y una sola muestra de control del ensayo. Durante la incubación de FVIIa/sTF, los 20 milímetros de FFR-CMK fueron diluidos a 8 µM en 1 milímetro HCl, seguido por 9 series de diluciones de 1.25 dobleces a través de una placa de 96 posos. Los dos posos restantes de la fila fueron dejados con 1 milímetro HCl solamente. Esta fila luego fue diluida en 10 dobleces en 1X de tampón de AST y mezclado para generar una serie de concentraciones de FFR-CMK a partir del 800 nanómetro a 107 nanómetros. A cada fila de la placa de 384 posos, le fueron medidos 4 µl de la serie de la dilución de FFR-CMK con una pipeta. luego, 4 µl de la solución de FVIIa/sTF fueron mezclados con la serie del inhibidor a través de once columnas de la placa. La columna final fue llenada con 4 µl del tampón de 1X AST para que actuara como la pieza elemental de la placa. La placa fue centrifugada, sellada, e incubada a temperatura ambiente por siete horas con agitación. El ensayo fue iniciado con 72 µl de 110 µM de Mesyl-dFPR-ACC diluido en 1X de tampón de AST. El aumento en fluorescencia fue controlado en Ex: 380 nanómetro y Em: 460nm por 20 minutos con lecturas cada 45 segundos en 37ºC. Los datos fueron analizados de manera semejante como en el ejemplo 6, con los siguientes refinamientos. Primero, la actividad residual fue limitada a esas actividades entre el 20% y el 80% de las actividades solamente de la proteasa. En segundo lugar, la intercepción de Y del ajuste linear fue

precisada para caer entre 0.9 y 1.1. Tercero, la intercepción de X fue precisada a estar entre 125 nanómetro y 375 nanómetro. La intercepción de X para las tres réplicas de cada proteasa fue promediada y el valor y la desviación estándar informados.

Ejemplo 7

La determinación del IC50 para la inhibición de TFPI de FVIIa/TF

La potencia de la interacción entre TFPI y el complejo de FVIIa/TF fue evaluada midiendo el nivel de inhibición de diferentes concentraciones de TFPI en la actividad catalítica de FVIIa/TF hacia un sustrato, Espectracima VIIa. La concentración de TFPI que fue requerido para la inhibición del 50% (IC50) fue calculada para cada variante de FVII, y una norma de FVIIa.

Una placa de ensayo de media área color clara de 96 posos (Nunc) fue pre tratada añadiéndole 150 µl/ poso de 1 x tampón de placa (100 milímetros Tris pH 8.4, 100 milímetros de NaCl, 0.01% BSA, 0.01% Tween-20) a cada poso e incubando la placa en 37ºC por un mínimo de 1 hora. El tampón fue eliminado totalmente agitando y secando la placa y centrifugando la placa boca abajo para eliminar el tampón restante. La placa fue secada al aire para 1 hora, y almacenada a temperatura ambiente (TEMPERATURA AMBIENTE).

En un tubo de la microcentrífuga del 1.7 ml (tubo de microcentrífuga de baja adhesión de ISC Bioexpress), una mezcla de FVIIa/TF fue preparada en un volumen total de 450 µl mezclando 9 µl de 250 nanómetro de FVIIa (American Diagnostica, CB553-02 o una respectiva variante para ser ensayada) fue mezclado con 337.5 µl de 2 x TF (Innovin; Dade Behring; el

producto liofilizado resuspendido en 10 mL de agua destilada para generar 2X TF, del cual iguala aproximadamente 7 nanómetro de TF lipidado), 90 µl 5 x tampón de ensayo (500 milímetros Tris pH 8.4, 500 milímetros de NaCl, 25 milímetros de $CaCl_2$, 0.05% BSA) y 13.5 µl de agua, dando por resultado una solución que contiene 5 nanómetro FVIIa y 5.2 nanómetro TF. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir los componentes complejarse. A cada poso de 2 columnas en la placa de ensayo de media área de color claro pre tratada de 96 posos, 25 µl de la mezcla respectiva de FVIIa/sTF fueron añadidos y la placa fue cubierta para evitar la evaporación.

TFPI recombinante humano (R&D Systems) fue disuelto inicialmente en 33 µl de 50% glicerol (v/v) para hacer un material de 10 µM para almacenarse a -2OºC. El material de TFPI fue diluido adicionalmente a 1.5 µM en un final 1 x tampón directo (100 milímetros Tris pH 8.4, 100 milímetros de NaCl, 5 milímetros de $CaCl_2$, 0.01% BSA) en una placa de almacenamiento de polipropileno como sigue a continuación: para cada proteasa ensayada, 87.5 µl de una solución de 1.5 µM de TFPI fueron hechos mezclando 13.1 µl 10 µM TFPI con 17.5 µl 5 x tampón de ensayo y 56.9 µl de agua destilada. Las diluciones seriales de tres dobleces de la solución de TFPI fueron hechas en 1 x tampón de ensayo mezclando 27.5 µl TFPI en 55 µl 1x tampón de ensayo, tal que las soluciones que contenían 750 nanómetro, 250 nanómetro, 83.3 nanómetro, 27.8 nanómetro, 9.26 nanómetro, 3.1 nanómetro, y 1.03 nanómetro TFPI fueron generadas. El poso final de la serie contuvo solamente 1X tampón directo como control.

Veinticinco µl de cada dilución de TFPI fueron añadidos a 2 posos (es decir. dos veces) de 2 columnas de una placa de ensayo de media área color clara de 96 posos que contenía la mezcla de FVIIa/TF, tal que la mezcla de la proteasa era ensayada dos veces con cada dilución de TFPI. Una solución de 1 x tampón de ensayo de sin TFPI también fue añadida a 2 posos que contenían la mezcla de FVIIa/TF como control negativo. La placa fue agitada brevemente y luego centrifugada en 3000 rpm por 5 minutos antes de la incubación en 37ºC por 1.5 horas.

Una solución madre de Espectracima VIIa (American Diagnostica) fue preparada reconstituyendo 50 µmoles de 5 a 10 milímetros de agua destilada y almacenada a 4ºC hasta su uso. Inmediatamente antes de uso, la solución fue diluida a 600 µM en agua destilada. Siguiendo la incubación de la placa de ensayo de arriba, 10 µl del Espectracima VIIa diluido fue añadido a cada poso de la placa de ensayo. Las reacciones fueron mezcladas y la placa fue incubada a 37ºC. El aumento de la absorción a 405 nanómetro fue medido cada 30 segundos por una hora a 37Cº, y la tasa de absorción fue calculada usando el programa de computador SoftMax Pro (dispositivos moleculares).

Para determinar el grado de inhibición por TFPI, las tasas de absorción de la reacción de la proteasa que contenían TFPI, fueron divididas primero por la reacción de la tasa de absorbencia de las que no contenía TFPI (la muestra de control) para obtener la actividad de fraccionamiento, y el $\log_{10}$ de cada concentración de TFPI pudo ser determinado. Usando el programa de computador GraphPad Prism, el $\log_{10}$ [TFPI] fue trazado vs. La actividad de

fraccionamiento para cada proteasa, y la curva de respuesta a la dosis fue generada con un ajuste a la curva, asumiendo que la parte superior y la inferior de la actividad de los datos son fijos entre 1 y 0, respectivamente. El programa fue utilizado para determinar la inhibición de TFPI, tanto en los valores de IC_{50} (pIC_{50}), y del valor absoluto de IC_{50} (La inhibición del TFPI en el nanómetro) para cada proteasa, y su promedio y la derivación estándar fueron determinados.

El nivel de inhibición de TFPI en cada una de las variantes de FVIIa en complejo con el sTF fue determinado y expresado como IC_{50} o PIC_{50} (tabla 13). El grado al cual TFPI inhibió la actividad de no modificación del FVIIa (CB553-02) en complejo con el sTF también fue determinado, y se encontró el IC_{50} como 88 nanómetro. Nueve de las variantes de FVIIa que fueron generadas mostraron una disminución en su potencia de interacción con TFPI, según lo reflejado en los valores crecientes de IC50.

Tabla 13. Inhibición de las variantes de FVIIa por TFP

ID	**Mutación (Numeración de FVII maduro)**	**Mutación (Numeración de quimotripsina)**	**IC_{50} (nM)**	**pIC_{50}**
CB553-02	ninguno	ninguno	88	7.1
CB554	D196K	D60K	45	7.4
CB555	D196R	D60R	37	7.4
CB556	D196A	D60A	5	8.3
CB557	K197D	K60aD	220	6.7
CB558	K197E	K60aE	310	6.5
CB559	K197A	K60aA	53	7.3
CB560	K197L	K60aL	1100	5.9

CB561	K197Y	K60aY	110	7.0
CB562	K199D	K60cD	63	7.2
CB563	K199E	K60cE	33	7.5
CB564	K199A	K60cA	68	7.2
CB565	T239A	T99A	320	6.5
CB566	R290D	R147D	240	6.6
CB567	R290E	R147E	440	6.4
CB568	R290A	R147A	200	6.7
CB569	K341R	K192R	300	6.5
CB579	D196R/R290E	D60R/R147E	28	7.6
CB580	D196K/R290E	D60K/R147E	52	7.3
CB581	D196R/R290D	D60R/R147D	32	7.5
CB586	D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/ K60cE	13	7.9
CB587	D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/ K60cE	20	7.7
CB588	D196R/ K197E/ K199E/R290E	D60R/K60aE/ K60cE/R147E	28	7.6
CB589	D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/ K60cE	44	7.4
CB590	D196R/ K197M/ K199E/R290E	D60R/K60aM/ K60cE/R147E	66	7.2
CB591	L305V/S314E/ L337A/F374Y	L163V/S170bE/ K188A/F225Y	43	7.4
CB592	M298Q	M156Q	35	7.5
CB593	V158D/E296V/ M298Q	V21D/E154V/ M156Q	41	7.4
CB594	V158D/E296V/ M298Q/K337A	V21D/E154V/ M156Q/K188A	22	7.7

Ejemplo 8

Evaluación en vivo de la actividad coagulante de FVIIa de tipo salvaje

Para realizar el ensayo se tomo un ratón con hemofilia A, el cual fue establecido para evaluar la actividad coagulante de los polipéptidos de FVIIa. La hemofilia A fue inducida en ratones CD-I por medio de la administración de

los anticuerpos del anti-FVIII, seguida por la extracción quirúrgica de las puntas de sus colas para iniciar la hemorragia. Los ratones entonces fueron tratados con el polipéptido de FVIIa, y el tiempo necesario para que estos dejaran de sangrar y la cantidad de sangre perdida durante este tiempo, fue medida para determinar la actividad coagulante de los polipéptidos de FVIIa.

Los ratones machos CD-I fueron anestesiados vía intraperitoneal con sodio thiobarbital en 100 mg/kg, y con cetamina en 100 mg/kg. La lidocaína fue administrada por inyección subcutánea en el cuello ventral para reducir la sensibilidad. La tráquea y la arteria carótida fueron canuladas a través de una pequeña incisión en la piel del cuello para facilitar libremente la respiración y la administración de los anticuerpos del anti-factor VIII, con el factor humano recombinante VIIa (rhFVIIa) y/o de los polipéptidos modificados de FVII.

Los ratones fueron canulados con anticuerpos de oveja-anti-humano-FVIII en dosis de 3.76 mg (afinidad Biológica, lote IG129R4, 612 ratón BU/ml) en 40 µL. Esta dosis fue determinada conduciendo un experimento de la respuesta de la dosis inicial con el anticuerpo, usando 0.376, 0.94, 1.88 y 3.76 mg del contra-humano-FVIII, y de evaluar el tiempo de la pérdida de sangre y de la cantidad de la hemorragia. Después de 20 minutos, las colas de los ratones eran colocadas en los tubos de 15mL que contenían 39ºC de Solución salina taponada fosfato (PBS) por un período de 10 minutos. A los 30 minutos, las colas fueron extraídas rápidamente de la solución de PBS y los últimos 5 milímetros de las colas fueron cortados para iniciar la hemorragia. El tiempo en el cual la hemorragia comenzó fue señalado. Las colas fueron entonces

devueltas al tubo que contenía los 39ºC de PBS y se les permitió sangrar por 5 minutos (PRE-sangrado) para asegurar que los ratones hubieran respondido al contra del anticuerpo de FVIII. Después del PRE sangrado, a los ratones se les administro polipéptidos de FVIIa o el vehículo en los cuales las proteínas de FVIIa fueron preparadas y suministradas. Los polipéptidos de FVIIa fueron diluidos en PBS o en un Tampón compuesto de cloruro sódico de 52 milímetros, 10.2 milímetros de cloruro cálcico deshidratado, 9.84 milímetros de glicilglicina, 0.01% de polisorbato 80 y 165 milímetros de manitol. Las preparaciones de FVIIa fueron administradas en 1, 3 o 10 mg/kg, en un volumen equivalente a 3 mL/kg, vía la cánula en la carótida y las colas fueron colocadas en tubos nuevos que contenían 39ºC de PBS. La hemorragia fue monitoreada por un período de 20 minutos y los tiempos en los cuales la hemorragia se detenía eran anotados. El tiempo total de la hemorragia fue calculado como la suma de la duración de la hemorragia durante el PRE sangrado, y la duración del sangrado después de la administración de los polipéptidos de FVIIa, o PBS o el Tampón.

Para determinar la cantidad de sangre perdida durante los episodios de la hemorragia, se analizo el contenido de hemoglobina en los tubos de 15mL. El Triton X-100 fue diluido en proporción 1 en 4 en agua esterilizada y 100 µL fueron añadidos a 1mL de las muestras para causar hemólisis. La absorción de las muestras entonces fue medida en una longitud de onda de 546 nanómetros. Para calcular la cantidad de sangre perdida, la absorción fue leída vs. a una curva estándar generada midiendo la absorción en 546 nanometros de

volúmenes conocidos de sangre múrino, diluidos en PBS y emulsionada como se hizo en la parte superior con Triton X 100.

Un experimento fue llevado a cabo para comparaba el rhFVIIa (CB533) generado como se describe anteriormente con el FVIIa humano recombinante disponible en el comercio (NovoSeven®, Novo Nordisk) y la pérdida de sangre fue evaluada con la continua administración de una dosis de 3 mg/kg de cada proteína. La pérdida de sangre en el grupo del vehículo (Tampón, n = 15) fue 671.9 + - 57.89 µl en un período de 20 minutos. Esto fue reducida por el rhFVIIa producido por Catalyst Biosciences a 264.1 + - 56.59 µl y por NovoSeven (R) a 273.7 + - 53.93 µl (n = 14). Este experimento demostró equivalencia entre las dos proteínas.

Ejemplo 9

Análisis Farmacocinético de los polipéptidos de FVIIa

Las propiedades farmacocinéticas de los polipéptidos de FVIIa fueron evaluadas por la medición de la cantidad del factor humano VIIa en el plasma del ratón. Dos ensayos fueron usados para cuantificar el FVIIa en el plasma. Un ELISA fue utilizado para cuantificar la proteína total del FVIIa en el plasma y un ensayo de coagulación FVIIa-dependiente (FVII: C) fue empleado para cuantificar la actividad del coagulante de los polipéptidos de FVIIa en el plasma.

A. Administración de los polipéptidos de FVIIa a los ratones

Los polipéptidos de FVIIa modificados y la proteína sin modificar del recombinante FVIIa humano (rhFVIIa) (NovoSeven®, Novo Nordisk) fue

evaluada en estudios farmacocinéticos. Para cada estudio, 18 ratones machos CD-I fueron inyectados con una dosis bolo intravenosa (0.1-3.0 mg/kg, dependiendo del estudio) del rFVIIa. En 5, 15, 30, 60, 120, y 240 minutos después de la inyección, tres ratones de cada protocolo de inyección se les hizo la eutanasia por medio de asfixia con CO2 y aproximadamente 1.0 ml de sangre fueron vertidos en una jeringa de 1.0 ml por medio de una punción cardiaca percutánea. Cada jeringa fue cargada con suficiente citrato de sodio para lograr una concentración final de 3.2% en 1 mL de sangre. Las muestras de sangre fueron entonces centrifugadas en 9000 rpm por 8 minutos en 4ºC. El plasma fue trasladado a tubos de 1.5 ml para ser marcados individualmente (Eppendorf), congelados instantáneamente en nitrógeno líquido y almacenado en -80ºC. Además, un ratón por cada experimento fue inyectado con el vehículo solo (el ficticio) y el plasma de este ratón fue utilizado para el historial de la determinación de la actividad de FVIIa.

B. Ensayo ELISA

Un estuche disponible en el comercio, IMUBIND® del factor VII ELISA (American Diagnostica) fue utilizado para detectar la proteína de FVII en el suero de ELISA. Este estuche emplea una placa precubierta con un anticuerpo de anti-FVII/FVIIa para capturar la proteína, y un anticuerpo biotinilado de anti-FVII para la detección a través de una esteptavidina marcada como peroxidasa de rábano picante. El estuche era utilizado según la dirección de los fabricantes con las siguientes excepciones: primero, la curva estándar ha sido reducida para asegurar un rango lineal sobre el intervalo total de concentración y se

extiende a las concentraciones de 0.88 ng/ml a 10 ng/ml; en segundo lugar, la variante FVIIa purificada en sí misma fue utilizada para la curva patrón en vez de La FVII estándar proporcionadas con el estuche debido a las diferencias en la afinidad de los anticuerpo. Experimentos indicaron que el complejo de FVIIa con anti-trombina III (ATIII), un inhibidor potencial del plasma de FVIIa, se detecto al 75% del nivel de la proteasa libre, asegurando que el envase del ensayo detecta el total de FVIIa en la muestra de plasma tanto en forma activa como inactiva.

Brevemente, las muestras de plasma fueron descongeladas a temperatura ambiente y diluidas 10 dobleces en Tampón de muestra (PBS + 0.1% Triton X-100 + 1.0% BSA) luego diluidas en serie por 5.5 dobleces para cuatro diluciones. Las cuatro muestras diluidas fueron diluidas 2 dobleces sobre la placa de ELISA para las diluciones finales de la muestra de 20, 110, 605 y 3327.5 dobleces. Estas cuatro diluciones del plasma de ratón cubrieron un intervalo de concentraciones de la proteasa desde 33.000 ng/ml a 20 ng/ml. Cada muestra fue medida en dos placas independientes de ensayos, y esas mediciones dentro del intervalo de la curva patrón fueron utilizadas para calcular la concentración de la variante de FVIIa en la muestra de plasma.

C. Ensayo de coagulación

Un estuche disponible en el comercio (STACLOT FVIIa-rTF, Diagnostica Stago, Parsippany, NJ) fue utilizado como el ensayo de coagulación. Para determinar la actividad coagulante de los polipéptidos activos de FVIIa, las muestras de plasma fueron ensayadas con un ensayo de coagulación de FVIIa-

dependiente (FVII: C). El ensayo fue realizado usando las reaccionantes y las instrucciones proporcionadas en un estuche comercial y el tiempo de coagulación fue medido usando un instrumento electromecánico para la detección del coágulo (STArt4, Diagnostica Stago, Parsippany, NJ). El estuche fue utilizado según la dirección de los fabricantes con las siguientes excepciones: primero, la variante purificada de FVIIa en sí misma fue utilizada para la curva patrón en vez que la estándar de rhFVIIa proporcionadas con el estuche; en segundo lugar, el volumen de los reaccionantes comerciales resultantes fueron utilizados para estudios rutinarios de proyección de farmacocinéticos y dieron resultados comparables a las reaccionantes del estuche: factor de tejido soluble (CalBioChem, La Jolla, Ca) y una mezcla sintética del fosfolípido (lípidos polares de Avanti, alabastro, ALUMINIO), Tampón de TBSA (Tris-NaCl, pH 7.5 con el 1% BSA; DiaPharma, West Chester, Ohio), y solución de cloruro cálcico de 25 µM (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ).

El ensayo de coagulación fue realizada de la siguiente manera. Las muestras de plasma congeladas fueron descongeladas a temperatura ambiente por aproximadamente 45 minutos y luego diluidas en 1:5000 en Tampón. Cincuenta µL del plasma diluido se combino con 50 µL plasma humano Factor Vll- deficiente y 50 µL de factor tisular re-lipidados y preincubados por 180 segundos. La siguientes preincubación, 50 µL de solución de cloruro cálcico (25 µM) fue añadida para iniciar coagulación. El tiempo de coagulación fue determinado usando un detector electromecánico de coágulos. Cada muestra

de plasma fue ensayada dos veces. El sistema fue calibrado construyendo una curva estándar usando el tiempo de coagulación de varias diluciones contenidas en el Tampón que tenían una cantidad conocida de la variante específica del FVIIa ensayado. Las concentraciones de FVIIa en las muestras de plasma de ratón fueron calculadas de la porción lineal del registro FVIIa contra la curva estándar de los registros de tiempo de coagulación. La capacidad de las muestras de plasma para inducir la coagulación en el factor Vll- plasma deficiente fue informada como ng FVIIa/Ml del plasma de ratón seguido por el historial de la sustracción de tipo endógeno silvestre FVIIa en plasma de ratones ficticios tratados.

La vida media de cada proteína de FVII fue determinado rutinariamente haciendo un ajuste convencional del registro natural de su actividad a una línea recta, y midiendo el tiempo empleado en la actividad de ser reducidas a la mitad las proteínas de FVIIa. Para las proteínas de FVII con multi-disminución del exponencial, La vida media fue determinado de la porción final del registro del plasma VS el tiempo del perfil. Los parámetros farmacocinéticos adicionales fueron calculados usando el programa de computador disponible en el comercio (WinNonLin v5.1, Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

D. Propiedades farmacocinéticas de CB728, CB735 y CB945

Usando el protocolo anterior, las propiedades farmacocinéticas de tipo salvaje FVIIa y dos variantes de FVIIa: CB728, CB735 y CB945 fueron evaluados. Los resultados se establecen en la tabla 14. CB735 y CB945

mostraron avances en los parámetros farmacocinéticos comparados con el tipo salvaje FVIIa.

Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos del ratón de las variantes de FVIIa

CB#	Mutación (Numeración de FVII maduro)	IV Dosis (mg/kg)	AUC $_{0\text{-INF}}$ Plasma (µg.min/mL)/Dosis	Vida media (min)	Cl (mL/min/kg)	Vd (mL/kg)	N
CB553	WT	0.1	606	35.1	2.02	98.8	5
CB553	WT	1.0	798	50.2	1.55	118	2
CB728	Gla Intercambio FIX	0.1	207	19.9	4.85	140	2
CB735	K341D	0.1	2817	106	0.14	22.0	1
CB945	M156Q/K192D	0.1	2430	78.1	0.41	46.3	1

E. Propiedades farmacocinéticas de CB558

La vida media de un polipéptido modificado de FVIIa que mostró creciente resistencia a TFPI (CB-558; con una mutación de K197E) fue medido y comparado con el de una proteína humana recombinante sin modificar de FVIIa (rhFVIIa) (NovoSeven®, Novo Nordisk) en un estudio farmacocinético similar a este descrito anteriormente, con algunas modificaciones. Quince ratones machos CD-I fueron inyectados con una dosis bolo intravenosa 0.5mg/kg de CB-558, y 15 ratones fueron inyectados con una dosis intravenosa del bolo 0.5mg/kg del rhFVIIa. En 5, 15, 30, 60, 120, y 240 minutos después de la inyección, tres ratones de cada protocolo de inyección se les hizo la eutanasia por medio de asfixia con CO2 y aproximadamente 1.0 ml de sangre fueron vertidos en una jeringa de 1.0 ml por medio de una punción cardiaca

percutánea. Cada jeringa fue cargada con suficiente citrato de sodio para lograr una concentración final de 3.2% en 1 mL de sangre. Las muestras de sangre fueron entonces centrifugadas en 9000 rpm por 8 minutos en 4ºC. El plasma fue trasladado a tubos de 1.5 ml para ser marcados individualmente (Eppendorf), congelados instantáneamente en nitrógeno líquido y almacenado en -80ºC.

Para determinar la actividad coagulante y la vida media de los polipéptidos activos de FVIIa, las muestras de plasma fueron evaluadas en Machaon Diagnostics, Inc. (Oakland, CA) usando un ensayo de coagulación FVIIa-dependiente (FVII: C) y un instrumento automatizado hemostasis (AMAX 190plus, Trinidad Biotech). Brevemente, las muestras de plasma congeladas fueron descongeladas en baños de agua de 37ºC por 5 minutos y luego diluidas 1:40 en el Tampón de Veronal. Seis µl del plasma diluido fueron añadidos a 54 µl Tampón de Veronal en una cubeta y mezclados con una perla de metal. Una cantidad igual (60 µl) de factor de plasma humano Vll-deficiente (Precision Biologic) fue añadida a la cubeta después, que fue incubada a 37ºC por 60 segundos mezclando constante.

Para iniciar la temporización de la reacción, fue añadido a la cubeta 120 µL de tromboplastina (proviene del cerebro del conejo, Tromboplastina-DS; Hemostasis pacífico) y sin parar de mezclar constantemente en todo el proceso. La reacción de coagulación fue controlada foto-óptimamente en 405nm para detectar la formación de fibrina. El sistema fue calibrado analizando el tiempo de coagulación de varias diluciones del plasma en

referencia con los niveles publicados de FVII (Precision Biologic), y después analizando el tiempo de coagulación del plasma con control normal (Precision Biologic) y del plasma con control anormal (Precision Biologic).

La capacidad de las muestras de plasma para inducir la coagulación del factor de plasma Vll-deficiente fue informada como un porcentaje del tiempo de coagulación observado en el plasma humano normal. La actividad coagulante del plasma en ambos casos, FVIIa (NovoSeven®)-tratada y de ratones CB-558-tratada disminuyo con el tiempo. La vida media de cada proteína de FVII fue determinado rutinariamente haciendo un ajuste convencional del registro natural de su actividad a una línea recta, y midiendo el tiempo empleado en la actividad de ser reducidas a la mitad las proteínas de FVIIa. La vida media de CB-558 se observo ser fue aproximadamente dos veces el de FVIIa (NovoSeven®); 156 minutos compararon con 67 minutos.

Ejemplo 10

Generación de variantes adicionales de FVII

Una serie de mutaciones adicionales de FVII fueron generadas para alterar una o más propiedades y/o actividades de FVII. Además de modificaciones para incrementar la resistencia al TFPI, las modificaciones fueron diseñadas para aumentar la resistencia a AT-III, para incrementar la actividad catalítica, extender las vidas medias, y/o acrecentar la afinidad y/o unión a los fosfolípidos, tales como ésos en plaquetas activadas. Las modificaciones incluyen el reemplazo de aminoácidos, la inserción y la supresión. Las variantes de FVII que contienen dos o más modificaciones

también fueron generadas. La tabla 23 establece las variantes de FVII que fueron generadas y expresadas en las células 293-F Freestyle™. Los reemplazos del aminoácido fueron incorporados en los polipéptidos de FVII usando los métodos descritos en el ejemplo 2.B, en la parte superior de este documento, con un oligonucleótido apropiado.

La tabla 15 de la parte inferior establece las variantes adicionales de FVII que fueron generadas. Las variantes GIa intercambio FVII fueron generadas con los residuos de aminoácidos A1 a Y44 (por la enumeración madura de FVII) en los N-extremos de la proteína del tipo salvaje FVII fue sustituida con los residuos de aminoácidos correspondientes a GIa domain of FIX, FX, la proteína C, la proteína S o trombina. La variante "GIa Intercambio FIX" FVII (es decir. un polipéptido de FVII en el cual el endógeno GIa domain se ha sustituido con el GIa domain de FIX) contiene los residuos de aminoácidos A2 a Y45 con SEQ ID NO: de 110 a los N-términos; la variante de "GIa Intercambio FX" FVII contiene residuos de aminoácidos A1 a Y44 con SEQ ID NO: 111 a los N-términos; la variante "GIa Intercambio de proteína C" FVII contiene residuos de aminoácidos A1 a H44 con SEQ ID NO: 113 a los N-términos, la variante de "GIa Intercambio de proteína S" FVII contiene residuos de aminoácidos A1 a Y44 con SEQ ID NO: 114 a los N-términos y la variante de "GIa Intercambio de trombina" FVII contiene residuos de aminoácidos A1 a Y44 con SEQ ID NO: 115 a los N-términos.

Tabla 15. Variantes ejemplares del factor VII

ID	Variante (Numeración de FVII	Variante (Numeración de	Variante de polipéptidos

	maduro)	**Quimiotripcina)**	**Numeración de ID Secuencial**
CB697	R290N	R147N	206
CB698	R290Q	R147Q	207
CB699	R290K	R147K	208
CB700	R290M	R147M	209
CB701	R290V	R147V	210
CB733	K341N	K192N	211
CB734	K341M	K192M	212
CB735	K341D	K192D	213
CB853	G237T238insA	G97T98insA	214
CB854	G237T238insS	G97T98insS	215
CB855	G237T238insV	G97T98insV	216
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS	217
CB857	G237T238insSA	G97T98insSA	218
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK	219
CB859	D196K197insR	D60K60ainsR	220
CB860	D196K197insY	D60K60ainsY	221
CB861	D196K197insW	D60K60ainsW	222
CB862	D196K197insA	D60K60ainsA	223
CB863	D196K197insM	D60K60ainsM	224
CB864	K197I198insE	K60aI60binsE	225
CB865	K197I198insY	K60aI60binsY	226
CB866	K197I198insA	K60aI60binsA	227
CB867	K197I198insS	K60aI60binsS	228
CB637	K197E/K341Q	K60aE/K192Q	229
CB638	K197L/K341Q	K60aL/K192Q	230
CB670	G237V/K341Q	G97V/K192Q	231
CB688	K197E/K199E	K60aE/K60cE	232
CB689	K197E/G237V	K60aE/G97V	233
CB691	K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	250
CB694	K199E/K341Q	K60cE/K192Q	234
CB671	K197E/G237V/K341Q	K60aE/G97V/K192Q	235
CB669	V158D/G237V/E296V/ M298Q	V21D/G97V/E154V/M 156Q	241
CB591	L305V/S314E/ L337A/F374Y	L163V/S170bE/K188A /F225Y	147
CB592	M298Q	M156Q	148
CB593	V158D/E296V/ M298Q	V21D/E154V/M156Q	149
CB594	V158D/E296V/ M298Q/K337A	V21D/E154V/M156Q/ K188A	150
CB690	K197E/G237V/M298Q	K60aE/G97V/M156Q	242
CB692	K197E/G237V/M298Q/ K341Q	K60aE/G97V/M156Q/ K192Q	243

CB693	K197E/K199E/G237V/ M298Q/K341Q	K60aE/K60cE/G97V/ M156Q/K192Q	244
CB695	G237V/M298Q	G97V/M156Q	245
CB696	G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	246
CB902	K197E/M298Q	K60aE/M156Q	248
CB945	M298Q/K341D	M156Q/K192D	249
CB728	Gla intercambio FIX	Gla intercambio FIX	236
CB729	Gla intercambio FX	Gla intercambio FX	237
CB730	Gla Intercambio Prot C	Gla Intercambio Prot C	238
CB731	Gla Intercambio Prot S	Gla Intercambio Prot S	239
CB732	Gla intercambio Thrombin	Gla intercambio Thrombin	240
CB850	M298Q/Gla Intercambio FIX	M156Q/Gla Intercambio FIX	247

Ejemplo 11

Análisis de la actividad catalítica de las variantes de FVIIa para el sustrato, Factor X

La actividad catalítica de las variantes de FVIIa para el sustrato, Factor X (FX), fue evaluada indirectamente en dos tipos de ensayos cromogénicos por medio de pruebas de la actividad de FXa, generada sobre la activación por FVIIa, en el sustrato sintético Spectrafluor FXa. Los dos ensayos fueron realizados tanto en la presencia o en la ausencia de factor de tejido lipidado, para evaluar la actividad tanto de TF-dependiente como de TF-independiente. Las variantes de FVII fueron expresadas, purificadas y activadas a FVIIa como se describe anteriormente en los ejemplos 2 y 3. Aunque casi todas las variantes FVIl fueron expresadas solamente en las células 293-F FreestyleTM, algunas también fueron expresadas en las células BHK-21.

Ensayo indirecto del factor de tejido lipidado

La actividad catalítica de las variantes de FVIIa en presencia del factor de tejido fue evaluado usando el ensayo descrito en el ejemplo 5, arriba, con menores modificaciones. Una de estas modificaciones fue el uso de una proteasa de sustrato del factor X que había sido tratada con ERG-CMK y FFR-CMK para reducir la actividad del antecedente (Moleculares Onnovations). Dos tipos de análisis de datos fueron realizados usando dos ensayos independientes; un ensayo de análisis lineal de intervalos y un ensayo hiperbólico de análisis de intervalos. El ensayo de análisis lineal de intervalo utilizo un rango de concentraciones del factor X entre 0 y 150 nanómetro para asegurar una medición exacta de la constante cinética en el intervalo lineal de la curva de la dosis. En cambio, el ensayo hiperbólico del análisis de intervalo utilizo un rango de las concentraciones del factor X entre 0 y 1.44 µM para asegurar una medición exacta de la constante cinética con una curva (hiperbólica) de la dosis saturada.

El ensayo indirecto del factor de tejido lipidado con los datos del análisis del intervalo lineal fue realizado esencialmente como se describió en el ejemplo 5, arriba, con las siguientes modificaciones. Las soluciones de la variante FVIIa/ TF fueron preparadas como unas soluciones de 0.1 nanómetro FVIIa/ 0.4 nanómetro TF y incubadas por 30 minutos antes de ser diluidas doblemente en 0.4 nanómetros TF hacia una solución que contenga 1.5625 pM FVIIa/0.4 nanómetro TF. Veinticinco µL de la solución de FVIIa/TF fueron mezclados con 25 µL de una solución de sustrato que contenía 1.0 milímetros de Spectrofluor FXa (American Diagnostica) y uno de 300 nanómetros, 200 milímetros, 133.3

nanómetro, 88.9 nanómetro, 59.3, 39.5 nanómetros, 36.3 nanómetros o 0 nanómetros del factor X (Molecular Innovations). Así, las concentraciones finales para el ensayo eran 0.8 pM de FVIIa, 0.2 nanómetros de TF, 0.5 milímetros de Spectrofluor FXa y 150 nanómetros, 100 milímetros, 66.7 nanómetros, 44.4 nanómetros, 29.6 nanómetros, 19.8 nanómetros, 13.2 nanómetros o 0 nanómetros del factor X (Molecular Innovations) en 50µL/poso. La curva patrón de AMC, que sirvió como el factor de conversión para RFU µM en cálculos subsiguientes, fue expandida para incluir un intervalo de dosis que cubriera desde 0 µM al 100 µM AMC.

El ensayo indirecto del factor de tejido lipidado con los datos del análisis del intervalo hiperbólico fue realizado esencialmente como descrito en el ejemplo 5, arriba, con las siguientes modificaciones. Las soluciones de la variante FVIIa/ TF fueron preparadas como unas soluciones de 0.1 nanómetro FVIIa/ 0.4 nanómetro TF y incubadas por 30 minutos antes de ser diluidas doblemente en 0.4 nanómetros TF hacia una solución que contenga 1.5625 pM (o 0.78 pM debido a expectativas de proteasas con alta actividad) FVIIa/0.4 nanómetro TF. Veinticinco µL de la solución de FVIIa/TF fueron mezclados con 25 µL de una solución de sustrato que contenía 1.0 milímetros de Spectrofluor FXa (American Diagnostica) y uno de 1440 nanómetros, 720 milímetros, 360 nanómetros, 180 nanómetros, 90 nanómetros, 45 nanómetros, 22.5 nanómetros o 0 nanómetros del factor X (Molecular Innovations). Así, las concentraciones finales para el ensayo fueron 0.8 (o 0.39) pM FVIIa, 0.2 nanómetros TF, 0.5 milímetros Spectrofluor FXa y 7 nanómetros, 720

milímetros, 360 nanómetros, 180 nanómetros, 90 nanómetros, 45 nanómetros, 22.5 nanómetros, 11.25 nanómetros o 0 nanómetros del factor X (Molecular Innovations) en 50 µL/poso. Los parámetros k_{cat} y el K_m son calculado usando la ecuación hiperbólica de Michaelis Menton de la forma (V_{max}/(1+ (K_m/ x))). La curva patrón de AMC, que sirvió como el factor de conversión para RFU µM en cálculos subsiguientes, fue expandida para incluir un intervalo de dosis que cubriera desde 0 µM a 100 µM AMC.

Para determinar los constantes de velocidad cinética para la activación de la variante de FVIIa o de FVIIa de FX, los datos primos recogidos con la aplicación del programa para computadores de SoftMax (Molecular devices) fue exportada como archivos .XML. Complementarios análisis de datos lineales y no lineales fueron realizados con XLfit4, un paquete del programa de computadores para automatizar el ajuste de las curvas y los análisis estadísticos dentro del entorno de las hojas de cálculo de Microsoft (programa de computador IDBS).

Para los datos recogidos usando el ensayo de intervalo lineal, las constantes cinética k_{cat} /K_m (M^{-1} sec^{-1}) son calculados directamente de la pendiente del análisis de regresión lineal de la concentración de FX FRENTE la velocidad de la escisión fluoro génica del sustrato (en µM/ sec^2) donde k_{cat} /K_m = pendiente/ [FVIIa] x 0.5x k_2. El factor de corrección k_2 fue determinado para ser 45 usando el procedimiento descrito en el ejemplo 5 y la constante cinética para la escisión de FXa de Spectrofluor FXa del $k_{cat,FXa}$ = 56 sec-1 y $K_{m,FXa}$ = 126 nanómetro, determinados experimentalmente con FX activado (FXa) que

era previamente un sitio activo calibrado con AT-III/ heparin. Excluyendo datos puntuales que resultaron en los valores menores a 0.98 de R^2 asegurado la linealidad de los conjuntos de datos utilizados en la rutina del ajuste.

El análisis de los datos recogidos usando el ensayo hiperbólico de intervalos fueron calculados de un análisis de regresión no lineal de la concentración de FX frente la velocidad de la escisión fluoro génica del sustrato (en µM/ sec^2). Los parámetros individuales del k_{cat} y el K_m son calculados como parámetros de ajuste usando la ecuación hiperbólica de Michaelis Menton de la forma (V_{max}/ (1 + (K_m/ x))) donde $k_{cat} = V_{max}$ / [FVIIa] x 0.5 x k_2. La constante cinética, kcat / Km fue calculada de los parámetros enposodos individualmente de kcat y de Km.

Ensayo indirecto del factor-independiente del tejido

La actividad catalítica de las variantes de FVIIa en presencia del factor de tejido fue evaluada en un ensayo indirecto similar a el descrito anteriormente, salvo que el factor de tejido no fue incluido en el ensayo anterior. Así, el ensayo para evaluar la actividad TF-independiente fue realizado esencialmente como se describe anteriormente, con las siguientes modificaciones. Las soluciones de la variante de FVIIa fueron diluidas a 50 nanómetros. Veinticinco µL de cada solución de FVIIa fueron mezclados con 25 µL de una solución de sustrato que contuvo 1.0 milímetros Spectrofluor FXa (American Diagnostica) y uno de 1050 nanómetros, 700 milímetros, 466.7 nanómetros, 311.1 nanómetros, 207.4 nanómetros, 138.3 nanómetros, 92.2 nanómetros o 0 nanómetros del factor X (Molecular Innovations). Así, las

concentraciones finales para el ensayo eran 25 nanómetro FVIIa, 0.5 milímetros Spectrofluor FXa y 525 milímetros, 350 nanómetros, 233.3 nanómetros, 155.6 nanómetros, 103.7 nanómetros, 69.1 nanómetros, 46.1 nanómetros o 0 nanómetros del factor X (Molecular Innovations) en 50 µL/ poso. Los análisis de los datos fueron realizados como se describió para el ensayo del intervalo lineal, en la parte superior y sin modificaciones.

Las Tablas 16-18 proporcionan los resultados de los ensayos que fueron realizados para medir la actividad catalítica de las variantes de FVIIa. La tabla 15 y 16 proporciona la actividad catalítica como fue medida en un ensayo indirecto TF-dependiente usando los polipéptidos de FVIIa expresados como las células 293-F y de las células BHK-21, respectivamente, y la Tabla 17 proporciona la actividad catalítica como fue medida en un ensayo indirecto TF-independiente usando los polipéptidos de FVIIa expresados desde las células 293-F y/o las células BHK-21. Los resultados son presentados como la constante cinética para la actividad catalítica, k_{cat} / K_m (M^{-1} seg^{-1}), y también expresado como porcentaje de la actividad del salvaje-tipo FVIIa, en donde la actividad es actividad catalítica, k_{cat} / K_m (M^{-1} seg^{-1}) de cada variante de FVIIa para su sustrato, FX. El uso del análisis de datos de intervalos lineal o hiperbólico también es indicado para los valores presentados en las tablas. No todas las variantes de FVIIa fueron ensayadas en cada ensayo. Algunas de las variantes de FVII ensayadas en el ejemplo 5, en la parte anterior, muestra levemente reducción o aumento de la actividad catalítica para FX en este conjunto de ensayos comparado con el ensayo descrito en el ejemplo 5. La

diferencia en las actividades de estos, vista en el Ejemplo 5 pueden ser debido a los antecedentes de actividades variadas de los residuos de FXa en el sustrato de FX obtenido de American Diagnostica. Las distintas variantes de FVIIa mostraron una actividad catalítica creciente comparada con la molécula de FVIIa de tipo salvaje. Por ejemplo, CB760, que contiene la mutación de Q366V, tiene una actividad catalítica entre de 1.5 y 5 veces que la de FVIIa de tipo salvaje.

Tabla 16. Actividad catalítica de las variantes de FVIIa: Ensayo indirecto de TF-Dependiente con los polipéptidos de FVIIa de las células 293-F

ID	Mutación (Numeración de FVII maduro)	Mutación (Numeración Quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% WT)	Formato de ensayo
CB553	WT	WT	3.42×10^7	100	Lineal
CB554	D196K	D60K	1.10×10^7	23	hiperbólica
CB555	D196R	D60R	2.25×10^7	46	hiperbólica
CB556	D196A	D60A	2.58×10^7	53	hiperbólica
CB557	K197D	K60aD	3.05×10^7	63	hiperbólica
CB558	K197E	K60aE	1.54×10^7	32	hiperbólica
CB559	K197A	K60aA	3.67×10^7	75	hiperbólica
CB560	K197L	K60aL	1.51×10^7	31	hiperbólica
CB561	K197Y	K60aY	5.16×10^7	106	hiperbólica
CB562	K199D	K60cD	4.62×10^7	95	hiperbólica
CB563	K199E	K60cE	3.63×10^7	74	hiperbólica
CB564	K199A	K60cA	5.56×10^7	114	hiperbólica
CB565	T239A	T99A	1.66×10^7	34	hiperbólica
CB566	R290D	R147D	5.80×10^6	12	hiperbólica
CB567	R290E	R147E	6.18×10^6	13	hiperbólica
CB568	R290A	R147A	8.25×10^6	17	hiperbólica
CB569	K341R	K192R	3.95×10^7	81	hiperbólica
CB579	D196R/R290E	D60R/R147E	2.31×10^6	5	hiperbólica
CB580	D196K/R290E	D60K/R147E	7.81×10^4	0	hiperbólica
CB581	D196R/R290D	D60R/R147D	2.91×10^6	6	hiperbólica
CB586	D196R/ K197E/ K199E	K60cE/K60aE/D60R	7.97×10^6	16	hiperbólica

CB587	D196K/ K197E/ K199E	K60cE/K60aE/D60K	7.22×10^{6}	15	hiperbólica
CB588	D196R/ K197E/ K199E/R290E	K60cE/K60aE/D60R/R147E	3.66×10^{5}	1	hiperbólica
CB589	D196R/ K197M/ K199E	K60cE/K60aM/D60R	1.81×10^{7}	37	hiperbólica
CB590	D196R/ K197M/ K199E/R290E	K60cE/K60aM/D60R/R147E	2.88×10^{5}	1	hiperbólica
CB591	L305V/S314E/L337A/F374Y	L163V/S170bE/K188A/F225Y	6.73×10^{7}	138	hiperbólica
CB592	M298Q	M156Q	1.40×10^{8}	409	Lineal
CB593	V158D/E296V/ M298Q	V21D/E154V/ M156Q	1.67×10^{8}	487	Lineal
CB594	V158D/E296V/ M298Q/K337A	V21D/E154V/ M156Q/K188A	5.18×10^{8}	1061	hiperbólica
CB595	K197I	K60aI	5.31×10^{7}	109	hiperbólica
CB596	K197V	K60aV	5.15×10^{7}	106	hiperbólica
CB597	K197F	K60aF	7.20×10^{7}	148	hiperbólica
CB598	K197W	K60aW	6.25×10^{7}	128	hiperbólica
CB599	K197M	K60aM	7.83×10^{7}	160	hiperbólica
CB600	D196F	D60F	2.35×10^{7}	48	hiperbólica
CB601	D196Y	D60Y	6.93×10^{7}	142	hiperbólica
CB602	D196W	D60W	3.40×10^{7}	70	hiperbólica
CB603	D196L	D60L	8.57×10^{7}	176	hiperbólica
CB604	D196I	D60I	7.99×10^{7}	164	hiperbólica
CB605	G237W	G97W	8.63×10^{7}	177	hiperbólica
CB606	G237T	G97T	3.13×10^{7}	64	hiperbólica
CB608	G237V	G97V	8.91×10^{7}	183	hiperbólica
CB609	K341Q	K192Q	1.56×10^{7}	32	hiperbólica
CB611	K197L/D196L	K60aL/D60L	4.39×10^{7}	90	hiperbólica
CB612	K197L/D196F	K60aL/D60F	3.79×10^{6}	8	hiperbólica
CB613	K197L/D196M	K60aL/D60M	1.86×10^{7}	38	hiperbólica
CB614	K197L/D196W	K60aL/D60W	9.81×10^{6}	20	hiperbólica
CB615	K197E/D196F	K60aE/D60F	1.87×10^{7}	38	hiperbólica
CB616	K197E/D196W	K60aE/D60W	3.50×10^{7}	72	hiperbólica
CB617	K197E/D196V	K60aE/D60V	6.50×10^{6}	13	hiperbólica
CB637	K197E/K341Q	K60aE/K192Q	7.22×10^{6}	15	hiperbólica
CB638	K197L/K341Q	K60aL/K192Q	6.66×10^{6}	14	hiperbólica
CB669	V158D/G237V/	V21D/E154V/	6.70×10^{7}	196	Lineal

	E296V/M298Q	M156Q/G97V			
CB670	G237V/K341Q	K192Q/G97V	1.57×10^7	32	hiperbólica
CB671	K197V/G237V/K341Q	K60aE/K192Q/G97V	7.05×10^6	21	Lineal
CB688	K197E/K199E	K60aE/K60cE	9.85×10^6	20	hiperbólica
CB689	K197E/G237V	K60aE/G97V	1.32×10^7	27	hiperbólica
CB690	K197E/G237V/M298Q	K60aE/G97V/M156Q	3.19×10^7	93	Lineal
CB691	K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	3.89×10^6	8	hiperbólica
CB692	K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	6.42×10^6	13	hiperbólica
CB693	K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/K60cE/G97V/M156Q/K192Q	3.49×10^6	7	hiperbólica
CB694	K199E/K341Q	K60cE/K192Q	7.64×10^6	16	hiperbólica
CB695	G237V/M298Q	G97V/M156Q	4.30×10^7	125	Lineal
CB696	G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	4.25×10^7	124	Lineal
CB697	R290N	R147N	1.36×10^7	28	hiperbólica
CB698	R290Q	R147Q	8.59×10^6	18	hiperbólica
CB699	R290K	R147K	1.52×10^7	31	hiperbólica
CB700	R290M	R147M	1.23×10^7	25	hiperbólica
CB701	R290V	R147V	2.66×10^6	5	hiperbólica
CB728	Gla intercambio FIX	Gla intercambio FIX	3.83×10^7	112	Lineal
CB729	Gla intercambio FX	Gla intercambio FX	9.46×10^6	19	hiperbólica
CB730	Gla Intercambio Protein C	Gla Intercambio Prot C	3.19×10^6	7	hiperbólica
CB732	Gla intercambio Thrombin	Gla intercambio Thrombin	1.04×10^7	21	hiperbólica
CB850	M298Q/Gla Intercambio FIX	M156Q/Gla intercambio FIX	7.51×10^7	219	Lineal
CB733	K341N	K192N	2.35×10^7	69	Lineal

CB734	K341M	K192M	8.35×10^6	17	hiperbólica
CB735	K341D	K192D	1.44×10^7	42	Lineal
CB854	G237T238insS	G97T98insS	1.32×10^7	38	Lineal
CB855	G237T238insV	G97T98insV	1.23×10^7	36	Lineal
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS	1.12×10^7	33	Lineal
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK	3.03×10^7	88	Lineal
CB859	D196K197insR	D60K60ainsR	4.81×10^7	140	Lineal
CB860	D196K197insY	D60K60ainsY	3.93×10^7	115	Lineal
CB866	K197I198insA	K60aI60binsA	4.11×10^7	120	Lineal
CB902	K197E/M298Q	K60aE/M156Q	9.68×10^7	283	Lineal

Tabla 17. Actividad catalítica de las variantes de FVIIa: Ensayo indirecto TF-Dependiente con los polipéptidos de FVIIa de las células BHK-21

ID	Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% WT)	Formato de Ensayo
CB553	WT	WT	5.42×10^7	100	Lineal
CB592	M298Q	M156Q	9.34×10^7	172	Lineal
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	2.04×10^8	376	Lineal
CB728	Gla swap FIX	Gla swap FIX	8.70×10^7	160	Lineal
CB735	K341D	K192D	1.02×10^7	19	Lineal
CB853	G237T238insA	G97T98insA	1.60×10^7	30	Lineal
CB854	G237T238insS	G97T98insS	1.67×10^7	31	Lineal
CB855	G237T238insV	G97T98insV	1.66×10^7	31	Lineal
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS	1.68×10^7	31	Lineal
CB857	G237T238insSA	G97T98insSA	1.83×10^7	34	Lineal
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK	3.55×10^7	65	Lineal

CB859	D196K197insR	D60K60ainsR	7.24×10^7	133	Lineal
CB862	D196K197insA	D60K60ainsA	4.31×10^7	79	Lineal
CB863	D196K197insM	D60K60ainsM	3.61×10^7	67	Lineal
CB864	K197I198insE	K60aI60binsE	2.80×10^7	52	Lineal
CB865	K197I198insY	K60aI60binsY	4.27×10^7	79	Lineal
CB867	K197I198insS	K60aI60binsS	6.35×10^7	117	lineal
CB945	M298Q/K341D	M156Q/K192D	1.04×10^7	19	

Tabla 18. Actividad catalítica de las variantes de FVIIa: Ensayo indirecto TF-Independiente

ID	Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Células 293-F		Células BHK-21	
			k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% WT)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (% WT)
CB553	WT	WT	22.60	100	1.58	100
CB592	M298Q	M156Q	485.5	2029	310.25	1969
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	5493.68	24313	3217.77	20423
CB669	V158D/G237V/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q/G97V	2145.3	9494		
CB692	K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	1	4		
CB695	G237V/M298Q	G97V/M156Q	24.35	108		
CB728	Gla swap FIX	Gla swap FIX	110	486	24	154
CB850	M298Q/Gla Swap FIX	M156Q/Gla swap FIX	15.4	68		
CB902	K197E/M298Q	K60aE/M156Q	8.55	38		

Ejemplo 12

Determinación de la inhibición de FVIIa/TF o de FVIIa por AT-III/heparina

La potencia de la interacción entre el complejo de AT-III/heparina y FVIIa en la presencia o la ausencia del factor de tejido soluble (sTF), es decir. TF-dependiente o TF- independiente, fue evaluado midiendo el nivel de inhibición

de diferentes concentraciones de AT-III en la actividad catalítica de FVIIa/sTF hacia un sustrato, Mesil-FPR-ACC. El valor $K_{0.5}$ fue determinado para cada variante de FVIIa probada, que corresponde a la concentración molar de AT-III que fue requerido para la inhibición del 50% (IC_{50}) de la variante de FVIIa en un ensayo de 30 minutos a temperatura ambiente (~25°).

Dos ensayos fueron preparados por separado, uno con TF y uno sin TF. Una solución de 2µM de AT-III/heparina (5 mM finales de heparina) fue preparada mezclando 26.4 µL de 151.7 µM AT-III (el plasma purificó AT-III humano; Innovaciones moleculares) con 50 µL de 0.2 mM de heparina de LMW (CalBiochem), 400 µL de 5^x tapón de ensayo (100 mM de Hepes, 750 mM de NaCl, 25 mM de $CaCl^2$, 0.05% BSA, 0.5% PEG 8000, pH 7.4) y 1.523 mL del agua de calidad reactiva. Esta solución estaba para ser usada en su más alta concentración alta en el ensayo dependiente del TF-. Una solución que contenía 4 µM AT-III/heparina (5 mM finales de heparina) fue preparada para el uso en el ensayo del TF-independiente, mezclando 52.8 µL de 151.7 µM AT-III (innovaciones moleculares) con 50 µL de 0.2 mM de heparina de LMW (CalBiochem), 400 µL 5^x tapón de ensayo y 1.497 mL agua de calidad reactiva. Las soluciones de AT-III/heparina fueron incubadas de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente y después diluidas dos veces en una placa profunda 96 de de polipropileno, con un volumen final de 1 mL que contenía la heparina de 5 µM, dando por resultado diluciones de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 0 nM, ó de 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 0 nM. Las variantes de FVIIa y el tipo-salvaje de FVIIa fueron diluidos a 250 nM 1^x en un tapón de

ensayo de (20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, 5 mM de $CaCl_2$, 0.01% BSA, 0.1% PEG 8000, pH 7.4). Para el ensayo de TF-dependiente, complejos de 5 nM de FVIIa/50 nM de sTF eran formados al mezclar 20 µL de FVIIa con 10 µL de 5 µM de sTF (Sistemas R&D de Factor III de Coagulación Humana: #2339-PA), 200 µL 5^x en tapón de ensayo y 770 µL de agua de calidad reactiva e incubando las soluciones de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Para el ensayo TF-independiente, 100 µL de FVIIa fueron mezclados con 200 µL 5^x en tapón de ensayo y 700 µL de agua de calidad reactiva para producir soluciones de 25 nM de FVIIa. Para comenzar el ensayo, 25 µL de FVIIa/TF o sólo soluciones de FVIIa fueron mezcladas por separado con 25 µL de cada dilución de AT-III/heparina en pozos de placa 96 de ensayo de media área negra (Nunc). Las condiciones de ensayo finales para el ensayo TF-dependiente eran 2.5 nM de sTF de FVIIa/25 nM y de concentraciones de AT-III/heparina en rangos desde 1000 nM a 0 nM. Para el ensayo TF-independiente, las concentraciones de FVIIa eran de 12.5 nM de FVIIa y las concentraciones de AT-III/heparina se extendieron en rangos desde 2000 nM a 0 nM. Las placas fueron incubadas por 30 minutos con agitación a temperatura ambiente (25°C).

Una solución de reserva del sustrato de FVIIa (Mesil-FPR-ACC) fue preparada disolviendo el sustrato en DMSO a 20 mM, después preparando una solución de trabajo de 0.5 mM 1^x en tapón de ensayo. Seguida por la incubación de la placa de ensayo de arriba, 50 µL del sustrato de FVIIa fue añadida a cada pozo de placas de ensayo. Las reacciones fueron mezcladas y la actividad residual de FVIIa fue evaluada siguiendo las velocidades iniciales

de división del sustrato por 15 minutos bajo un lector fluorescente graduado a 30°C.

Para determinar el nivel de inhibición por AT-III/heparina para las variantes de FVIIa o de FVIIa, los datos primos recogidos con la aplicación SoftMax Pro (dispositivos moleculares) fueron exportados como archivos .XML. Otros análisis no lineares de los datos fueron realizadas con XLfit4, un programa para el análisis automatizado del ajuste y estadísticas de la curva, dentro de la hoja de cálculo de Microsoft Excel (programa de IDBS). La plantilla de la hoja de cálculo era utilizada calcular la serie de la dilución de AT-III, la relación de AT-III con FVIIa, y las relaciones de Vi/Vo para cada replica de FVIIa en cada concentración experimental de AT-III. Los análisis de regresión no lineares de la actividad residual de FVIIa (expresada como Vi/Vo) frente a la concentración de AT-III eran procesadas con XLfit4 y una ecuación hiperbólica de inhibición de la forma ((C+ (Amp* (1-(X/($K_{0.5}$+X))))); donde C = el desplazamiento (fijado en 0 para permitir la extrapolación de los conjuntos de datos, que no alcanzan al 100% de la inhibición durante el curso del ensayo), amperio = la amplitud del ajuste y $K_{0.5}$, el cual corresponde a la concentración de AT-III requerido para la inhibición media-máxima bajo condiciones de ensayo. Para muchas de las variantes de FVIIa, AT-III fue inhibido menos del 20 al 25% de la actividad de la proteasa, a la mayor concentración probada de AT-III, representando un límite superior de detección para el ensayo. Las variantes con menos del 20 al 25% de la máxima inhibición, les fueron por lo tanto asignadas un valor más bajo del límite $K_{0.5}$ (5 µM para TF-dependiente y

10 µM para TF-independiente) y en la mayoría de los casos son esperadas unas resistencias de AT-III mayores al valor reportado.

Las tablas 19 y 20 proporcionan los resultados de los ensayos, que fueron realizados usando las variantes de FVIIa expresadas en células de Freestyle TM 293-F y/o células de BHK-21, en la presencia y la ausencia de TF, respectivamente. Los resultados fueron ambos presentados como el parámetro ajustado de $K_{0.5}$ y como representación de la extensión de la resistencia de AT-III para cada variante, comparada con el tipo-salvaje de FVIIa expresado por la relación de sus valores ajustados de $K_{0.5}$ (variante de $K_{0.5}$ / tipo-salvaje de $K_{0.5}$). Muchas de las variantes de FVIIa exhibieron resistencia creciente a AT-III comparadas con el tipo-salvaje de FVIIa.

Tabla 19. Inhibición de las variantes de FVIIa por AT-III/heparina en presencia de TF

FVIIa	Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	TF-Dependiente de ATIII Ensayo de Resistencia			
			Células 293-F		Células BHK-21	
			$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5wt}$	$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5wt}$
CB553	WT	WT	72.3	1.0	56.0	1.0
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	75.1	1.0	79.0	1.4
CB609	K341Q	K192Q	104.5	1.4		
CB733	K341N	K192N	41.2	0.6		
CB734	K341M	K192M	78.2	1.1		
CB735	K341D	K192D	1985.8	27.5		
CB853	G237T238insA	G97T98insA			169.5	3.0
CB854	G237T238insS	G97T98insS			163.9	2.9
CB855	G237T238insV	G97T98insV	189.6	2.6		
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS			391.4	7.0
CB857	G237T238insSA	G97T98insSA			266.9	4.8
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK			64.9	1.2
CB859	D196K197insR	D60K60ainsR			34.0	0.6
CB860	D196K197insY	D60K60ainsY	29.5	0.4		
CB862	D196K197insA	D60K60ainsA			60.7	1.1
CB863	D196K197insM	D60K60ainsM			55.9	1.0
CB864	K197I198insE	K60al60binsE			183.7	3.3
CB865	K197I198insY	K60al60binsY			66.5	1.2
CB867	K197I198insS	K60al60binsS			82.7	1.5
CB728	Gla swap FIX	Gla swap FIX	68.8	1.0		

Tabla 20. Inhibición de las variantes de FVIIa por AT-III/heparina en la ausencia de TF

FVIIa	Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	TF-Independiente de ATIII Ensayo de Resistencia			
			Células 293-F		Células BHK-21	
			$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5wt}$	$K_{0.5}$ (nM)	$K_{0.5mut}/K_{0.5wt}$
CB553	WT	WT	2265.8	1.0	2222.7	1.0
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	389.7	0.2	415.6	0.2
CB609	K341Q	K192Q	4622.6	2.0		
CB733	K341N	K192N	1554.4	0.7		
CB734	K341M	K192M	5523.9	2.4		
CB735	K341D	K192D	10000.0	>4.4		

CB853	G237T238insA	G97T98insA			10000.0	>4.5
CB854	G237T238insS	G97T98insS			10000.0	>4.5
CB855	G237T238insV	G97T98insV	10000.0	>4.4		
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS			10000.0	>4.5
CB857	G237T238insSA	G97T98insSA			10000.0	>4.5
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK			9329.6	4.2
CB859	D196K197insR	D60K60ainsR			4322.6	1.9
CB860	D196K197insY	D60K60ainsY	2053.3	0.9		
CB862	D196K197insA	D60K60ainsA			7414.3	3.3
CB863	D196K197insM	D60K60ainsM			7299.4	3.3
CB864	K197I198insE	K60aI60binsE			10000.0	>4.5
CB865	K197I198insY	K60aI60binsY			8800.4	4.0
CB867	K197I198insS	K60aI60binsS			10000.0	>4.5
CB728	Gla swap FIX	Gla swap FIX	1005.2	0.4		

Ejemplo 13

Determinación de la resistencia a TFPI de las variantes de FVIIa

La resistencia de las diversas variantes de FVIIa a TFPI fue evaluada usando el ensayo descrito en el Ejemplo 7, arriba. La tabla 21 proporciona los resultados de los ensayos. Los resultados son expresados como la resistencia de pliegue de cada variante de FVIIa a TFPI, comparados con el tipo-salvaje de FVIIa.

Tabla 21. Inhibición de las variantes de FVIIa por TFPI

ID	Mutación (numeración de FVII maduro)	Mutación (numeración de quimotripsina)	TFPI resistencia a doblez
CB553	wt	wt	1.0
CB554	D196K	D60K	0.6
CB555	D196R	D60R	0.5
CB556	D196A	D60A	<0.3
CB557	K197D	K60aD	3.0
CB558	K197E	K60aE	1.3
CB559	K197A	K60aA	0.7

CB560	K197L	K60aL	16.0
CB561	K197Y	K60aY	1.5
CB562	K199D	K60cD	0.9
CB563	K199E	K60cE	1.3
CB564	K199A	K60cA	0.9
CB565	T239A	T99A	4.5
CB566	R290D	R147D	3.3
CB567	R290E	R147E	6.1
CB568	R290A	R147A	2.8
CB569	K341R	K192R	4.1
CB579	D196R/R290E	D60R/R147E	0.4
CB580	D196K/R290E	D60K/R147E	0.7
CB581	D196R/R290D	D60R/R147D	0.4
CB586	D196R/ K197E/ K199E	D60R/K60aE/K60cE	<0.3
CB587	D196K/ K197E/ K199E	D60K/K60aE/K60cE	0.3
CB588	D196R/ K197E/ K199E/R290E	D60R/K60aE/K60cE/R147E	0.4
CB589	D196R/ K197M/ K199E	D60R/K60aM/K60cE	0.6
CB590	D196R/ K197M/ K199E/R290E	D60R/K60aM/K60cE/R147E	0.9
CB591	L305V/S314E/L337A/F374Y	L163V/S170bE/K188A/F225Y	0.6
CB592	M298Q	M156Q	0.5
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	0.8
CB594	V158D/E296V/M298Q/K337A	V21D/E154V/M156Q/K188A	0.3
CB595	K197I	K60aI	0.8
CB596	K197V	K60aV	0.6
CB597	K197F	K60aF	<0.3
CB598	K197W	K60aW	<0.3
CB599	K197M	K60aM	0.3
CB600	D196F	D60F	<0.3
CB601	D196Y	D60Y	<0.3
CB602	D196W	D60W	<0.3
CB603	D196L	D60L	<0.3
CB604	D196I	D60I	<0.3
CB605	G237W	G97W	<0.3
CB606	G237T	G97T	0.3
CB608	G237V	G97V	0.8
CB609	K341Q	K192Q	12.2
CB611	K197L/D196L	K60aL/D60L	<0.3
CB612	K197L/D196F	K60aL/D60F	<0.3
CB614	K197L/D196W	K60aL/D60W	<0.3
CB615	K197E/D196F	K60aE/D60F	<0.3
CB617	K197E/D196V	K60aE/D60V	<0.3
CB637	K197E/K341Q	K60aE/K192Q	80.7
CB638	K197L/K341Q	K60aL/K192Q	39.0

CB670	G237V/K341Q	G97V/K192Q	14.1
CB671	K197V/G237V/K341Q	K60aE/G97V/K192Q	18.9
CB688	K197E/K199E	K60aE/K60cE	2.1
CB689	K197E/G237V	K60aE/G97V	1.7
CB691	K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	34.3
CB692	K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	15.2
CB693	K197E/K199E/G237V/M298Q/ K341Q	K60aE/K60cE/G97V/M156Q/ K192Q	22.1
CB694	K199E/K341Q	K60cE/K192Q	19.1
CB696	G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	3.2
CB697	R290N	R147N	1.5
CB698	R290Q	R147Q	1.2
CB699	R290K	R147K	0.6
CB700	R290M	R147M	1.0
CB701	R290V	R147V	2.5
CB733	K341N	K192N	10.7
CB734	K341M	K192M	4.4
CB735	K341D	K192D	148.0

Ejemplo 14

Evaluación *In vivo* de la actividad pro-coagulante del polipéptido de FVIIa

El modelo con el ratón de hemofilia A, fue establecido para evaluar la actividad pro-coagulante de los polipéptidos de FVIIa. La hemofilia A fue inducida en ratones de CD-1 en la administración de los anticuerpos del anti-FVIII, seguida por la eliminación quirúrgica de las puntas de las colas para iniciar la hemorragia (similar a lo anteriormente descrito, en el ejemplo 8). Ratones deficientes en FVIII (los ratones $FVIII^{-/-}$) también fueron utilizados, pero no fueron tratados con los anticuerpos del anti-FVIII. Los ratones entonces fueron tratados con el polipéptido de FVIIa y la cantidad de sangre perdida en 20 minutos fue medida para determinar la actividad pro-coagulante de los polipéptidos de FVIIa.

A. Análisis de la actividad del coagulante de FVIIa en ratones de CD-1 con la inducción de la hemofilia A

Los experimentos iniciales fueron realizados para determinar la dosis requerida, tiempo y duración del efecto de los anticuerpos anti-humanos-FVIII, cuando son administrados por vía intraperitoneal para inducir hemofilia en ratones CD-1. Para el primer lote de anti-FVIII (lote 1; Afinidades Biológicas, lote IG129R4), este estaba basado inicialmente en la dosis utilizada para los experimentos de canulación, anteriormente descritos en el ejemplo 8. La dosis determinada para causar un estado hemofílico (hemorragia incontrolada sobre un período de 20 minutos del ensayo) fue de 7.54 mg/ratón (80 µL de 94.25 mg/ml solución de reserva). Este lote tenía una actividad neutralizadora de 612 ratón BU/ml. Para el segundo lote de FVIII anti-humano (lote 2; Afinidades Biológicas, lote IG1577R2, la actividad neutralizadora de 474 ratón BU/ml) la dosis utilizada fue de 11.98 mg/ratón (120 µL de 99.8 mg/ml de solución de reserva) y fueron administradas 6 horas antes del corte de la cola.

Para inducir hemofilia, los ratones masculinos de CD-1 (25-35 g) fueron dosificados intraperitonealmente al lote 1 o al lote 2 de anti-FVIII antes del experimento. CD-1 masculino y los ratones $FVIII^{-/-}$ fueron anestesiados con la administración intraperitoneal de un cóctel de la quetamina/xilazina (solución de 100 mg/mL) y colocados en una plataforma calentada (39°C), para asegurarse de que no hubiera una caída en la temperatura corporal. La habitación del procedimiento fue mantenida en una temperatura de 82°F. Diez minutos antes del corte de la cola, la cola fue sumergida en 10 mls de PBS precalentado (tubo

centrífugo de 15ml; 39°C). Ocho a diez ratones fueron inyectados con FVIIa humano recombinante (Novoseven®, Novo Nordisk) o polipéptidos modificados de FVII diluidos en un tapón compuesto de 52 mM de cloruro sódico, 10.2 mM de cloruro cálcico deshidratado, 9.84 mM de glicilglicina, 0.01% de polisorbato 80 y 165 mM de manitol, vía la vena de la cola en una sola inyección. El vehículo sólo, también fue inyectado en un grupo de ratones como control. Si la inyección falto, el animal fue excluido del estudio. La inyección con el agente de ensayo o el vehículo, fue hecha 5 minutos antes de la corte de la cola. Un corte de la cola fue hecho usando una hoja de afeitar, a 5 mm del extremo de la cola y la sangre fue recogida en PBS, por un período de 20 minutos. Al final del período de colección, la pérdida de sangre del total fue evaluada. Los tubos de la colección fueron mezclados y una alícuota de 1 ml de cada muestra fue obtenida y ensayada por el contenido de hemoglobina. El Triton X-100 fue diluido 1 en 4 en agua estéril y 100 µL fueron añadidos a las muestras de 1 mL para causar hemólisis. La absorbancia de las muestras fue medida entonces a una longitud de onda de 546 nm. Para calcular la cantidad de sangre perdida, la absorbancia fue leída contra una curva estándar, generada midiendo la absorbancia en 546 nm de volúmenes conocidos de sangre del múrido, diluidos en PBS y hemolisada, como anteriormente, con el Triton X 100.

Un estudio de la dosis respuesta en el cual 0.3, 1 o 3 mg/kg de CB553 (tipo-salvaje de FVIIa) fueron evaluados, también fue realizado. Ratones que recibieron el vehículo perdieron 1002.3 ± 60.71 µL en el ensayo de 20 minutos. Esto fue reducido perceptiblemente en los ratones que fueron administrados 3

mg/kg de CB553, a 415.5 ± 90.85 µL ($p < 0.05$ usando Kruskal-Wallis seguido por la posprueba de Dunn). Reduciendo la dosis a 1 mg/kg resultó en la pérdida de sangre de 679.57 ± 83.95 µL y una dosis más baja de 0.3 mg/kg resultó en la pérdida de sangre de 852.42 ± 94.46 µL.

En un estudio por separado, CB735 (K341D) y CB945 (M298Q/K341D) fueron evaluados con una dosis de 3 mg/kg. La inyección del vehículo sólo, fue utilizada como control. Grupos de ratones que recibieron el vehículo sólo, perdieron entre 803 ± 92.18 µL y 813.1 ± 82.66 µL de sangre en el ensayo de 20 minutos. Esto fue similar al tratamiento con CB735 ó CB945, el cual resultó en 746 ± 110.5 µL y 870.9 ± 78.38 µL pérdida de sangre, respectivamente.

B. Análisis de la actividad del coagulante de FVIIa en ratones de FVIII$^{-/-}$

Un modelo con el ratón de hemofilia A usando los ratones deficientes en FVIII (ratones de FVIIF$^{-/-}$), también fue utilizado para ensayar la actividad del coagulante de los polipéptidos de FVIIa, usando los mismos protocolos descritos anteriormente, salvo que los ratones no fueron tratados con los anticuerpos del anti-FVIII.

1. Estudio de la respuesta a la dosis de la actividad del coagulante de tipo-salvaje FVIIa

Estudios sobre la respuesta a la dosis, para evaluar la actividad del coagulante de NovoSeven® y de CB553 en ratones de FVIIF$^{-/-}$ al 0.3, 1, 3 y 6 mg/kg fueron realizados. En el experimento de NovoSeven®, la pérdida de sangre en el grupo del vehículo fue de 912.79 ± 38.32 µL, el cual fue reducido perceptiblemente por el tratamiento de NovoSeven® en 6 y 3 mg/kg (a 361.74

± 55.28 µL y 586.98 ± 60.56 µL; p < 0.05 Kruskal-Wallis seguido por la posprueba de Dunn). Reduciendo la dosis a 1 mg/kg resultó en la pérdida de sangre de 674.84 ± 46.88 µL y en la dosis ensayada más baja el valor fue de 801.08 ± 41.39 µL. En el experimento CB553, el grupo del control de vehículo produjo la pérdida de sangre de 904.08 ± 15.38 µL. Esto fue reducido perceptiblemente (p < 0.05 Kruskal-Wallis seguido por la posprueba de Dunn) por CB553 en 6 mg/kg a 451.04 ± 74.17 µL. Reduciendo la dosis a 3 mg/kg produjo un valor de la pérdida de sangre de 695.75 ± 60.50 µL mientras se bajaba la dosis adicionalmente a 1 y 0.3 mg/kg, resultó en los valores de la pérdida de sangre próximos y en los niveles del control del vehículo (846.08 ± 34.17 µL y 936.43 ± 31.39 µL, respectivamente).

Ejemplo 15

La determinación del factor VIIa que unía el factor del tejido soluble

La capacidad de las variantes de FVIIa expresadas en las células de HEK 293 o en las células de BHK, para unir el factor del tejido soluble (sTF), fue evaluada usando resonancia del plasmón de superficie de Biacore. Las variantes de FVIIa son evaluadas a través de la medición de la unión del perfil, en tres concentraciones de la proteasa de dos experimentos duplicados, usando dos diferentes niveles de sTF unidos a un chip de Biacore CM5.

Una nueva Serie S CM5 chip sensorial (GE Healthcare Cat #BR 1006-68) fue acoplado albúmina de suero bovino y con factor del tejido soluble, usando un instrumento de Biacore T100. El acoplamiento fue efectuado con el tapón de acoplamiento de Biacore (30 mM Na Hepes pH 7.4, 135 mM NaCl, de

1 mM EDTA, 0.01% Tween-20) con un Estuche de Acoplamiento de Amina (GE Healthcare Cat #BR 1000-50) y el asistente del protocolo en el programa de Biacore T100. Para la inmovilización, las cuatro células del chip fueron utilizadas. Las células 1 y 3 fueron acopladas con 500 unidades de respuesta (RU) de la proteína de referencia de la albúmina de suero bovino, diluida en el tapón de acetato, pH 4.0; y las células 2 y 4 fueron acopladas con 500 y 250 RU de sTF (sistemas del R&D) diluidos en el tapón de acetato, pH 4.5.

Cada variante de FVIIa, y la proteasa del tipo-salvaje de FVIIa, fueron probadas en tres concentraciones y en duplicado. Las proteasas fueron diluidas a 60 nM, a 30 nM y a 15 nM en un tapón de ensayo de Biacore de 100 µL (200 mM Na Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM de $CaCl_2$, 0.1% PEG 8000, 0.1% BSA, 0.01% Tween-20) en una placa de 96 pozos de ensayo. El ensayo: cada muestra fue ensayada en el instrumento de Biacore T100, usando 120 segundos de tiempo de contacto, seguidos por 180 segundos de tiempo de disociación en un caudal de 10 µL./min. Un tapón en blanco también fue ensayado. El chip fue regenerado con el EDTA de 50 mM, pH 7.0 por 60 segundos y después 30 segundos. El ensayo para medir la unión del tipo-salvaje de FVIIa al sTF debe ceder tres grupos de curvas con un índice de K_d de aproximadamente 8 nM.

El programa de la evaluación de Biacore T100 fue utilizado para analizar los datos. Específicamente, la Cinética/Afinidad 1:1 Análisis de Unión, el cual ajusta los datos a la isoterma de Langmuir, era utilizada y los datos fueron ajustados individualmente por dos réplicas de cada variante en dos

acoplamientos de la unidad de la respuesta. Los cuatro ajustes de valores de K_d fueron promediados y presentados en la tabla 22. Los polipéptidos de FVIIa que contenían la mutación de M156Q tendieron para tener resultados más bajos de K_d y así unirse más firmemente al sTF.

Tabla 22. La unión de las variantes de FVIIa al soluble TF

ID	Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	Afinidad Kd (nM)	
			HEK 293	BHK
CB553	WT	WT	7.9	9.0
CB592	M298Q	M156Q	3.9	
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	8.0	
CB669	V158D/G237V/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q/G97V	14.9	
CB690	K197E/G237V/M298Q	K60aE/G97V/M156Q	4.8	
CB691	K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	6.6	
CB692	K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	5.9	
CB693	K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/K60cE/G97V/M156Q/K192Q	6.4	
CB695	G237V/M298Q	G97V/M156Q	3.8	
CB696	G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	2.5	
CB946	M298Q/K341D	M156Q/K192D	7.9	

Ejemplo 16

Resonancia del plasmón de la superficie (SPR) examinando las variantes de FVIIa para la resistencia a TFPI

La resistencia relativa de las diferentes variantes de FVIIa a la inhibición por el soluble recombinante humano TFPI, fue evaluado usando un ensayo del alto-rendimiento de la resonancia del plasmón de la superficie (SPR) con el instrumento de Biacore T100. La resistencia relativa de las variantes de FVIIa

a la inhibición por TFPI fue evaluada por la medición de la cantidad relativa de variante de FVIIa unida al soluble TFPI, inmovilizado en un chip sensorial Biacore CM5, comparado a la cantidad del tipo-salvaje de FVIIa unido posterior a la estandarización del tiempo de inyección y de la concentración de proteasa.

Para cada experimento, TFPI soluble (sistemas del R&D) fue inmovilizado a un nuevo chip Biacore CM5 series S sensorial de 4 células de flujo de (GE Healthcare), que usaba el protocolo de acoplamiento de la amina disponible dentro del programa del control de Biacore T-100 (GE Healthcare), y de los reaccionantes proporcionados con el Estuche de Acoplamiento de Amina (GE Healthcare). Las cuatro células de flujo disponibles eran utilizadas para la inmovilización de dos diferentes densidades de TFPI y de la albúmina de suero bovino (BSA), que sirvieron como agente de bloqueo en las células de la referencia. BSA fue diluido a 5 µg/ml en el acetato de sodio (pH 4.0) e inmovilizado en las células de flujo 1 y 3 a 1000 y 2000 unidades de respuesta (RU), respectivamente. Para la inmovilización de TFPI, el soluble liofilizado TFPI (10 µg) era resuspendido en 100 µL 1X del tapón de acoplamiento (30 mM Hepes, 135 mM de NaCl, 1 mM EDTA, 0.01% Tween-20, pH 7.4) a una concentración de 0.1 mg/mL. Un total de 20 µL de 0.1 mg/ml TFPI, según lo diluido a 10 µg/ml en el pH 4.0 del acetato de sodio para la inmovilización de las células de flujo 2 y 4 a 1000 y 2000 RU, respectivamente. El tapón de acoplamiento fue utilizado como el tapón de funcionamiento durante las etapas de la inmovilización.

Cada muestra de FVIIa fue preparada a una concentración final de 320 nM en 1X tapón de funcionamiento (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM $CaC1_2$, 0.1% PEG 8000, 0.1% BSA, 0.01% Tween-20, pH 7.4) conteniendo el sTF de 620 nM (Factor de Coagulación Humana III; Sistemas de R&D). Generalmente, cada variante de FVIIa fue diluida diez veces en 1X tapón de funcionamiento antes de la dilución final de 320 nM. Los complejos de FVIIa/sTF fueron preparados a un volumen final de 120 µL en duplicado, que permitían hasta 48 variantes únicas de FVIIa para ser cargados en una placa de almacenamiento de 96 pozos y evaluados con las inyecciones duplicadas en una sola operación. El complejo de FVIIa/sTF fue incubado a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos, antes de la iniciación de la primera inyección de la muestra.

Un método de análisis obligatorio normalizado fue creado dentro del Programa de Control de Biacore (GE Healthcare) en el cual cada replica de FVIIa se inyecta por 180 segundos de tiempo asociado, seguidos por 60 segundos cortos de disociación, a un caudal de 10 µL./min. La regeneración del chip sensorial siguió a la fase de la disociación, por 30 segundos con 10 mM glicina, 500 mM NaCl, pH 3.0 y después de un período de 60 segundos de estabilización con 1X tapón de funcionamiento a los mismos 10 µL./min. de caudal. Dos puntos de referencia del ensayo fueron registrados para cada operación y el análisis subsiguiente de los datos, una de 5 segundos antes de la conclusión de la fase de la asociación (unión) y otra de 5 segundos informados antes de la conclusión de la fase de la disociación (disociación).

Antes de iniciar un ensayo completo, el chip sensorial fue ensayado con una sola inyección del tipo-salvaje FVIIa/sTF de 320 nM por 180 segundos, que deben dar una respuesta de aproximadamente 400-450 RU y 750-850 RU para unir a las células de flujo 2 (RU 1000) y 4 (200 RU), respectivamente.

El análisis de los datos fue realizado primero con el Programa de Evaluación de Biacore T100 (GE Healthcare), para inspeccionar los parámetros de la validación del ensayo, los cuales incluyen la verificación de que la unión a la célula de referencia es minima, la derivación de la línea de base y el control de la unión de las inyecciones en blanco (tapón del funcionamiento). Las tablas de los datos fueron generadas dentro de esta aplicación, que indican la cantidad de variante unida de FVIIa (en RU) en ambos, la unión del punto del informe y la disociación del punto del informe. Los datos de las tablas fueron exportados posteriormente para el análisis adicional, dentro del ambiente de la hoja de cálculo Microsoft Excel. Los puntos de datos primos (RU unidos) fueron corregidos para el control de unión del chip sensorial; y después una relación de la cantidad de tipo-salvaje de FVIIa unida (en RU) con la cantidad de variante de unión de FVIIa fue tomada para cada parámetro e informada como Unida (wt/variante) y Disociación (wt/variante). La resistencia a la inhibición de TFPI se refleja como un aumento de la relación de uno o ambos parámetros evaluados. Por ejemplo, un valor de 20 de Unión (wt/variante) o de Disociación (wt/variante) para una variante concreta de FVIIa, indica que la variante es 20-veces más resistente a la inhibición de TFPI, que la de tipo-salvaje de FVIIa. Las distintas variantes exhibieron resistencia creciente a la

inhibición de TFPI. Por ejemplo, CB609, CB637, CB691, CB856 y CB857 están entre el grupo que exhibió de 20 a 60-veces resistencia y las variantes que contenían el K341D por la numeración de FVII maduro (correspondiente por a la numeración de la quimotripsina) por ejemplo CB735, tiene relaciones indicando resistencia significativa a TFPI (mayor que 50 -150-veces) y las variantes que contienen la mutación 9CB945 de K192D) tiene una relación indicando resistencia significativa a TFPI (mayor que 40 -150-veces). En algunos casos, la velocidad de disociación era más afectada que la velocidad de asociación. Algunos ejemplos de las variantes que exhibieron este perfil son CB735, CB854, CB855, CB856 y CB857.

Tabla 23. Resistencia de las variantes de FVIIa a la inhibición por TFPI

ID	Mutación (numeración FVII maduro)	Mutación (numeración de Quimotripsina)	TF-Dependiente TFPI Ensayo de Resistencia			
			Células 293-F		Células BHK-21	
			Unión (wt/variante)	Disociación (wt/variante)	Unión (wt/variante)	Disociación (wt/variante)
CB553	WT	WT	1.0	1.0	1.0	1.0
CB558	K197A	K60aE	1.4	1.3		
CB563	K197E	K60cE	1.4	1.4		
CB592	M298Q	M156Q	1.9	1.8		
CB593	V158D/E296V/M298Q	V21D/E154V/M156Q	0.8	0.8	1.0	1.0
CB608	G237V	G97V	2.2	1.8		
CB609	K341Q	K192Q	13.0	19.7		
CB637	K197E/K341Q	K60aE/K192Q	67.2	171.1		
CB670	G237V/K341Q	K192Q/G97V	12.8	12.4		
CB671	K197V/G237V/K341Q	K60aE/K192Q/G97V	18.9	21.8		
CB688	K197E/K199E	K60aE/K60cE	2.2	2.1		

CB689	K197E/G237V	K60aE/G97V	1.8	1.6		
CB691	K197E/K199E/K341Q	K60aE/K60cE/K192Q	33.9	68.1		
CB692	K197E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/G97V/M156Q/K192Q	15.9	21.5		
CB693	K197E/K199E/G237V/M298Q/K341Q	K60aE/K60cE/G97V/M156Q/K192Q	23.4	43.5		
CB694	K199E/K341Q	K60cE/K192Q	18.8	30.7		
CB695	G237V/M298Q	G97V/M156Q	0.9	0.8		
CB696	G237V/M298Q/K341Q	G97V/M156Q/K192Q	4.5	6.0		
CB697	R290N	R147N	1.6	1.5		
CB698	R290Q	R147Q	1.3	1.2		
CB699	R290K	R147K	0.7	0.7		
CB700	R290M	R147M	1.1	1.1		
CB701	R290V	R147V	2.6	2.7		
CB733	K341N	K192N	11.3	63.8		
CB734	K341M	K192M	4.9	5.4		
CB735	K341D	K192D	185.6	380.7		
CB853	G237T238insA	G97T98insA			6.5	18.2
CB854	G237T238insS	G97T98insS			5.2	13.0
CB855	G237T238insV	G97T98insV			7.3	16.8
CB856	G237T238insAS	G97T98insAS			22.8	154.5
CB857	G237T238insSA	G97T98insSA			21.5	146.5
CB858	D196K197insK	D60K60ainsK			1.0	0.8
CB859	D196K197insR	D60K60ainsR			0.5	0.5
CB862	D196K197insA	D60K60ainsA			0.5	0.4
CB863	D196K197insM	D60K60ainsM			0.4	0.4
CB864	K197I198insE	K60aI60binsE			1.3	1.1
CB865	K197I198insY	K60aI60binsY			1.1	1.0
CB867	K197I198insS	K60aI60binsS			0.7	0.6
CB902	K197E/M298Q	K60aE/M156Q	2.6	2.3		
CB945	M298Q/K341D	M156Q/K192D	146.8	196.5		

Ejemplo 17

Determinación de Concentración de Proteasa Catalítica Activa usando el Sitio Activo Valorante 4-metilumbeliferil *p'* - guanidinobenzoato (MUGB)

La concentración catalíticamente activa de FVIIa en una solución de reserva fue determinada valorando un complejo de FVIIa y un factor de tejido soluble (sTF) con 4-metilumbeliferil *p'* - guanidinobenzoato (MUGB), un sustrato fluorogénico del éster desarrollado como sitio activo para las cuasi-tripsina serina proteasa. El ensayo fue realizado esencialmente como descrito por Payne et al. (Bioquímica (1996) 35:7100-7106) con algunas pequeñas

modificaciones. MUGB reacciona fácilmente con FVIIa, pero no FVII o la proteasa inactiva, para formar un efectivamente estable Acilo-enzima intermedia bajo las condiciones en las cuales la concentración de MUGB está saturada, y la desacilación es especialmente lenta y la velocidad se limita para la catálisis. Bajo estas condiciones, la proteasa de FVIIa experimenta un solo recambio catalítico para liberar el 4-metilumbeliferona fluoróforo (4-MU). Cuando el estallido inicial de la fluorescencia se calibra a un patrón externa de concentración de una curva estándar de fluorescencia 4-MU, la concentración de sitios activos puede ser calculada.

Los ensayos fueron realizados con 2 mL de volumen de reacción en una cubeta de cuarzo de 1 cm x 1 cm bajo continua agitación. Cada reacción contuvo 0.5 µM sTF (Sistemas Humanos de R&D) en un tapón de ensayo que contenía 50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$ y 0.1% PEG 8000, PH 7.6. La solución estándar de 4-MU era recién preparada en una concentración de reserva de 0.5 M en DMSO y la concentración confirmada por espectroscopía de la absorbancia a 360 nm, usando un coeficiente de extinción de 19.000 M-1 cm-1 m- en 50 mM tapón Tri, pH 9.0. MUGB fue preparado en una concentración de reserva de 0.04 M en DMSO basado en el peso seco. Los ensayos fueron iniciados añadiendo 4 µL de 4 mM MUGB (8 µM de concentración final) a una solución de 0.5 µM sTF (20.2 µL de 49.4 µM sTF) en tapón de ensayo de 1x y primero midiendo el antecedente de la hidrólisis de MUGB por ~150-200 segundos antes de la adición de FVIIa o de FVIIa variante a una concentración final de ~100-200 nM basado en el inicial de ELISA

(Ejemplo 2C.1) o la valoración del sitio activo con FFR-CMK (Ejemplo 6). La liberación de la fluorescencia 4-MU en la fase de ráfaga de la reacción, fue seguida por 1000-1200 segundos adicionales. Una curva estándar libre de 4-MU fue preparada por la valoración de la absorbancia-calibrada de 4-MU en tapón de ensayo de 1x que contenía 0.5 µM sTF en 20 nM pasos para una concentración final de 250 nM.

Para el análisis de los datos, las huellas de la reacción fueron importadas al paquete del programa Graphpad Prism y la contribución del antecedente de la hidrólisis fue restada de la curva por la extrapolación de la velocidad inicial medida por hidrólisis espontánea de MUGB, que era típicamente más pequeña que el 5% de la ráfaga de la fluorescencia total. La curva corregida fue ajustada a una sola ecuación exponencial con un componente lineal (para tomar en cuenta la velocidad lenta de la desacilación) de la forma Δ fluorescencia = Amp $(1\text{-}e^{-kl})$+B*t*, donde Amp = la amplitud de la fase de la ráfaga bajo la saturación de las condiciones del ensayo descritas arriba, *k* es la constante de velocidad de primer orden para la formación de la Acilo-enzima y B es una mayor tasa constante de velocidad aparente asociado con la rotación completa de MUGB. La concentración de proteasa activa de FVIIa es calculada por la comparación del ajuste del parámetro por amplitud de la curva estándar 4-MU. Los valores de múltiples ensayos fueron medidos, promediados y las desviaciones estándar determinadas.

Debido a que las modificaciones serán evidentes para aquellos especialistas en esta técnica, está destinado que esta invención sea limitada solamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de factor VII (FVII) modificado, en donde

el polipéptido FVII sin modificar comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en cualquiera de SEQ ID NOS:1-3; y

el polipéptido modificado comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en cualquiera de SEQ ID NOS: 21, 23-26, 28, 29, 39-43, 128-133, 139-146, 229, 230, 232-235, 242-244, 248 and 250.

2. El polipéptido FVII modificado de la reivindicación 1, en donde el polipéptido FVII comprende una modificación del aminoácido adicional que se selecciona entre un reemplazo que corresponde a D196K, D196R, D196Y, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341R, K341N, K341M, K341D y K341Q.

3. El polipéptido FVII modificado de la reivindicación 2, que comprende las modificaciones seleccionadas entre los reemplazos correspondientes a D196R/K197E/K199E, D196K/K197E/K199E, D196R/K197E/K199E/R290E, D196R/K197M/K199E, D196R/K197M/K199E/R290E, D196F/K197L, D196L/K197L, D196M/K197L, D196W/K197L, D196F/K197E, D196W/K197E, K196V/K197E, K197E/K341Q,

K197L/K341Q, K197E/G237V/K341Q, K197E/K199E, K197E/G237V, K199E/K341Q y K197E/K199E/K341Q.

4. El polipéptido modificado del factor VII (FVII) de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, que comprende dos o más modificaciones en un polipéptido de FVII, o fragmentos activos del mismo, en donde:

dos o más modificaciones de aminoácido se seleccionan entre las modificaciones de aminoácido que corresponden a D196K, D196R, D196Y, D196L, D196I, K197Y, K197A, K197E, K197D, K197L, K197M, K197I, K197V, K197F, K197W, K199A, K199D, K199E, G237W, G237V, T239A, R290A, R290E, R290D, R290N, R290Q, R290K, K341R, K341N, K341M, K341D, K341Q, G237T238insA, G237T238insS, G237T238insV, G237T238insAS, G237T238insSA, D196K197insK, D196K197insR, D196K197insY, D196K197insA, D196K197insM, K197I198insE, K197I198insY, K197I198insA o K197I198insS en un polipéptido de FVII que tiene una secuencia de aminoácidos dispuesta en la SEQ ID NO:3 o en residuos correspondientes en un polipéptido de FVII.

5. El polipéptido FVII modificado de la reivindicación 7 4, que comprende las modificaciones seleccionadas entre D196R/K197E/K199E, D196K/K197E/K199E, D196R/K197E/K199E/R290E, D196R/K197M/K199E, D196R/K197M/K199E/R290E, K197E/K341Q, K197L/K341Q, G237V/K341Q,

K197E/G237V/K341Q, K197E/K199E, K197E/G237V, K199E/K341Q, K197E/K199E/K341Q y K197E/G237V/M298Q.

6. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5 que exhibe resistencia aumentada al inhibidor de vía del factor de tejido (TFPI) en comparación con el polipéptido FVII no modificado.

7. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el polipéptido FVII no modificado tiene una secuencia de aminoácidos dispuesta en la SEQ ID NO:3.

8. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que consiste de una secuencia de aminoácidos como se establece en cualquiera de SED ID NOS: 21, 23-26, 28, 29, 39-43, 128-133, 139-146, 229, 230, 232-235, 242-244, 248 y 250.

9. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 8, que es un polipéptido del Factor VII activado por dos cadenas (FVIIa) que esta partido entre los residuos que corresponden a la arginina en la posición 152 y la isoleucina en la posición 153 de la SEQ ID NO. 3.

10. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en donde el polipéptido de FVII es glicosilatado, carboxilatado, hidroxilado, sulfatado, fosforilatado, albuminatado, o conjugado a una porción del polietilenglicol (PEG).

11. El polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que es un polipéptido de cadena simple.

12. Una molécula del ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido FVII modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde:

la secuencia de la molécula de ácido nucléico sin modificar comprende la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 108 o SEQ ID NO: 109 o degenerados de las mismas o una porción de las mismas que codifiquen el polipéptido FVII de la SEQ ID NO. 3.

13. Un vector, que comprende la molécula del ácido nucleico de la reivindicación 12, en donde el vector se selecciona de entre pCMV, pQE 32, pQE 30, pQE 31, pET 11a, pET 12a-c, pET 15b y pET 19b.

14. Una célula aislada, que comprende el vector de la reivindicación 13, en donde la célula se selecciona de entre células de *Pichiasp.* y células de *Pichiapastoris*.

15. Una célula aislada que comprende el vector de la reivindicación 13, en donde la célula es seleccionada de células de E. coli, *Saccharomycescerevisiae*, *Drosophila*, *lepidopteran*, *Schizosaccharomycespombe*, *Yarrowialipolytica*, *Kluyveromyceslactis, Pichia Sp.*, y *Pichia pastoris*.

16. Una célula, que comprende el vector de la reivindicación 13, en donde la célula se selecciona de entre células de rinón de hámster bebe (BHK-21), células 293, células CHO, células Sf9, células *Pseudaletiaunipuncta* (A7S), células *Danaus plexippus* (DpN1), células Schnieder 2 (S2), células Kc, células C7, células Balb/3T3, células HeLa, células MT2, células NS0 (que no secretan) de ratón, células Sp2/0, células COS, células NIH3T3, células 2B8, células HKB y células EBNA-1 libres de suero.

17. Una composición farmacéutica, que comprende una concentración o una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido FVII modificado de cualquiera de reivindicaciones 1 a 11, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17 que es una solución suspensión o emulsión.

19. La composición farmacéutica de la reivindicación 17 que es un gel, loción o crema.

20. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 17-19 que contiene liberación controlada de liposomas.

21. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 17-19 que se formula para administración de dosis sencilla.

RESUMEN

Se suministran polipéptidos de factor VII modificados y usos de los mismos. Dichos polipéptidos FVII modificados incluyen Factor VIIa y otras formas del Factor VII. Entre los polipéptidos FVII suministrados se encuentran aquellos que tienen actividades alteradas, típicamente actividad procoagulante alterada, incluyendo actividades procoagulante aumentadas. Así, dichos polipéptidos modificados son terapéuticos.

US006280761B1

(12) **United States Patent**
Santus

(10) **Patent No.: US 6,280,761 B1**
(45) **Date of Patent: Aug. 28, 2001**

(54) **NICOTINE LOZENGE**

(75) Inventor: **Gian Carlo Santus**, Milan (IT)

(73) Assignee: **Pharmacia AB**, Helsingborg (SE)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) Appl. No.: **08/644,971**

(22) Filed: **May 15, 1996**

Related U.S. Application Data

(62) Division of application No. 08/097,962, filed on Jul. 26, 1993, now Pat. No. 5,549,906.

(51) **Int. Cl.**[7] **A61K 9/20**
(52) **U.S. Cl.** **424/435**; 424/440
(58) **Field of Search** 424/440, 435

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

Re. 34,089	10/1992	Kydonieus et al.	424/449
4,753,800	6/1988	Mozda et al.	424/440
4,806,356	2/1989	Shaw	424/440
4,837,027	6/1989	Lee et al.	424/449
4,907,605	3/1990	Ray et al.	131/270
4,908,213	3/1990	Govil et al.	424/447
4,946,853	8/1990	Bannon et al.	415/343
4,953,572	9/1990	Rose et al.	131/270
5,004,601	4/1991	Snipes	424/78
5,016,652	5/1991	Rose et al.	131/270
5,055,478	10/1991	Cooper et al.	514/343
5,069,904	12/1991	Masterson	424/401
5,135,752	8/1992	Snipes	424/435
5,135,753 *	8/1992	Baker et al.	424/435
5,139,790	8/1992	Snipes	424/435
5,156,845	10/1992	Grodberg	424/440
5,174,989	12/1992	Tanaka et al.	424/52
5,362,496 *	11/1994	Baker et al.	424/435

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

0899037	6/1964	(BE) .
1273878	1/1988	(CA) .
0192950	1/1986	(EP) .
2142822	1/1985	(GB) .
2227659	8/1990	(GB) .
2230439	10/1990	(GB) .
2255892	11/1992	(GB) .
8803803	6/1988	(WO) .
9101132	2/1991	(WO) .
9102518	3/1991	(WO) .
9109599	7/1991	(WO) .

OTHER PUBLICATIONS

Pharmetrix—"Nicotine Smoking Cessation Therapeutic Systems," Technology Overview, May 12, 1993, Copy No. 32, Pharmetrix Corp.

Lee, Emmet W. et al. "Cigarette Smoking, Nicotine Addiction, & Its Pharmacologic Treatment," *Arch Intern* Med/vol. 153, Jan. 11, 1993.

Sachs, David P.L. et al. "Effectiveness of a 16–Hour Transdermal Nicotine Patch in a Medical Practice Setting, Without Intensive Group Counseling," In Press: *Arch Int Med.*

Smith, Eric W. et al. "The Local Side Effects of Transdermally Absorbed Nicotine," *Skin Pharmacol* 1992:5:69–76.

McKenna, James P. et al. "Transdermal Nicotine Replacement and Smoking Cessation," *American Family Physician* Jun. 1992 p. 2595–2601.

Fiore, Michael C. et al. "Tobacco Dependence and the Nicotine Patch," *JAMA,* Nov. 18, 1992 vol. 268, No. 19 p. 2687–2694.

"Correspondence," *The New England Journal of Medicine,* Jan. 30, 1992, vol. 326 No. 5, p. 344–345.

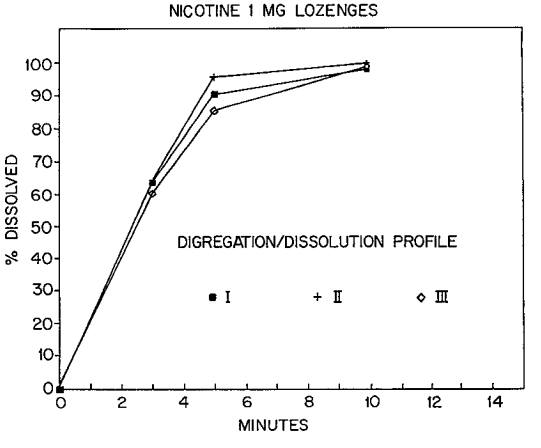
(List continued on next page.)

Primary Examiner—Jyothsan Venkat
(74) *Attorney, Agent, or Firm*—Pravel, Hewitt, Kimball & Krieger

(57) **ABSTRACT**

A method for smoking cessation therapy is described that utilizing an improved nicotine lozenge to satisfy transient craving. The lozenge contains nicotine, a nonnutritive sweetener and an absorbent excipient.

3 Claims, 2 Drawing Sheets



OTHER PUBLICATIONS

Product Insert for Prostep™ (nicotine transdermal system), Lederle Laboratories, 1992.
Soderling, Eva, et al. "Perspectives on xylitol–induced oral effects," Proc Finn Dent Soc 1991 87 No. 2.
Product Insert for Habitrol™ nicotine, Transdermal Therapeutic System, Basel Pharmaceuticals, 1991.
Sachs, David P.L. "Advances in Smoking Cessation Treatment*," Reprinted from Current Pulmonology, Chap. 6, vol. 12, 1991, p. 140–197.
Tonneson, Philip et al. "A Double–Blind Trial of a 16–Hour Transdermal Nicotine Patch in Smoking Cessation," *The New England Journal of Medicine* vol. 325, No. 5, 1991, p. 311–315.
Sachs, David P.L. et al. "Pharmacologic Approaches to Smoking Cessation,"*Clinics in Chest Medicine*—vol. 12, No. 4, Dec. 1991 p. 769–791.
Bradlet, J. R. et al. "Buccal Absorption of Nicotine from Smokeless Tobacco Sachets," *The Lancet,* Dec. 14, 1985 p. 1370.
Gourlay, Steven G. et al. "Antismoking products," *The Medical Journal of Australia* vol. 153 Dec. 3/17, 1990 p. 699–707.
U.S. Department of Health and Human Services. "The Health Benefits of Smoking Cessation," U.S. Dept.of Health & Human Services Public Health Service, Centers for disease Control, Center for Chronic Disease Prevention & Health Promotion, Office on Smolind & Health. DHHS Publication No. (DCD) 90–8416, 1990.
Muller, Ph. et al. "The Use of Transdermal Nicotine in Smoking Cessation," *Lung* Springer–Verlag, New York Inc. 1990, p. 445–453.
Olinger, Philip M. "Sweetening Sugar–Free Medications: Xylitol," Presented at Interphex•USA Conference/Exhibition, May 8–11, 1990, New York.
Steuer, Jill D. et al. "Cigarette Craving and Subsequent Coping Responses Among Smoking Cessation Clinic Participants," *Steuer*—vol. 16, No. 2, 1989, p. 193–198.
Sachs, David P.L. "Nicotine Polacrilex: Practical Use Requirements*," *Curr Pulmonol,* Chapter 7, 10:141–158, 1989.
Excerpt from *Oral Drug Delivery* "Oral Mucosal Drug Delivery," 1989, Chapter 3, p. 183–190.
Graffner, Christina "Clinical experience with novel buccal and sublingual administration," *Novel Drug Delivery and Its Therapeutic Application,* Chapter 16, 1989, p. 159–165.
Sachs, David P.L. "Transdermal Nicotine for Smoking Cessation—Six–Month Results From Two Multicenter Controlled Clinical Trials," *JAMA,* Dec. 11, 1991—vol. 266, No. 22, p. 3133–3138.
Sachs, David P.L.et al. "Are Smokers Trying to Stop and Smokers Not Trying to Stop the Same Experimental Model?," *Research* Monograph Series, Problems of Drug Dependence 1989, Proceedings of the 51st Annual Scientific Meeting, The Committee on Problems of Drug Dependence, Inc., U.S. Dept. of Health and Human Servies, p. 366–367 & Slide Sheets p. 1–7.
Pilot Study for "The Optimum Dose and Schedule for Nicotine Polacrilex Use," National Institute on Drug Abuse U.S. Public Health Service, 1988–1993, p. 775.1–775.9.
Russell, Michael A.H. "Nicotine Replacement: The Role of Blood Nicotine Levels, Their Rate of Change, and Nicotine Tolerance," Nicotine Replacement: A Critical Evaluation, 1988, p. 63–94.
Makinen, Kauko K. "Sweeteners and prevention of dental caries," Preventative, Sep. 1988, vol. 78/No. 9, p. 57–66.
Sachs, David P.L. "Pharmocologic, Neuroendocrine, and Bio–behaviorial Basis for Tobacco Dependence*," *Curr Pulmonol* 8:371–406, 1987.
Warburton, David M. et al. "Facilitation of learning and state dependency with nicotine," *Psychopharmacology* (1986) 89:55–59.
Machacek, Dwaine A. et al. "Quantification of Cotinine in Plasma and Saliva by Liquid Chromatography," *Clinical Chemistry* vol. 32, No. 6, 1986 p. 979–982.
Sachs, David P.L."Cigarette Smoking—Health Effects & Cessation Strategies," Clinics in Geriatric Med.vol. 2, No. 2, May 1986 p. 337–362.
Sachs, David P.L. "Nicotine Polacrilex: Clinical Promises Delivered & Yet to Come," The Pharmacologic Treatment of Tobacco Dependence: Proceedings of the World Congress, Nov. 4–5 1985, p. 120–140.
Russell M.A.H. et al. & Bradley, J. R. et al. "Buccal Absorption of Nicotine From Smokeless to Tobacco Sachets," & "Aortic Valve Replacement in Chronic Renal Failure," *The Lancet* Dec. 14, 1985, p. 1370.
West, R. J. et al. "Effect of Nicotine Replacement on the Cigarette Withdrawal Syndrome," *British Journal of Addiction* 79 (1984) p. 215–219.
Hughes, John R. et al. "Effect of nicotine on the tobacco withdrawal syndrome*," *Psychopharmacology* (1984) 83:82–87.
Wesnes, Keith et al. "Effects of scopolamine and nicotine on human rapid information processing performance," *Psychopharmacology* (1984) 82:147–150.
Benowitz, Neal L. et al. "Smokers of Low–Yield Cigarettes Do Not Consume Less Nicotine," Reprinted from *The New England Journal of Medicine* 309:139–142 (Jul. 21), 1983.
Szeztli, I. "Cyclodextrins and their inclusion complexes," Akademiai Kiado: Budapest, 1992, p. 109.
Harrington, Neil "The craving factor in the treatment of smoking," Br. J. Soc. Clin. Psychol. (1978), 17, p. 363–371.
Jarvik, M.E. et al. "Inhibition of cigarette smoking by orally administered nicotine," *Clinical Pharmacology & Therapeutics* vol. 11, No. 4, 1970, p. 574–576.
Encyclopedia of Chemical Technology, Third Edition, vol. 9, p. 198 (1980).
Encyclopedia of Chemical Technology, Third Edition, vol. 15, p. 568 (1981).
The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, Tenth Edition, p. 5183 (1983).
EMDEX®(Dextrates, NF Hydrated), Revised Nov., 1995, pp. 1–4.

* cited by examiner

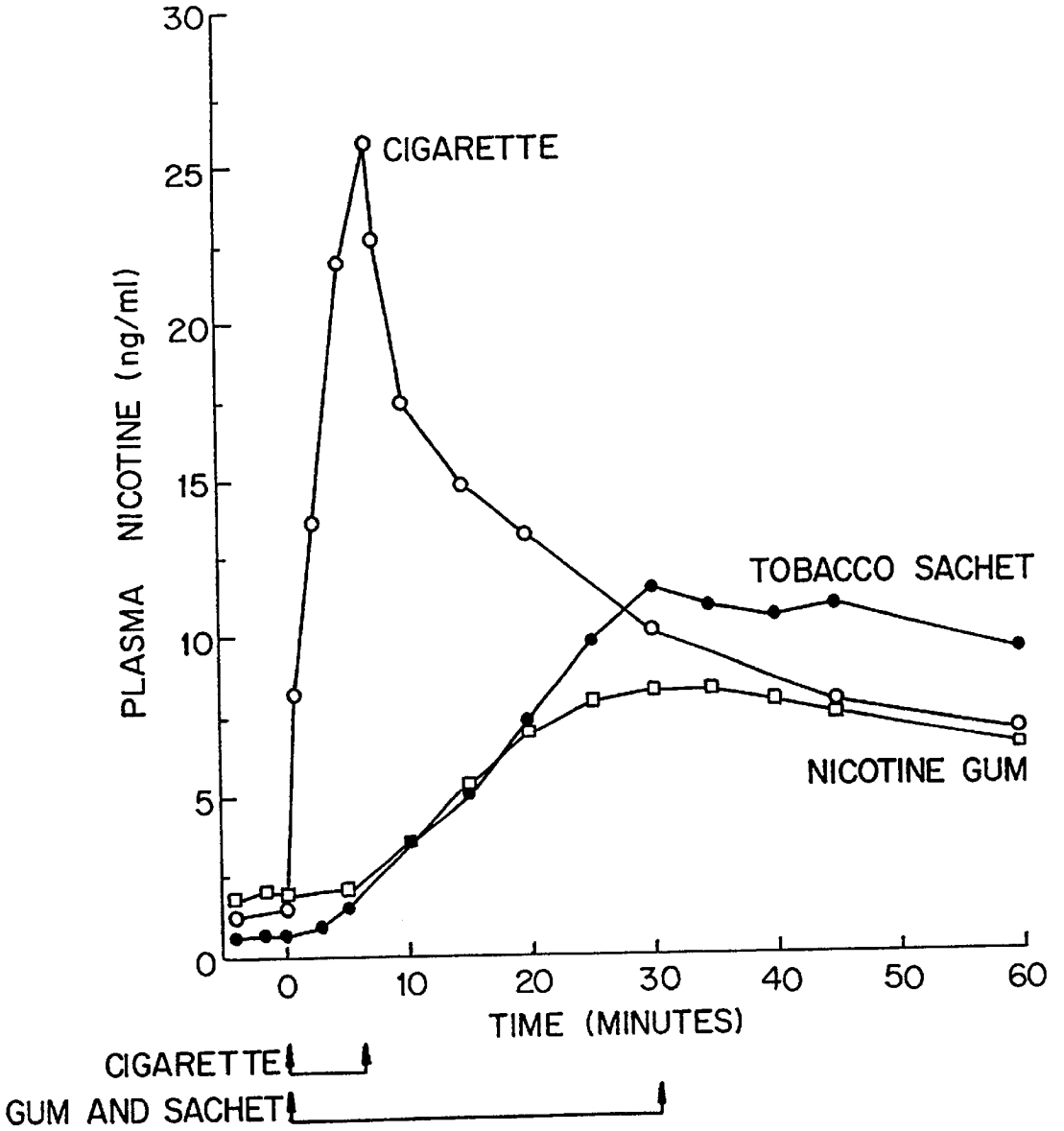

30
25
20
15
10
5
0
PLASMA NICOTINE (ng/ml)
CIGARETTE
TOBACCO SACHET
NICOTINE GUM
0
10
20
30
40
50
60
TIME (MINUTES)
CIGARETTE
GUM AND SACHET

FIG. 1.

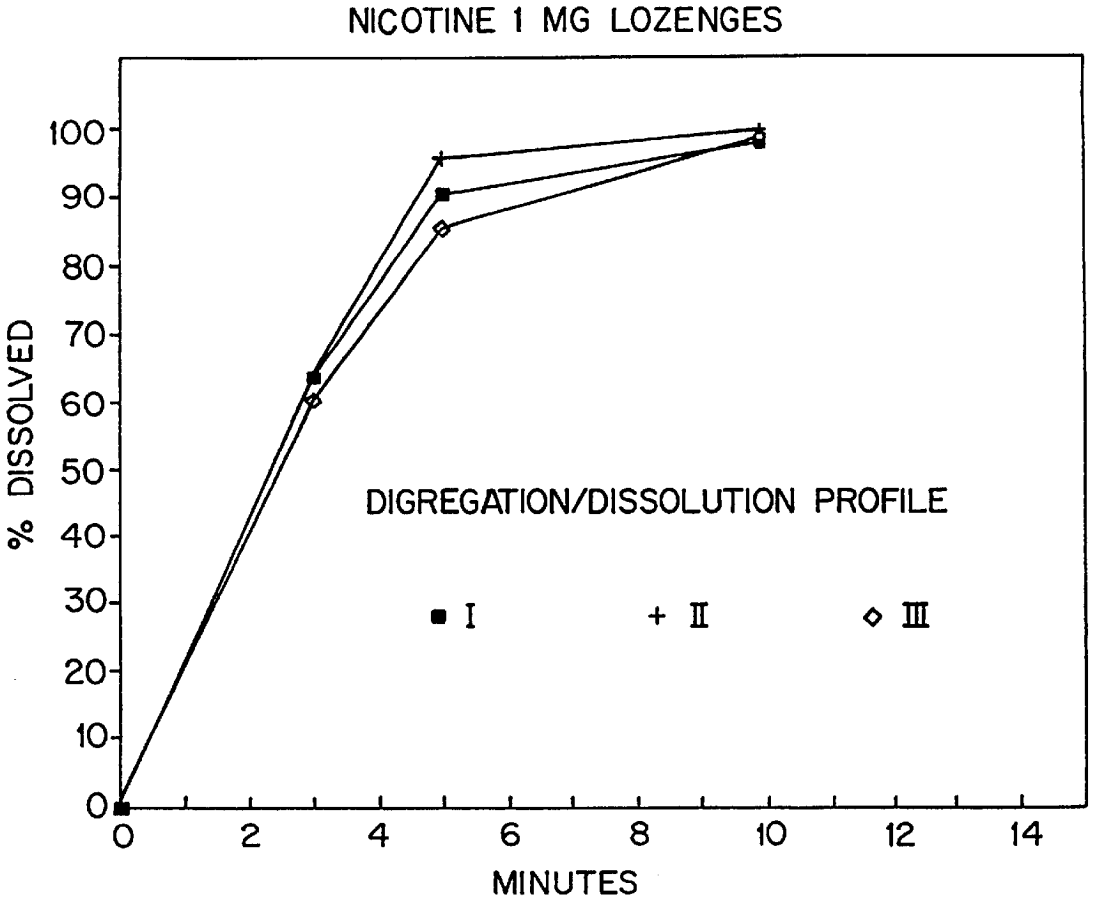

NICOTINE 1 MG LOZENGES
% DISSOLVED
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
14
MINUTES
DIGREGATION/DISSOLUTION PROFILE
I
II
III

FIG. 2.

NICOTINE LOZENGE

This is a division of application Ser. No. 08/097,962, filed Jul. 26, 1993 now U.S. Pat. No. 5,549,906.

BACKGROUND OF THE INVENTION

This invention pertains to compositions and therapeutic methods for reducing the craving for nicotine and for smoking cessation. More particularly, this invention is directed to improved compositions of nicotine lozenges and therapeutic methods to provide periodic doses of nicotine to persons who are attempting to quit smoking.

Nicotine replacement therapy as an aid to quitting smoking has been become increasingly popular. Nicotine chewing gum (nicotine polacrilex) and transdermal nicotine are two of the more popular forms of nicotine replacement available commercially. It has become clear, however, that the mere replacement of cigarettes with another nicotine source may not be sufficient to insure success in smoking cessation therapy. Specifically, conventional nicotine replacement therapy does not adequately address the symptoms associated with the cessation of smoking.

Of the many smoking withdrawal symptoms, craving for cigarettes is one of the most difficult to alleviate. As described in Steuer, J. D. and Wewers, M. E. in *Oncology Nursing Forum* 1989, 16, 193–198, cigarette craving is one of the most consistent, most severe, and earliest withdrawal symptoms experienced by those attempting to quit smoking. Some reports suggest that craving peaks over the first 24 to 72 hours of abstinence and then declines, although craving has been reported after five years of abstinence.

Research is focusing on the factors that precipitate craving in an attempt to better understand and deal with the problem of relapse. Some investigators believe that certain smokers are much more likely than others to experience craving symptoms, especially when trying to quit smoking. Based on literature reports and his own investigations, Harrington (in *Br. J. Soc. Clin. Psychol.* 1978, 17, 363–371) reported that smokers can be separated by craving versus noncraving status, and that these separate populations have different responses to smoking cessation therapy. (In his study, treatment consisted of various behavioral strategies, and nicotine replacement was not used.) In particular, abstinence during treatment and success at the end of treatment were significantly related to being a noncraver.

Most commercially available products for nicotine replacement in smoking cessation therapy have not specifically addressed the issue of satisfying craving for nicotine. Instead, as mentioned above, they have generally been targeted towards providing a stable baseline level of nicotine in the blood. Some evidence indicates that low consistent blood levels of nicotine (as provided by transdermal nicotine, and to a lesser extent by nicotine gum) relieve some of the symptoms of nicotine withdrawal, but craving symptoms may not be among these (see Russell, M. A. H. in *Nicotine Replacement: a Critical Evaluation;* Pomerleau, O. F. and Pomerleau, C. S., Eds.; Alan R. Liss, Inc.: New York, 1988; pp 63–94). This may be because cigarette smoking provides an initial sharp rise in blood level, which is missing in these nicotine replacement therapies. The blood level peak produced by cigarettes is both higher (between 30–40 ng/mL) and sharper (this peak is attained within 10 minutes) than the steadier levels obtained from gum or a transdermal system. Russell states that the optimal steady-state blood level for nicotine replacement is between 10–15 ng/mL, but that quick-rise effects are probably necessary for more

complete relief from craving in the early stages of cigarette withdrawal. His investigations have indicated that a rise in nicotine blood level of at least 10 ng/mL in 10 minutes is required to obtain postsynaptic effects at nicotinic cholinergic receptors in the central nervous system and at autonomic ganglia. These postsynaptic effects may be responsible for drug-like "high" feelings such as lightheadedness or dizziness experienced by cigarette smokers.

As mentioned above, nicotine gum (nicotine polacrilex) is one of the commercially available sources of nicotine for replacement therapy. Nicotine gum is actually an ion-exchange resin that releases nicotine slowly when the patient chews, and the nicotine present in the mouth is delivered directly to the systemic circulation by buccal absorption. However, much of the nicotine is retained in the gum through incomplete chewing or is largely wasted through swallowing, so that the systemic bioavailability of nicotine from gum is low and averages only 30–40%. Moreover, compared with cigarette smoking, nicotine gum is a slow and inefficient source of nicotine.

Nicotine replacement through transdermal nicotine systems is another therapy that has become commercially available. These nicotine patches provide a low, consistent blood level of nicotine to the user, and bypass the first pass effects of the gut and liver. Transdermal nicotine systems can be designed to provide higher steady-state blood levels of nicotine, but are unable to provide blood level peaks or to provide a rapid increase in blood level. Thus both nicotine gum and transdermal nicotine compete with each other as products providing steady-state nicotine blood levels, but do not satisfy craving symptoms for cigarettes in some smokers.

Other nicotine replacement products that are on the market or have been proposed in the literature have not been of serious interest in smoking cessation therapy, because of problems related to their use, and also because of limited ability to satisfy craving for cigarettes. Nicotine vapor has been delivered to patients in aerosol form, similar to the inhaler technology used to supply bronchial asthma medications, and in a "smokeless cigarette" such as that marketed by Advanced Tobacco Products under the trade name Favor®. Some data indicate, however, that these modes of nicotine delivery do not result in significant nicotine blood levels in patients after use. In addition, inhalation of these nicotine vapor products may be too irritating to the mucosa to be tolerable by patients.

Another smokeless version of nicotine delivered to the buccal mucosa is provided by chewing tobacco, oral snuff, or tobacco sachets. Tobacco sachets, which are especially popular in Scandinavia and the U.S., contain ground tobacco in packets that are sucked or held in the mouth. However, as shown in FIG. **1** (cigarette, nicotine gum, and tobacco sachet levels from Russell, M. A. H., Jarvis, M. J., et al. Lancet 1985, 2 1370), use of tobacco sachets results in nicotine blood levels that are more comparable to those resulting from nicotine gum use than from those resulting from cigarette smoking; i.e. they require approximately 30 minutes of use to attain the maximum level of approximately 12 ng/mL, which is less than half of the peak value from smoking one cigarette. One possible reason that nicotine from tobacco sachets is absorbed so slowly is that nicotine is released slowly into the mouth as with nicotine gum; another may be that a significant proportion of the nicotine is swallowed, and therefore subject to the first pass effect of the stomach and liver. In any case, these oral delivery forms may be useful for producing low, steady-state nicotine blood levels, but they do not provide the peak levels needed to satisfy craving.

The literature describes other capsules, tablets, and lozenges for oral delivery of nicotine. For example, WO 8803803 discloses a chewable capsule filled with a liquid containing 0.1–10.0 mg of nicotine, together with additives for improving flavor and dispersion. The capsules are provided in a variety of pH values to allow the patient a choice of nicotine absorption rate, and are especially intended as an aid to quitting smoking.

Another nicotine capsule formulation is disclosed by M. E. Jarvik et al. (in *Clin. Pharm. Ther.* 1970, 11, 574–576) for ingestion as a smoking cessation aid. These capsules, however, were apparently swallowed whole by the subjects, according to the theory that intestinal absorption of nicotine could produce significant blood levels. The study showed a small but significant decrease in the number of cigarettes smoked by subjects, but no quantitative measurements of nicotine blood levels were obtained.

The literature also describes different designs of tablets for delivering nicotine to the mouth and digestive system. BE 899037 discloses a tablet containing 0.1 to 5 mg nicotine as a base or water-soluble acid salt as an aid for quitting smoking.

Wesnes and Warburton (in *Psychopharmacology* 1984, 82, 147–150; and *Psychopharmacology* 1986, 89, 55–59) discuss the use of nicotine tablets in experiments examining the effects of nicotine on learning and information processing. In the first experiment, nicotine was added to dextrose tablets with a drop of tabasco sauce added to disguise the taste of nicotine. In the second experiment, nicotine was added to magnesium hydroxide tablets, under the theory that an alkaline environment in the mouth would enhance buccal absorption. Again, tabasco sauce was added to the tablets to mask the taste of nicotine in both active and placebo tablets. The subjects were instructed to hold the tablets in the mouth for 5 minutes before swallowing, in order to maximize contact with the buccal mucosa.

Shaw (for example in GB 2142822 and U.S. Pat. No. 4,806,356) describes a nicotine lozenge prepared from a mixture of inert filler material, a binder, and either pure nicotine or a nicotine-containing substance by cold compression. The lozenges are intended to be held in the mouth as they dissolve slowly and release nicotine gradually in the buccal cavity.

WO 9109599 describes a nicotine product for oral delivery in the form of an inclusion complex of nicotine and a cyclodextrin compound. The patent also discusses the use of various excipients and direct compression for manufacture of the product.

In recent years, several nicotine lozenges have been commercialized and are available as over-the-counter products in the U.K. Resolution® lozenges, manufactured by Phoenix Pharmaceuticals and distributed by Ernest Jackson, contain 0.5 mg nicotine, together with the anti-oxidant vitamins A, C, and E. Stoppers® lozenges, distributed by Charwell Pharmaceuticals Ltd., contain 0.5 mg nicotine and are available in chocolate, orange and peppermint flavors.

Since nicotine has an acrid, burning taste, these nicotine lozenges typically are formulated with sugar as a major component. However, weight gain after smoking cessation has been identified as a significant factor contributing to smoking relapse. According to a recent survey, current smokers who had tried to quit were asked to judge the importance of several possible reasons for their return to smoking. Twenty-seven percent reported that "actual weight gain" was a "very important" or "somewhat important" reason why they resumed smoking: twenty-two percent said that "the possibility of gaining weight" was an important reason for their relapse. See The Health Benefits of Smoking Cessation: A Report of the Surgeon General, Executive Summary (1990). Thus, sugar-based nicotine lozenge formulations may be unacceptable for a smoking cessation program for those subjects concerned with weight gain.

To date, it has been difficult to deliver nicotine in a profile mimicking the nicotine blood levels achieved by consistent smoking, to satisfy cravings for nicotine in people who are attempting to quit smoking, and thus, to provide greater protection against relapse than other nicotine replacement therapies for people who are trying to quit smoking. It is therefore desirable to provide improved lozenge compositions and methods which avoid the disadvantages of these conventional nicotine delivery devices and methods while providing an effective means for delivering nicotine.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides for the use of nicotine lozenges containing nonnutritive sweeteners as a method of reducing craving for nicotine and of smoking cessation therapy. More specifically, the present invention provides a novel method for producing transient blood levels of nicotine mimicking the effects of cigarette smoking, comprising the periodic use of nicotine lozenges, preferably comprising nicotine, an absorbent excipient, and a nonnutritive sweetener, and more preferably a combination of nonnutritive sweeteners, to provide rapid delivery of nicotine to the buccal mucosa. The nicotine lozenges are designed to be held in the patient's mouth and sucked, and to release nicotine into the buccal cavity. In a preferred embodiment, the nicotine is released rapidly with maximum nicotine blood levels occurring from 2 to 30 minutes after administration of the lozenge.

The lozenges contain fairly low doses, preferably less than 5 mg, and most preferably from 0.5 to 2.0 mg, of nicotine. In particularly preferred embodiments, the nicotine is dispersed in mannitol or β-cyclodextrin and the lozenge is a buffered formulation, preferably at a pH of 6–11, and more preferably at a pH of 7–9. In the most preferred formulation, the lozenge contains the nonnutritive sweetener xylitol, known for its noncariogenic properties, in combination with the sweetener ammonium glycyrrhizinate.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. **1** is a graph of average nicotine plasma levels (nanograms (ng)/milliliter (mL)), resulting from use of cigarettes, tobacco sachets, or nicotine gum, as a function of time (minutes).

FIG. **2** is a graph of the disintegration/dissolution profiles (weight % dissolved) of three different lozenge formulations, each containing 1 mg nicotine, as a function of time (minutes).

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT

I. Terminology

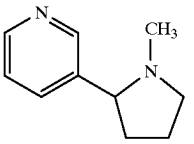
Unless otherwise stated, the following terms used in the specification and claims have the meanings given below:

"Buccal administration" refers to any system or device for oral administration of a drug to a patient that is held in the mouth and is used to deliver a drug through the buccal mucosa and into the patient's body. This term includes, but is not limited to, lozenges, capsules, and tablets.

"Essential oil" refers to a natural oil with a distinctive scent secreted by the glands of certain aromatic plants

having terpenes as the major component. Examples of essential oils include, but are not limited to, citrus oils, flower oils (e.g., rose and jasmine), and oil of cloves.

"Nicotine" refers to nicotine free base, i.e., a compound having the formula:



"Nicotine salt" refers to any mono- or bis- pharmaceutically acid addition acceptable salt or metal salt of nicotine.

"Nicotine lozenge" refers to any lozenge, capsule, tablet, or other device for buccal delivery of nicotine.

"Nonnutritive sweetener" refers to a synthetic or natural substance whose sweetness is higher than or comparable to sucrose and which may have properties such as reduced cariogenicity, health benefits for diabetics, or reduced caloric value compared to sugars.

"Pharmaceutically acceptable acid addition salt" refers to those salts which retain the biological effectiveness and properties of the free bases and which are not biologically or otherwise undesirable, formed with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid and the like, and organic acids such as acetic acid, propionic acid, glycolic acid, pyruvic acid, oxalic acid, malic acid, malonic acid, succinic acid, maleic acid, fumaric acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, cinnamic acid, mandelic acid, menthanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, p-toluenesulfonic acid, salicylic acid and the like. For a description of pharmaceutically acceptable acid addition salts, see Bundgaard, H., ed., (1985) *Design of Prodrugs,* Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

"Pharmaceutically acceptable metal salt" refers to those salts which retain the biological effectiveness and properties of the free bases and which are not biologically or otherwise undesirable, formed with alkali metal ions such as sodium or potassium; alkaline earth metal ions such as calcium and magnesium; and other metal ions such as zinc.

II. The Lozenge

The present invention provides for lozenges used to deliver nicotine to a patient for reducing his craving for nicotine and for smoking cessation therapy, and methods of using nicotine lozenges for this purpose, including but not limited to the embodiments and methods described below. The nicotine lozenge of the present invention comprises any lozenge, tablet, or capsule formulation that delivers nicotine to the buccal cavity, comprising nicotine dispersed in an absorbent excipient and a nonnutritive sweetener.

A. Nicotine

Nicotine is a heterocyclic compound that exists in both a free base and a salt form. The free base is extremely volatile and is absorbed readily through mucous membranes and intact skin. The major problems reported for products based on nicotine free base originate from the volatility of the nicotine, its acrid, burning taste, the irritant sensation of the mucous membranes, and the decomposition of nicotine in the presence of oxygen. Previously, these problems have been alleviated, in part, through the use of nicotine's salt form, i.e., an acid addition salt or metal salt.

Surprisingly, the lozenges described herein can be produced from either the free base or a pharmaceutically acceptable acid addition salt thereof, or any combination thereof. In the exemplary embodiment, nicotine, i.e., the free base form of nicotine, is used.

Regardless of the formulation used, the lozenge contains fairly low doses of nicotine, preferably between 0.5 and 5 mg, and most preferably from 0.5 to 2.0 mg, to avoid accidental overdosage by swallowing the lozenge intact. High doses are not required because the purpose of the nicotine lozenge is to provide a transient blood level peak of nicotine.

B. The Absorbent Excipient

According to the compositions and methods described herein, the nicotine is dispersed in an absorbent excipient. Absorbent excipients are pharmaceutically acceptable substances that are capable 1) of reducing the volatility of the nicotine, for example, through absorption or by the incorporation of nicotine, such as in an inclusion complex, and 2) of being compressed into a lozenge or tablet. Suitable absorbent excipients include, but are not limited to, mannitol; cyclodextrins, including α, β, and γ-cyclodextrin, as well as derivatives of cyclodextrins, such as trimethyl-β-cyclodextrin, dimethyl-β-cyclodextrin, hydroxyethyl-β-cyclodextrin, and hydroxypropyl-β-cyclodextrin; silica preparations, such as the synthetic silica formulation marketed under the trade name syloid™ by W. R. Grace Limited of North Dale House, North Circular Road, London; cellulosic materials, such as Avicel microcellulose manufactured by FMC Corporation; and other conventional binders and fillers used in the food industry, such as acacia powder, gelatin, gum arabic, and sorbitol.

According to some embodiments, the absorbent excipient will serve more than one role in the lozenge formulation. For example, mannitol can function as both a nonnutritive sweetener and an absorbent excipient. Similarly, the absorbent excipient can serve as a flavorant, buffering agent, lubricant, or other component of the lozenge.

The absorbent excipient is typically present in an amount between about 5 and 25% by weight (wt %), preferably in an amount between about 5 and 20 wt %, and more preferably in an amount between about 5 and 15 wt %.

In a preferred embodiment, the absorbent excipient comprises mannitol or β-cyclodextrin.

C. The Nonnutritive Sweetener

The lozenge will also contain a nonnutritive sweetener. Since nicotine has an acrid, burning taste, the choice of a sweetener for a nicotine lozenge can be critical, for many patients do not find the taste of nicotine palatable in lozenge form. Typically, a nonnutritive sweetener or combination of sweeteners will be utilized in the lozenges described herein.

A nonnutritive sweetener is a synthetic or natural sugar substitute whose sweetness is higher than or comparable to sucrose. Table I lists examples of nonnutritive sweeteners and their relative sweetness values.

TABLE I

Nonnutritive Sweeteners

Sweetener	Sweetness[1]	Sweetener	Sweetness[1]
Saccharin	400–500	Invert sugar	1.1–1.2
Cyclamate	30–40	Palantinose	0.4–0.5
Aspartame	100–200	Xylitol	1.0
Acesulfame	200	Sorbitol	0.5–0.6
Monellin	2500	Mannitol	0.4–0.6
Neohesperidine	1000	Maltitol	0.7–0.9
Palatinit	0.4–0.5	—	—

[1]Sucrose = 1.0

Thus, the nonnutritive sweetener should have a relative sweetness value between about 0.4 and 2500, as compared

with sucrose, more typically between about 0.4 and 500, preferably between about 0.4 and 200, and more preferably, between about 0.4 and 2. See Makinen (1988) *Oral Health* 78: 57–66, which is incorporated herein by reference.

In a preferred embodiment, the nonnutritive sweetener is also noncariogenic. The cariogenicity of a substance is dependent upon its susceptibility to fermentation by *Streptococcus mutans* and other oral microorganisms. Dental researchers have long recognized that fermentable sweeteners such as sucrose, glucose, starch, and corn syrup are [1] Sucrose =1.0 cariogenic or caries causing. The polyol nonnutritive sweeteners, such as xylitol, sorbitol, fructose, invert sugar, palantinose, mannitol, maltitol, palatinit, and ammonium glycyrrhizinate, however, are generally not fermented to any significant degree and are less cariogenic than sucrose. See Olinger presented at the Interphex-USA Conference/Exhibition, New York; May 8–11, 1990.

More specifically, the ability of xylitol to inhibit the development of new caries has been demonstrated in numerous in vitro and in vivo studies. For example, field trials of oral products containing xylitol have suggested that substitution of sucrose by xylitol in products such as chewing gum may aid in prevention of dental caries (see Söderling, E., and Scheinin, A., *Proc. Finn. Dent. Soc.* 1991, 87(2), 217–229). Studies have also revealed that when xylitol-containing confections are consumed as part of a normal diet, in conjunction with accepted oral hygiene practices, new caries incidence is reduced by about 50% to as high as 80%. See Olinger supra.

Moreover, the literature suggests that nonnutritive sweeteners, and particularly xylitol, may be useful as a sugar substitute for weight control, (see U.S. Pat. No. 3,717,711), which is clearly a major concern for people who are quitting smoking. In addition, xylitol as been shown to prolong gastric emptying and decrease food intake in humans. See Shafer et al. (1987) *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 744–47. Likewise, because xylitol is not metabolized as a sugar, it has value for use with people who must restrict their sugar intake, such as diabetics (see Maukinen, K., *Oral Health* 1988, 78(9), page 60).

Xylitol also has a cooling effect when it dissolves in the mouth, due to its negative heat of solution. Xylitol's heat of solution is −36.6 cal/g, compared to −28.9 cal/g for mannitol, −26.6 cal/g for sorbitol, and −4.3 cal/g for sucrose (see Olinger, P. M., presented at the Interphex-USA Conference/Exhibition, New York; May 8–11, 1990). Therefore, xylitol is an excellent choice for a sweetener and excipient in a lozenge that needs to be held in the mouth for an extended period of time, and that needs to be taken frequently every day for maximum therapeutic effect.

Frequently a combination of nonnutritive sweeteners will be used. According to one embodiment, a sweetener with temporal sensory properties similar to that of sucrose (i.e., an appearance time of about 4 seconds and an extinction time of 13 seconds, e.g., some of the polyol sweeteners, saccharin, cyclamate and aspartame) will be combined with a sweetener whose sweetness develops slower or persists longer. For example, ammonium glycyrrhizinate, a nonnutritive sweetener with a slight licorice taste, has a taste onset or appearance time of about 16 seconds for ammonium glycyrrhizinate and a taste persistence or extinction time of 69 seconds. Dubois and Lee (1983) *Chem. Sens.* 7: 237–248. Other examples of nonnutritive sweeteners with temporal sensory properties different than that of sucrose include, but are not limited to, neohesperidine dihydrochalcone (appearance time of 9 seconds and an extinction time of 40 seconds) and stevioside (appearance time of 4 seconds and an extinction time of 22 seconds).

Thus, in a preferred formulation, the lozenge will contain a nonnutritive, noncariogenic sweetener, such as xylitol, sorbitol, fructose, invert sugar, palantinose, mannitol, maltitol, and palatinit, either alone or in combination with other nonnutritive sweeteners. More preferably, xylitol, either alone or in combination with a nonnutritive sweetener having an extinction time longer than that of sucrose, such as ammonium glycyrrhizinate, neohesperidine dihydrochalcone, or stevioside, will be used. In an exemplary embodiment, the nonnutritive sweetener will comprise xylitol and ammonium glycyrrhizinate.

The nonnutritive sweetener is typically present in an amount between about 50 and 90 wt %, preferably in an amount between about 70 and 90 wt %, and more preferably in an amount between about 80 and 90 wt %.

D. Other Ingredients

The lozenge preferably is a buffered formulation in order to aid in buccal absorption of nicotine. A preferred formulation is at a pH of about 6–11, and preferably at a pH of about 7–9. Preferred buffered formulations will include sodium carbonate, sodium bicarbonate, sodium phosphate, calcium carbonate, magnesium hydroxide, potassium hydroxide, magnesium carbonate, aluminum hydroxide, and other substances known to those skilled in the art, as well as combinations of the aforementioned substances. In a most preferred formulation, the lozenge will contain sodium carbonate and bicarbonate as buffering agents.

The buffering agent(s) should be present in an amount sufficient to adjust the pH of the lozenge to between 6 and 11, typically, between about 0.1 and 25% by weight (wt %), preferably in an amount between about 0.1 and 10 wt %, and more preferably in an amount between about 0.1 and 5 wt %.

In addition, the lozenge may contain a flavorant, for example, a candy taste, such as chocolate, orange, vanilla, and the like; essential oils such as peppermint, spearmint and the like; or other flavor, such as aniseed, eucalyptus, 1-menthol, carvone, anethole and the like, to mask the taste of nicotine. See Hall et al. *Food Technol.* 14: 488 (1960); 15: 20 (1961); 19: 151 (1965); 24: 25 (1970); 26: 35 (1972); 27: 64 (1973); 27: 56 (1973); 28: 76 (1974); 29: 70 (1974) 31: 65 (1977); 32: 60 (1978); and 33: 65 (1979), each of which is incorporated herein by reference. It may also contain tobacco flavor in order to reproduce some of the sensation of smoking for the user. A small amount of colloidal silica (less than about 1 wt %) typically is added to tablets containing tobacco flavor to aid in manufacturing.

Magnesium stearate and/or hydrogenated vegetable oil may also be added to the formulation as lubricants. Typically, the lubricant will be present in an amount between about 0.1 and 25 wt %, preferably in an amount between about 0.1 and 10 wt %, and more preferably in an amount between about 0.1 and 5 wt %.

The lozenges described herein may also contain a variety of other additives. For example, pharmacologically active ingredients such as sodium monofluorophosphate, sodium fluoride, dextranase, mutanase, hinokitiol, allantoin, aminocaproic acid, tranexamic acid, azulene, vitamin E derivatives, sodium chloride and the like can be added at need. More specifically, since the effects of xylitol and fluoride on dental hygiene are additive, the former can significantly enhance the efficacy of traditional fluoride treatments. Thus, according to one embodiment, fluoride, and more particularly sodium monofluorophosphate or sodium fluoride will be incorporated into a lozenge formulation having xylitol as a nonnutritive sweetener.

In addition, the lozenge may be colored with conventional, pharmaceutically acceptable food coloring

agents. Other additives that may be incorporated within the lozenges described herein include, but are not limited to, preservatives, antimicrobial agents, and antioxidants.

E. The Method of Manufacture

The method of manufacture of these lozenges may be any suitable method known in the art, including but not limited to, the addition of a nicotine compound to premanufactured tablets; cold compression of an inert filler, a binder, and either pure nicotine or a nicotine-containing substance (as described in U.S. Pat. No. 4,806,356, herein incorporated by reference); and encapsulation of nicotine or a nicotine compound. See U.S. Pat. No. 5,135,753, herein incorporated by reference, for examples of methods of manufacture of various nicotine lozenges, sublingual tablets, and gelatin capsules. In a preferred embodiment, the lozenges are formed using direct compression. See Example 4 for a discussion of the manufacturing process in which the nicotine is dispersed in mannitol.

According to another embodiment, an in situ inclusion complex is created with nicotine and β-cyclodextrin using a kneading technique. Specifically, a small amount of a nicotine-water solution is added to cyclodextrin and kneaded or mixed. See Szezetli in *Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes,* Akademiai Kiado: Budapest, 1992; p. 109; herein incorporated by reference. This method of forming the nicotine-cyclodextrin inclusion complex is preferred as it minimizes the use of solvents or diluents and thus, eliminates a purification step in the manufacturing process. See also Example 5 for discussion of use of the kneading technique with nicotine and β-cyclodextrin.

A further embodiment of the present invention provides for the production of inclusion complexes of both the nicotine and the flavorant. This embodiment is employed, for example, when an essential oil, or other volatile flavorant, such as carvone or menthol, is used in the lozenge formulation. As in the case of the nicotine inclusion complexes described herein, incorporation of the flavorant into cyclodextrin decreases the volatility of the flavorant and increases formulation stability. In addition, as the flavorant is slowly released from the complex during lozenge administration, the flavorant will "last" longer and thus, offset the acrid taste of the nicotine for longer periods of time.

According to this embodiment, a mixture of the nicotine and the flavorant, and optionally water, is added to the cyclodextrin and kneaded. Alternatively, the nicotine inclusion complex and the flavorant inclusion complex can be prepared separately and then mixed prior to lozenge formulation.

According to another embodiment, a portion of the non-nutritive sweetener, preferably xylitol, is utilized to hard coat the nicotine lozenge. Traditional pan coating techniques can be employed. Typically, weight increases of approximately 35% can be accomplished in less than three hours. See, e.g., Olinger supra.

The lozenges may be packaged in such a manner as to aid in maintaining nicotine stability. Preferred packaging methods include strip lamination in a foil-like material such as Barex®, or packaging in blisters using a Teflon-like material such as Aclar®. See also, Hunt et al. (1991) U.S. Pat. No. 5,077,104.

As noted above, nicotine is a volatile substance. Others have reported a short shelf-life for nicotine lozenges due to evaporation of the nicotine, particularly when the ambient temperature is above 15° C. See Belcher et al. (1989) *Brit. J. Med.* 298: 570. The lozenges described herein, however, are stable for extended periods of time at elevated temperatures, as shown below in Table 2. See Example 6 for a discussion of the assay procedure used to determine stability.

TABLE 2

Nicotine Lozenge Stability Data

Temperature (° C.)	Time (month)	Appearance	Nicotine mg/loz.	Degradation products	Dissolution test 5 min.	Dissolution test 10 min.
—	Initial	White	1.001	<0.1%	89.7%	99.8%
35	1	Unchanged	0.996	<0.1%	90.3%	100.0%
35	2	Unchanged	0.998	<0.1%	88.7%	100.0%
35	3	Unchanged	1.000	<0.1%	92.2%	99.6%
R.T.	1	Unchanged	1.000	<0.1%	93.1%	99.8%
R.T.	2	Unchanged	0.986	<0.1%	95.3%	99.9%
R.T.	3	Unchanged	1.000	<0.1%	94.5%	100.1%

The lozenges described herein will typically have a weight of between about 70 and 1000 mg and will contain fairly low doses of nicotine, preferably less than 5 mg, and most preferably from 0.5 to 2.0 mg.

III. Method of Use

The present invention further provides a method of using nicotine lozenges to provide periodic transient blood level peaks of nicotine as an aid in reducing symptoms of craving of nicotine. Typically, the lozenges described herein will be used ad libitum by the patient to alleviate cravings for nicotine as they arise. Thus, this method provides for a means for the patient to self-titrate his administration needs.

More specifically, nicotine cravings depend, in part, upon daily stress patterns, sleep and eating habits and body weight, previous smoking levels, and the like. Thus, the desire or need for lozenges (comparable to the desire to smoke cigarettes) typically will vary during any given day and from day to day, as well as from patient to patient. The methods described herein allow the patient to consume lozenges in the amounts and at the times when he most feels the craving for nicotine. As nicotine craving is considered by some to be the most consistent and most severe factor in preventing a person from quitting smoking, this ability to self-titrate and thus, stave off the craving for nicotine will increase the efficacy of a smoking cessation program.

A variety of methods can be utilized to assess the craving for nicotine, including but not limited to, the nicotine craving test specified by the *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Revised Third Edition* (DSM-III-R) (see (1991) *J. Am. Med. Assoc.* 266: 3133); the Shiffman-Jarvik Craving Subscale (see O'Connell and Martin (1987) *J. Consult. Clin. Psychol.* 55: 367–371 and Steur and Wewers (1989) *ONF* 16: 193–198, also describing a parallel visual analog test); West et al. (1984) *Br. J. Addic-*

tion 79: 215–219; and Hughes et al. (1984) *Psychopharmacology* 83: 82– 87, each of which is expressly incorporated herein by reference.

A preferred nicotine craving scale comprises that specified in DSM-III-R. Supra. According to this scale, a subject is asked to rate the severity of his craving for nicotine on a scale between 0 and 4, wherein 0 is none; 1 is slight; 2 is mild; 3 is moderate; and 4 is severe. Using the compositions and methods described herein, the subject should attain at least a one unit, and preferably at least a two unit, decrease in his craving for nicotine as measured by the protocol set forth in DSM-III-R from 2 to 30 minutes after administration of the nicotine lozenge. More preferably, the maximum reduction in craving for nicotine will occur from about 2 to 10 minutes after administration of the nicotine lozenge.

The Shiffman-Jarvik Craving Scale is a six-item, forced-choice, self-report tool that measures cigarette craving. Each item has seven possible responses which correspond to scores ranging from 1 (no craving) to 7 (high craving). A mean score is obtained to determine the respondent's level of craving. A craving typical score measured 48 hours after the initiation of a smoking cessation program is between about 4 and 5; while a two-week follow-up craving scale will typically be between about 3 and 4. Using the compositions and methods described herein, the subject should attain at least a one unit, and preferably at least a two unit, decrease in his craving for nicotine as measured by the protocol set forth in the Shiffman-Jarvik Craving Scale from 2 to 30 minutes after administration of the nicotine lozenge. More preferably, the maximum reduction in craving for nicotine will occur from about 2 to 10 minutes after administration of the nicotine lozenge.

The "craving questionnaire" craving scale employs a five item questionnaire that asks subjects to rate how much they had been missing their cigarettes, how difficult it had been to be without cigarettes, how much they had been aware of not smoking, how preoccupied they had been with thinking about cigarettes, and how much they had craved their cigarettes. The subject responds to each question with a number between 1 and 3, where 1 is low and 3 is high. The ratings are combined to give a single craving score. According to this craving scale, a combined score of between about 9 and 12 is typical. Using the compositions and methods described herein, the subject should attain at least a three unit, and preferably at least a four unit, decrease in his craving for nicotine as measured by the protocol set forth for use with this craving questionnaire from 2 to 30 minutes after administration of the nicotine lozenge. More preferably, the maximum reduction in craving for nicotine will occur from about 2 to 10 minutes after administration of the nicotine lozenge.

Of course, the lozenges can also be used according to a dosage pattern prescribed by a physician. The dosage pattern will vary with the indication. For example, in addition to use in smoking cessation or reduction therapy, the nicotine lozenges described herein can be used for the treatment of Alzheimer's Disease, ulcerative colitis and related conditions, and diseases associated with reduced central cholinergic function, loss of cholinergic neurons, significant reduction in nicotine receptor binding, neurodegenerative dementia, or cognition and memory impairment. See Masterson (1991) U.S. Pat. No. 5,069,904; Wesnes and Warburton (1984) *Psychopharmacology* 82: 147–150; and Warburton et al. (1986) *Psychopharmacology* 89: 55–59.

The lozenge should be administered without holding any other substance, such as food or beverage, in the mouth. It is particularly important that acidic substances or beverages such as fruits, coffee, tea, or fruit juices are not consumed immediately or concurrently with the nicotine lozenge, in order to insure that a basic environment is maintained within the mouth.

The lozenge is preferably held from 2–10 minutes in the mouth as it dissolves completely and releases nicotine into the mouth, and the dissolved nicotine solution is held in the mouth for as long as possible so that the nicotine is absorbed through the buccal mucosa.

Example 7 describes a protocol for measuring nicotine blood levels in patients using the nicotine lozenge of the present invention. Use of the lozenge will result in a transient nicotine blood level peak from 2 to 30 minutes, and more preferably from 2 to 10 minutes, after the lozenge is placed in the mouth.

FIG. **2** presents the disintegration/dissolution profiles of the three formulations described in Examples 1–3 (Formulation 1 contains nicotine, mannitol, xylitol, mint flavor, and other excipients; Formulation 2 contains nicotine, mannitol, xylitol, tobacco flavor, and other excipients; and Formulation 3 contains nicotine, cyclodextrin, xylitol, and mint flavor). As shown in FIG. **2**, lozenges formulated according to the present invention will be at least 60% dissolved after 3 minutes in the mouth, at least 80% dissolved after 5 minutes, and approximately 100% dissolved after 10 minutes.

Specific examples of the composition of this invention are set forth below.

In order that the invention described herein can be more fully understood, the following examples are set forth. It should be understood that these examples are for illustrative purposes only, and are not to be construed as limiting this invention in any manner.

EXAMPLE 1

Nicotine Lozenge Formulation with Xylitol, Mannitol, and Mint Flavor

Ingredients	mg/tablet
Nicotine	1.0
Mannitol	200.0
Xylitol	1309.0
Mint flavor	20.0
Ammonium glycyrrhizinate	15.0
Sodium carbonate	5.0
Sodium bicarbonate	15.0
Hydrogenated vegetable oil	25.0
Magnesium stearate	10.0

Manufacturing process

Nicotine was dispersed in mannitol.

The powders were mixed.

The mixture was compressed with a suitable alternative tablet press, using a square 16 mm-punch dosing 1600 mg/tablet.

Packaging

Tablets were packed into strips of aluminum/Barex.

EXAMPLE 2

Nicotine Lozenge Formulation with Xylitol, Mannitol, and Tobacco Flavor

Ingredients	mg/tablet
Nicotine	1.0
Mannitol	200.0
Xylitol	1316.5
Tobacco flavor	6.0

-continued

Ingredients	mg/tablet
Colloidal silica	1.5
Ammonium glycyrrhizinate	15.0
Sodium carbonate	5.0
Sodium bicarbonate	15.0
Hydrogenated vegetable oil	30.0
Magnesium stearate	10.0

Manufacturing process

Nicotine was dispersed in mannitol.

The powders were mixed.

The mixture was compressed with a suitable alternative tablet press, using a square 16 mm-punch dosing 1600 mg/tablet.

Packaging

Tablets were packed into strips of aluminum/barex.

EXAMPLE 3

Nicotine Lozenge Formulation with Xylitol, β-Cyclodextrin, and Mint Flavor

Ingredients	mg/tablet
Nicotine	1.0
β-cyclodextrin	109.0
Water	10.0
Xylitol	1400.0
Mint flavor	20.0
Ammonium glycyrrhizinate	15.0
Sodium carbonate	5.0
Sodium bicarbonate	15.0
Hydrogenated vegetable oil	25.0
Magnesium stearate	10.0

Manufacturing process

Nicotine was dispersed in β-cyclodextrin.

The powders were mixed.

The mixture was compressed with a suitable alternative tablet press, using a square 16 mm-punch dosing 1600 mg/tablet.

Packaging

Tablets were packed into strips of aluminum/barex.

EXAMPLE 4

Manufacturing Process for Nicotine Lozenge Formulation with Xylitol, Mannitol, and Mint Flavor

1) Preparation of the nicotine-mannitol mixture

One kg of mannitol was sieved through a 50 mesh sieve and was placed in a Tonazzi mixer. Next, 10 g of nicotine were added slowly with mixing for 10 minutes. The mixture was transferred to a 2 liter amber glass bottle and mixed for 15 minutes in a Turbula mixer.

2) Preparation of the granulate

A quantity of 50.5 g of the mixture from (1) above and 654.5 g of Xilitab 200 (xylitol) were sieved with a 20 mesh sieve, and then were mixed with 50 g mannitol, 5 g magnesium stearate, 12.5 mg Lubritab (hydrogenated vegetable oil), 10 g mint flavor, 7.5 g ammonium glycyrrhizinate, 7.5 g sodium bicarbonate, and 2.5 g sodium carbonate, and was sieved through a 50 mesh sieve. The mixture was transferred to a 2 liter amber glass bottle and mixed for 15 minutes in a Turbula mixer.

3) Tablet formation

The mixture was tabletted in a Belloni alternative press, using a 16-mm^2 punch. Tablet weight was 1600 mg/tablet.

4) Packaging

The tablets were packaged into strips of paper/aluminum/Barex.

EXAMPLE 5

Manufacturing Process for Nicotine Lozenge Formulation with Xylitol, β-Cyclodextrin, and Mint Flavor

1) Preparation of the nicotine - β-cyclodextrin complex

An initial quantity of 56.76 g of β-cyclodextrin was placed in a 400 mL beaker and 5.68 g of H_2O (equivalent to 10% of the powder) was added with stirring. The water was added in amounts of 1.9 g at a time, with stirring for 10 minutes at each step. The powder, before addition of nicotine, was similar to a wet granulate. Next, 6.37 g of nicotine was added very slowly with stirring, and at the end of the process the granulate was stirred for 10 minutes. The obtained granulate was dried in an oven at 35° C. for 2 hours. A sample was then analyzed for nicotine content.

2) Preparation of the dry granulate

A quantity of 5.25 g of the nicotine - β-cyclodextrin complex, 50 g of β-cyclodextrin, 5 g magnesium stearate, 12.5 g Lubritab® (hydrogenated vegetable oil), 10 g mint flavor, 7.5 g ammonium glycyrrhizinate, 7.5 g sodium bicarbonate, and 2.5 g sodium carbonate were sieved through an 80 mesh sieve. Next, 700 g of Xilitab® 100 (xylitol) was sieved through a 50 mesh sieve. The mixture was mixed in a Turbula mixer for 20 minutes.

3) Tablet formation

The mixture from (2) above was tabletted with a Belloni tablet press equipped with square punches. Tablet weight was 1600 mg/tablet.

4) Packaging

The tablets were put in strips of paper/aluminum/Barex having the following composition: paper 50 g/m^2, aluminum 12μ thickness, 32 g/m^2, Barex 35 g/m^2.

EXAMPLE 6

Nicotine Lozenge Stability Assay

One nicotine lozenge was crushed and placed in a 50 mL volumetric flask. To the flask was then added tetrahydrofuran (25 mL) and the flask was transferred to a sonicating bath where it was allowed to stand for 20 minutes. Sufficient ethyl acetate was added to bring the solution up to 50 mL. A portion of this solution (1 mL) was removed and placed in a 25 mL volumetric flask. To this flask was then added a few milliliters of water and 0.25 mL of an internal standard solution consisting of 50 mg acetanilide diluted to 100 mL with water. The organic solvents were removed using a gentle nitrogen gas flow which resulted in a cloudy solution. Sufficient water was then added to the cloudy solution to bring the volume of the solution to 25 mL. The solution was then filtered through a 0.22 mcm membrane.

The amount of nicotine in the sample was determined using high performance liquid chromatography (column temperature, 30±1° C.; mobile phase, water:methanol:acetate buffer (0.1 M, pH=4.0):acetonitrile 60:31:7:2, adjusted to pH=6.82 with triethylamine, filtered, and deaerated; mobil phase flow rate, 1.0 mL/min; solid phase, Supelcosil LC1808 (5 mcm) 25 centimeters (cm) ×4.6 millimeters (mm), available from Supelco Inc.; and analytical wavelength 254±1 nanometers (nm)). Under these conditions,

nicotine and acetanilide had retention times of about 7.7 and 9.3 minutes, respectively. The ratio of the components in the mobile phase can be varied to provide suitable elution times for the nicotine and the internal standard.

EXAMPLE 7

In Vivo Measurement of Nicotine Release from a Lozenge

A clinical trial of the lozenge described in Example 1 involves six patients who are each given one lozenge on study day 1 at 8:00 a.m. A pre-dose blood sample is taken before each administration. The patients are asked to suck the lozenge. Blood samples are taken at 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, and 240 minutes. In addition, immediately after the lozenge has dissolved, the patient notifies the medical staff so that the time of dissolution can be recorded.

Blood samples of 5 mL are collected in lithium heparinate tubes. Immediately after collection, the samples are cooled and centrifuged at 4° C. at 1500 rpm for 15 minutes. The plasma is then transferred to polypropylene tubes and stored at −30° C. until analysis for nicotine and cotinine. A capillary gas chromatographic method is used for the analysis of nicotine and cotinine. The detection limit is 0.8 ng/mL for nicotine and 5.0 ng/mL for cotinine. The quantitative determination limit is 1.0 ng/mL for nicotine and 10 ng/mL for cotinine.

The disclosures in this application of all articles and references, including patent documents, are incorporated herein by reference.

It is to be understood that the above description is intended to be illustrative and not restrictive. Many embodiments will be apparent to those of skill in the art upon reviewing the above description. The scope of the invention should, therefore, be determined not with reference to the above description, but should instead be determined with reference to the appended claims, along with the full scope of equivalents to which such claims are entitled.

What is claimed is:

1. A nicotine lozenge consisting of 1 mg nicotine, 200 mg mannitol, 1309 mg xylitol, 20 mg mint flavor, 15 mg ammonium glycyrrhizinate, 5 mg sodium carbonate, 15 mg sodium bicarbonate, 25 mg hydrogenated vegetable oil, and 10 mg magnesium stearate.

2. A nicotine lozenge consisting of 1 mg nicotine, 200 mg mannitol, 1316.5 mg xylitol, 6 mg tobacco flavor, 1.5 mg colloidal silica, 15 mg ammonium glycyrrhizinate, 5 mg sodium carbonate, 15 mg sodium bicarbonate, 30 mg hydrogenated vegetable oil, and 10 mg magnesium stearate.

3. A nicotine lozenge consisting of 1 mg nicotine, 109 mg betacyclodextrin, 10 mg water, 1400 mg xylitol, 20 mg mint flavor, 15 mg ammonium glycyrrhizinate, 5 mg sodium carbonate, 15 mg sodium bicarbonate, 25 mg hydrogenated vegetable oil, and 10 mg magnesium stearate.

* * * * *

US006569416B1

(12) **United States Patent**
Laub

(10) **Patent No.: US 6,569,416 B1**
(45) **Date of Patent: *May 27, 2003**

(54) **COMPOSITIONS CONTAINING SYNTHETIC SOIL-EXTRACT MATERIALS AND MEDICAMENTS BASED THEREON**

(75) Inventor: **Richard J. Laub**, Newport Beach, CA (US)

(73) Assignee: **Lamb Biochemicals Corp.**, Newport Beach, CA (US)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

This patent is subject to a terminal disclaimer.

(21) Appl. No.: **09/345,865**

(22) Filed: **Jul. 1, 1999**

Related U.S. Application Data

(62) Division of application No. 08/798,329, filed on Feb. 10, 1997, now Pat. No. 5,945,446.

(51) **Int. Cl.**[7] **A61K 31/74**; A61K 39/385; A61K 31/35

(52) **U.S. Cl.** **424/78.02**; 424/195.11; 514/456

(58) **Field of Search** 424/78.02, 683

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

4,921,840 A		5/1990	Seubert et al.	
4,999,202 A	*	3/1991	Cronje et al.	424/683
5,284,651 A		2/1994	Riede et al.	

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

DE	3830333 C1	3/1990
DE	0537430 A1	4/1993
DE	41 34 378 A1	4/1993
EP	0119768 A1	9/1984

OTHER PUBLICATIONS

"Selective Inhibitory Activity of Polyhydroxycarboxylates Derived from Phenolic Compounds Against Human Immunodeficiency Virus Replication"—Dominique Schols, Peter Wutzler, Renate Kloching, Bjorn Helbig, and Erik De Clercq Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes; 4:677–685, 1991 Raven Press, Ltd. New York.

"Sulfated Polysaccharides Are Potent and Selective Inhibitors of Various Enveloped Viruses, Including Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, Vesicular Stomatitis Virus, and Human Immunodeficiency Virus"—Masanori Baba, Robert Snoeck, Rudi Pauwels, and Erik De Clercq Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nov. 1988, p. 1742–1745, vol. 32, No. 11.

"Comparison of Core Antigen (p24) Assay and Reverse Transcriptase Activity for Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication"—Sally Land, Fiona Beaton, Dale A. McPhee, and Ian D. Gust Journal of Clinical Microbiology, Mar. 1989, p. 486–489, vol. 27, No. 3.

WO 95/08335—PCT—Treatment Of HIV Infection With Humic Acid—Mar. 30, 1995.

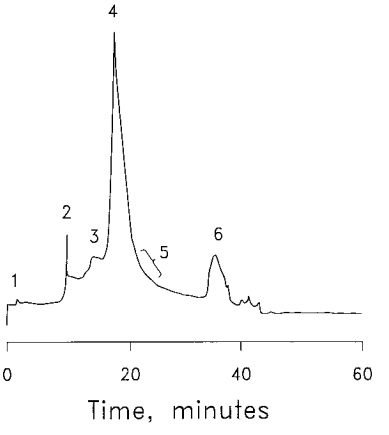
(List continued on next page.)

Primary Examiner—Thurman K. Page
Assistant Examiner—Blessing Fubara
(74) *Attorney, Agent, or Firm*—Knobbe, Martens, Olson & Bear, LLP

(57) **ABSTRACT**

Compositions for treating viral and bacterial diseases are described. The compositions contain a synthetic soil phenolic polymeric material which contains sulfur, boron, alkaline earth, or transition metals but does not contain nitrogen. The synthetic materials may be synthetic humic acids or fulvic acids. The polymeric materials in the compositions are prepared by oxidizing one or more organic phenols in the presence of inorganic salts. Polymeric materials prepared from organic phenols having at least one carboxylic acid group are especially effective. The compositions can be injected, applied topically, ingested, inhaled, or applied as a suppository.

23 Claims, 3 Drawing Sheets



OTHER PUBLICATIONS

HealthGate Document—R. Ansorg et al.—Studies On The Antimicrobial Effect Of Natural And Synthetic Humic Acids—*Arzeimittelforschung* 1978, 28(12), pp. 2195–2198.

HealthGate Document—K.D. Thiel et al.—Comparison Of The In Vitro Activities Of Ammonium Humate And Of Enzymically Oxidized Chlorogenic And Caffeic Acids Against Type 1 And Type 2 Human Herpes Virus—*Pharmazie* 1981, 36(1), pp. 50–53.

HealthGate Document—H. Schultz—Investigations On The Viricidal Effects Of Humic Acids In Peat–Mull—*Dtsch Tierarztl Wochenschr* Jul. 1, 1965, 72(13), pp. 294–297.

HealthGate Document—R. Klocking et al.—Antiviral Properties Of Humic Acids—*Experientia* May 15, 1972, 28(5), pp. 607–608.

HealthGate Document—G. Sydow et al.—The Effect Of Phenolic Polymers On Retroviruses—*Pharmazie* Dec. 1986, 41(12), pp. 865–868.

R. Klocking and M. Sprossig—*Experientia* 1972 28(5)—pp. 607–608.

HealthGate Document—R. Klocking et al.—Antiviral Activity Of Phenolic Polymers Against Type 1 Herpesvirus Hominis—*Pharmazie* Aug. 1978, 33(8), p. 539.

HealthGate Document—F. Schiller et al.—Results Of An Oriented Clinical Trial Of Ammonium Humate For The Local Treatment Of Herpesvirus Hominus (HVH) Infections—*Dermatol Monatsschr* Jul. 1979, 165(7), pp. 505–509.

HealthGate Document—B Helbig et al.—Therapeutic Effect Of (E)–5–(2–Bromovinyl)–2'–Deoxyuridine, Caffeic Acid Oxidation Product, And Trisodiumphosphonoformate On Cutaneous Herpes Simplex Virus Type 1 Infection In Guinea Pigs—*J Med Virol* Nov. 1987, 23(3), pp. 303–309.

R. Klocking—Interaction Of Humic Acids And Humic–Acid–Like Polymers With Herpes Simplex Virus Type 1—*Humanic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment*, Berlin 1991, pp. 408–412.

HealthGate Document—In Vitro Studies Of The Antiviral Activity Of Enzymatically Oxidized O–Diphenolic Compounds Against Herpes Simplex Virus Type 1 And 2—*Zentralbl Bakterios* (*Orig. A*) Mar. 1979, 234(2), pp. 159–169.

HealthGate Document—K.D. Thiel et al.—In Vitro Studies Of The Antiviral Activity Of Ammonium Humate Against Herpes Simplex Virus Type 1 And Type 2—*Zentralbl Bakteriol* (*Orig. A*) Nov. 1977, 239(3), pp. 304–321.

HealthGate Document—K.D. Thiel et al.—Comparison Of The In Vitro Activities Of Ammonium Humate And Of Enzymically Oxidized Chlorogenic And Caffeic Acids Against Type 1 and Type 2 Human Herpes Virus—*Pharmazie* 1981, 36(1), pp. 50–53.

HealthGate Document—K.D. Thiel et al.—Antiviral Activity Of Enzymatically Oxidized Caffeic Acid Against Herpesvirus Hominis Type 1 And Type 2—*Acta Virol* May 1983, 27(3), pp. 200–208.

HealthGate Document—K.D. Thiel et al.—Antiviral Effect Of Enzymatically And Nonenzymatically Oxidized Caffeic And Hydrocaffeic Acids Against Herpesvirus Hominis Type 1 And Type 2 In Vitro—*Pharmazie* Nov. 1984, 39(11), pp. 781–782.

M. Cushman et al.—Preparation And Anti–Hiv Activities Of Aurintricarboxylic Acid Fractions And Analogues: Direct Correlation Of Antiviral Potency With Molecular Weight—*Journal of Medicinal Chemistry* 1991, 34(1), pp 329–337.

M. Cushman et al.—Synthesis And Anti–HIV Activities Of Low Molecular Weight Aurintricarboxylic Acid Fragments And Related Compounds—*Journal of Medicinal Chemistry* 1991, vol. 34, pp. 337–342.

HealthGate Document—D. Schols et al.—Selective Inhibitory Activity Of Polyhydroxcarboxylates Derived From Phenolic Compounds Against Human Immunodeficiency Virus Replication—*J. Acquir Immune Defic Syndr* 1991, 4(7), pp. 677–685.

S. Loya et al.—Hexaprenoid Hydroquinones, Novel Inhibitors Of The Reverse Transcriptase Of Human Immunodeficiency Virus Type 1—*Journal of Natural Products* Dec. 1993, 56(12), pp. 2120–2125.

J. Schneider et al.—Inhibition Of HIV–1 In Cell Culture By Synthetic Humate Analogues Derived From Hydroquinone: Mechanism Of Inhibition—*Virology* 1996, 218(2), pp. 389–395.

HealthGate Document—R. Mentel et al.—Effectiveness Of Phenol Body Polymers Against Influenza Virus A/Krasnodar/101/59/H2N2—*Biomed Biochem Acta* 1983, 42(10), pp. 1353–1356.

HealthGate Document—J. Hills et al.—Inhibition Of Several Strains Of Influenza Virus Type A And B By Phenolic Polymers—*Biomed Biochem Acta* 1986, 45(9), pp. 1173–1179.

A. Jankowski et al.—A Randomized, Double–Blind Study On The Efficacy Of Tolpa Torf Preparation (TTP) In the Treatment Of Recurrent Respiratory Tract Infections—*Arch Immunol Ther Exp* (*Warsz*) 1993, 41(1), pp. 95–97.

R. Klocking et al.—Title?—*Pharmazie* 1977, 32, p. 297.

HealthGate Document—R. Klocking et al.—Preparation, Characterization And Antiviral Activity Of Phenolic Polyers. 2. Antiviral Activity Of Phenolic Polymers (Proceedings)—*Pharmazie* May 1979, 34(5–6), pp. 293–294.

HealthGate Document—R. Mentel et al.—Effectiveness Of Phenol Body Polymers Against Influenza Virus A/Krasnodar/101/59/H2N2—*Biomed Biochim Acta* 1983, 42(10), pp. 1353–1356.

HealthGate Document—H.P. Klocking et al.—Effect Of Phenol Ring Polymers On The Release Of Plasminogen Activators—*Farmakol Toksikol* Jan.–Feb. 1984, 47(1), pp. 93–95.

HealthGate Document—K.D. Thiel et al.—Antiviral Effect Of Enzymatically And Nonezymatically Oxidized Caffeic And Hydrocaffeic Acids Against Herpesvirus Hominis Type 1 And Type 2 In Vitro—Pharmazie. 39: 11, Nov. 1984, 781–782.

J. Hills—Hemmung Ausgewahlter Influenzavirusstamme Der Typen A And B Durch Phenolkorperpolymerisate—*Biomed Biochim Acta* 1986, 45(9), pp. 1173–1179.

HealthGate Document—B. Helbig et al.—Therapeutic Effect Of (E)–5–(2–Bromovinyl)–2–Deoxyuridine, Caffeic Acid Oxidation Product, And Trisodiumphosphonoformate On Cutaneous Herpes Simplex Virus Type 1 Infection In Guinea Pigs—*J Med Virol* Nov. 1987, 23(3), pp. 303–309.

K. I. Hanninen et al.—Synthesis And Characterization Of Humic Acid–Like Polymers—*The Science of the Total Environment* 1987, 62, pp. 201–210.

R. Klocking et al.—Interaction Of Humic Acids And Humic–Acid–Like Polymers With Herpes Simplex Virus Type 1 *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment* New York—Springer–Verlag 1989, pp. 407–412.

HealthGate Document—C. Schewe et al.—Lipoxygenase–Inhibitory Action Of Antiviral Polymeric Oxidation Products Of Polyphenols—*Biomed Biochem Acta* 1991, 50(3), pp. 299–305.

D. Schols et al.—Selective Inhibitory Activity Of Polyhydroxycarboxylates Derived From Phenolic Compounds Against Human Immunodeficiency Virus Replication—*Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 1991, 4(7), pp. 677–685.

M. Cushman et al.—Preparation And Anti–Hiv Activities Of Aurintricarboxylic Acid Fractions And Analogues Direct Correlation Of Antiviral Potency With Molecular Weight—*Journal of Medicinal Chemistry* 1991, 34(1), pp 329–337.

M. Cushman et al.—Synthesis And Anti–Hiv Activities Of Low Molecular Weight Aurintricarboxylic Acid Fragments And Related Compounds—*Journal of Medicinal Chemistry* 1991, 34(1), pp. 337–342.

HealthGate Document—M. Robert–Gero et al.—Biochemical Study Of Humus Action Of A Proteolytic Enzyme On Natural And Synthetic Humic Polymers And Those Of Microbial Origin—*Ann Inst Pasteur* (*Paris*) Dec. 1967, 113(6), pp. 903–909.

HealthGate Document—M. Jakubiec et al.—Comparison Of The Effect Of Natural And Synthetic Humates And Edta On The Growth Of *Escherichia coli*—**Abstract not available.

HealthGate Document—R. Ansorg et al.—Studies On The Antimicrobial Effect On Natural And Synthetic Humic Acids—*Arzneimittelforschung* 1978, 28(12, pp. 2195–2198.

HealthGate Document—J. Pommery et al.—SOS Chromotest Study Concerning Some Appreciation Criteria Of Humic Substances' Genotoxic Potency—*Mutat Res* Jun. 1989, 223(2), pp. 183–189.

HealthGate Document—Department of Biochemistry et al.—Humic Acid: Inhibitor of Plasmin—*Sci Total Environ* Apr. 1992, 114, pp. 135–139.

HealthGate Document—K. Wiegleb et al.—The Use Of The Het–Cam Test For The Determination Of The Irritating Effects Of Humic Acids—*DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr* Oct. 1993, 100(10), pp. 412–416.

HealthGate Document—H.L. Yang et al.—Humic Acid Induces Expression Of Tissue Factor By Cultured Endothelial Cells: Regulation By Cytosolic Calcium And Protein Kinase C—*Thromb Haemost* Mar. 1994, 71(3), pp. 325–330.

HealthGate Document—W. Seffner—Subchronic Application Of Humic Acids And Associated Compounds Provokes Histological Changes Of Goitre In The Rat—*Exp Toxicol Pathol* Jan. 1995, 47(1), pp. 63–70.

HealthGate Document—J. Schneider—Inhibition Of Hiv–1 Cell Culture By Synthetic Humate Analogues Derived From Hydro Mechanism Of Inhibition—*Virology* Apr. 15, 1996, 218(2), pp. 389–395.

Hassett et al. 109 CA: 539 LLY, 1988.

Shindo 117 CA 52663x, 1992.

* cited by examiner

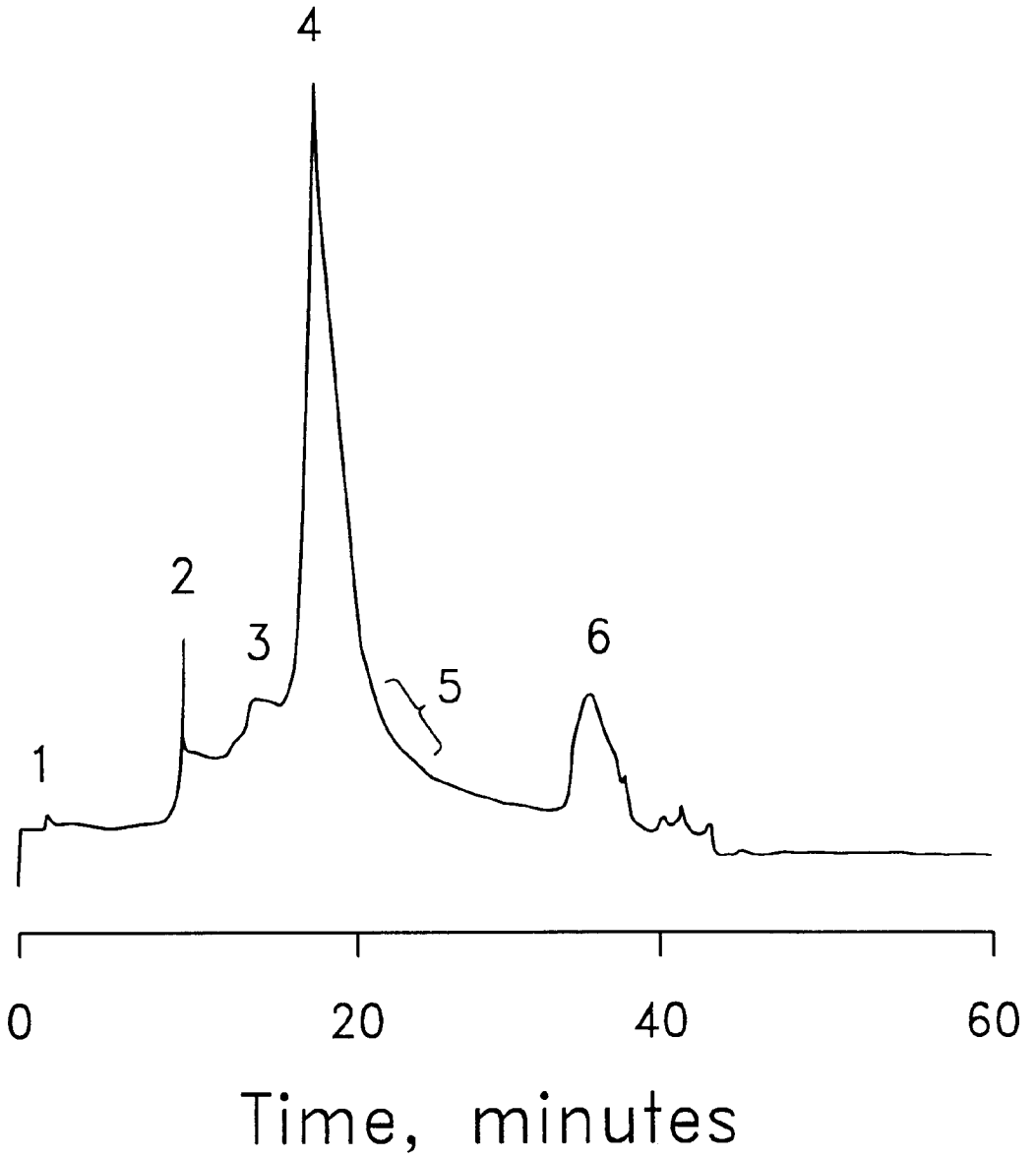


FIG. 1

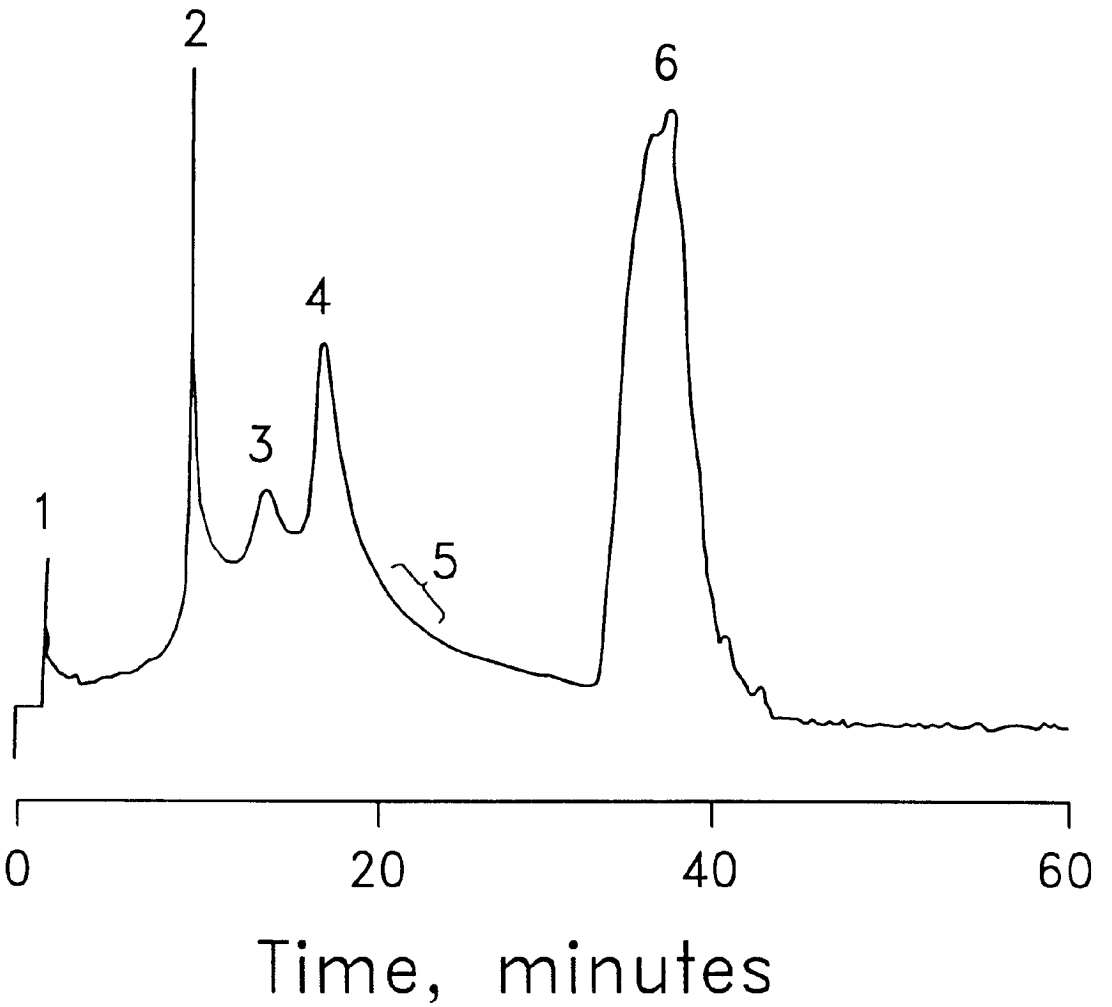


FIG. 2

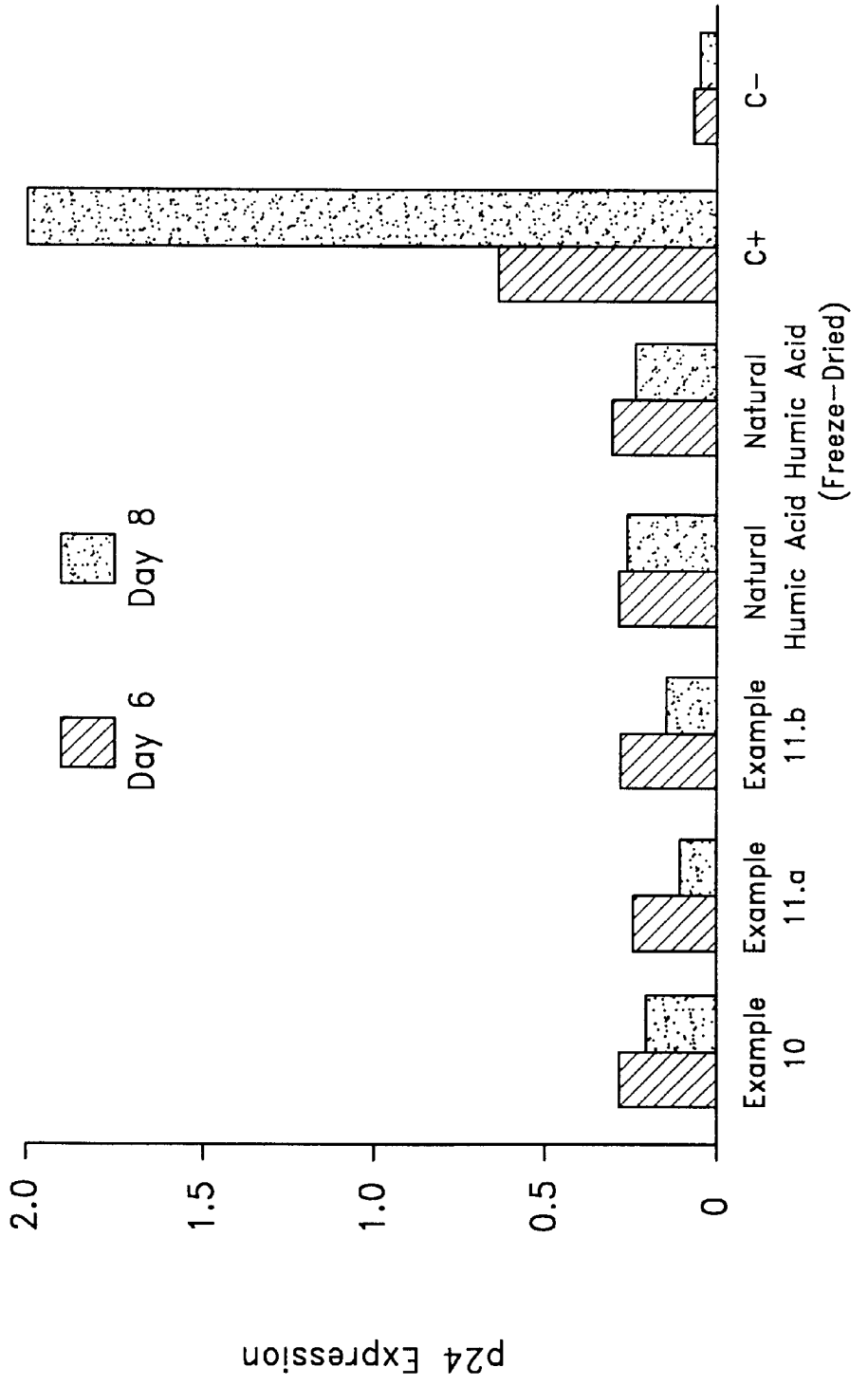

p24 Expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0
Day 6
Day 8
Example 10
Example 11.a
Example 11.b
Natural Humic Acid
Natural Humic Acid (Freeze-Dried)
C+
C-

FIG. 3

COMPOSITIONS CONTAINING SYNTHETIC SOIL-EXTRACT MATERIALS AND MEDICAMENTS BASED THEREON

This application is a divisional of application Ser. No.: 08/798,329, filed Feb. 10, 1997 now U.S. Pat. No. 5,945,446.

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to synthetic soil extract substances comprised of phenolic polymers, to the procedures for the preparation thereof, to the processes for the purification and isolation as aqueous solutions or dried powders of the synthetic materials, to compositions and methods for employing these synthetic phenolic polymers for reducing or eliminating viral activity in blood products, anti-viral compositions for treating or preventing human or animal viral diseases and antimicrobial compositions for treating or preventing human or animal microbial diseases.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Soil extract materials, particularly the classes of substances known collectively as "humus," "humics," "humic acid(s)," or "humates," have been widely used in a number of applications for many years, as reviewed by F. J. Stevenson, *Humus Chemistry. Genesis Composition Reactions*; New York: Wiley, 1964; and, more recently, by A. Piccolo, *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*; New York: Elsevier, 1996.

Natural and synthetic soil extracts have already been used extensively in horticultural and related industries, particularly as soil enhancement as well as soil remediation agents. In addition, natural and synthetic soil extracts have been employed as additives in organic gardening and landscaping; and in fresh-water aquaria. Some medicinal benefits have also been claimed for both synthetic- and naturally-occurring soil extract substances.

R. H. Faust, in a paper presented at the *Conference of the International Federation of Organic Agriculture Movements; Copenhagen, Denmark: October,* 1996; P2, 20, has documented the benefits of humates in agriculture. In general, it has been found that humic materials can stimulate plant growth, including crop yield, by about 10–30%.

Soil extracts, and humic acid in particular, chelate a variety of metals. As a result, humic materials have been employed in soil remediation to remove heavy-metal contamination, as reported by M. A. Rashid, *Soil Sci.* 1971, 111, 298–306. Humic acid has also been used to enhance the removal of aromatic hydrocarbons from aquifers contaminated with petroleum products: H. Xu, S. Lesage, L. Durham, and K. Novakowski, in *Proceedings of the Fourth Annual Symposium on Groundwater and Soil Remediation; Calgary Alberta: Sep.* 21–23, 1994; 635–646; S. Lesage, H. Xu, K. S. Novakowski, S. Brown, and L. Durham, in *Proceedings of the Fifth Annual Symposium on Groundwater and Soil Remediation*; Toronto, Ontario: Oct. 2–6, 1995.

Humate materials have been used as poultry feed additives. Adding humate materials to the fodder of broiler chickens increases the yield mass on average by 5–7%, and also provides for a 3–5% gain in poultry safety: L. M. Stepchenko, L. V. Zhorina, and L. V. Kravtsova, *Biol. Nauki* 1991, 10, 90–95.

T. A. Huck, N. Porter, and M. E. Bushell, *J. Gen. Microbiol.* 1991, 137(10), 2321–2329, have reported that soil isolates are effective media additives for the production of antibiotics, and that the extent of microbial growth stimulation can be quite large depending upon the species, the culture medium, and the environment. The use of selected batches of soil lignite humate as culture media for isolating thermophilic Campylobacter species extracts has also been documented by K. Weinrich, K. Winkler, and E. Heberer, *DTW Dtsch. Tierarztl Wochenschr.* 1990, 97(12), 511–515. In addition, B. Grunda, *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.* 1970, 125(6), 584–593, has described the effects of humic acid on the count of soil microorganisms in culture.

Humates have long been used as folk remedies for a wide variety of illnesses (F. K. Achard, *Crells Chem. Ann.* 1786, 11, 391–403), as recounted by T. D. Lotosh, *Biol. Nauki* 1991, 10, 99–103.

Humic acids isolated from peat exhibited significant efficacy for adhesions when tested on female rats that had standardized lesions placed on both uterine horns and the peritoneum of the anterior abdominal wall: M. Mesrogli, D. H. Maas, B. Mauss, S. Plogmann, W. Ziechmann, and J. Schneider, *Zentralbl. Gynakol.* 1991, 113(10), 583–590.

The ability of natural humic acid to affect anaphylactic sensitization and mast cell secretory function has been established by J. Wyczolkowska, T. Michon, Z. Slusarczyk, B. Kolago, and C. Maslinski, *Acta Pol. Pharm.* 1993, 50(6), 475–480. Humic substances in doses of 20 and 50 milligrams per kilogram body weight reduced histamine release from mouse peritoneal mast cells challenged with anti-IgE or concanavalin A in vitro.

Humic substances, including peats and sodium humates, are known to exhibit anti-inflammatory properties: M. Kuhnert, V. Fuchs, and S. Golbs, *Arch. Exp. Veterinarmed.* 1982, 36(2), 169–177; S. B. Ye, J. Y. Chen, and Z. X. Zeng, *Ssu Chuan I Hsueh Yuan Hsueh Pao* 1985, 16(2), 127–129. Inflammatory states of the cervix, especially cervical erosion (known generally as cervicitis), can be treated with humic preparations: J. Woyton, M. Gabrys, T. Bielanow, M. Zimmer, J. Sokalski, R. Geneja, and M. Zborowski, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (*Warsz*) 1993, 41(1), 99–103.

Humic substances have been known to exhibit antimicrobial properties. Species for which natural as well as synthetic humic substances have been shown to be inhibitory include *C. albicans, Ent. cloacae, Prot. vulgaris, Ps. aeruginosa, S. typhimurium, St. aureus, St. epidermidis, Str. pyogenes* (R. Ansorg and W. Rochus, *Arzneimittelforschung* 1978, 28(12), 2195–2198; *E. coli* and *Str. faecalis* were not affected), and *Str. mutans* (*sobrinus*) (Y. Nakamura, H. Kuwashima, S. Aoki, and T. Masuhara, *Shika Kiso Igakkai Zasshi* 1989, 31(3), 329–332). Broadly speaking, concentrations in the range 50–2000 parts per million (ppm) are usually effective, yet are not cytotoxic: K. D. Thiel, B. Helbig, R. Klocking, P. Wutzler, M. Sprossig, and H. Schweizer, *Pharmazie* 1981, 36(1), 50–53.

Humic substances have long been known to exhibit anti-viral properties (H. Schultz, *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1962, 69, 613; 1965, 72(13), 294–297; R. Klocking and M. Sprossig, *Experientia* 1972, 28(5), 607–608), particularly retroviruses (G. Sydow, V. Wunderlich, R. Klocking, and B. Helbig, *Pharmazie* 1986, 41(12), 865–868). Viral pathogens for which soil-extract materials have been shown to be effective include in particular Coxsackie virus A9 (Griggs-Baylor) (R. Klocking and M. Sprossig, *Experientia* 1972, 28(5), 607–608), herpes simplex virus type 1 (B. T. Rouse (Ed.), Herpes Simplex Virus; Berlin: Springer-Verlag, 1992; R. Klocking, K. D. Thiel, P. Wutzler, B. Helbig, and P. Drabke, *Pharmazie* 1978, 33(8), 539; F. Schiller, R.

Klocking, P. Wutzler, and I. Farber, *Dermatol. Monatsschr.* 1979, 165(7), 505–509; B. Helbig, A. Sauerbrei, R. Klocking, P. Wutzler, N. Wicht, U. Wiedemann, and G. Herrmann, *J. Med. Virol.* 1987, 23(3), 303–309; R. Klocking and B. Helbig, in *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment*; Berlin: Springer-Verlag, 1991; 407–412;) and type 2 (anon. *Zentralbl. Bakteriol* [*Orig. A*] 1976, 234(2), 159–169; K. D. Thiel, R. Klocking, H. Schweizer, and M. Sprossig, *Zentralbl. Bakteriol* [*Orig. A*] 1977, 239(3), 304–321; K. D. Thiel, B. Helbig, R. Klocking, P. Wutzler, M. Sprossig, and H. Schweizer, *Pharmazie* 1981, 36(1), 50–53; K. D. Thiel, B. Helbig, M. Sprossig, R. Klocking, and P. Wutzler, *Acta Virol.* 1983, 27(3), 200–208; K. D. Thiel, P. Wutzler, B. Helbig, R. Klocking, M. Sprossig, and H. Schweizer, *Pharmazie* 1984, 39(11), 781–782); human immunodeficiency virus (HIV) (M. Cushman, P. Wang, S. H. Chang, C. Wild, E. De Clercq, D. Schols, M. E. Goldman, and J. A. Bowen, *J. Med Chem.* 1991, 34(1), 329–337; M. Cushman, S. Kanamathareddy, E. De Clercq, D. Schols, M. E. Goldman, and J. A. Bowen, *J. Med Chem.* 1991, 34(1), 337–342; D. Schols, P. Wutzler, R. Klocking, B. Helbig, and E. De Clercq, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1991, 4(7), 677–685; S. Loya, R. Tal, A. Hizi, S. Issacs, Y. Kashman, and Y. Loya, *J. Nat. Prod* 1993, 56(12), 2120–2125; J. Schneider, R. Weis, C. Manner, B, Kary, A. Werner, B. J. Seubert, and U. N. Riede, *Virology* 1996, 218(2), 389–395; influenza virus type A (Krasnodar/101/59/H2N2) (R. Mentel, B. Helbig, R. Klocking, L. Dohner, and M. Sprossig, *Biomed. Biochim. Acta* 1983, 42(10), 1353–1356); and type B (J. Hils, A. May, M. Sperber, R. Klocking, B. Helbig, and M. Sprossig, *Biomed. Biochim. Acta* 1986, 45(9), 1173–1179); as well as other respiratory tract infectious agents (A. Jankowski, B. Nienartowicz, B. Polanska, and A. Lewandowicz-Uszynska, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (*Warsz*) 1993, 41(1), 95–97).

The mechanism whereby humic substances inhibit the cytopathicity of a number of viruses has been studied in some detail. It is thought that the materials prevent viral replicating by sorbing onto the viral envelope protein (gp120SU in the case of HIV) and thereby blocking the sorption of viral particles to cell surfaces: K. D. Thiel, R. Klocking, H. Schweizer, and M. Sprossig, *Zentralbl. Bakteriol.* [*Orig. A*] 1977, 239(3), 304–321; D. Schols, P. Wutzler, R. Klocking, B. Helbig, and E. De Clercq, *J. Acquir. Immune Def. Syndr.* 1991, 4(7), 677–685; anon., *Fortschr. Med.* 1995, 113(7), 10; J. Schneider, R. Weis, C. Manner, B. Kary, A. Werner, B. J. Seubert, and U. N. Riede, *Virology* 1996, 218(2), 389–395. Extracellular interception of pathogens by chemical agents that bind to them is a well-known means of immunological defense (D. M. Shankel, S. Kuo, C. Haines, and L. A. Mitscher, in *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III*; G. Bronzetti, H. Hayatsu, S. De Flora, M. D. Waters, and D. M. Shankel (Eds.); New York: Plenum, 1993; 65–74). Such materials might well be termed "despathogens," following the terminology proposed by T. Kada and K. Shimoi, *Bioessays* 1987, 7, 113–116, regarding "desmutagens."

It has been reported that heat treatment of humic acids at 120 degrees Centigrade for 15 minutes does not alter their inhibitory effect on mutagens: T. Sato, Y. Ose, and H. Nagase, *Mutat. Res.* 1986, 162(2), 173–178; T. Sato, Y. Ose, H. Nagase, and K. Hayase, *Sci. Total Environ.* 1987, 62(4), 305–310). That is, humic acids can be sterilized by autoclaving.

A direct comparison of enzymatic- with nonenzymatic-synthesized humic acid has shown that the latter is about a factor of ten more effective than the former for the treatment of herpes types 1 and 2: K. D. Thiel, P. Wutzler, B. Helbig, R. Klocking, M. Sprossig, and H. Schweizer, *Pharmazie* 1984, 39(11), 781–782.

Implanted bovine calcium hydroxyapatite is highly osteoconductive, and serves the host tissue as a "guideline" for the deposition of newly developing bone tissue. However, while it is well tolerated, it is resorbed only very slowly. Impregnation of the bovine hydroxyapatite with synthetic humic acid measurably stimulates the resorption process.

There is extensive covalent as well as hydrogen bonding of humic substances to collagen fibers (with undoubted crosslinking as well), as determined by x-ray diffraction analysis: U. N. Riede, I. Jonas, B. Kirn, U. H. Usener, W. Kreutz, and W. Schlickewey, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 1992, 111(5), 259–264. Tendon strength is thereby increased by as much as 75 percent.

Natural as well as synthetic humic acids have been found to stimulate the phagocytic and bactericidal activity of granulocytes in humans at dose levels of 100–300 milligrams per day over a 14-day testing period: U. N. Riede, G. Zeck-Kapp, N. Freudenberg, H. U. Keller, and B. Seubert, *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 1991, 60(1), 27–34; M. Kowalska, A. Denys, and J. Bialek, *Acta Pol. Pharm.* 1993, 50(4–5), 393–395. Of additional interest is the finding that dose levels of 600 milligrams per day caused only a transient and insignificant increase of phagocytic and bactericidal properties of the granulocytes.

The influence of natural as well as synthetic humic acids on haemostasis has been studied: H. P. Klocking, *Arch. Toxicol. Suppl.* 1991, 14, 166–169; W. Buczko, B. Malinowska, M. H. Pietraszek, D. Pawlak, and E. Chabielska, *Acta Pol. Pharm.* 1993, 50(6), 507–511. It was found that humic acid in dose levels of 100–300 milligrams per kilogram body weight had no effect on bleeding time, clotting time, thrombin time, prothrombin time, kaolin-kephalin time, euglobulin lysis time, the concentration of fibrinogen, the platelet count, or ADP-induced platelet aggregation.

Various synthetic humic acids have been found to inhibit strongly the activity of purified lipoxygenase of rabbit reticulocytes, whereas prostaglandin H synthase of sheep vesicular gland is only weakly inhibited: C. Schewe, R. Klocking, B. Helbig, and T. Schewe, *Biomed. Biochim. Acta* 1991, 50(3), 299–305. The most effective humic acids were those derived from caffeic acid, 2,5-dihydroxytoluene, and 3,4-dihydroxytoluene.

The effect of natural humic acid on the regenerative response of liver tissue has been examined in rats submitted to two-thirds hepatectomy. The results were thought to be two-fold in nature. First, the short-term application of humic acid at a dose of 20 milligrams per kilogram body weight per day inhibited ornithine decarboxylase activity, as well as caused a decrease in spermidine formation and DNA and RNA, resulting in an overall decrease in liver restitution. In contrast, long-term application of humic acid resulted in the stimulation of ornithine decarboxylase, an increase in spermidine and histamine as well as RNA and DNA levels, and in overall liver mass. The effects might be due at least in part to the humic-acid inhibition of polyamine biosynthesis: C. Maslinksi, W. A. Fogel, and W. Andrzejewski, *Acta Pol. Pharm.* 1993, 50(4–5), 413–416.

Humic as well as fulvic acids extracted from peat have been shown to stimulate respiration in rat liver mitochondria when present at concentrations of 40–360 micrograms per milliliter. Humic substances at concentrations of 40–400

micrograms per milliliter also increased the efficiency of oxidative phosphorylation in mitochondria in vitro, particularly after contact periods of over 1 hour: S. A. Visser, *Sci. Total Environ.* 1987, 62(4), 347–354.

Natural, synthetic, and commercial humic acids all have the ability to inhibit human plasmin activity: F. J. Lu and Y. S. Lee, *Sci. Total Environ.* 1992, 114(4), 135–139. Thus, at a concentration of 20 micrograms per milliliter, each resulted respectively in residual plasmin activities of 70, 93, and 40 percent. Synthetic humic acids fabricated from caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid have also been found to raise the activity of plasminogen activator in isolated vascular preparations of pig ear (H. P. Klocking, R. Klocking, and B. Helbig, *Farmakol. Toksikol* 1984, 47(1), 93–95).

Peat-derived natural humic acids have been found to inhibit the hydrolysis of N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester and N-benzoyl-L-leucine methyl ester by alpha-chymotrypsin as well as by subtilisin: Sh. Zh. Zhorobekova and K. A. Kydralieva, *Biol. Nauki* 1991, 10, 151–154.

Sodium humate has been found to increase the lifespan of mongrel rats exposed to lethal doses of ^{60}Co -radiation, as reported by G. G. Pukhova, N. A. Druzhina, L. M. Stepchenko, and E. E. Chebotarev, *Radiobiologiia* 1987, 27(5), 650–653.

It has been found that naturally-occurring humic acid preparations can stimulate the production of cytokines, including interferon-gamma, interferon-alpha, and tumor necrosis factor-alpha (A. D. Inglot, J. Zielinksa-Jenczylik, and E. Piasecki, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (*Warsz*) 1993, 41(1), 73–80); and interferon-beta (Z. Blach-Olszewska, E. Zaczynksa, E. Broniarek, and A. D. Inglot, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (*Warsz*), 1993, 41(1), 81–85).

Histopathological and ultrastructural studies have shown that naturally-occurring humic acids can cause morphological changes characteristic of thymus activity stimulation: J. A. Madej, J. Kuryszko, and T. Garbulinski, *Acta Pol. Pharm.* 1993, 50(4–5), 397–404.

It has been shown that incubation of cultured human umbilical vein endothelial cells either with natural or synthetic humic acid results in an enhanced cell surface expression of tissue factor activity. There are also changes in intracellular divalent calcium levels: H. L. Yang, F. J. Lu, S. L. Wung, and H. C. Chiu, *Thromb. Haemost.* 1994, 71(3), 325–330.

Natural humic acid administered prophylactically to rats can decrease significantly the amount of gastric mucosa damage induced with ethanol. Humic acid also significantly accelerates the healing process of experimental-induced gastric and duodenal ulcers: T. Brzozowski, A. Dembinski, and S. Konturek, *Acta Pol. Pharm.* 1994, 51(1), 103–107.

Humic acids have also been employed as veterinary medicine therapies, as described and discussed by M. Kuhnert, V. Fuchs, H. Knauf, and U. Knoll, *Arch. Exp. Veterinarmed.* 1985, 39(3), 344–349; and by M. Kuhnert, V. Fuchs, and S. Golb, *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1989, 96(1), 3–10. For example, H. Schultz, *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1962, 69, 613; 1965, 72(13), 294–297, successfully employed peat mull to prevent the transmission of foot and mouth disease in pigs.

The pharmacokinetics of sodium humate in chickens have been studied extensively by J. Hampl, I. Herzig, and J. Vlcek, *Vet. Med.* (*Praha*), 1994, 39(6), 305–313. Free or liposome-encapsulated sodium humate was administered to chickens intracardially, orally, or subcutaneously and a number of pharmacokinetic parameters were then determined. The blood clearance of liposome-encapsulated sodium humate was higher than that of free sodium humate regardless of the manner of administration. On the other hand, the elimination half-life was longer after extravascular than after intracardial administration. Maximal drug concentration values indicated that the penetration of sodium humate from the injection site into blood circulation is very slow. Biological availability of sodium humate also depended on the method of administration and dosage form. Aside from intracardial administration, the highest bioavailability was found after subcutaneous administration of free sodium humate. Synthetic humic acid has been found to penetrate the dermis very quickly from a 1 percent water/oil emulsion, and to then form a reservoir in the horny layer: W. Wohlrab, B. Helbig, R. Klocking, and M. Sprossig, *Pharmazie* 1984, 39(8), 562–564. Also, about 30 minutes after external application, concentrations of 1–3 percent of the total quantity applied are achieved, which percentage remains essentially unchanged thereafter.

The toxicity of naturally-occurring humic acids is remarkably low (K. D. Thiel, B. Helbig, R. Klocking, P. Wutzler, M. Sprossig, and H. Schweizer, *Pharmazie* 1981, 36(1), 50–53; U. N. Riede, 1. Jonas, B. Kirn, U. H. Usener, W. Kreutz, and W. Schlickewey, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 1992, 111(5), 259–264; H. Czyzewska-Szafran, Z. Jastrzebski, D. Soltysiak-Pawluczuk, M. Wutkiewicz, A. Jedrych, and M. Remiszewska, *Acta Pol. Pharm.* 1993, 50(4–5), 373–377; H. L. Yang, F. J. Lu, S. L. Wung, and H. C. Chiu, *Thromb. Haemost.* 1994, 71(3), 325–330). [Cytotoxic effects of antiviral substances, including humic acids, are usually evaluated via biological (viability and alterations of cell morphology) and biochemical testing methods (^{51}Cr release), as described by K. D. Thiel, U. Eichhorn, H. Schweizer, and R. Klocking, *Arch. Toxicol. Suppl.* 1980, 4, 428–430.] The cytotoxicity (CD_{50}) of a naturally-occurring humic acid for human peripheral blood leukocytes (PBL) was found to be 1–9 milligrams per milliliter. In addition, J. Schneider, R. Weis, C. Manner, B. Kary, A. Werner, B. J. Seubert, and U. N. Riede, *Virology* 1996, 218(2), 389–395, reported that the cytotoxicity of a synthetic humic acid prepared from hydroquinone for MT-2 cells was approximately 600 micrograms per milliliter. It has also been found that medicaments prepared from humic acids isolated from naturally-occurring soil materials are neither carcinogenic (Syrian hamster embryo cell transformation test: J. Koziorowska and E. Anuszewska, *Acta Pol. Pharm.* 1994, 51(1), 101–102) nor mutagenic (T. Sato, Y. Ose, and H. Hagase, *Mutat. Res.* 1986, 162(2), 173–178; V. M. Sui, A. I. Kiung, and T. I. Veidebaum, *Vopr. Kurortol. Fiozioter. Lech. Fiz. Kult.* 1986, 2(3–4), 34–37; J. Koziorowska, B. Chlopkiewicz, and E. Anuszewska, *Acta Pol. Pharm.* 1993, 50(4–5), 379–382). Prenatal (S. Golbs, V. Fuchs, M. Kuhnert, and C. Polo, *Arch. Exp. Veterinarmed.* 1982, 36(2), 179–185) and embryotoxic and teratogenic effects (T. Juszkiewicz, M. Minta, B. Wlodarczyk, B. Biernacki, and J. Zmudzki, *Acta Pol. Pharm.* 1993, 50(4–5), 383–388) are also not observed with humic preparations at daily dose levels from 5–50 milligrams per kilogram body weight. Topical preparations are tolerated even better (V. V. Soldatov and M. N. Cherepanova, *Vopr. Kurortol. Fizioter. Lech. Fiz. Kult.* 1970, 35(3), 256–259; H. Czyzewska-Szafran, Z. Jastrzebski, D. Soltysiak-Pawluczuk, M. Wutkiewicz, A. Jedrych, and M. Remiszewska, *Acta Pol. Pharm.* 1993, 50(4–5), 373–377) when applied dermally in aqueous solution in amounts as high as 10 percent weight-by-volume (K. Wiegleb, N. Lange, and M. Kuhnert, *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1993, 100(10), 412–416).

Soil extracts, including humics, are quite complex mixtures of organic and inorganic polymeric compounds whose composition varies widely depending upon the source of the soil and the method(s) of extraction and subsequent treatment: D. Vaughan and R. E. Malcolm, *Plant Soil Sci.* 1985, 16, 1–443 (see also N. Senesi, Y. Chen, and M. Schnitzer, *Soil Biol. Biochem.* 1977, 9, 397–403).

Techniques used for the chemical characterization of soil extracts, including humics, have included capillary electrophoresis (S. Pompe, K. Heise, and H. Nitsche, *J. Chromatogr. A,* 1996, A723(1), 215–218), ultracentrifugation (R. S. Cameron, B. K. Thornton, R. S. Swift, and A. M. Posner, *J. Soil Sci.* 1972, 23(4), 394–408; A. E. Wilkinson, J. J. Higgo, and M. N. Jones, *Biochem. Soc. Trans.* 1991, 19(4), 414S), electron paramagnetic resonance and infrared spectroscopy (G. Tollin and C. Steelink, *Biochim. Biophys. Acta,* 1966, 112(2), 377–379), various solvent and other fractionation methods (R. S. Cameron, B. K. Thornton, R. S. Swift, and A. M. Posner, *J. Soil Sci.* 1972, 23(4), 394–408; C. E. Clapp, M. H. Hayes, and R. S. Swift, *Agricultural Research Service Report Number* 0000042025; M. H. Hayes, R. L. Malcolm, and C. E. Clapp, *Agricultural Research Service Report Number* 0000042035; I. Csiky, G. Marko-Varga, and J. A. Jonsson, *Anal Chim. Acta* 1985, 178, 307–312; J. A. Amador, P. J. Milne, C. A. Moore, and R. G. Zika, *Mar. Chem.* 1990, 29, 1–17), gas chromatography (I. Arsenie, H. Boren, and B. Allard, *Sci. Total Environ.* 1992, 116(3), 213–220), gas chromatography-mass spectrometry (H.-R. Schulten and M. Schnitzer, *Soil Sci.* 1992, 153(3), 205–224; G. Chiavari, G. Torsi, D. Fabbri, and G. C. Galletti, *Analyst (London)* 1994, 119(6), 1141–1150), gel-permeation chromatography (B. Kosinkiewicz, *Acta Microbiol. Pol.* 1977, 26(4), 387–392; S. Mori, M. Hiraide, and A. Mizuike, *Anal. Chim. Acta* 1987, 193, 231–238), high-performance liquid chromatography (M. A. Curtis, A. F. Witt, S. B. Schram, and L. B. Rogers, *Anal. Chem.* 1981, 53, 1195–1199; K. Ravichandran, J. J. Lewis, I.-H. Yin, M. Koenigbauer, C. R. Powley, P. Shah, and L. B. Rogers, *J. Chromatogr.* 1988, 439, 213–226; J. Knuutinen, L. Virkki, P. Mannila, P. Mikkelson, J. Paasivirta, and S. Herve, *Wat. Res.* 1988, 22(8), 985–990, M. Susic and K. G. Boto, *J. Chromatogr.* 1989, 482(1), 175–187), mass spectrometry (H.-R. Schulten, G. Abbt-Braun, and F. H. Frimmel, *Environ. Sci. Technol.* 1987, 21(4), 349–357; C. Sorge, R. Mueller, P. Leinweber, and H. R. Schulten, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 1993, 346 (6–9), 697–703; M. Remmler, A. Georgi, and F.-D. Kopinke, *Eur. Mass Spectrom.* 1995, 1(4), 403–407), nuclear magnetic resonance (F. J. Vila, H. Lentz, and H. D. Ludemann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976, 72(3), 1063–1070; G. Almendros, R. Frund, F. J. Gonzalez-Vila, K. M. Haider, H. Knicker, and H. D. Ludemann, *FEBS Lett.* 1991, 282(1), 119–121), and polyacrylamide gel electrophoresis (R. Klocking, *J. Chromatogr.* 1973, 78, 409–416; L. P. Glazkova, V. S. Ulashchik, and F. A. Puntus, *Vopr. Kurortol. Fizioter. Lech. Fiz. Kult.* 1984, 2(2), 21–24).

Very many studies have been carried out on the structural characterization of soil extracts, including humic acid, by reductive degradation, as reviewed by L. B. Sonnenberg, Ph.D. Thesis, University of North Carolina at Chapel Hill, 1989: *Dissertation Services Order No.* 9007318. Models of humic structure based on the physicochemical properties of membranes have also been developed by R. L. Wershaw, *Environ. Health Perspect.* 1989, 83(11), 191–203. R. R. Engebretson and R. von Wandruszka, *Environ. Sci. Technol.* 1994, 28, 1934, have described efforts at characterizing the micro-organization of dissolved humic acids in terms of their secondary structure, that is, on the way in which these large molecules arrange themselves in three dimensions in solution. The molecules are thought to be dendritic, that is, are hyperbranched fractal-like structures that emanate somewhat like the spokes of a wagon-wheel from a central core, and which contain a large number of carboxyl and hydroxyl terminal groups: T. H. Mourey, S. R. Turner, M. Rubinstein, J. M. J. Frechet, C. J. Hawker, and K. L. Wooley, *Macromolecules* 1992, 25, 2401–2406. Cluster aggregates of humic acid have an average diameter of 700–1700 Angstroms; large clusters have a fractal dimension of 2.3: R. Osterberg and K. Mortensen, *Radiat. Environ. Biophys.* 1994, 33(3), 269–276.

Because humic substances are not chemically well-defined, the preparation of synthetic humic acids whose physicochemical properties mimic naturally-occurring materials is quite difficult, as pointed out by K. Murray and P. W. Linder, *J. Soil Sci.* 1983, 34, 511–523. Nevertheless, there have been several notable advances in this area. Broadly speaking, three general strategies have evolved. All depend upon starting with well-defined molecules of molecular weight on the order of hydroxybenzoic acid, and then causing the molecules to polymerize upon themselves to form larger molecules. The methods differ in the causation factor, which can be microbial, chemical, or enzymatic.

Humic acids of microbial origin have been described and discussed by M. Robert-Gero, C. Hardisson, L. Le Borgne, and G. Pignaud, *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 1966, 111(6), 750–767; and by M. Robert-Gero, C. Hardisson, L. Le Borgne, and G. Vidal, *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 1967, 113(6), 903–909.

The chemical synthesis of humic acids has been pioneered by R. Klocking, B. Helbig, and associates: R. Klocking, B. Helbig, and P. Drabke, *Pharmazie* 1977, 32, 297; R. Klocking, B. Helbig, K. D. Thiel, T. Blumohr, P. Wutzler, M. Sprossig, and F. Schiller, *Pharmazie* 1979, 34(5–6), 293–294; R. Mentel, B. Helbig, R. Klocking, L. Dohner and M. Sprossig, *Biomed. Biochim. Acta* 1983, 42(10), 1353–1356; H. P. Klocking, R. Klocking, and B. Helbig, *Farmakol. Toksikol.* 1984, 47(1), 93–95; K. D. Thiel, P. Wutzler, B. Helbig, R. Klocking, M. Sprossig, and H. Schweizer, *Pharmazie* 1984, 39(11), 781–782; J. Hils, A. May, M. Sperber, R. Klocking, B. Helbig, and M. Sprossig, *Biomed. Biochim. Acta* 1986, 45(9), 1173–1179; B. Helbig, A. Sauerbrei, R. Klocking, P. Wutzler, N. Wicht, U. Wiedemann, and G. Herrmann, *J. Med. Virol.* 1987, 23(3), 303–309; K. I. Hanninen, R. Klocking, and B. Helbig, *Sci. Total Environ.* 1987, 62, 201–210; R. Klocking and B. Helbig, in *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment*; New York: Springer-Verlag, 1989; 407–412; C. Schewe, R. Klocking, B. Helbig, and T. Schewe, *Biomed. Biochim. Acta* 1991, 50(3), 299–305; D. Schols, P. Wutzler, R. Klocking, B. Helbig, and E. De Clercq, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1991, 4(7), 677–685. Typically, 10 millimoles of the starting small-molecule phenolic compound is dissolved in distilled water, the pH is adjusted to 8.5 with aqueous sodium hydroxide (NaOH), and then 2–5 millimoles of sodium periodate ($NaIO_4$) is added. The solution is warmed at 50° C. for 30 minutes, and is then allowed to stand overnight. The resultant humic acid-like polymeric products are isolated by precipitation with lead(II) nitrate [$Pb(NO_3)_2$]. The precipitated polymers are redissolved in aqueous sodium hydroxide (pH 8.5) and heated with 8-hydroxyquinoline for 30 minutes at 100° C. The precipitate formed is lead(II) chelate, which is removed by filtration. Residual 8-hydroxyquinoline is extracted with chloroform, and the desired polymeric material is then precipitated from the aqueous solution by the addition of

various combinations of acetic acid, ethyl acetate, and ethanol. Starting compounds that have been used for the synthesis of humic-like materials include 4-[bis(p-hydroxyphenyl)methylene]-2,5-cyclohexadie-1-one (aurin), 4-[bis(3-carboxy-4-hydroxyphenyl)methylene]-2-carboxy-2,5-cyclohexadien-1-one (aurintricarboxylic acid), 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propenoic acid (caffeic acid), 1,2-dihydroxybenzene (catechol), 1,3,4,5-tetrahydroxycyclohexanecarboxylic acid 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propenoate (chlorogenic acid), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (homoprotocatechuic acid), 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-(N-methylamino)ethanol (epinephrine), 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid (ferulic acid), 3,4–5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid), 2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid), 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid), 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid (hydrocaffeic acid), 1,4-dihydroxybenzene (hydroquinone), 2,3-dihydroxytoluene (3-methylcatechol), 3,4-dihydroxytoluene (4-methylcatechol), 2,5-dihydroxytoluene (2-methylhydroquinone), 4,4'-(2,3-dimethyltetramethylene)-di-(1,2-dihydroxybenzene) (nordihydroguaiaretic acid), 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-aminoethanol (norepinephrine), 3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid), 1,2,3-trihydroxybenzene (pyrogallol), 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol), and 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (vanillic acid). Other notable efforts on the chemical synthesis of humic-like substances include the studies by De Clercq and colleagues on aurintricarboxylic acid, its derivatives, and related compounds: M. Cushman, P. Wang, S. H. Chang, C. Wild, E. De Clercq, D. Schols, M. E. Goldman, and J. A. Bowen, *J. Med Chem.* 1991, 34(1), 329–337; M. Cushman, S. Kanamathareddy, E. De Clercq, D. Schols, M. E. Goldman, and J. A. Bowen, *J. Med Chem.* 1991, 34(1), 337–342. Related efforts have also been reported by M. Robert-Gero, C. Hardisson, L. Le Borgne, and G. Vidal, *Ann. Inst. Pasteur* (*Paris*) 1967, 113(6), 903–909; M. Jakubiec, E. Miszczak, and J. Szczerkowska, *Acta Microbiol. Pol.* [*B*] 1971, 3(1), 63–66; R. Ansorg and W. Rochus, *Arzneimittelforschung* 1978, 28(12), 2195–2198; J. Pommery, M. Imbenotte, A. F. Urien, D. Marzin, and F. Erb, *Mutat. Res.* 1989, 223(2), 183–189; F. J. Lu and Y. S. Lee, *Sci. Total Environ.* 1992, 114, 135–139; K. Wiegleb, N. Lange, and M. Kuhnert, *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1993, 100(10), 412–416; H. L. Yang, F. J. Lu, S. L. Wung, and H. C. Chiu, *Thromb. Haemost.* 1994, 71(3), 325–330; W. Seffner, F. Schiller, R. Heinze, and R. Breng, *Exp. Toxicol. Pathol.* 1995, 47(1), 63–70; and J. Schneider, R. Weis, C. Manner, B. Kary, A. Werner, B. J. Seubert, and U. N. Riede, *Virology* 1996, 218(2), 389–395.

The enzymatic catalytic synthesis of humic acids dates to about 1961 with the work by R. E. Hampton and R. W. Fulton, *Virology* 1961, 13, 44–52 (see also R. E. Hampton, *Phytophathology* 1970, 60, 1677–1681), who found that enzymatically oxidized phenols inactivate phytopathogenic (i.e., plant-related) viruses. Typically o-diphenol oxidase has been employed for the enzymatic synthesis of humic-like materials: anon. *Zentralbl. Bakteriol.* [*Orig. A*] 1976, 234 (2), 159–169; R. Klocking, B. Helbig, and P. Drabke, *Pharmazie* 1977, 32(5), 297; K. D. Thiel, B. Helbig, R. Klocking, P. Wutzler, M. Sprossig, and H. Schweizer, *Pharmazie* 1981, 36(1), 50–53; K. D. Thiel, B. Helbig, M. Sprossig, R. Klocking, and P. Wutzler, *Acta Virol.* 1983, 27(3), 200–208; K. D. Thiel, P. Wutzler, B. Helbig, R. Klocking, M. Sprossig, and H. Schweizer, *Pharmazie* 1984, 39(11), 781–782; and G. Sydow, V. Wunderlich, R. Klocking, and B. Helbig, *Pharmazie* 1986, 41 (12), 865–868.

A direct comparison of humic acids synthesized enzymatically and nonenzymatically from caffeic and hydrocaffeic acids has shown that the two synthetic routes produce materials that differ somewhat in their efficacy for the suppression of herpes (hominis) types 1 and 2 viruses: K. D. Thiel, P. Wutzler, B. Helbig, R. Klocking, M. Sprossig, and H. Schweizer, *Pharmazie* 1984, 39(11), 781–782.

German patent DE 3830333 C1 (Mar. 15, 1990) issued to Wagner discloses a pharmaceutical composition comprised in part of humic acid for the topical treatment of herpes virus-induced vesicular rash. The method of preparation of the humic acid utilized is not disclosed.

U.S. Pat. No. 4,999,202 (Mar. 12, 1991) issued to Cronje, et al disloses a composition that has bactericidal or bacteriostatic properties, and which comprises oxidized coal-derived humic acid or a salt or derivative thereof as the active ingredient in a suitable carrier. The active ingredient is preferably an alkali metal salt of coal-derived humic acid and the carrier is preferably water. The method of preparation involves recovery of the humic acid by precipitation, after acidification with an acid such as hydrochloric acid to a pH value of 2.

European patent application 0537430A1 (Apr. 21, 1993) from Riede, et al. discloses the use of natural or synthetic, modified or unmodified ammonium or alkali metal humates against viruses, especially against retroviruses such as HIV. Riede et al. disclose humates that have insignificant toxicity and are neither mutagens nor teratogens. Riede, et al. also disclose a specific synthetic preparation of said humates that requires as long as 10–15 days to complete the oxidation of the starting material during which time the reaction temperature is maintained below 40° C. The solution is acidified to pH 4–5 following the synthesis, following which known methods of purification, such as preparative chromatography, ultrafiltration, centrifugation, or electrodialysis, are employed. No inorganic salts other than the oxidant or the starting material are employed during or after the synthesis.

World patent application 95/08335 (published Mar. 30, 1995) from Zanetti, which is equivalent to U.S. application 08/310,675 (filed Sep. 22, 1994) discloses a method of inhibiting human immunodeficiency virus infection that comprises contacting leukocytes, peripheral blood mononuclear cells, and lymphocytes of an individual infected with said virus with an anti- immunodeficiency virus amount of a natural, commercially available preparation of humic acid. Synthetic humic acid preparations are also disclosed. The synthetic procedure disclosed employs no inorganic salts other than sodium periodate for the oxidation of the starting material. The synthetic procedure employs acidification of the product of the synthesis with 6 M HCl to a pH of less than 1. This solution is allowed to stand overnight. A precipitate of the synthetic product forms which is washed several times with 1M HCl. The final step involves freeze drying the precipitate.

Phenolic polymers such as humic acid, when exposed to hydrochloric acid under the above conditions as well as the conditions in Cronje '202, may be chlorinated. That is, one or more chlorine atoms will possibly be added to the aromatic rings of the phenolic polymers: R. B. Wagner and H. D. Zook, *Synthetic Organic Chemistry*, New York: J. Wiley & Sons, March 1963, 88–147. Other changes such as selective 0-demethylation of humic acid products may also occur in the presence of hydrochloric acid: M. Fieser and L. F. Fieser, *Reagents For Organic Synthesis*, New York, Wiley-Interscience, Vol. 4, 1974, 250. It has been reported

that aqueous chlorination of humic acids results in the formation of compounds with direct-acting mutagenic activity in the Ames/Salmonella plate assay. Nonchlorinated humic acids are not mutagenic: J. R. Meier, R. D. Lingg, R. J. Bull, *Mutat. Res.,* 1983, 118(1–2), 25–41. It has also been reported that freeze-dried, chlorinated humic acid contains nonvolatile, direct-acting mutagenic and/or alkylating agents: S. C. Agarwal, J. Neton, *Sci. Total Environ.,* 1989, 79(1), 69–83. A subchronic 90-day toxicology study has been conducted with chlorinated and nonchlorinated humic acids using male Sprague-Dawley rats. Increased incidence and severity of hematuria was found in the 1.0-g/l chlorinated humic acid group: L. W. Condie, R. D. Laurie, J. P. Bercz, *J. Toxicol. Environ. Health,* 1985, 15(2), 305–14. Thus, synthetic methods for the production of humic acids that can possibly produce chlorinated humic acids are to be avoided.

Another area of related art relevant to this invention is comprised of blood product compositions and methods for treating blood products to reduce viral and microbial activity. A variety of human blood products including blood platelets exist to meet critical medical therapeutic needs. Viral safety depends upon donor selection and screening. It has proven to be impossible to date to screen blood products adequately to provide complete assurance that there is no viral contamination. These blood products may be inadvertantly contaminated with viruses such as HIV-human immunodeficiency virus, hepatitus virus, including hepatitus A, B, and C and other viruses. A solvent/detergent (SD) technique exists for treating blood products including blood platelets, but this technique is primarily limited to lipid enveloped viruses and is known to be ineffective for nonenveloped viruses such as hepatitus A, parvovirus B19 and picornaviruses: P. M. Mannucci, et al., *Ann. Intern. Med.,* 1994, 120(1),1–7; and L. Gurtler, *Infusionsther. Transfusionsmed.,* 1994, 21(Suppl 1), 77–9. Additionally, it is necessary to separate the detergents in the SD method from the blood product utilizing extraction with soybean or castor oil and chromatography on insolubilized C18 resin: B. Horowitz et al., *Blood,* 1992, 79(3), 826–31; and Y. Piquet et al., *Vox Sang.,* 1992, 63(4), 251–6.

A pasteurization process has been developed for treating blood products. This involves heat treatment of a stabilized aqueous protein solution at 60° C. for 10 hours. However, residual infectious hepatitus A virus has been found even after 10 hour heat treatment of the stabilized preparation: J. Hilfenhaus and T. Nowak, *Vox Sang,* 1994, 67(Suppl 1), 62–6. Neither the solvent/detergent (S/D) process nor the pasteurization process alone are adequate to inactivate viruses that are strongly resistant to heat and organic solvents. In this context, human parvovirus B19 and hepatitus A virus are of particular concern: H. Schwinn et al., *Arznneimittelforschung,* 1994, 44(2), 188–91.

A final super heat treatment (100° C. for 30 min) has been developed as an additional virus inactivation step to improve the safety of plasma derived factor VIII (FVIII) concentrate already treated with the solvent/detergent (S/D) method during the manufacturing process. The efficiency of the super heat treatment was demonstrated in inactivating two nonlipid enveloped viruses (Hepatitus A virus and Poliovirus 1). However, the loss of FVIII procoagulant activity during the super heat treatment was about 15%, estimated both by clotting and chromogenic assays: S. Arrighi et al., *Thromb. Haemost.,* 1995, 74(3), 863–73.

A method for treating human blood products employing short wavelength ultraviolet light (UVC) irradiation for virus inactivation and enhancement of its compatibility with proteins by quenchers of reactive oxygen species has been developed. However, blood protein recovery was typically only around 75%: S. Chin et al., *Blood,* 1995, 86(11), 4331–6. Ultraviolet irradiation methods have additionally been reported not to be applicable to cellular blood products: C. M. Allen, *Photochem. Photobiol.,* 1995, 62(1), 184–9.

In summary, there remains a need for a safe, efficacious and simple method for treating all human blood products to reduce or eliminate lipid enveloped and nonenveloped virus activity without loss of blood product or blood product activity.

The diversity of physicochemical characteristics as well as wide variation in the biological activity and toxicity of humics extracted or otherwise derived from natural soils has been well documented. This diversity and variation is due to variations in factors such as the source of the soil, the method(s) of extraction and/or isolation, and the technique (s) employed to treat the extract once it has been separated and isolated from crude soil. The consequence of irreproducibility of the properties of substances extracted from natural soil is that the commercial value of such materials is minimized. In addition, they are rendered unsuitable as medicaments. Also, while a number of laboratory-scale processes have already been described that address various aspects of the isolation, synthesis, and/or preparation of humic substances or similar materials, there are no reports of preparing and isolating such purely synthetic humic acids or similar materials by methods that are suitable for scaleup directly to industrial levels, that provide economically acceptable yields, and that optimize the preparation procedures from the standpoint of medicament safety and efficacy. All of the known synthetic methods utilize potentially toxic precipitation methods (lead(II) nitrate precipitation) followed by complex isolation procedures, potentially mutagenic compound-producing hydrochloric acid precipitation or lengthy synthetic steps as long as 10 days. The solution is to devise simple synthetic procedures that yield inexpensive, safe materials whose physicochemical attributes are reproducible, and that at least simulate those of typical commercially-available soil extracts. This invention is directed to this solution and to compositions and methods employing synthetic materials prepared according to the process of the invention.

SUMMARY OF THE INVENTION

One aspect of the invention is a process for preparing synthetic phenolic polymeric materials whose physicochemical properties and attributes are reproducible, and which simulate the physicochemical properties and attributes of typical commercially-available natural humic acids and other soil extracts. This process comprises the steps of:

a) dissolving one or more starting organic compounds selected from the group consisting of the compounds listed in Table 1 and Table 2 in an aqueous solution comprising distilled water or sodium hydroxide;

b) adjusting the pH of the aqueous solution resulting from step a) to between 8 and 11 if necessary;

c) adding an alkaline periodate salt or alkaline-earth periodate salt to the aqueous solution resulting from step b);

d) maintaining the temperature of the solution resulting from step c) between 35 and 80° C. for a period of 30 minutes to 100 hours;

e) adding one or more compounds or salts selected from the group consisting of boric acid, borate salts, alkaline

earth salts, transition metal salts, alkaline sulfides, alkaline earth sulfides or transition metal sulfides to the aqueous solution resulting from step d);

f) allowing the aqueous solution resulting from step e) to stand with or without stirring at room temperature between 2 and 48 hours;

g) removing molecules from the solution resulting from step f) below about 500 to about 10,000 daltons;

h) concentrating the solution resulting from step g); and

i) removing the water from the solution resulting from step h) if necessary.

In one embodiment of the process, the pH of the aqueous solution resulting from step a) is adjusted to between 8 and 11 by adding aqueous ammonium hydroxide, or other aqueous alkaline oxide or hydroxide, or aqueous alkaline-earth oxide or hydroxide, or aqueous transition-metal oxide or hydroxide, or hydrochloric acid or other inorganic acid. In another embodiment of the process, the alkaline or alkaline-earth sulfides are added to the solution resulting from step b). Alternatively, the alkaline or alkaline-earth sulfides are added to the solution resulting from step c). In another embodiment of the process, transition-metal sulfides are added to the solution resulting from step b). Alternatively, transition-metal sulfides are added to the solution resulting from step c). In another embodiment of the process, any precipitate formed from the solution resulting from step f) is removed by centrifugation. In another embodiment of the process, step g) is accomplished by dialyzing the solution resulting from step f) with a flow-through apparatus consisting of a sandwich-type membrane of molecular-weight cutoff of 500–10,000 daltons until the conductivity of the retentate solution has dropped to 200 microsiemens or less. In a further embodiment of the process following dialysis in step g), the solution resulting from step g) is concentrated in step h) by utilizing a flow-through dialysis apparatus that produces a retentate solution such that the volume of the dialysis apparatus retentate solution is allowed to drop. In another embodiment of the process, the solution resulting from step g) is passed through a filter of pore size between 0.2 and 0.4 micron to produce a sterile solution. In another embodiment of the process, the solution resulting from step g) is autoclaved between 100 and 150° C. for 5 to 60 minutes to produce a sterile solution. In another embodiment of the process, the solution resulting from step h) is passed through a filter of pore size between 0.2 and 0.4 micron to produce a sterile solution. In another embodiment of the process, the solution resulting from step h) is autoclaved between 100 and 150° C. for 5 to 60 minutes to produce a sterile solution. In another embodiment of the process, mannose or other static electricity reduction material is added to the solution resulting from step h) prior to removing the water from said solution in step i). In another embodiment of the process, step i) is accomplished by spray-drying or thermally-induced evaporation or vacuum or freeze-drying. In another embodiment of the process, the dried powder from step i) is autoclaved between 100 and 150° C. for 5 to 60 minutes to produce a sterile powder. In another embodiment of the process, tubular, capillary, coiled-spiral, or plane dialysis membranes are used in step g) for removing molecules from the solution resulting from step f). In a further embodiment of the process employing tubular, capillary, coiled spiral, or plane dialysis membranes in step g), the solution resulting from step g) is passed through a filter of pore size between 0.2 and 0.4 micron to produce a sterile solution. Alternatively, the solution resulting from step g) which employed tubular, capillary, coiled-spiral, or plane dialysis emebranes is autoclaved between 100 and 150° C. for 5 to 60 minutes to produce a sterile solution. In a further embodiment of the process employing tubular, capillary, coiled-spiral, or plane dialysis membranes in step g), the solution resulting from step g) is concentrated in step h) by utilizing a flow-through dialysis apparatus that produces a retentate solution such that the volume of the dialysis apparatus retentate solution is allowed to drop. In another embodiment of the process of the invention, the solution resulting from step g) is further dialyzed with a flow-through apparatus consisting of a sandwich-type membrane of molecular-weight cutoff of 30,000–100,000 daltons to produce an aqueous filtrate solution containing synthetic phenolic polymeric materials of lower molecular weight between 500 and 10,000 daltons and upper molecular weight between 30,000 and 100,000 daltons. In a further embodiment of the prior process employing further dialysis, tubular, capillary, coiled spiral, or plane dialysis membranes are used for said further dialysis. In a further embodiment of the prior process employing tubular, capillary, coiled spiral, or plane dialysis membranes in step g), the solution resulting from step g) is passed through a filter of pore size between 0.2 and 0.4 micron to produce a sterile solution. Alternatively, the solution resulting from step g) which employed tubular, capillary, coiled-spiral, or plane dialysis membranes is autoclaved between 100 and 150° C. for 5 to 60 minutes to produce a sterile solution. In a further embodiment of the previous process employing tubular, capillary, coiled-spiral, or plane dialysis membranes in step g), the solution resulting from step g) is concentrated in step h) by utilizing a flow-through dialysis apparatus that produces a retentate solution such that the volume of the dialysis apparatus retentate solution is allowed to drop.

In another aspect of the invention, a blood product composition is provided comprising an anti-viral amount of a synthetic phenolic polymeric material produced by the process of the invention combined with a blood product. In one embodiment of the blood product composition, said blood product is whole human blood. In another embodiment of the blood product composition, said blood product is human blood platelets. In another embodiment of the human blood platelet blood product composition, the anti-viral amount is an amount sufficient to reduce human immunodeficiency virus (HIV) activity. In yet another embodiment of the human blood platelet blood product composition, the anti-viral amount is an amount sufficient to reduce non-enveloped virus activity. Preferably, the non-enveloped virus is parvovirus or cytomegalovirus. In another embodiment of the blood product composition, said blood product is human blood serum. In another embodiment of the blood product composition, said blood product is a human blood protein. Preferably, said human blood protein is human serum albumin or human serum gamma-globulin. In another embodiment of the blood product composition, said blood product is a human haemophilia factor. Preferably, the human haemophilia factor is factor VIII or factor IX. In a further embodiment of the blood product composition

wherein said blood product is a human haemophilia factor, the anti-viral amount is sufficient to reduce human immunodeficiency virus (HIV) activity. Alternatively, the anti-viral amount is sufficient to reduce non-enveloped virus activity. Preferably, the non-enveloped virus is parvovirus or cytomegalovirus.

In yet another aspect of the invention, there is provided a method of reducing the amount of virus in a blood product by contacting said blood product with an anti-viral amount of a synthetic phenolic polymeric material produced by the process of the invention. In one embodiment of the method of reducing the amount of virus in a blood product, said contacting consists of sterily breaking a seal in a connecting path between two separate chambers, one of which contains said blood product in a sterile form and the other of which contains said anti-viral amount of said synthetic phenolic polymeric material in sterile form. In another embodiment of the aforementioned method, said contacting consists of injecting a sterile solution containing said anti-viral amount into said blood product. In another embodiment of the method above, said virus is preferably Human Immunodeficiency Virus (HIV). In another preferred embodiment of the above method, said virus is Hepatitis A virus, Hepatitis B virus, Hepatitis C virus, parvovirus, or cytomegalovirus. In another embodiment of the above method, one or more additional blood treatment methods for reducing viral activity are employed. Preferably, the additional blood treatment method is the solvent/detergent (SD) method.

In a further aspect of the invention, there is provided a composition for treating or preventing human or animal diseases caused by a virus comprising an anti-viral amount of a synthetic phenolic polymeric material produced by the process of the invention and at least one physiologically acceptable carrier or excipient. Preferably, the virus is Human Immunodefiency Virus (HIV), Herpes Simplex Virus Type I or Type II, or is a picornavirus. Preferably, the physiologically acceptable carrier or excipient is an injectable solution excipient, a topical formulation excipient, an ingestable excipient, a nasal spray excipient, a metered-dose inhaler excipient, vaginal or anal suppository excipient, or an excipient suitable for disinfection or preservation of a medical device.

Still another aspect of the invention provides a composition for treating or preventing human or animal microbial-induced diseases comprising an antimicrobial amount of a synthetic phenolic polymeric material produced by the process of the invention and at least one physiologically acceptable excipient. Preferably, the physiologically acceptable carrier or excipient is an injectable solution excipient, a topical formulation excipient, an ingestable excipient, a nasal spray excipient, a metered-dose inhaler excipient, vaginal or anal suppository excipient, or an excipient suitable for disinfection or preservation of a medical device. Preferably, the medical device is a contact lens, intraocular lens, dental prosthesis, implantable medical device such as a heart valve or a medical instrument which contacts the body such as an endoscope or catheter.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. **1** shows the high-performance liquid chromatography (HPLC) trace obtained for the synthetic humic acid product obtained from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid), as described in Examples 10 and 11;

FIG. **2** shows the high-performance liquid chromatography (HPLC) trace obtained for a typical commercially-available natural humic acid;

FIG. **3** shows the p24 expression of HIV-positive cells harvested 6 and 8 days after treatment with synthetic humic acids prepared as described in Examples 10 and 11. Also shown for comparison are the results obtained for natural humic acid that has been dialyzed, and natural humic acid that has been dialyzed and freeze-dried. C+ and C− are positive and negative controls, respectively.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT

An object of the present invention is to provide new and improved combinations of chemical processes for the preparation of synthetic phenolic polymeric materials, also known as synthetic humic acids, whose physicochemical properties and attributes are reproducible, and which simulate those of typical commercially-available natural humic acids and other soil extracts, which contain no ionic salts or other compounds of molecular weight less than 500 daltons, which have a minimum molecular weight of 500 daltons, and which processes shall be suitable for scaleup directly to industrial levels that provide economically acceptable yields.

Still another object of the present invention is to provide human or animal blood product compositions comprising an anti-viral amount of a synthetic humic acid prepared according to the above processes.

Still another object of the present invention is to provide methods for reducing or eliminating the amount of virus in human or animal blood products by contacting said blood products with an anti-viral amount of a synthetic humic acid prepared according to the above processes.

Still another object of the present invention is to provide compositions for treating or preventing human or animal viral diseases comprising an anti-viral amount of a synthetic humic acid prepared according to the above processes.

Still another object of the present invention is to provide compositions for treating or preventing human or animal microbial diseases comprising an anti-microbial amount of a synthetic humic acid prepared according to the above processes.

According to the present invention the starting compounds used in the chemical processes employed for production of synthetic humic acids are known materials that are readily available commercially.

Generally speaking, the chemical processes for the preparation of synthetic humic acids of the invention are characterized by the following steps:

A. Dissolving the starting organic compound or mixture of organic compounds in an aqueous solution comprising distilled water or sodium hydroxide.

B. Adjusting the pH of the aqueous solution resulting from step A) to between 8 and 11 if necessary.

C. Adding an alkaline periodate salt or alkaline-earth periodate salt to the aqueous solution resulting from step B).

D. Maintaining the temperature of the solution resulting from step C) between 35 and 80° C. for a period of 30 minutes to 100 hours.

E. Adding one or more compounds or salts selected from the group consisting of boric acid, borate salts, alkaline earth salts, transition metal salts, alkaline sulfides, alkaline earth sulfides or transition metal sulfides to the aqueous solution resulting from step D);

F. Allowing the aqueous solution resulting from step E) to stand with or without stirring at room temperature between 2 and 48 hours.

G. Removing molecules from the solution resulting from step F) below about 500 to about 10,000 daltons.

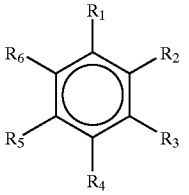
H. Concentrating the solution resulting from step G).

I. Removing the water from the solution resulting from step H) if necessary.

The starting organic compound in step A) above can be one, or more than one in combination, of different compounds taken from the group consisting of starting organic compounds illustrated in Tables 1 and 2. Starting organic compounds illustrated in Table 1 are comprised of a single benzene ring with six substituents R1–R6, wherein R1–R6 can be any one of the indicated atom or functional groups, as long as at least one of R1–R6 is a hydroxy (—OH) functional group. Preferably, at least one of R1–R6 is a hydroxy (—OH) functional group and at least one of the remaining substituents R1–R6 contains a carboxylic acid functional group. More preferably, two of R1–R6 are hydroxy (—OH) functional groups and one of the remaining substituents R1–R6 contains a carboxylic acid functional group. Homogentisic acid, which is 2,5-dihydroxyphenylacetic acid, is a particularly preferred starting organic compound.

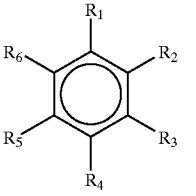
Various initial concentrations of starting organic compounds in distilled water can be employed and no lower or upper limits are uniformly required. A low concentration solution of sodium hydroxide, such as 0.1 Normal, may also be employed as a diluent for the starting organic compound. The appropriate initial concentration of the starting organic compound or compounds is determined by the

TABLE 1



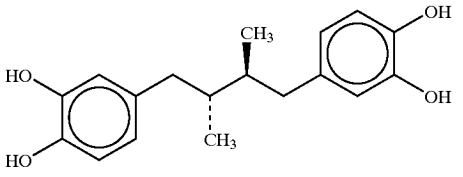
R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 =
—H
—CH_3
—CH_2CH_3
—$(CH_2)_2CH_3$
—$CH(CH_3)_2$
—OH
—OCH_3
—CHO
—CO_2H
—CO_2CH_3
—CH_2OH
—CH_2OCH_3
—CH_2CHO

TABLE 1-continued

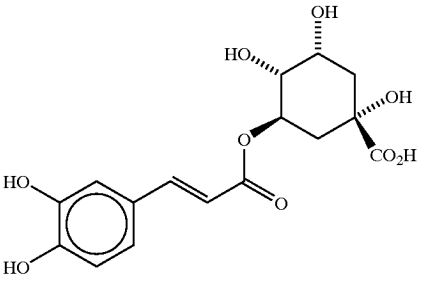


R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 =
—CH_2CO_2H
—$CH_2CO_2CH_3$
—$(CH_2)_2OH$
—$(CH_2)_2OCH_3$
—$(CH_2)_2CHO$
—$(CH_2)_2CO_2H$
—$(CH_2)_2CO_2CH_3$
—$CH(CH_3)OH$
—$CH(CH_3)OCH_3$
—$CH(CH_3)CHO$
—$CH(CH_3)CO_2H$
—$CH(CH_3)CO_2CH_3$
—$CH(CH_3)CH_2OH$
—$CH(CH_3)CH_2OCH_3$
—$CH(CH_3)CH_2CHO$
—$CH(CH_3)CH_2CO_2H$
—$CH(CH_3)CH_2CO_2CH_3$
—$CH(OH)_2$
—$CH(OH)OCH_3$
—CH(OH)CHO
—$CH(OH)CO_2H$
—$CH(OH)CO_2CH_3$
—$CH(OCH_3)OH$
—$CH(OCH_3)_2$
—$CH(OCH_3)CHO$
—$CH(OCH_3)CO_2H$
—$CH(OCH_3)CO_2CH_3$
—$CH(OH)CH_2OH$
—$CH(OH)CH_2OCH_3$
—$CH(OH)CH_2CHO$
—$CH(OH)CH_2CO_2H$
—$CH(OH)CH_2CO_2CH_3$
—$CH(OCH_3)CH_2OH$
—$CH(OCH_3)CH_2OCH_3$
—$CH(OCH_3)CH_2CHO$
—$CH(OCH_3)CH_2CO_2H$
—$CH(OCH_3)CH_2CO_2CH_3$
—$(CH_2)_3OH$
—$(CH_2)_3OCH_3$
—$(CH_2)_3CHO$
—$(CH_2)_3CO_2H$
—$(CH_2)_3CO_2CH_3$
—CHCHOH (cis or trans)
—$CHCHOCH_3$ (cis or trans)
—CHCHCHO (cis or trans)
—$CHCHCO_2H$ (cis or trans)
—$CHCHCO_2CH_3$ (cis or trans)
—$CH_2CHCHOH$ (cis or trans)
—$CH_2CHCHOCH_3$ (cis or trans)
—$CH_2CHCHCHO$ (cis or trans)
—$CH_2CHCHCO_2H$ (cis or trans)
—$CH_2CHCHCO_2CH_3$ (cis or trans)

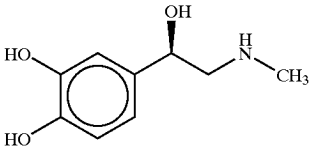
TABLE 2



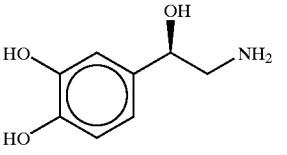
Nordihydroguaiaretic Acid



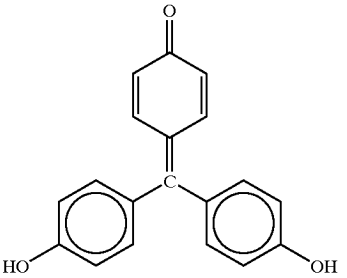
Chlorogenic Acid



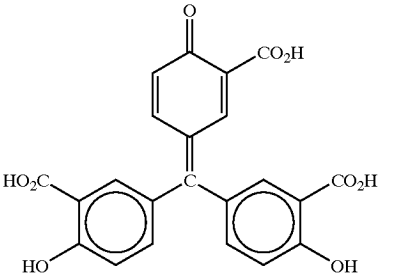
Epinephrine



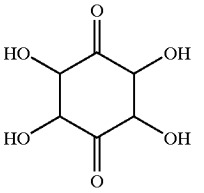
Norepinephrine



Aurin



Aurintricarboxylic Acid



Tetrahydroxybenzoquinone

synthesis yield requirements and inherent requirements, such as the upper limit of aqueous solubility of the starting organic compound or compounds. Conventional methods are employed to determine the appropriate initial concentration of the starting organic compound or compounds.

The pH of the aqueous solution containing the starting organic compound or compounds can be adjusted in step B) to between 8 and 11 by adding aqueous ammonium hydroxide, or other aqueous alkaline oxide or hydroxide, or aqueous alkaline earth oxide or hydroxide, or aqueous transition metal oxide or hydroxide. Additonally, if the initial aqueous solution contains a low concentration of base, such as 0.1 Normal sodium hydroxide and the initial solution pH is too high, an acid such as hydrochloric acid may be employed to adjust the pH to the desired value. Other inorganic acids may also be employed for pH adjustment. Note that if hydrochloric acid is employed to adjust the pH downwards from an initial high value, care should be taken to avoid letting the pH go below 8. Acidic conditions below pH 7 should be avoided in the presence of hydrochloric acid to eliminate the possibility of formation of mutagenic chlorinated humic acid materials.

An alkaline periodate salt or alkaline earth periodate salt may be employed as an oxidant or polymerization initiator of the starting organic compound in step C). Sodium periodate is particularly preferred. The concentration of the alkaline periodate salt or alkaline earth periodate salt is generally between 10% and 100% of the starting organic compound or compounds on a molar basis. Thus, if 10 millimoles of starting organic compound is employed, 1 to 10 millimoles of alkaline periodate salt may be employed. Preferably, a molar concentration of periodate which is 10–50% of the molar concentration of the starting organic compound or compounds is employed. Most preferably, a molar concentration of periodate which is 25–35% of the molar concentration of the starting organic compound or compounds is employed. The exact concentration to be used can be determined by conventional synthetic yield optimization techniques.

Alkaline or alkaline earth sulfides or transition metal sulfides can be optionally added to the initial aqueous solution containing the starting organic compound or compounds following the pH adjustment step B) and immediately before, at the same time or following the addition of the

periodate in step C). Sulfides contribute to the phenolic polymeric structure, the stability of the structure and its biological activity. Sodium sulfide nonahydrate is a particularly preferred sulfide. The concentration of the sulfide is generally between 1% and 20% of the starting organic compound or compounds on a molar basis. Thus, if 10 millimoles of starting organic compound is employed, 0.1 to 2 millimoles of sulfide may be employed. Preferably, a molar concentration of sulfide which is 5–15% of the molar concentration of the starting organic compound or compounds is employed. Most preferably, a molar concentration of sulfide which is 8% to 12% of the molar concentration of the starting organic compound or compounds is employed. The exact concentration of sulfide to be used can be determined by conventional synthetic yield optimization techniques.

The pH-adjusted aqueous solution containing the starting organic compound, periodate and optional sulfide is placed in a water-bath or other thermostat heating device at between 35° C. and 80° C. for a period of 30 minutes to 100 hours in step D). Alternatively, the aqueous solution itself may be thermostated between 35° C. and 80° C. for a period of 30 minutes to 100 hours. A preferred temperature and time is 50° C. for 30 minutes.

Following this period, salts are added to the solution resulting from step D) alone or in combination in step E). Salts containing boron, calcium and other alkaline earths, iron and other transition metals are preferred. Such salts additionally contribute to the phenolic polymeric structure, its stability and biological activity. Boric acid or boron-containing-borate salts such as sodium borate are particularly preferred, as are alkaline earth salts, such as calcium sulfate dihydrate and transition metal salts, such as ferrous sulfate heptahydrate. The concentrations of each of the salts employed is generally between 0.1% and 20% of the starting organic compound or compounds on a molar basis. Preferably, a molar concentration of salt which is 0.2% to 10% of the molar concentration of the starting organic compound or compounds is employed. Most preferably, a molar concentration of salt which is 0.2% to 2% of the molar concentration of the starting organic compound or compounds, is employed. The exact concentration to be used can be determined by conventional synthetic yield optimization techniques.

The solution resulting from step E) is allowed to stand at room temperature with or without stirring for a period of time from 2 to 48 hours in step F). Any precipitate formed at this stage is removed via conventional centrifugation.

Molecules are removed from the solution resulting from step F) below about 500 to about 10,000 daltons in step G). A variety of known conventional techniques can be employed such as preparative chromatography, ultrafiltration or dialysis. Molecules are preferably removed from the solution resulting from step F) by employing dialysis in step G) with a flow-through open-channel or screen membrane apparatus consisting of a sandwich-type membrane of lower molecular-weight cutoff of 500–10,000 daltons until the conductivity of the solution has dropped to 200 microsiemens or less. Most preferably, molecules are removed from the solution resulting from step F) by employing dialysis in step G) until the conductivity of the solution has dropped to 30 microsiemens or less. A Pall Filtron Ultrasette® Tangential Flow Device or Mini- Ultrasette® Tangential Flow Device used with a Pall Filtron Ultralab® Specialized Pump and Reservoir System are preferred for solution dialysis.

The conductivity of the solution processed in step G) above can conveniently be monitored with a flow-through conductivity cell and conductivity meter. Alternatively, a simple inexpensive hand-held combination conductivity cell-conductivity meter (e.g., a Nalcometer Model MLN) can be employed.

Before removing the water from the solution in step H) above, the solution resulting from step G) above can be further dialyzed with a flow-through apparatus consisting of a sandwich-type membrane of molecular weight cutoff of 50,000 daltons. In this case the filtrate solution, not the retentate, is saved for further concentrating and processing according to steps H) and I). The resultant product will have a molecular-weight range of 500–50,000 daltons.

If the solution resulting from either steps G) or H) above is to be stored as an aqueous solution for long periods of time for later application or use, for example as an anti-viral treatment solution, anti-viral therapy, anti-microbial therapy, a spray-on fertilizer or soil amendment, it can be filtered through standard 0.2 to 0.4 micron filters to remove bacteria and viruses, that is, can be made sterile by filtration. Alternatively, the aqueous solution from either steps G) or H) can be autoclaved for 5–60 minutes at 100–150° C. to produce a sterile solution.

A final optional step I) in the process of the present invention involves removing water from the solution resulting from step H). When freeze-drying is employed as the method of water removal in step I) above, the resultant product is a light fluffy dark-colored powder that is subject to static electricity effects. To minimize these effects, a small amount of mannose or other sugar can be added to the solution resulting from step H) just prior to freeze-drying. Water removal from the product can be carried out by means other than freeze-drying in step I) above, such as by heat evaporation with or without vacuum, by rotary evaporation, by spray-drying, or by any other solvent-removal technique that is convenient as well as economical for aqueous solutions. The dried powder obtained from step I) above can be autoclaved for 15–30 minutes at 100–120° C. to produce a sterile powder.

The synthetic humic acid materials produced according to the chemical processes and separation and isolation procedures of the present invention exhibit the physicochemical properties and attributes of typical naturally-occurring commercially-available humic acids and other soil extracts.

A facile method of examining the physicochemical characteristics of the product yielded by steps A) through H) above, or by modifications thereto, is high-performance liquid chromatography (HPLC). The chromatographic fingerprint pattern so obtained from HPLC also offers a convenient means of comparing one product with another, as well as comparing each of the synthetic products with naturally-occurring humic acids and other soil-extract materials. The HPLC method is thus used to determine the reproducibility of the physiochemical properties and attributes of the synthetic phenolic polymeric materials, as well as to determine if the aforementioned properties and attributes simulate the physiochemical properties and attributes of typical commercial-available natural humic acids and other soil extracts. The latter determination of simulation is done in the conventional manner employing HPLC; e.g., by visually and quantitatively comparing the HPLC chromatographic fingerprint patterns of the materials. The fingerprint patterns of the two materials, one synthetic and one natural, need not be 100% identical to conclude that the physiochemical properties and attributes of the synthetic phenolic polymeric material simulates the physiochemical properties and attributes of the natural humic acid. An approximate correspondence between the aforementioned

HPLC fingerprint patterns is all that is required to conclude that the synthetic material simulates the natural material. In general, even a 75% visual correspondence in 2 HPLC fingerprint patterns is all that is necessary to conclude that one material simulates another. A useful fingerprint pattern for natural as well as synthetic soil extract materials can be obtained as follows. The column is comprised of a packing, typically reversed-phase polymer PRP-1 (Hamilton Co.), of particle size 5 microns, and being 150 millimeters in length by 4.1 millimeters inside diameter. The mobile phase is comprised of three solutions. Solution A is 0.1 Normal aqueous sodium hydroxide. Solution B is 0.05 Normal of so-called Prideaux universal buffer, which is made by combining 4.25 grams of sodium nitrate ($NaNO_3$), 12.37 grams of boric acid (H_3BO_3), 23.06 grams of phosphoric acid (H_3PO_4), and 12.01 grams of acetic acid (CH_3CO_2H) with 4 liters of distilled water. Solution C is 100% methanol (CH_3OH). The mobile-phase gradient employed for an HPLC run consists of 40% solution A plus 60% solution B at the beginning, which composition is changed in a linear manner to 100% solution A after 20 minutes. The mobile phase is then changed linearly again to 10% A plus 90% C over the next 5 minutes, which final composition is held for the purpose of a column wash for the next 35 minutes. The mobile-phase flow rate is 1 milliliter per minute. The detector is UV-Visible, which is set at 340 nanometers. The chart speed is typically 0.5 centimeter per minute. The sample loop size is 5–20 microliters. Solutions are prepared for analysis by dissolving 1–10 grams of dried sample in 100 milliliters of 0.1 normal aqueous sodium hydroxide of pH 8–10.

The chemical processes and separation and isolation procedures of the present invention are suitable for scaleup directly to industrial levels that provide economically acceptable yields. The chemical processes and separation and isolation procedures of the present invention can produce synthetic product yields approaching 100%. More typically, approximately 0.08 to 0.65 g of synthetic humic acid can be produced from 10 millimoles of starting organic compound or compounds in 300 ml. These procedures can be scaled up to pharmaceutical production scales employing 10,000 to 20,000 liters or more of initial solution containing the starting organic compound or compounds. A total yield of between approximately 2.7 and 21.7 kg of synthetic humic acid can be achieved utilizing a 10,000 liter thermally jacketed stainless steel tank and a concentration of starting organic compound of 10 millimoles per 300 ml. A single anti-viral treatment may employ milligram amounts of synthetic humic acid. 20 kg of synthetic humic acid represents 2 million units of anti-viral product at 10 mg per unit. Even at a treatment cost of $ 0.10 per unit, this represents $ 200,000 of synthetic humic acid. Since the starting organic compounds utilized in the present invention are relatively inexpensive, the synthesis yields of the chemical processes and separation and isolation procedures of the present invention are economically very acceptable.

Examples 1 through 9 are illustrative of the variety of starting organic compounds that can be employed in the process of the present invention. It was not considered necessary to carry out all steps of the process of the present invention to illustrate starting compound variety. More particularly, Examples 1 through 9 are illustrative of all steps of the process of the invention with the exception of step E).

EXAMPLE 1

Preparation of a synthetic humic acid from 2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid). The starting organic compound is shown in Table 1, and consists of R_1=—CO_2H, R_2,R_5=—OH, and R_3,R_4,R_6=—H. 1.55 grams (10 millimoles) of gentisic acid is dissolved in 300 milliliters of 0.1 Normal aqueous sodium hydroxide (NaOH). The solution pH is adjusted to 8.5 with 6 Normal HCl. 0.54 gram of sodium periodate ($NaIO_4$; 2.5 millimoles) is added, and the solution is placed in a water-bath at 50° C. for 30 minutes. The solution is allowed to stand at room temperature overnight. Any precipitate is removed by centrifugation. The solution is dialyzed with a 3,000-dalton cut-off flow-through open-channel or screen membrane system (Pall Filtron: Ultrasette® 7 Tangential Flow Device or Mini-Ultrasette® 7 Tangential Flow Device used with a Pall Filtron Ultralab® 7 Specialized Pump and Reservoir System) to a conductivity of 30 microsiemens or less against distilled water. The dialysis apparatus is then used to concentrate the solution to about 200 milliliters. The solution can be saved at this point for further use as an aqueous solution; or it can be freeze-dried to a powder. (0.05–0.2 gram of mannose or other suitable carbohydrate can be added to the solution prior to freeze-drying to reduce static electricity effects associated with the freeze-dried powder.) The yield of synthetic soil extract is 0.2 gram.

The following examples 2–9 employ the synthesis procedure of Example 1 beginning with the adjustment of solution pH.

EXAMPLE 2

Preparation of a synthetic humic acid from 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (homoprotocatechuic acid). The starting organic compound, 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid, is shown in Table 1, and consists of R_1=—CH_2CO_2H, R_3,R_4=—OH, and R_2,R_5,R_6=—H. 1.68 grams (10 millimoles) of homoprotocatechuic acid is dissolved in 300 milliliters of 0.1 Normal aqueous sodium hydroxide (NaOH). The remaining procedure follows that of Example 1. The yield of synthetic soil extract is 0.24 gram.

EXAMPLE 3

Preparation of a synthetic humic acid from dl-(3,4-dihydroxyphenyl)hydroxyacetic acid (dl-3,4-dihydroxymandelic acid). The starting organic compound, dl-(3,4-dihydroxyphenyl)hydroxyacetic acid is shown in Table 1, and consists of R_1=—$CH(OH)CO_2H$, R_3,R_4=—OH, and R_2,R_5,R_6=—H. 1.84 grams (10 millimoles) of dl-3,4-dihydroxymandelic acid is dissolved in 300 milliliters of 0.1 Normal aqueous sodium hydroxide (NaOH). The remaining procedure follows that of Example 1. The yield of synthetic soil extract is 0.08 gram.

EXAMPLE 4

Preparation of a synthetic humic acid from aurintricarboxylic acid. The chemical structure of the starting organic compound is shown in Table 2. 4.2 grams (10 millimoles) of aurintricarboxylic acid is dissolved in 300 milliliters of 0.1 Normal aqueous sodium hydroxide (NaOH). The remaining procedure follows that of Example 1. The yield of synthetic soil extract is 4.7 grams.

EXAMPLE 5

Preparation of a synthetic humic acid from 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propenoic acid (caffeic acid). The starting organic compound is shown in Table 1, and consists of R_1=—$CHCHCO_2H$, R_3,R_4=—OH, and R_2,R_5,R_6=—H. 1.80 grams (10 millimoles) of caffeic acid is dissolved in 300

milliliters of 0.1 Normal aqueous sodium hydroxide (NaOH). The remaining procedure follows that of Example 1. The yield of synthetic soil extract is 0.65 gram.

EXAMPLE 6

Preparation of a synthetic humic acid from tetrahydroxybenzoquinone. The chemical structure of the starting organic compound is shown in Table 2. 1.72 grams (10 millimoles) of tetrahydroxybenzoquinone is dissolved in 300 milliliters of 0.1 Normal aqueous sodium hydroxide (NaOH). The remaining procedure follows that of Example 1. The yield of synthetic soil extract is 0.016 gram.

EXAMPLE 7

Preparation of a synthetic humic acid from 1,4-dihydroxybenzene (hydroquinone). The starting organic compound is shown in Table 1, and consists of R_1,R_4=—OH, and R_2,R_3,R_5,R_6=—H. 1.10 grams (10 millimoles) of hydroquinone is dissolved in 300 milliliters of 0.1 Normal aqueous sodium hydroxide (NaOH). The remaining procedure follows that of Example 1. The yield of synthetic soil extract is 0.16 gram.

EXAMPLE 8

Preparation of a synthetic humic acid from 3,4,5-trihydroxybenzenoic acid (gallic acid). The starting organic compound is shown in Table 1, and consists of R_1=—CH2CO_2H, R_3,R_4,R_5=—OH, and R_2,R_6=—H. 1.70 grams (10 millimoles) of gallic acid is dissolved in 300 milliliters of 0.1 Normal aqueous sodium hydroxide (NaOH). The remaining procedure follows that of Example 1. The yield of synthetic soil extract is 0.10 gram.

EXAMPLE 9

Preparation of a synthetic humic acid from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid). The starting organic compound is shown in Table 1, and consists of R_1=—CH_2CO_2H, R_2,R_5=—OH, and R_3,R_4,R_6=—H. 1.68 grams (10 millimoles) of homogentisic acid is dissolved in 300 milliliters of 0.1 Normal aqueous sodium hydroxide (NaOH). The remaining procedure follows that of Example 1. The yield of synthetic soil extract is 0.20 gram.

The following Examples 10–13 are illustrative of the entire process of the present invention including step E). Examples 10–13 illustrate that the synthetic humic acid materials produced according to the chemical processes and separation and isolation procedures of the present invention exhibit the physicochemical properties and attributes of typical naturally-occurring commercially-available humic acids and other soil extracts. Examples 10–13 also illustrate that the therapeutic indications of the synthetic humic acids produced according to the chemical processes and separation and isolation procedures of the present invention are those of soil extracts and humic acids in general, that is to say for viral-related and other disorders and diseases of inflammatory, microbial and other origin.

EXAMPLE 10

Preparation of another synthetic humic acid from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid). The starting organic compound is shown in Table 1, and consists of R_1=—CH_2CO_2H, R_2,R_5=—OH, and R_3,R_4,R_5=—H. 1.0 gram (6 millimoles) of homogentisic acid is dissolved in 300 milliliters of 0.1 Normal aqueous sodium hydroxide (NaOH). The solution pH is adjusted to 8.5 with 6 Normal HCl. 0.32 gram of sodium periodate ($NaIO_4$; 1.5 millimole) and 0.12 gram of sodium sulfide nonahydrate ($Na_2S.9H_2O$; 0.5 millimole) are added, and the solution is placed in a water-bath at 50° C. overnight. 0.001 gram of boric acid (H_3BO_3; 0.016 millimole), 0.021 gram of ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$; 0.075 millimole), and 0.006 gram of calcium sulfate dihydrate ($CaSO_4.2H_2O$; 0.035 millimole) are added and the solution is stirred for 2 hours at room temperature. Any precipitate is removed by centrifugation. The solution is dialyzed with a 3,000-dalton cut-off flow-through open-channel or screen membrane system (Pall Filtron: Ultrasette® 7 Tangential Flow Device or Mini-Ultrasette® 7 Tangential Flow Device used with a Pall Filtron Ultralab® 7 Specialized Pump and Reservoir System) to a conductivity of 30 microsiemens or less against distilled water. The dialysis apparatus is then used to concentrate the solution to about 200 milliliters. The solution can be saved at this point for further use as an aqueous solution; or it can be freeze-dried to a powder. (0.05–0.2 gram of mannose or other suitable carbohydrate can be added to the solution prior to freeze-drying to reduce static electricity effects associated with the freeze-dried powder.) The yield of synthetic soil extract is 0.23 gram. The HPLC trace of the synthetic soil extract obtained in this Example is illustrated in FIG. **1**. Peaks 1–6 are produced by this example. Peak 5 is under the shoulder of Peak 4 and not overtly apparent. A mathematical first derivative of the detector signal versus time can more clearly show Peak 5. FIG. **2** shows the HPLC trace of a typical commercially-available natural humic acid. Peak 6 in FIGS. **1** and **2** is produced by a column wash with 90–100% v/v methanol and also contains synthetic humic acid. It can be seen that with the exception of the relative amounts of material in Peaks 2,4 and 6, the remainder of the HPLC traces in FIGS. **1** and **2** are essentially equivalent. Thus, the synthetic procedure of the present invention produced a humic acid material with physicochemical characteristics that are essentially equivalent to those of a commercially-available soil extract.

EXAMPLE 11

Preparation of still another synthetic humic acid from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid). The starting organic compound is shown in Table 1, and consists of R_1=—CH_2CO_2H, R_2,R_5=—OH, and R_3,R_4,R_6=—H. 1.68 gram (10 millimoles) of homogentisic acid is dissolved in 300 milliliters of 0.1 Normal aqueous sodium hydroxide (NaOH). The solution pH is adjusted to 8.5 with 6 Normal HCl. 0.75 gram of sodium periodate ($NaIO_4$; 3.5 millimoles) and 0.24 gram of sodium sulfide nonahydrate ($Na_2S.9H_2O$; 1 millimole) are added, and the solution is placed in a water-bath at 50° C. overnight. 0.006 gram of boric acid (H_3BO_3; 0.1 millimole), 0.28 gram of ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$; 1 millimole), and 0.017 gram of calcium sulfate dihydrate ($CaSO_4.2H_2O$; 0.1 millimole) are added and the solution is stirred for 48 hours at room temperature. Any precipitate is removed by centrifugation. The solution is dialyzed with a 3,000-dalton cut-off flow-through open-channel or screen membrane system (Pall Filtron: Ultrasette™ 7 Tangential Flow Device or Mini-Ultrasette™ 7 Tangential Flow Device used with a Pall Filtron Ultralab™ 7 Specialized Pump and Reservoir System). The dialysis apparatus is then used to concentrate the solution to about 200 milliliters. The solution can be saved at this point for further use as an aqueous solution; or it can be freeze-dried to a powder. (0.05–0.2 gram of mannose or other suitable carbohydrate can be added to the

solution prior to freeze-drying to reduce static electricity effects associated with the freeze-dried powder.) The yield of synthetic soil extract is 0.47 gram. The HPLC trace of the synthetic soil extract obtained in this Example is identical to that described in Example 10 and illustrated in FIG. **1**.

EXAMPLE 12

Anti-viral properties of synthetic humic acid prepared according to Examples 10 and 11. Several hundred milligrams of synthetic humic acid are prepared according to the procedures of Examples 10 and 11. The antiviral properties of these materials was assessed according to the following methods:

Jurkat cells obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Md.) are subcultured every fifth day using RPMI-1640 medium supplemented with 2 millimolar L-glutamine and 15 percent by volume fetal bovine serum (FBS). Cell counts are determined with a Coulter particle counter (Coulter Corporation, Hialeah, Fla.). The cells are infected with an HIV-1 plasmid construct, pNL4-3 (A. Adachi, H. E. Gendleman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, and M. A. Martin, *J. Virol.* 1986, 59, 284–291; cell cultures thereby treated produce high levels of HIV-1, approximately 1×10^7 particles per milliliter, as measured by electron microscopy). The infected cells are then cultured in complete medium comprised of RPMI-1640 supplemented with 2 millimolar L-glutamine, 15 percent by volume fetal calf serum, and 1 percent by volume Pen-Strep (100 Units of Penicillin and 100 milligrams of Streptomycin per milliliter). The cells are monitored for approximately four weeks prior to use in order to ensure stable HIV-1 production.

Prior to testing the anti-viral efficacy of the synthetic humic acid, Jurkat cell culture supernatants are first tested for HIV-1 p24 production to establish a pretreatment baseline. After confirming the level of virus production, the growth medium is changed and the cell number is adjusted to 1.5×10^6 cells per milliliter. Then, two days prior to administering the synthetic humic acid to be tested, equal volumes of transfected cells are admixed with normal, untreated cells to bring the level of virus production to within the range of the HIV-1 p24 immunoassay. After 24 hours, a known quantity of synthetic humic acid is added to the cell blend. The determination of HIV-1 p24 expression after a given number of days following synthetic humic acid administration is carried out with a solid-phase assay designed for HIV-1 antigens (HIVAG-1; Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Abbott Park, Ill.; Abbott Quantum II ELISA reader and data reduction module 1.21).

FIG. **3** shows the effect of the synthetic humic acid prepared as described in Examples 10 and 11 on the p24 expression of HIV-positive cells as measured according to the procedures of Example 12. Example 11a in FIG. **3** was prepared exactly according to the procedure of Example 11. Example 11b in FIG. **3** was prepared according to the procedure of Example 11 with the additional step of freeze-drying the final solution. Shown for comparison are the results obtained with natural humic acid that was subjected to dialysis as described in Examples 1–11; and natural humic acid that was subjected to dialysis with subsequent freeze-drying as described in Examples 1-11. The results show significant reductions in p24 expression for all samples. Additionally, at day 12, no p24 was detected within the experimental error of the method (none greater than the C– control).

EXAMPLE 13

Toxicity of synthetic humic acid prepared according to Example 10. Several hundred milligrams of synthetic humic acid are prepared according to the procedure of Example 10.

Five units of 450 milliliters each of whole human blood are collected into CP2D/AS-3 Leukotrap RC-PL systems. The blood is rested for 3 hours at room temperature. Each sample is weighed, and then centrifuged at 2820 revolutions per minute (2312 gravities) for 3 minutes, 44 seconds. The blood samples are then expressed through ATS-LPL filters into platelet storage bags. The filtration time is noted. The LR-PRP is centrifuged at 3600 revolutions per minute (3768 gravities) for 7 minutes. All but about 55 grams of platelet poor plasma is removed from each sample. The platelet concentrates are rested for 90 minutes at room temperature, and are then weighed and placed in a platelet incubator. RCM1 filters are primed with AS-3 solution. The primary bags are hung at a height of 60 inches above empty AS-3 bags, such that filtration occurs by gravity. The filtration time is noted, and the LR-RCC systems are sealed off 3 inches below the RCM1 filters. Each RCM1 filter together with 6 inches of tubing and the LR-RCC, including the donor identification tube segment, are weighed. Samples are taken at this point for post-filtration testing (LR-RCC). At day 1 sufficient synthetic humic acid is added to each platelet concentrate so as to make its concentration 25 micrograms per milliliter. Treated platelet concentrates are then incubated in a platelet incubator for 1 hour, following which samples of each platelet concentrate are taken for testing. Subsequent samples are also taken on day 5 for further testing.

Table 3 shows the effect of the synthetic humic acid prepared as described in Example 10 on the viability of platelet concentrates as measured according to the procedures of this Example. The results are all nominal, that is, the synthetic humic acid has no effect on platelet viability (i.e., is nontoxic). These results are particularly noteworthy, as blood platelets are known to be sensitive to a variety of chemical agents. It is for this reason that few safe anti-viral treatments are available for blood platelets.

Examples 12 and 13 illustrate that synthetic humic acids prepared according to the above processes and separation and isolation procedures of the present invention can be combined in anti-viral amounts with blood products to form blood product compositions. Synthetic humic acids may be added in anti-viral amounts to human or animal blood products such as whole blood, blood plasma, blood platelets or other blood products containing blood fractions such as haemophilia factor VIII, haemophilia factors IX and V, albumin, IgG, IgM or other blood proteins or blood materials to reduce or eliminate viral activity. Synthetic humic acids may be added in anti-viral amounts to both liquid and solid blood products. Synthetic humic acid will have application to blood materials including all blood materials where the solvent/detergent (SD) treatment applies. In direct contrast to the SD treatment, which is ineffective for nonenveloped viruses, synthetic humic acid prepared according to the present invention has anti-viral activity against both lipid enveloped and nonenveloped viruses and thus has broader application. An anti-viral amount of synthetic humic acid is an amount that is known from the prior art regarding anti-viral amounts of humic acids to be useful in reducing or eliminating viral activity. Generally, an anti-viral amount useful in blood product compositions for reducing or eliminating viral activity in liquid blood product compositions is a concentration of synthetic humic acid

TABLE 3

	pH at 22° C.		pCO_2, mm Hg		pO_2, mm Hg		HCO3, mmol/L		MPV, fl	
Unit No.	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5
1	7.466	7.394	19.3	12.8	33.5	44.4	16.8	9.5	7.0	6.6
2	7.321	7.215	21.6	14.3	9.9	22.2	13.8	7.3	6.7	6.3
3	7.320	7.276	24.4	16.6	10.3	21.3	15.6	9.7	6.7	6.5
4	7.368	7.308	20.7	14.3	13.4	22.2	14.6	8.9	6.5	6.3
5	7.457	7.454	20.1	13.8	23.7	29.0	17.1	11.6	7.7	7.4
Mean	7.386	7.329	21.2	14.4	18.2	27.8	15.6	9.4	6.9	6.6
Std. Dev.	0.071	0.095	2.0	1.4	10.2	9.8	1.4	1.5	0.5	0.6

	WBC Yield, $\times 10^5$	Platelet Yield, $\times 10^{10}$		Streaming		% ESC		% HSR		Lactate, mmol/L	
Unit No.	Day 1	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5
1	0.1	8.3	9.0	3	3	24.2	16.9	78.0	64.0	5.1	12.1
2	0.2	14.5	14.2	3	3	27.5	20.3	81.7	71.5	6.6	13.4
3	0.4	13.3	13.4	3	3	28.7	26.3	81.7	79.4	6.3	12.4
4	0.3	11.7	12.3	3	2	22.1	19.2	81.4	77.1	6.6	13.1
5	0.3	8.9	9.1	3	3	19.1	14.4	74.7	70.2	4.5	9.7
Mean	0.3	11.3	11.6	3.0	2.8	24.3	19.4	79.5	72.4	5.8	12.1
Std. Dev.	0.1	2.7	2.4	0.0	0.4	3.9	4.5	3.1	6.1	1.0	1.4

between 5 and 1000 micrograms per milliliter of liquid blood product composition. This same concentration range applies to solid blood product compositions containing dried synthetic humic acid upon dissolution in solution prior to use. The exact amount to be utilized to reduce or eliminate viral activity depends upon the particular virus and blood product and can be determined with conventional anti-viral test procedures known in the art. Whole blood, blood plasma or other blood products suspected to be contaminated or contaminated with HIV or hepatitus virus can be modified, for example, with the addition of about 10 to about 200 micrograms per milliter of synthetic humic acid. Examples 14 and 15 are illustrative of blood product compositions containing anti-viral amounts of synthetic humic acid prepared according to the processes and separation and isolation procedures of the present invention.

EXAMPLE 14

Whole human blood composition containing 25 ug/milliliter of a synthetic humic acid from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid). The blood product composition follows:

Whole human blood: 1 liter

Synthetic humic acid: 25 mg

EXAMPLE 15

Human haemophilia factor VIII composition containing a synthetic humic acid from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid). The blood product composition follows:

Human haemophilia factor VIII: 1–5 ml vial*

Synthetic humic acid: 125 ug

*Note: This is a vial containing sterile highly purified lyophilized factor VIII concentrate intended for dilution with 5ml of sterile injectable saline and containing 3900 units (IU) of factor VIII at a concentration of 100 IU/mg of protein.

Synthetic humic acids prepared according to the above processes and separation and isolation procedures of the present invention can be utilized in anti-viral amounts as defined above in methods for reducing or eliminating the amount of virus in human or animal blood products. Generally, such methods involve contacting the blood product in some way with an anti-viral amount of synthetic humic acid. Various means of contacting can be employed, such as direct injection of a sterile solution containing said anti-viral amount into said blood product. A particularly preferred method involves the usage of so-called "dual bag" technology for intravenous solutions. This method employs a plastic bag with two separate chambers and a connecting path between them. The two chambers may vary in volume and the volume ratio between them. The two chambers may contain two different drugs or for the purpose of employing the present invention, a blood product in one chamber and the synthetic humic acid in the other chamber. The connecting path is closed until the product is ready to be used. The path can be opened with a valve arrangement or by breaking a seal between the two chambers. The seal is typically broken without compromising the sterility of the products in both chambers. Dual bag sterile solution technology is available from Abbott Laboratories in Illinois, McGaw in California and other companies. Alternatively, a blood product may be contacted with an anti-viral amount of synthetic humic acid during the processing of the blood product prior to or including the final processing step wherein the blood product is placed into its final container for patient use. Due to the nontoxic nature of synthetic humic acid as prepared herein, it is not necessary to separate the humic acid from the blood product prior to use of the blood product. It has already been disclosed herein that it is necessary to separate the detergents in the solvent/detergent (SD) blood treatment method from the blood product utilizing extraction with soybean or castor oil and chromatography on insolubilized C18 resin. Methods for reducing or eliminating the amount of virus in human blood products employing synthetic humic acid have an additional advantage over the SD methods in that unlike the SD methods, both lipid enveloped and nonenveloped viruses can be inactivated. Additionally, unlike various heat treatments or ultraviolet light irradiation of blood products, essentially no loss of blood product is observed with synthetic humic acid treatment methods. Methods for reducing or eliminating the amount of virus in blood products employing synthetic humic acid can be combined with the solvent/detergent (SD) blood treatment method or other blood treatment methods, including heat treatments, ultraviolet irradiation or other methods. One or

more of the aforementioned blood treatment methods may be combined with the humic acid treatment method.

Example 16 illustrates that synthetic humic acids prepared according to the above processes and separation and isolation procedures of the present invention can be utilized in anti-viral amounts in methods for reducing the amount of virus in human blood products.

EXAMPLE 16

Method for the reduction of the amount of virus in human blood bags with the use of synthetic humic acid from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid). The antiviral properties of the synthetic humic acid material prepared according to the procedure of Example 10 are assessed according to the following methods: In this example, Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) is utilized as an indicator virus for anti-viral activity. BVDV is a lipid-enveloped virus and is known to be a good indicator virus for anti-viral activity, including anti-human immunodeficiency virus activity. A titered virus stock of BVDV at a TCID 50 of 10E-7 is prepared. Twelve blood bags containing blood platelets are obtained (one for each humic acid concentration, 0,10,50 and 100 ug/ml, performed in triplicate). The method for the reduction of the amount of virus in human blood bags with the use of synthetic humic acid involves a simple addition of a sterile volumetric amount of synthetic humic acid in aqueous solution to each blood bag. Specifically, a sterile liquid aliquot of a 100 ug/ml concentration of synthetic humic acid in distilled water is added to each blood bag containing between 40 and 60 ml of blood product such that the final concentration of humic acid was 10, 50 or 100 ug/ml. Bags are sampled at the following intervals: T0 hours as a pre-inoculation control; T1 hour post inoculation with the virus stock (at T1 hour post inoculation the humic acid is added); at T2 hours post inoculation another sample is pulled. Additional samples are pulled at T24 hours, T72 hours and T120 hours. Quantitative virus cultures are prepared from the pulled samples and the resulting TCID 50s and log reductions are determined for each humic acid concentration. The results of the testing show that synthetic humic acid prepared according to the present invention can successfully be used in methods for reducing the amount of virus in human blood products.

Synthetic humic acid prepared according to the above processes and separation and isolation procedures of the present invention can be utilized in anti-viral amounts in compositions for treating or preventing human or animal viral diseases. Synthetic humic acid containing compositions are suitable for treating or preventing human or animal viral diseases for which natural humic acid materials have been shown to be useful. Thus, synthetic humic acid compositions are suitable for treating or preventing human disease caused by Human Immunodeficiency Virus (HIV), Herpes Simplex Virus and other human viruses. Synthetic humic acid compositions are also suitable for treating or preventing diseases caused by the entire picornavirus family including the current five known genera of viruses: (1) aphthoviruses, (2) cardioviruses, (3) hepatoviruses (previously classified as enteroviruses), (4) renteroviruses (which mainly constitute a combination of the previous genera rhinovirus and enterovirus), and (5) a new genus, with a single representative to date, the echovirus 22. Compositions suitable for various routes of administration and particular viral diseases can be prepared. An anti-viral amount of synthetic humic acid for a particular viral disease can be determined from the known anti-viral amount of natural humic acid known to be useful for the same particular viral disease. A variety of compositions comprising an anti-viral amount of synthetic humic acid and at least one physiologically acceptable excipient can be prepared. Compositions comprising physiologically acceptable excipients suitable for intravenous injection, intramuscular injection, topical application, oral ingestion, nasal spray administration, metered-dose inhalation administration and vaginal and anal suppository administration can be prepared with known excipients and methods. Examples 17–21 are illustrative of the foregoing compositions.

EXAMPLE 17

Injectible solution composition for treating human immunodeficiency virus (HIV) infection containing an anti-viral amount of synthetic humic acid from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid) and injectable solution excipients:

Sodium chloride	9.00 gram
Synthetic humic acid	500 mg
Distilled water	q.s. to 1 liter

The pH of the above solution can additionally be adjusted to 7.4 with 1 Normal sodium hydroxide prior to adding all of the water. This injectable solution composition can be prepared by conventional methods for preparing injectable sterile solutions.

EXAMPLE 18

Topical ointment composition for treating human herpes simplex virus (HSV-I or HSV-II) infection containing an anti-viral amount of synthetic humic acid from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid) and topical formulation excipients:

Synthetic humic acid	3.0 gram
Cetostearyl alcohol	27 gram
Liquid paraffin	20 gram
White soft paraffin	50 gram

EXAMPLE 19

Topical cream composition for treating human herpes simplex virus (HSV-I or HSV-II) infection containing an anti-viral amount of synthetic humic acid from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid) and topical formulation excipients:

Synthetic humic acid	2.4 gram
Cetosteryl alcohol	5 gram
Liquid paraffin	50 gram
Distilled water	add to 100 gram

EXAMPLE 20

Topical solution composition for treating human herpes simplex virus (HSV-I or HSV-II) infection containing an anti-viral amount of synthetic humic acid from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid) and topical formulation excipients:

Synthetic humic acid	2.4 gram
Sodium sulfide	1.0 gram
Colloidal sulfur	1.4 gram
Sodium chloride	2.2 gram
Potassium sorbate	0.2 gram

Distilled water q.s. to 100 ml

Note that the above composition contains the same amount of humic acid disclosed by Wagner in German patent DE 3830333.

EXAMPLE 21

Ingestible lozenge composition for treating human immunodeficiency virus (HIV) infection containing an anti-viral amount of synthetic humic acid from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid) and ingestible lozenge excipients:

Synthetic humic acid	500 mg
Menthol	3.6 mg
Cetylpyridinium chloride	1.4 mg
Cherry flavor	100 mg
Glucose	500 mg
Sucrose	500 mg

Other excipients may also be added to the above composition. Colorants such as D&C Red No. 33, FD&C Red No. 40 or other colorants may be used. Other flavoring agents may also be utilized in lozenge formulations as well preservatives other than cetylpyridinium chloride. The aforementioned excipients as well as other excipients not mentioned are all known in the art and can be employed in amounts previously used in lozenge formulas. The composition of Example 21 is also useful for treating the common cold, which is caused by members of the rhinovirus family. Nasal spray compositions containing synthetic humic acid are also particularly useful for treating the common cold.

Compositions comprising physiologically acceptable excipients suitable for disinfection and preservation of medical devices can be prepared with known excipients and methods. A variety of medical devices which contact the body can be disinfected or preserved with compositions containing synthetic humic acid. These medical devices can be disinfected or preserved before or after bodily contact to prevent viral infection. Contact lenses, intraocular lenses, dental prostheses, implantable medical devices such as heart valves and medical instruments which contact the body such as endoscopes and catheters can be disinfected or preserved with compositions containing synthetic humic acid.

Synthetic humic acid prepared according to the above processes and separation and isolation procedures of the present invention can be utilized in anti-microbial amounts in compositions for treating or preventing human or animal microbial diseases. An anti-microbial amount of synthetic humic acid is an amount that is known from the prior art referenced herein regarding anti-microbial amounts of humic acids to be useful in reducing or eliminating microbial activity. Generally, an anti-microbial amount useful in product compositions for reducing or eliminating microbial activity in liquid product compositions is a concentration of synthetic humic acid between 50 and 2000 micrograms per milliliter of liquid product composition. This same concentration range applies to solid product compositions containing dried synthetic humic acid upon dissolution in solution prior to use. Cronje et al., U.S. Pat. No. 4,999,202, discloses bacteriocidal or bacteriostatic compositions comprising humic acid with higher concentrations. The concentrations employed by Cronje et al. can also be employed herein. The exact amount to be utilized to reduce or eliminate microbial activity depends upon the particular microorganism and product and can be determined with conventional anti-microbial test procedures known in the art. The synthetic humic acids of the present invention have anti-microbial activity comparable to the activity of natural humic acids and other synthetic humic acids referenced herein. Thus, the synthetic humic acids of the present invention will have activity against cryptosporidium species, *C.albicans, Ent. cloacae, Prot. vulgaris, Ps. aeruginosa, S. typhimurium, St. aureus, St. epidermidis, Str. pyrogenes, Str. mutans, E. coli* and other organisms. A variety of compositions comprising an anti-microbial amount of synthetic humic acid and at least one physiologically acceptable excipient can be prepared. Compositions comprising physiologically acceptable excipients suitable for intravenous injection, intramuscular injection, topical application, oral ingestion, nasal spray administration, metered-dose inhalation administration and vaginal and anal suppository administration can be prepared with known excipients and methods. The topical compositions of Examples 18–20 also have anti-microbial activity and are illustrative of anti-microbial compositions. Compositions comprising physiologically acceptable excipients suitable for disinfection and preservation of medical devices such as contact lenses can be prepared with known excipients and methods. A variety of medical devices which contact the body can be disinfected or preserved with compositions containing synthetic humic acid. These medical devices can be disinfected or preserved before or after bodily contact to prevent microbial infection. Contact lenses, intraocular lenses, dental prostheses, implantable medical devices such as heart valves and medical instruments which contact the body such as endoscopes and catheters can be disinfected or preserved with compositions containing synthetic humic acid. Example 22 which follows is illustrative of a composition suitable for disinfection and preservation of contact lenses. Example 22 is illustrative of a one bottle contact lens multipurpose disinfecting, preservation (storage), cleaning, rinsing and rewetting solution. This solution provides the necessary antibacterial disinfection activity required by U.S. FDA disinfection efficacy guidelines for contact lens solutions. This solution is non-toxic and extremely comfortable for the eye and thus can be placed directly in the contact lens user's eye without further rinsing with a separate saline solution. The solution can be used with all contact lenses such as conventional hard, soft, rigid, gas permeable and silicone lenses but is preferably employed with soft lenses such as those commonly referred to as hydrogel lenses prepared from monomers such as hydroxyethylmethacrylate, vinylpyrrolidone, glycerolmethacrylate, methacrylic acid or acid esters and the like. Proteolytic enzymes used for cleaning contact lenses, such as those disclosed in U.S. Pat. No. 5,356,555 can also be combined with contact lens multipurpose solutions containing synthetic humic acid prepared according to the methods of the present invention. The methods of combining proteolytic enzymes with synthetic humic acid containing multipurpose solutions and the amounts of enzyme and excipients to be employed are the same as disclosed in U.S. Pat. No. 5,356,555 which is incorporated herein by reference. Generally, for the purposes of the present invention an aqueous solution containing from 0.0010 w/v % to less than or equal to 0.0100 w/v % of the synthetic humic acid

disinfecting agent may be used as a contact lens multipurpose solution. Contact lens multipurpose solutions containing synthetic humic acid prepared according to the methods of the present invention have advantages over the prior art contact lens multipurpose solutions containing other disinfecting agents. Synthetic humic acid containing multipurpose solutions achieve equal or greater disinfection efficacy while providing greater comfort for the contact lens wearer. This is a result of the inherently lower cytotoxicity or toxicity of synthetic humic acid disinfecting agents as compared to prior art disinfecting agents which are presently in use for contact lens multipurpose solutions. The advantages of synthetic humic acid for contact lens applications are also a result of their anionic and neutral polymeric nature. Current contact lens multipurpose solutions contain cationic polymeric disinfecting agents such as polyhexamethylenebiguanide (PHMB) and polyquaternium 1 which have a much higher affinity for the inherently neutral to anionic contact lens polymers. However, the synthetic humic acid prepared according to the present invention is a colored material. Solutions at a concentration of 0.0025 w/v % are very light brown. Thus, for cosmetic reasons, not all solutions may be acceptible. However, because they are neutral to anionic polymers, synthetic humic acid will have a low affinity for plastic materials and therefore the materials will not be discolored if the synthetic humic acid compositions are formulated properly.

EXAMPLE 22

One-bottle contact lens multipurpose disinfecting, preservation (storage), cleaning, rinsing and re-wetting solution containing an anti-microbial amount of synthetic humic acid from 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid). The aqueous solution has the following composition:

Ingredient	% w/v
Synthetic humic acid	0.0025
Edetate disodium, USP	0.050
Hydroxypropylmethylcellulose	0.20
Boric acid, NF	0.39
Sodium borate decahydrate, NF	0.20
Sodium chloride, USP	0.40
Pluronic F-127	0.10
pH adj. w/NaOH or HCl	7.4

While this invention has been described fully and completely with special emphasis on several examples, it should be understood that within the scope of the appended claims this invention may be practiced otherwise than as specifically described above.

What is claimed is:

1. A composition for treating or protecting against infectious disease in a mammal comprising an effective amount of a synthetic phenolic polymeric material, said synthetic phenolic material having been prepared by the following steps:

a) dissolving in an aqueous solution at least one starting organic compound comprising at least one hydroxyl group and at least one carbonyl group or at least two hydroxyl groups on an aromatic structure;

b) adjusting the pH of the aqueous solution resulting from step a) to between about 8 and 11;

c) oxidizing the at least one starting organic compound solution resulting from step b);

d) polymerizing the oxidized compound resulting from step c);

e) adding at least one water soluble compound or salt selected from the group consisting of boric acid, borate salts, alkaline earth salts, transition metal salts, alkaline sulfides, alkaline earth sulfides, or transition metal sulfides to the aqueous solution resulting from step d); and

f) removing molecules from the solution resulting from step e) below about 500 to about 10,000 daltons; and

at least one physiologically acceptable carrier or excipient.

2. The composition of claim **1**, wherein the synthetic polymeric material does not contain nitrogen.

3. The composition of claim **1**, wherein the synthetic polymeric material is a synthetic fulvic acid.

4. The composition of claim **1**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is an injectable carrier or excipient.

5. The composition of claim **1**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is a topical formulation carrier or excipient.

6. The composition of claim **1**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is an ingestable carrier or excipient.

7. The composition of claim **1**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is a nasal spray carrier or excipient.

8. The composition of claim **1**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is a metered-dose inhaler carrier or excipient.

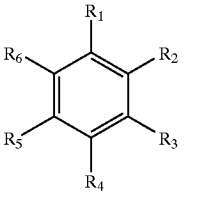
9. The composition of claim **1**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is a vaginal or anal suppository carrier or excipient.

10. The composition of claim **1**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is suitable for disinfection or preservation of a medical device.

11. A composition for treating or preventing infectious disease in a mammal comprising:

an effective amount of a synthetic phenolic polymeric material produced from the oxidation of one or more of the starting organic compounds selected from the group consisting of a compound represented by the formula I:

(I)



wherein R_1,R_2,R_3,R_4,R_5, and R_6 is a substituent selected from the group consisting of H, CH_3, CH_2CH_3, $(CH_2)_2CH_3$,—$CH(CH_3)_2$, OH, —OCH_3, CHO, CO_2H, CO_2CH_3, CH_2OH, CH_2OCH_3, CH_2CHO, CH_2CO_2H, $CH_2CO_2CH_3$, $(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2OCH_3$, $(CH_2)_2CHO$, $(CH_2)_2CO_2H$, $(CH_2)_2CO_2CH_3$, $CH(CH_3)OH$, $CH(CH_3)OCH_3$, $CH(CH_3)CHO$, $CH(CH_3)CO_2H$, $CH(CH_3)CO_2CH_3$, $CH(CH_3)CH_2OH$, $CH(CH_3)CH_2OCH_3$, $CH(CH_3)CH_2CHO$, $CH(CH_3)CH_2CO_2H$, $CH(CH_3)CH_2CO_2CH_3$, $CH(OH)_2$, $CH(OH)OCH_3$, $CH(OH)CHO$, $CH(OH)CO_2H$, $CH(OH)CO_2CH_3$, $CH(OCH_3)OH$, $CH(OCH_3)_2$, $CH(OCH_3)CHO$, $CH(OCH_3)CO_2H$, $CH(OCH_3)CO_2CH_3$, $CH(OH)CH_2OH$, $CH(OH)CH_2OCH_3$, $CH(OH)CH_2CHO$, $CH(OH)CH_2CO_2H$, $CH(OH)CH_2CO_2CH_3$,

$CH(OCH_3)CH_2OH$, $CH(OCH_3)CH_2OCH_3$, $CH(OCH_3)CH_2CHO$, $CH(OCH_3)CH_2CO_2H$, $CH(OCH_3)CH_2CO_2CH_3$, $(CH_2)_3OH$, $—(CH_2)_3OCH_3$, $(CH_2)_3CHO$, $(CH_2)_3CO_2H$, $(CH_2)_3CO_2CH_3$, CHCHOH (cis or trans), $CHCHOCH_3$ (cis or trans), CHCHCHO (cis or trans), $CHCHCO_2H$ (cis or trans), $CHCHCO_2CH_3$ (cis or trans), $CH_2CHCHOH$ (cis or trans), $CH_2CHCHOCH_3$ (cis or trans), $CH_2CHCHCHO$ (cis or trans), $CH_2CHCHCO_2H$ (cis or trans), and $CH_2CHCHCO_2CH_3$ (cis or trans);

and an organic compound selected from the group consisting of nordihydroguaiaretic acid, chlorgenic acid, epinephrine, norepeinephrine, aurin, aurintricarboxylic acid, and tetrahydroxybenzoquinone;

in the presence of one or more water soluble compounds or salts selected from the group consisting of boric acid, borate salts, alkaline earth salts, transition metal salts, alkaline sulfides, alkaline earth sulfides and transition metal sulfides; and

at least one physiologically acceptable carrier or excipient.

12. The composition of claim **11**, wherein the starting organic compound contains at least one hydroxy group and at least one carboxylic acid group.

13. The composition of claim **11**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is an injectable carrier or excipient.

14. The composition of claim **11**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is a topical formulation carrier or excipient.

15. The composition of claim **11**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is an ingestable carrier or excipient.

16. The composition of claim **11**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is a nasal spray carrier or excipient.

17. The composition of claim **11**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is a metered-dose inhaler carrier or excipient.

18. The composition of claim **11**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is a vaginal or anal suppository carrier or excipient.

19. The composition of claim **11**, wherein the physiologically acceptable carrier or excipient is suitable for disinfection or preservation of a medical device.

20. The composition of claim **1**, wherein the steps to prepare the synthetic phenolic material does not include acid precipitation.

21. The method of claim **1**, wherein the synthetic phenolic material has been prepared by a method wherein step c) comprises adding an alkaline periodate salt or alkaline-earth periodate salt to the aqueous solution resulting from step b).

22. The method of claim **1**, wherein the synthetic phenolic material has been prepared by a method wherein step d) comprises maintaining the temperature of the solution from step c) between about 20° C. and 100° C. for a period of at least about 30 minutes.

23. The method of claim **1**, the synthetic phenolic material has been prepared by a method further comprising allowing the aqueous solution from step e) to stand with or without stirring at about 20° C. to 100° C. for at least about 2 hours after step e).

* * * * *

US006572886B2

(12) **United States Patent**
Ribadeau-Dumas et al.

(10) **Patent No.: US 6,572,886 B2**
(45) **Date of Patent: Jun. 3, 2003**

(54) **DEXTROSE-BASED LOZENGES AND PROCESS FOR THEIR MANUFACTURE**

(75) Inventors: **Guillaume Ribadeau-Dumas**, Verlinghem (FR); **Véronique Beaudier**, Lompret (FR)

(73) Assignee: **Roquette Freres**, Lestrem (FR)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 38 days.

(21) Appl. No.: **09/761,103**

(22) Filed: **Jan. 16, 2001**

(65) **Prior Publication Data**

US 2001/0009687 A1 Jul. 26, 2001

(30) **Foreign Application Priority Data**

Jan. 18, 2000 (FR) 00 00588

(51) **Int. Cl.**[7] **A61K 9/20**

(52) **U.S. Cl.** **424/464**; 424/439; 424/440; 424/441; 424/465

(58) **Field of Search** 424/439, 440, 424/441, 464, 465

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

4,251,561	A *	2/1981	Gajewski	426/571
4,263,328	A	4/1981	Parada et al.	
4,614,207	A	9/1986	Steinhagen	
4,620,982	A	11/1986	Serpelloni	
4,882,156	A	11/1989	Yang et al.	
5,080,906	A	1/1992	Carenzi et al.	
5,409,905	A	4/1995	Eby, III	
5,614,207	A	3/1997	Shah et al.	
5,939,091	A	8/1999	Eoga et al.	

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

EP	0 425 450	10/1990
EP	0 530 995	8/1992
EP	0 839 528	10/1996
EP	0 968 657	7/1999
WO	97/42941	5/1997

OTHER PUBLICATIONS

A. Slawatycki, Confectionery Production, Mar. 1971, pp 289–291.

R. Lees, E.B. Jackson "Sugar Confectionery and Chocolate Manufacture" pp 291–295 (1973).

* cited by examiner

Primary Examiner—James M. Spear
(74) *Attorney, Agent, or Firm*—Sturm & Fix LLP

(57) **ABSTRACT**

The invention relates to lozenges comprising a sweetening component and a binder, wherein more than 50% of the sweetening component consists of dextrose, this percentage being expressed by weight, based on the total weight of the sweetening component. The invention further relates to a process for the preparation of such lozenges.

8 Claims, No Drawings

DEXTROSE-BASED LOZENGES AND PROCESS FOR THEIR MANUFACTURE

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to lozenges in which the sweetening component consists predominantly of dextrose.

It further relates to a process for the manufacture of these lozenges.

BACKGROUND OF THE INVENTION

"Lozenges" are understood as meaning pastilles which are traditionally obtained from a paste based on finely ground sucrose. This paste, which contains a binder to assure adhesion between the sucrose crystals, is flavoured and optionally coloured and can also have pharmaceutical active principles added to it, after which it is converted to its definitive pastille form by rolling and then cutting, said pastilles being dried to remove the water which has necessarily been added in the preparation of the starting paste. The lozenges are therefore characteristically obtained without the need to apply a compressive force to the base starting material, as is the case for the preparation of tablets.

The lozenges must have a smooth surface and a homogeneous texture.

The intimate mixing between the liquid, especially the binding water, the pulverulent constituents, namely the sugar and the binder, and any other ingredients can be performed in a device of the kneader or extruder type.

The paste resulting from this mixing operation is converted to a layer of preselected thickness by rolling, and once the surface of the paste is sufficiently hard and dry to prevent any sticking to the cutting tools, the pastilles are cut to the desired shape before being dried. This cutting step is called stamping. As far as the hardening is concerned, this is generally effected by blowing with hot and/or cold air, optionally followed by dusting with e.g. starch or mannitol.

The drying is generally effected in controlled-atmosphere ovens in order to promote a uniform texture of the finished product, the drying temperatures generally being below 50° C. and the drying time less than 72 hours.

As far as the sweetening component is concerned, this generally consists of sucrose mixed with small amounts of glucose syrup or dextrose, and sometimes sorbitol or glycerol as humectants for slowing down the drying to give a regular surface.

"Sugar-free" lozenges exist in which the glucose syrups, sucrose and dextrose have been replaced with polyols such as xylitol, mannitol and hydrogenated starch hydrolyzates.

Patent EP 530 995, describing lozenges in which the sweetening component consists solely of maltitol or erythritol, may be cited in particular.

Another proposed way of obtaining "sugar-free" lozenges is to replace the sucrose with sorbitol (Confectionery Production, May 1971, pp. 289–291).

Lozenges based on crystallized fructose or sorbitol have also been proposed by the Assignee in patent U.S. Pat. No. 4,620,982.

The sugar-based lozenges are most often formulated with sucrose of very fine particle size, such as icing sugar. The addition of small amounts of glucose syrup improves the fineness of the paste but slows down the drying thereof. It is also possible to add small amounts of dextrose, which, when used as a very fine powder, has the advantage of giving the lozenge a refreshing effect; this is of particular value when mint flavourings are used in the lozenges (LEES R., JACKSON E. B., Sugar Confectionery and Chocolate Manufacture, pp. 29–295, 1973).

For economic reasons, attempts were then made to replace the sucrose with dextrose in lozenge formulations. However, dextrose can only be substituted for sucrose to the extent of about 50%. In fact, when the dextrose content of the sweetening component of the lozenge exceeds about 50% by weight, it is not possible to obtain as smooth a surface as that obtained with a sweetening component containing 100% of sucrose. The paste is very soft and sticky during kneading, so the rolling and stamping are more difficult. The lozenges are also very crumbly. Dextrose could therefore satisfactorily be substituted for sucrose only to the extent of about one third.

In the subsequent search to develop lozenges in which the sweetening component contains predominantly dextrose, the inventors have succeeded, after numerous experiments, in finding that it is possible, contrary to all expectation, to produce such lozenges which are as smooth as the lozenges containing predominantly sucrose and are of comparable hardness.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention therefore relates to lozenges comprising a sweetening component and a binder, characterized in that more than 50% of the sweetening component consists of dextrose, this percentage being expressed by weight, based on the total weight of the sweetening component.

The dextrose content of said sweetening component is preferably greater than 60%, particularly preferably greater than 75% and very particularly preferably greater than 90%, these percentages being expressed by weight, based on the total weight of the sweetening component. Among the suitable grades of dextrose, dextrose monohydrate, and especially ROFEROSE® SF marketed by the Assignee, may be mentioned in particular. The remainder to 100% advantageously consists of sucrose.

As regards the proportion of sweetening component, this preferably represents at least 80% by weight of the total weight of the lozenge.

The binder can consist of natural gums such as gum arabic or gum tragacanth, gelatin, starch or mixtures thereof. The binder is advantageously used in an amount of 0.5 to 8% by weight, based on the total weight of the lozenge.

The lozenges according to the invention are preferably prepared using an aqueous solution of gelatin.

As regards the water content of the lozenges according to the invention after drying, this is advantageously greater than or equal to 5% and preferably greater than or equal to 7% by weight, based on the total weight of the lozenge. Such water contents are unexpected as the traditional sucrose lozenges have water contents of the order of 1%. This is furthermore a definite economic advantage for the confectioners. Surprisingly, the lozenges according to the invention are totally satisfactory in terms of their hardness and their surface condition.

The lozenges according to the invention are obtainable by a process comprising the following steps: mixing of the pulverulent sweetening component with at least one binder in solution, kneading, rolling, stamping of the resulting paste to produce lozenges, and drying of the lozenges obtained, said process being characterized in that the binder is introduced in several portions into the sweetening component.

The pulverulent sweetening component is introduced into a kneader, which may or may not be heated. A suitable kneader is a mixer with zig-zag paddles. The binder in solution is then added to the sweetening component. The inventors have found, surprisingly and unexpectedly, that adding the binder in several portions is a neat way of giving the lozenges according to the invention their excellent surface condition. The binder is advantageously added in two portions. As for the preparation of sucrose lozenges, the paste can have flavourings, pharmaceutical active principles, colours and optionally acids added to it. The whole is intimately mixed and the paste is then rolled, stamped and dried in an oven at 30–50° C. for 8 to 24 hours to give lozenges whose quality is totally comparable to that of sucrose lozenges.

The advantages of the present invention will be understood more clearly from the Example which follows.

EXAMPLE 1

Preparation of Lozenges According to the Invention

Formulation:	
ROFEROSE ® SF (dextrose monohydrate) by weight	83%
Type A gelatin solution by weight 180 blooms at 10% solids content	17%

The dextrose monohydrate is introduced into an unheated kneader with zig-zag paddles.

Half of the gelatin solution is added and the mixture is kneaded for 6 minutes.

The other half of the gelatin solution is added and the mixture is kneaded for a further 6 minutes. The paste is then rolled to a thickness of 8 millimeters.

This paste is stamped and then dried for 24 hours at 20° C. and 50% relative humidity.

This gives lozenges containing 88.9% by weight of sweetening component (dextrose), 2% by weight of binder (gelatin) and 9.1% by weight of water. 100% of the sweetening component consists of dextrose.

These lozenges are as white, as smooth and as hard as lozenges containing predominantly sucrose.

What is claimed is:

1. A process for the preparation of a lozenge comprising a sweetening component and a binder and wherein more than 50% of the sweetening component consists of dextrose, this percentage being expressed by weight, based on the total weight of the sweetening component, comprising the following steps:

mixing of the sweetening component with at least one binder introduced in several portions into the sweetening component,

kneading, rolling, stamping to produce lozenges,

drying of the lozenges obtained.

2. A process according to claim **1**, wherein the dextrose content of the sweetening component is greater than 60%, these percentage being expressed by weight, based on the total weight of the sweetening component.

3. A process according to claim **1**, wherein the dextrose content of the sweetening component is greater than 75%, these percentage being expressed by weight, based on the total weight of the sweetening component.

4. A process according to claim **1**, wherein the dextrose content of the sweetening component is greater than 90%, these percentage being expressed by weight, based on the total weight of the sweetening component.

5. A process according to claim **1**, wherein the sweetener component represents at least 80% by weight of the total weight of the lozenges.

6. A process according to claim **1**, wherein the binder represents 0.5% to 8% by weight of the total weight of the finished product.

7. A process according to claim **1**, wherein the lozenge has a water content greater than or equal to 7% by weight.

8. A process according to claim **1**, wherein 100% of the sweetening component consists of dextrose.

* * * * *

US007132435B2

(12) **United States Patent**
Smith et al.

(10) **Patent No.: US 7,132,435 B2**
(45) **Date of Patent: Nov. 7, 2006**

(54) **COMPOUNDS**

(75) Inventors: **Mya Coral Helen Smith**, Sandwich (GB); **Christine Anne Louise Watson**, Sandwich (GB)

(73) Assignee: **Pfizer Inc.**, New York, NY (US)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) Appl. No.: **10/896,112**

(22) Filed: **Jul. 20, 2004**

(65) **Prior Publication Data**

US 2005/0020639 A1 Jan. 27, 2005

Related U.S. Application Data

(60) Provisional application No. 60/497,088, filed on Aug. 22, 2003.

(30) **Foreign Application Priority Data**

Jul. 25, 2003 (GB) 0317471.1

(51) **Int. Cl.**

A61K 31/4436	(2006.01)
A61K 31/4439	(2006.01)
C07D 409/14	(2006.01)
C07D 401/14	(2006.01)

(52) **U.S. Cl.** **514/341**; 546/273.4; 546/274.7; 546/276.1

(58) **Field of Classification Search** 546/273.4, 546/274.7, 276.1; 514/341

See application file for complete search history.

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

6,380,218 B1	4/2002	Marfat et al.	514/326
6,559,168 B1	5/2003	Marfat et al.	514/338
6,649,633 B1	11/2003	Chambers et al.	514/337
6,740,655 B1	5/2004	Magee et al.	514/255.05
2002/0111495 A1	8/2002	Magee et al.	546/291

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

WO	WO9845268	10/1998
WO	WO0157025	8/2001
WO	WO0157036	8/2001
WO	WO0260896	8/2002
WO	WO0368235	8/2003

OTHER PUBLICATIONS

Torphy et al., "Phosphodieterase IV Inhibitors as Therapy for Eosinophil-induced Lung Injury in Asthma", Environmental Health Perspectives, 1994, 102 Suppl. 10, p. 79-84.

Duplantier et al., "Biarylcarboxylic Acids and -amides: Inhibition of Phospodiesterase Type IV verses [^{3}H]Rolipram Binding Activity and Their Relationship to Emetic Behavior in the Ferret", J. Med. Chem., 1996, 39, p. 120-125.

Schneider et al., "Discriminative Stimulus Properties of the Stereoisomers of the Phosphodiesterase Inhibitor Rolipram", Pharmacology Biochemistry Behavior, 1995, 50, p. 211-217.

Banner and Page, "Acute versus chronic administration of phosphodiesterase inhibitors on allergen-induced pulmonary cell influx in sensitized guinea-pigs", British Journal of Pharmacology, 1995, 114, p. 93-98.

Barnette et al., "The ability of phosphodiesterase IV inhibitors to suppress superoxide production in guinea pig eosinophils is correlated with inhibition of phosphodiesterase IV catalytic activity", J. Pharmacol. Exp. Ther., 1995, 273, p. 674-679.

Wright et al., "Differential in vivo and in vitro bronchorelaxant activities of CP-80,633, a selective phosphodiesterase 4 inhibitor", Can. J. Physiol. Pharmacol., 1997, 75, p. 1001-1008.

Manabe et al., "Anti-inflammantory and bronchodilator properties of KF19514, a phosphodiesterase 4 and 1 inhibitor", European Journal of Pharmacology, 1997, 332, p. 97-107.

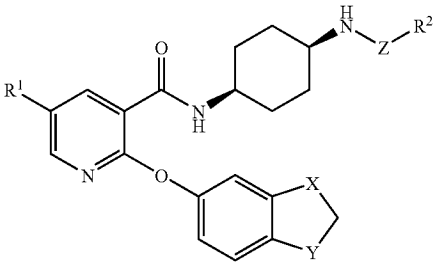
Ukita et al., "Novel Potent, and Selective Phosphodiesterase-4 Inhibitors as Antiasthmatic Agents: Synthesis and Biological Activities of a Series of 1-Pyridylnaphthalene Derivatives", J. of Med. Chem., 1999, 42, p. 1088-1099.

Primary Examiner—Patricia L. Morris
(74) *Attorney, Agent, or Firm*—Charles W. Ashbrook; Rosanna Goodman; Philip B. Polster, II

(57) **ABSTRACT**

This invention relates to nicotinamide derivatives of general formula (I):

(I)



in which R^1, X, Y, Z and R^2 have the meanings defined herein, and to processes for the preparation of, intermediates used in the preparation of, compositions containing and the uses of such derivatives.

14 Claims, No Drawings

COMPOUNDS

This invention relates to nicotinamide derivatives useful as PDE4 inhibitors, and to processes for the preparations of, intermediates used in the preparation of, compositions containing and the uses of such derivatives.

The 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) comprise a large class of enzymes divided into at least eleven different families which are structurally, biochemically and pharmacologically distinct from one another. The enzymes within each family are commonly referred to as isoenzymes, or isozymes. A total of more than fifteen gene products is included within this class, and further diversity results from differential splicing and post-translational processing of those gene products. The present invention is primarily concerned with the four gene products of the fourth family of PDEs, i.e., PDE4A, PDE4B, PDE4C, and PDE4D. These enzymes are collectively referred to as being isoforms or subtypes of the PDE4 isozyme family.

The PDE4s are characterized by selective, high affinity hydrolytic degradation of the second messenger cyclic nucleotide, adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP), and by sensitivity to inhibition by rolipram. A number of selective inhibitors of the PDE4s have been discovered in recent years, and beneficial pharmacological effects resulting from that inhibition have been shown in a variety of disease models (see, e.g., Torphy et al., *Environ Health Perspect.,* 1994, 102 Suppl. 10, p. 79–84 Duplantier et al., *J. Med. Chem.,* 1996, 39, p. 120–125; Schneider et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.,* 1995, 50, p. 211–217; Banner and Page, *Br. J. Pharmacol.,* 1995, 114, p. 93–98; Barnette et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* 1995, 273, p. 674–679; Wright et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.,* 1997, 75, p. 1001–1008; Manabe et al., *Eur. J. Pharmacol.,* 1997, 332, p. 97–107 and Ukita et al., *J. Med. Chem.,* 1999, 42, p. 1088–1099). Accordingly, there continues to be considerable interest in the art with regard to the discovery of further selective inhibitors of PDE4s.

Successful results have already been obtained in the art with the discovery and development of selective PDE4 inhibitors. In vivo, PDE4 inhibitors reduce the influx of eosinophils to the lungs of allergen-challenged animals while also reducing the bronchoconstriction and elevated bronchial responsiveness occurring after allergen challenge. PDE4 inhibitors also suppress the activity of immune cells (including $CD4^+$ T-lymphocytes, monocytes, mast cells, and basophils), reduce pulmonary edema, inhibit excitatory nonadrenergic noncholinergic neurotransmission (eNANC), potentiate inhibitory nonadrenergic noncholinergic neurotransmission (iNANC), reduce airway smooth muscle mitogenesis, and induce bronchodilation. PDE4 inhibitors also suppress the activity of a number of inflammatory cells associated with the pathophysiology of COPD, including monocytes/macrophages, $CD4^+$ T-lymphocytes, eosinophils and neutrophils. PDE4 inhibitors also reduce vascular smooth muscle mitogenesis and potentially interfere with the ability of airway epithelial cells to generate pro-inflammatory mediators. Through the release of neutral proteases and acid hydrolases from their granules, and the generation of reactive oxygen species, neutrophils contribute to the tissue destruction associated with chronic inflammation, and are further implicated in the pathology of conditions such as emphysema. Therefore, PDE4 inhibitors are particularly useful for the treatment of a great number of inflammatory, respiratory and allergic diseases, disorders or conditions and

for wounds and some of them are in clinical development mainly for treatment of asthma, COPD, bronchitis and emphysema.

The effects of PDE4 inhibitors on various inflammatory cell responses can be used as a basis for profiling and selecting inhibitors for further study. These effects include elevation of cAMP and inhibition of superoxide production, degranulation, chemotaxis, and tumor necrosis factor alpha (TNFa) release in eosinophils, neutrophils and monocytes.

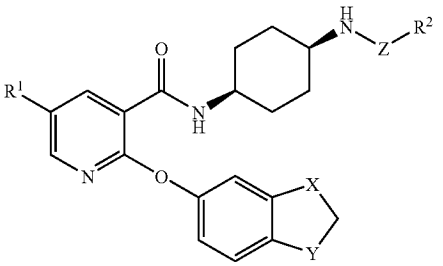
Some nicotinamide derivatives having a PDE4 inhibitory activity have already been made. For example, the patent application WO 98/45268 discloses nicotinamide derivatives having activity as selective inhibitors of PDE4D isozyme.

The patent applications WO 01/57036 and WO 03/068235 also disclose nicotinamide derivatives which are PDE4 inhibitors useful in the treatment of various inflammatory allergic and respiratory diseases and conditions.

However, there is still a huge need for additional PDE4 inhibitors that are good drug candidates. In particular, preferred compounds should bind potently to the PDE4 enzyme whilst showing little affinity for other receptors and enzymes. They should also possess favourable pharmacokinetic and metabolic activities, be non-toxic and demonstrate few side effects. Furthermore, it is also desirable that the ideal drug candidate will exist in a physical form that is stable and easily formulated.

The present invention therefore provides new nicotinamide derivatives of formula (I):

(I)



wherein

R^1 is selected from H, halo and $(C_1–C_4)$alkyl;

X is $—CH_2—$ and Y is S or X is S and Y is $—CH_2—$;

Z is a linker group selected from CO and SO_2,

R^2 is selected from

phenyl, benzyl, naphthyl, heteroaryl and $(C_3–C_8)$cycloalkyl, each of which is optionally substituted with 1 to 3 substituents each independently selected from halo, CN, $CONR^3R^4$, $(C_1–C_6)$alkyl, $(C_1–C_6)$alkoxy, halo$(C_1–C_6)$alkyl, OH, hydroxy$(C_1–C_6)$alkyl, $(C_3–C_8)$cycloalkyl-$(C_1–C_6)$alkoxy, hydroxy$(C_2–C_6)$alkoxy, $(C_3–C_8)$cycloalkyl-$(C_1–C_6)$alkyl, $(C_3–C_8)$cycloalkyloxy, phenyl (which is optionally substituted by OH, halo and/or $(C_1–C_6)$alkoxy), $(C_3–C_8)$cycloalkyl and NR^3R^4; and

R^3 and R^4 are each independently selected from H, $(C_1–C_4)$alkyl, and $SO_2(C_1–C_4$ alkyl);

a tautomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or polymorph of said compound or tautomer.

In the here above general formula (I), halo denotes a halogen atom selected from the group consisting of fluoro (F), chloro (Cl), bromo (Br) and iodo (I) in particular fluoro or chloro.

(C_1–C_4)alkyl or (C_1–C_6)alkyl radicals denote a straight-chain or branched group containing respectively 1 to 4 or 1 to 6 carbon atoms. This also applies if they carry substituents or occur as substituents of other radicals, for example in (C_1–C_6)alkoxy, halo(C_1–C_6)alkyl, hydroxy(C_1–C_6)alkyl and hydroxy(C_2–C_6)alkoxy radicals. Examples of suitable (C_1–C_4)alkyl and (C_1–C_6)alkyl radicals are methyl, ethyl, n-propyl, iso-propyl, n-butyl, iso-butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl etc. Examples of suitable (C_1–C_6)alkoxy and (C_2–C_6)alkoxy radicals are methoxy, ethoxy, n-propyloxy, iso-propyloxy, n-butyloxy, iso-butyloxy, sec-butyloxy and tert-butyloxy, pentoxy or hexyloxy. Hydroxy(C_1–C_6)alkyl and hydroxy(C_2–C_6)alkoxy radicals may contain more than one hydroxy group (—OH). According to a preferred embodiment of said invention, such radicals contain one hydroxy substituent. Examples of suitable hydroxy(C_1–C_6) alkyl radicals are hydroxymethyl, 1-hydroxyethyl or 2-hydroxyethyl. Accordingly, halo(C_1–C_6)alkyl radicals may contain more than one halo group.

According to the present invention, Heteroaryl means a monocyclic or polycyclic ring system comprising at least one aromatic ring, having 5 to 14 ring atoms, which ring system contains 1, 2, 3, 4 or 5 ring heteroatom(s) independently selected from N, O and S, including, where a ring nitrogen atom is present, the corresponding N-oxides and quaternary salts.

Finally, (C_3–C_8)cycloalkyl radical means a 3-membered to 8-membered saturated carbocyclic ring. Examples of suitable (C_3–C_8)cycloalkyl radicals are cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl and cyclooctyl.

It has been found that these nicotinamide derivatives are inhibitors of PDE4 isoenzymes, particularly useful for the treatment of inflammatory, respiratory and allergic diseases and conditions or for wounds.

In the general formula (I) according to the present invention, when a radical is mono- or poly-substituted, said substituent(s) can be located at any desired and chemically-feasible position(s). Also, when a radical is polysubstituted, said substituents can be identical or different, unless otherwise stated.

In one embodiment of the present invention, X is S and Y is —CH_2—.

In an alternative embodiment of the present invention, X is —CH_2— and Y is S.

Preferably, R^1 is H, halo, CH_3 or C_2H_5.

More preferably, R^1 is H, F, Cl or CH_3.

Most preferably, R^1 is F.

Preferably, R^2 is selected from phenyl, pyrrole, furan, furazan, thiophene, imidazole, pyrazole, oxazole, isoxazole, thiazole, isothiazole, tetrazole, triazine, pyridine, pyrazine, pyrimidine, pyridazine, indolizine, indole, isoindole, indazole, purine, naphthyridine, phthalazine, quinoline, isoquinoline, quinoxaline, quinazoline, cinnoline, benzofuran, thiadiazole, benzothiadiazole, oxadiazole, dihydrobenzofuran, benzoxadiazole, benzpyrimidine, benzothiophene, benzoxazole, benzothiazole, imidazopyridine, benzimidazole, pyrazolopyridine and pyrazolopyrimidine each of which is optionally substituted by one or more substituents selected from CH_3, $N(CH_3)SO_2CH_3$, $NHSO_2CH_2CH_3$, $NHSO_2CH(CH_3)_2$, OH, CH_2OH, Cl, F, C_2H_5, $CH(CH_3)_2$, OCH_3, OC_2H_4OH, C_2H_4OH, $O(CH_2)_3OH$, CF_3, OC_2H_5, cyclopropylmethoxy and cyclopentyloxy.

More preferably, R^2 is selected from phenyl, imidazole, indazole, quinoline, quinazoline, dihydrobenzofuran, benzothiadiazole, benzoxadiazole, pyrazole, imidazopyridine, benzimidazole, pyrazolopyridine, benzyl and cyclopropyl, each of which is optionally substituted by one or more substituents selected from CH_3, $N(CH_3)SO_2CH_3$, $NHSO_2CH_2CH_3$, $NHSO_2CH(CH_3)_2$, OH, CH_2OH, Cl, F, C_2H_5, $CH(CH_3)_2$, OCH_3, OC_2H_4OH, C_2H_4OH, $O(CH_2)_3OH$, CF_3, OC_2H_5, cyclopropylmethoxy and cyclopentyloxy.

Yet more preferably, R^2 is selected from phenyl, indazole and imidazo[1,2-a]pyridine, each of which is optionally substituted by one or more substituents selected from CH_3, $N(CH_3)SO_2CH_3$, $NHSO_2CH_2CH_3$, $NHSO_2CH(CH_3)_2$, OH, CH_2OH, Cl, F, C_2H_5, $CH(CH_3)_2$, OCH_3, OC_2H_4OH, C_2H_4OH, $O(CH_2)_3OH$, CF_3, OC_2H_5, cyclopropylmethoxy and cyclopentyloxy.

Even more preferably, R^2 is selected from phenyl, indazole and imidazo[1,2-a]pyridine, each of which is optionally substituted with 1 to 3 substituents each independently selected from methyl and hydroxy.

Most preferably, R^2 is selected from 2-hydroxy-4-methylphenyl, indazol-3-yl and imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl.

Preferably, Z is CO.

Preferred embodiments of compounds of formula (I) are those that incorporate two or more of the foregoing preferences.

Preferably, X is S and Y is —CH_2—;

R^1 is H, halo, CH_3 or C_2H_5;

R^2 is selected from phenyl, imidazole, indazole, quinoline, quinazoline, dihydrobenzofuran, benzothiadiazole, benzoxadiazole, pyrazole, imidazopyridine, benzimidazole, pyrazolopyridine, benzyl and cyclopropyl, each of which is optionally substituted by one or more substituents selected from CH_3, $N(CH_3)SO_2CH_3$, $NHSO_2CH_2CH_3$, $NHSO_2CH(CH_3)_2$, OH, CH_2OH, Cl, F, C_2H_5, $CH(CH_3)_2$, OCH_3, OC_2H_4OH, C_2H_4OH, $O(CH_2)_3OH$, CF_3, OC_2H_5, cyclopropylmethoxy and cyclopentyloxy; and

Z is CO.

More preferably, X is S and Y is —CH_2—;

R^1 is H, F, Cl or CH_3;

R^2 is selected from phenyl, indazole and imidazo[1,2-a]pyridine, each of which is optionally substituted with 1 to 3 substituents each independently selected from methyl and hydroxy; and

Z is CO.

Yet more preferably, X is S and Y is —CH_2—;

R^1 is F;

R^2 is selected from 2-hydroxy-4-methylphenyl, indazol-3-yl and imidazo[1,2-a]pyridin-8-yl, and

Z is CO.

Preferred compounds are:

Syn-Imidazo[1,2-a]pyridine-8-carboxylic acid (4-{[2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-amide,

Syn-1H-Indazole-3-carboxylic acid (4-{[2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-amide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-[4-(2-hydroxy-4-methyl-benzoylamino)-cyclohexyl]-nicotinamide,

Syn-Imidazo[1,2-a]pyridine-8-carboxylic acid (4-{[2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-5-yloxy)-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-amide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-{4-[2-(2-hydroxy-ethoxy)-benzoylamino]-cyclohexyl}-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-[4-(2-hydroxy-4-hydroxymethyl-benzoylamino)-cyclohexyl]-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-[4-(2-hydroxy-5-hydroxymethyl-benzoylamino)-cyclohexyl]-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-{4-[2-(2-hydroxy-ethoxy)-3-methyl-benzoylamino]-cyclohexyl}-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-{4-[2-(2-hydroxy-ethoxy)-4-methyl-benzoylamino]-cyclohexyl}-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-{4-[2-(2-hydroxy-ethoxy)-5-methyl-benzoylamino]-cyclohexyl}-nicotinamide,

Syn-N-{4-[4-Chloro-2-(2-hydroxy-ethoxy)-benzoylamino]-cyclohexyl}-2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-nicotinamide,

Syn-N-{4-[5-Chloro-2-(2-hydroxy-ethoxy)-benzoylamino]-cyclohexyl}-2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-N-(4-{[5-ethyl-1-(2-hydroxy-ethyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-5-fluoro-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-(4-{[1-(2-hydroxy-ethyl)-5-isopropyl-1H-pyrazole-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-nicotinamide,

Syn-1-(2-Hydroxy-ethyl)-1H-indazole-3-carboxylic acid (4-{[2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-amide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-N-[4-(5-ethyl-2-hydroxy-benzoylamino)-cyclohexyl]-5-fluoro-nicotinamide,

Syn-N-[4-(4-Chloro-2-hydroxy-benzoylamino)-cyclohexyl]-2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-[4-(2-hydroxy-4,5-dimethyl-benzoylamino)-cyclohexyl]-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-N-[4-(4-ethyl-2-hydroxy-benzoylamino)-cyclohexyl]-5-fluoro-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-[4-(2-hydroxy-5-methyl-benzoylamino)-cyclohexyl]-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-[4-(4-fluoro-2-hydroxy-benzoylamino)-cyclohexyl]-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-[4-(5-fluoro-2-hydroxy-benzoylamino)-cyclohexyl]-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-N-{4-[5-ethyl-2-(2-hydroxy-ethoxy)-benzoylamino]-cyclohexyl}-5-fluoro-nicotinamide,

Syn-N-[4-(5-Chloro-2-hydroxy-benzoylamino)-cyclohexyl]-2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-{4-[5-fluoro-2-(2-hydroxy-ethoxy)-benzoylamino]-cyclohexyl}-nicotinamide,

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-[4-(2-hydroxy-5-trifluoromethyl-benzoylamino)-cyclohexyl]-nicotinamide, and

Syn-N-[4-(4,5-Dichloro-2-hydroxy-benzoylamino)-cyclohexyl]-2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-nicotinamide,

a tautomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or polymorph of said compound or tautomer.

Most preferred compounds are:

Syn-Imidazo[1,2-a]pyridine-8-carboxylic acid (4-{[2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-amide,

Syn-1H-Indazole-3-carboxylic acid (4-{[2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-amide, and

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-[4-(2-hydroxy-4-methyl-benzoylamino)-cyclohexyl]-nicotinamide,

a tautomer thereof or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or polymorph of said compound or tautomer.

The nicotinamide derivatives of the formula (I) can be prepared using the Routes disclosed hereunder, and exemplified in the Examples and Preparations, in which the substituents R^1, R^2, X, Y and Z are as previously defined for the nicotinamide derivatives of the formula (I) unless otherwise stated. Other conventional methods may be used in accordance with the skilled person's knowledge.

Unless otherwise provided herein:

PyBOP® means Benzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate;

PyBrOP® means bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate;

CDI means N,N'-carbonyldiimidazole;

WSCDI means 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride;

Mukaiyama's reagent means 2-chloro-1-methylpyridinium iodide;

HATU means O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N'N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate;

HBTU means O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N'N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate;

DCC means N,N'-dicyclohexylcarbodiimide;

CDI means N,N'-carbonyidiimidazole;

HOAT means 1-hydroxy-7-azabenzotriazole;

HOBT means 1-hydroxybenzotriazole hydrate;

Hünig's base means N-ethyidiisopropylamine;

Et_3N means triethylamine;

NMM means N-methylmorpholine;

NMP means 1-methyl-2-pyrrolidinone;

DMAP means 4-dimethylaminopyridine;

NMO means 4-methylmorpholine N-oxide;

KHMDS means potassium bis(trimethylsilyl)amide;

NaHMDS means sodium bis(trimethylsilyl)amide;

DIAD means diisopropyl azodicarboxylate;

DEAD means diethyl azodicarboxylate;

DIBAL means diisobutylammonium hydride;

Dess-Martin periodinane means 1,1,1-triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-one;

TBDMS-Cl means tert-butyldimethylchlorosilane;

TMS-Cl means chlorotrimethylsilane;

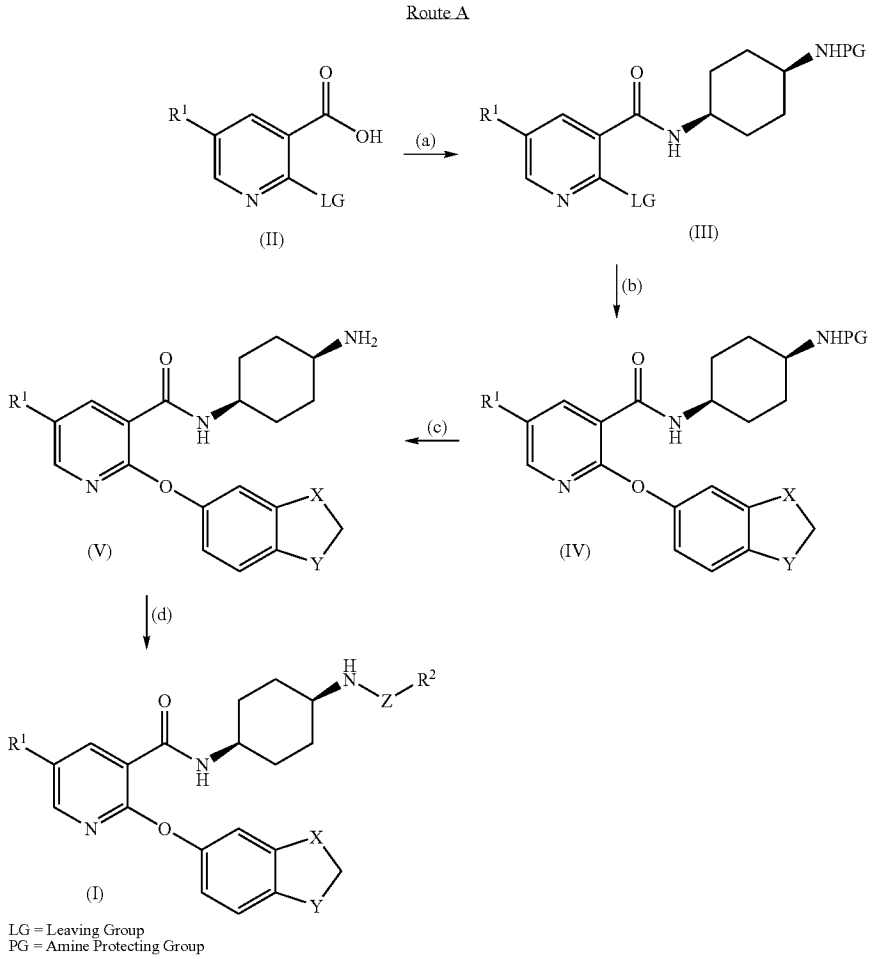
Boc means tert-butoxycarbonyl;

CBz means benzyloxycarbonyl;

MeOH means methanol, EtOH means ethanol, and EtOAc means ethyl acetate;

THF means tetrahydrofuran, DMSO means dimethyl sulphoxide, and DCM means dichloromethane; DMF means N,N-dimethylformamide;

ACOH means acetic acid, TFA means trifluoroacetic acid; rt means room temperature; 3° means tertiary; eq means equivalents; Me means methyl, Et means ethyl, Bn means benzyl; other abbreviations are used in accordance with standard synthetic chemistry practice.



Nicotinic acids of formula (II) are either available commercially or may be obtained by analogy with the methods of Haylor et. al. (EP 0634413). The protected cyclohexylamines are either available commercially or may be prepared by analogy with the method of Oku et. al. (WO 99/54284). The benzothiophenols may be prepared by analogy to the methods of Gymer et. al (WO 02/18333) and Malmström et. al. (J. Am. Chem. Soc., 2001, 123, 3434–3440).

In the scheme above, R^1, R^2, Z, X and Y are as previously defined, PG is a suitable amine protecting group, typically Boc, CBz or Bn, and preferably Boc, and LG is a suitable leaving group, typically halo, and preferably Cl.

(a)—Amide Bond Formation is conducted by reaction of nicotinic acid (II) with a cyclohexane-1,4-diamine (in which one amine function is protected by PG, a suitable amine protecting group e.g. Boc, Bn, preferably Boc) to form amide (III). This acid/amine coupling may be undertaken by using either

(i) an acyl chloride derivative of acid (II)+amine, with an excess of acid acceptor in a suitable solvent, or

(ii) the acid (II) with a conventional coupling agent+amine, optionally in the presence of a catalyst, with an excess of acid acceptor in a suitable solvent.

Typically, the reaction is conducted under the following conditions:

(i) acid chloride of acid (II) (generated in-situ), an excess of amine, optionally with an excess of 3° amine such as Et_3N, Hünig's base or NMM, in DCM or THF, without heating for 1 to 24 hrs,

or

(ii) acid (II), WSCDI/DCC/CDI, optionally in the presence of HOBT/HOAT, an excess of amine, with an excess of NMM, Et_3N, Hünig's base in THF, DCM or EtOAc, at rt. for 4 to 48 hrs; or, acid (II), PYBOP®/PyBrOP®/Mukaiyama's reagent, an excess of amine, with an excess of NMM, Et_3N, Hünig's base in THF, DCM or EtOAc, at rt. for 4 to 24 hrs.

The preferred conditions comprise treatment of a solution of acid (II) in DCM and DMF with oxalyl chloride and stirring at RT for 18 hours (to give the acid chloride), followed by the addition of a solution of the amine and Hünig's base in DCM and stirring for 18 hours at RT.

(b)—Ether Formation is conducted by substitution of leaving group LG, (e.g. Hal, preferably Cl) of (III) with an excess of 2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-ol or 2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-5-ol to give compound (IV), in the presence of a base in a suitable solvent (e.g. MeCN, dioxan).

Typically, the reaction is conducted using an alkali metal salt as the base (e.g. Cs_2CO_3, K_2CO_3) in a suitable solvent (e.g. MeCN or dioxan) at elevated temperature.

(c)—Amine Deprotection comprises removal of the protecting group, PG, from (IV) to give amine (V) by a method selective to the protecting group as detailed by Greene et al in "Protective Groups in Organic Synthesis".

Typically, when PG=Boc, the reaction comprises treatment of (IV) with a strong acid (e.g. TFA, HCl), in a suitable solvent (e.g. dioxan, DCM) at room temperature.

Preferably, when PG=Boc, the reaction comprises treatment of a solution of (IV) in DCM with TFA at RT for 4 hours.

(d)—Reaction of amino group with T-Z-R^2

Compounds of the formula (I) may be prepared by reaction of amine (V) with a suitable reagent of formula T-Z-R^2, where T represents OH or Cl. When Z represents CO, and T represents OH or Cl, compounds of formula (I) may be prepared by reaction of the amine of formula (V) with R^2CO_2H according to the general methods described previously for step (a).

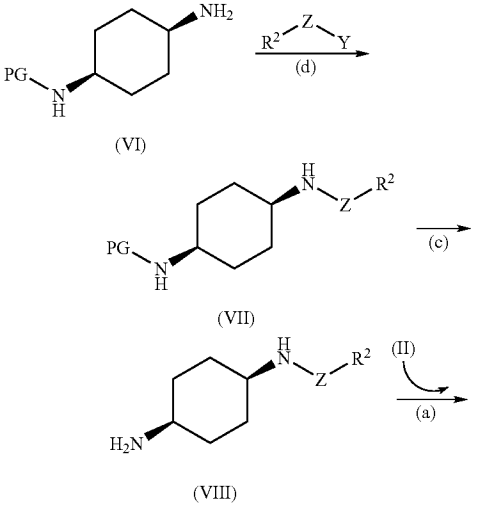
The preferred conditions are: WSCDI, HOBT, amine (V), R^2CO_2H, an excess of 3° amine base (Hünig's base, Et_3N or NMM) in dichloromethane, N,N-dimethylformamide, NMP or DMA, at rt. for up to 36 hrs, or amine (V), acid R^2CO_2H, HBTU in the presence of an excess of 3° amine base (Hünig's base, Et_3N or NMM) in DMF for up to 24 hrs at rt.

When Z represents SO_2 and T represents Cl, compounds of formula (I) may be prepared by reaction of the amine of formula (V) with R^2SO_2Cl by analogy with the general methods described in step (a).

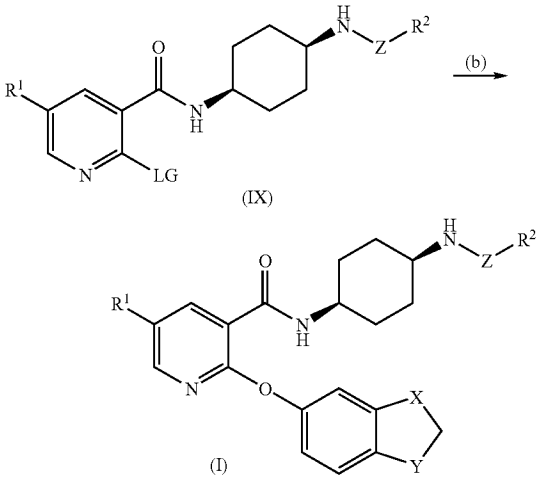
The preferred conditions are: WSCDI, HOBT, amine (V), R^2SO_2Cl, an excess of 3° amine base (Hünig's base, Et_3N or NMM) in N,N-dimethylformamide, at rt. for 18 hrs, or amine (V), R^2SO_2Cl in the presence of excess Et_3N in dichloromethane at rt.

Compounds of formula R^2ZT, are either commercially available, or may be obtained using standard methodology, or when R^2 is a heterocycle, by analogy with the methods described in Comprehensive Heterocyclic Chemistry I and II (Elsevier Science Ltd.) and references therein.

Route B



-continued



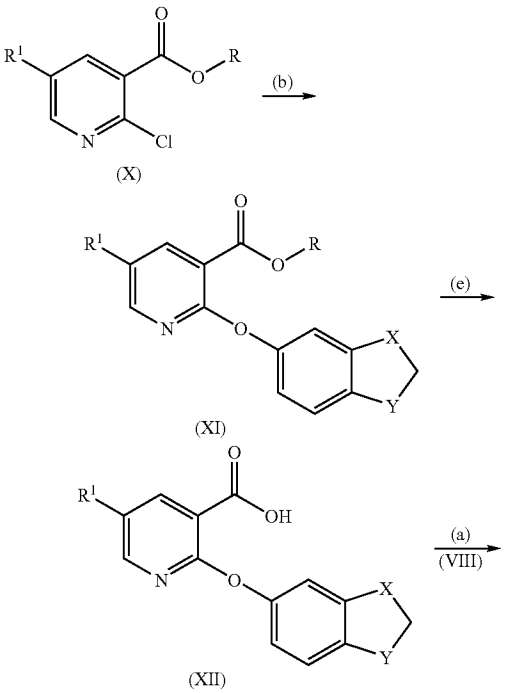
The compound of formula (VII) may be prepared from the amine (VI) by reaction with R^2ZY according to the methods described previously in step (d), Route A.

The compound of formula (VIII) may be prepared from the compound of formula (VII) by analogy to the methods described previously in step (c), Route A.

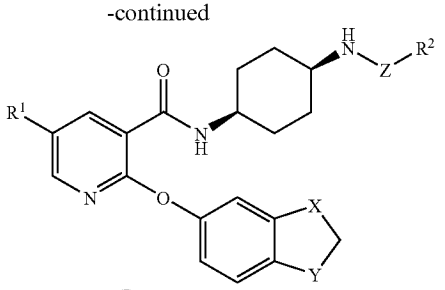
Compounds of formula (IX) may be prepared by reaction of the amine of formula (VIII) with the acid (II) according to the methods described previously in step (a), Route A.

Compounds of formula (I) may be prepared by reaction of compounds of formula (IX) with 2,3-dihydro-benzo[b] thiophen-6-ol or 2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-5-ol as described previously in step (b), Route A.

Route C



-continued



(I)

R represents a carboxylic acid protecting group (e.g. lower alkyl, Bn, typically lower alkyl, preferably ethyl).

Compounds of formula (X) are either available commercially or may be obtained from the compounds of formula (II), using standard esterification conditions.

Compounds of formula (XI) may be prepared by reaction of the ester (X) with 2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-ol or 2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-5-ol, as described previously in step (b), Route A.

Step (e)-Ester hydrolysis

Hydrolysis of the ester (XI) may be achieved in the presence of acid or base, in a suitable solvent, optionally at elevated temperature to afford the acid (XII).

Typically, the ester (XI) is treated with an alkali metal hydroxide (eg Li, Na, Cs) in aqueous solvent (MeOH, EtOH, dioxan, THF) at between rt and the reflux temperature of the reaction, to give the acid of formula (XII)

Reaction of the acid (XII) with the amine (VIII) as described previously in step (a) provides the compounds of formula (I).

Alternatively compounds of formula (XII) may be prepared by reaction of the nicotinic acids of formula (II) with 2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-ol or 2,3-dihydro-benzo[b] thiophen-5-ol, as described previously in step (b), Route A.

Further Routes

Certain R^2 groups may undergo further functional group interconversions (FGIs) and transformations, such as alkylation of a phenol hydroxy group, using a suitable alkylbromide, in the presence of a suitable alkali metal base (such as K_2CO_3), optionally in the presence of a catalyst (eg KI) in a suitable solvent such as acetonitrile and/or N,N-dimethylformamide at elevated temperature, or demethylation of a methoxy group by treatment with lithium iodide in pyridine or collidine, or by treatment with BBr_3 in dichloromethane.

For certain compounds of the description, a suitable protecting group strategy may be employed. For example, a hydroxyl group may be protected using a tetrahydropyran group, and deprotection may be achieved by treatment with a solution of acetic acid:water:tetrahydrofuran (4:1:2 by volume) at rt. for upto 18 hrs. Further, a benzyloxy group may be used and deprotected to give the corresponding hydroxyl compound, for example by using a reduction (e.g. with palladium black in acid).

All of the above reactions and the preparations of novel starting materials used in the preceding methods are conventional and appropriate reagents and reaction conditions for their performance or preparation as well as procedures for isolating the desired products will be well-known to those skilled in the art with reference to literature precedents and the examples and preparations hereto.

As mentioned above, use of protection/deprotection strategies are needed in some instances. Methods such as those described by T. W. GREENE (*Protective Groups in Organic Synthesis*, A. Wiley-Interscience Publication, 1981) or by McOMIE (*Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973), can be used.

Compounds of formula (I), as well as intermediate for the preparation thereof can be purified according to various well-known methods, such as for example crystallization or chromatography.

The nicotinamide derivatives of formula (I) may also be optionally transformed in pharmaceutically acceptable salts. In particular, these pharmaceutically acceptable salts of the nicotinamide derivatives of the formula (I) include the acid addition and the base salts (including disalts) thereof.

Suitable acid addition salts are formed from acids which form non-toxic salts. Examples include the acetate, aspartate, benzoate, besylate, bicarbonate/carbonate, bisulphate, camsylate, citrate, edisylate, esylate, fumarate, gluceptate, gluconate, glucuronate, hibenzate, hydrochloride/chloride, hydrobromide/bromide, hydroiodide/iodide, hydrogen phosphate, isothionate, D- and L-lactate, malate, maleate, malonate, mesylate, methylsulphate, 2-napsylate, nicotinate, nitrate, orotate, palmoate, phosphate, saccharate, stearate, succinate, sulphate, D- and L-tartrate, 1-hydroxy-2-naphtoate, 3-hydroxy-2-naphthoate and tosylate salts.

Suitable base salts are formed from bases which form non-toxic salts. Examples include the aluminium, arginine, benzathine, calcium, choline, diethylamine, diolamine, glycine, lysine, magnesium, meglumine, olamine, potassium, sodium, tromethamine and zinc salts.

For a review on suitable salts, see Stahl and Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2002).

A pharmaceutically acceptable salt of a nicotinamide derivative of the formula (I) may be readily prepared by mixing together solutions of the nicotinamide derivative of formula (I) and the desired acid or base, as appropriate. The salt may precipitate from solution and be collected by filtration or may be recovered by evaporation of the solvent.

Pharmaceutically acceptable solvates in accordance with the invention include hydrates and solvates wherein the solvent of crystallization may be isotopically substituted, e.g. D_2O, d_6-acetone, d_6-DMSO.

Also within the scope of the invention are clathrates, drug-host inclusion complexes wherein, in contrast to the aforementioned solvates, the drug and host are are present in non-stoichiometric amounts. For a review of such complexes, see J Pharm Sci, 64 (8), 1269–1288 by Haleblian (August 1975).

Hereinafter all references to nicotinamide derivatives of formula (I) include references to salts thereof and to solvates and clathrates of compounds of formula (I) and salts thereof.

The invention includes all polymorphs of the nicotinamide derivatives of formula (I).

Also within the scope of the invention are so-called dimethylformamide, "prodrugs" of the nicotinamide derivatives of formula (I). Thus certain derivatives of nicotinamide derivatives of formula (I) which have little or no pharmacological activity themselves can, when metabolised upon administration into or onto the body, give rise to nicotinamide derivatives of formula (I) having the desired activity. Such derivatives are referred to as "prodrugs".

Prodrugs in accordance with the invention can, for example, be produced by replacing appropriate functionalities present in the nicotinamide derivatives of formula (I) with certain moieties known to those skilled in the art as "pro-moieties" as described, for example, in "Design of Prodrugs" by H Bundgaard (Elsevier, 1985).

Finally, certain nicotinamide derivatives of formula (I) may themselves act as prodrugs of other nicotinamide derivatives of formula (I).

Nicotinamide derivatives of formula (I) containing one or more asymmetric carbon atoms can exist as two or more optical isomers. Where a nicotinamide derivative of formula (I) contains an alkenyl or alkenylene group, geometric cis/trans (or Z/E) isomers are possible, and where the nicotinamide derivative contains, for example, a keto or oxime group, tautomeric isomerism ('tautomerism') may occur. It follows that, unless otherwise defined, a single nicotinamide derivative may exhibit more than one type of isomerism.

Included within the scope of the present invention are all optical isomers, geometric isomers and tautomeric forms of the nicotinamide derivatives of formula (I), including compounds exhibiting more than one type of isomerism, and mixtures of one or more thereof.

Cis/trans isomers may be separated by conventional techniques well known to those skilled in the art, for example, fractional crystallisation and chromatography.

Conventional techniques for the preparation/isolation of individual stereoisomers include the conversion of a suitable optically pure precursor, resolution of the racemate (or the racemate of a salt or derivative) using, for example, chiral HPLC, or fractional crystallisation of diastereoisomeric salts formed by reaction of the racemate with a suitable optically active acid or base, for example, tartaric acid.

The present invention also includes all pharmaceutically acceptable isotopic variations of a nicotinamide derivative of formula (I). An isotopic variation is defined as one in which at least one atom is replaced by an atom having the same atomic number, but an atomic mass different from the atomic mass usually found in nature.

Examples of isotopes suitable for inclusion in the nicotinamide derivatives of the invention include isotopes of hydrogen, such as ^{2}H and ^{3}H, carbon, such as ^{13}C and ^{14}C, nitrogen, such as ^{15}N, oxygen, such as ^{17}O and ^{18}O, phosphorus, such as ^{32}P, sulphur, such as ^{35}S, fluorine, such as ^{18}F, and chlorine, such as ^{36}Cl.

Substitution of the nicotinamide derivative of formula (I) isotopes such as deuterium, i.e. ^{2}H, may afford certain therapeutic advantages resulting from greater metabolic stability, for example, increased in vivo half-life or reduced dosage requirements, and hence may be preferred in some circumstances.

Certain isotopic variations of the nicotinamide derivatives of formula (I), for example, those incorporating a radioactive isotope, are useful in drug and/or substrate tissue distribution studies. The radioactive isotopes tritium, i.e. ^{3}H, and carbon-14, i.e. ^{14}C, are particularly useful for this purpose in view of their ease of incorporation and ready means of detection.

Isotopic variations of the nicotinamide derivatives of formula (I) can generally be prepared by conventional techniques known to those skilled in the art or by processes analogous to those described in the accompanying Examples and Preparations using appropriate isotopic variations of suitable reagents.

According to a further aspect, the present invention concerns mixtures of nicotinamide derivatives of the formula (I), as well as mixtures with or of their pharmaceutically acceptable salts, solvates, polymorphs, isomeric forms and/or isotope forms.

According to the present invention, all the here above mentioned forms of the nicotinamide derivatives of formula (I) except the pharmaceutically acceptable salts (i.e. said solvates, polymorphs, isomeric forms and isotope forms), are defined as "derived forms" of the nicotinamide derivatives of formula (I) in what follows.

The nicotinamide derivatives of formula (I), their pharmaceutically acceptable salts and/or derived forms, are valuable pharmaceutical active compounds, which are suitable for the therapy and prophylaxis of numerous disorders in which the PDE4 enzymes are involved, in particular the inflammatory disorders, allergic disorders, respiratory diseases and wounds.

The nicotinamide derivatives of formula (I) and their pharmaceutically acceptable salts and derived forms as mentioned above can be administered according to the invention to animals, preferably to mammals, and in particular to humans, as pharmaceuticals for therapy or prophylaxis. They can be administered per se, in mixtures with one another or in combination with other drugs, or in the form of pharmaceutical preparations which permit enteral (gastric) or parenteral (non-gastric) administration and which as active constituent contain an efficacious dose of at least one nicotinamide derivative of the formula (I), its pharmaceutically acceptable salts and/or derived forms, in addition to customary pharmaceutically innocuous excipients and/or additives. The term "excipient" is used herein to describe any ingredient other than the compound of the invention. The choice of excipient will to a large extent depend on the particular mode of administration.

The nicotinamide derivatives of formula (I), their pharmaceutically acceptable salts and/or derived forms may be freeze-dried, spray-dried, or evaporatively dried to provide a solid plug, powder, or film of crystalline or amorphous material. Microwave or radio frequency drying may be used for this purpose.

Oral Administration

The nicotinamide derivatives of formula (I) their pharmaceutically acceptable salts and/or derived forms of the invention may be administered orally. Oral administration may involve swallowing, so that the compound enters the gastrointestinal tract, or buccal or sublingual administration may be employed by which the compound enters the blood stream directly from the mouth.

Formulations suitable for oral administration include solid formulations such as tablets, capsules containing particulates, liquids, or powders, lozenges (including liquid-filled), chews, multi- and nano-particulates, gels, films (including muco-adhesive), ovules, sprays and liquid formulations.

Liquid formulations include suspensions, solutions, syrups and elixirs. Such formulations may be employed as fillers in soft or hard capsules and typically comprise a carrier, for example, water, ethanol, propylene glycol, methylcellulose, or a suitable oil, and one or more emulsifying agents and/or suspending agents. Liquid formulations may also be prepared by the reconstitution of a solid, for example, from a sachet.

The nicotinamide derivatives of formula (I), their pharmaceutically acceptable salts and/or derived forms of the invention may also be used in fast-dissolving, fast-disintegrating dosage forms such as those described in Expert Opinion in Therapeutic Patents, 11 (6), 981–986 by Liang and Chen (2001).

The composition of a typical tablet in accordance with the invention may comprise:

Ingredient	% w/w
Nicotinamide derivative of formula (I)	10.00*
Microcrystalline cellulose	64.12
Lactose	21.38
Croscarmellose sodium	3.00
Magnesium stearate	1.50

*Quantity adjusted in accordance with drug activity.

A typical tablet may be prepared using standard processes known to a formulation chemist, for example, by direct compression, granulation (dry, wet, or melt), melt congealing, or extrusion. The tablet formulation may comprise one or more layers and may be coated or uncoated.

Examples of excipients suitable for oral administration include carriers, for example, cellulose, calcium carbonate, dibasic calcium phosphate, mannitol and sodium citrate, granulation binders, for example, polyvinylpyrrolidine, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose and gelatin, disintegrants, for example, sodium starch glycolate and silicates, lubricating agents, for example, magnesium stearate and stearic acid, wetting agents, for example, sodium lauryl sulphate, preservatives, anti-oxidants, flavours and colourants.

Solid formulations for oral administration may be formulated to be immediate and/or modified release. Modified release formulations include delayed-, sustained-, pulsed-, controlled dual-, targeted and programmed release. Details of suitable modified release technologies such as high energy dispersions, osmotic and coated particles are to be found in Verma et al, Pharmaceutical Technology On-line, 25(2), 1–14 (2001). Other modified release formulations are described in U.S. Pat. No. 6,106,864.

Parenteral Administration

The nicotinamide derivatives of formula (I), their pharmaceutically acceptable salts and/or derived forms of the invention may also be administered directly into the blood stream, into muscle, or into an internal organ. Suitable means for parenteral administration include intravenous, intraarterial, intraperitoneal, intrathecal, intraventricular, intraurethral, intrasternal, intracranial, intramuscular and subcutaneous. Suitable devices for parenteral administration include needle (including microneedle) injectors, needle-free injectors and infusion techniques.

Parenteral formulations are typically aqueous solutions which may contain excipients such as salts, carbohydrates and buffering agents (preferably to a pH of from 3 to 9), but, for some applications, they may be more suitably formulated as a sterile non-aqueous solution or as a dried form to be used in conjunction with a suitable vehicle such as sterile, pyrogen-free water.

The preparation of parenteral formulations under sterile conditions, for example, by lyophilisation, may readily be accomplished using standard pharmaceutical techniques well known to those skilled in the art.

The solubility of nicotinamide derivatives of formula (I) used in the preparation of parenteral solutions may be increased by suitable processing, for example, the use of high energy spray-dried dispersions (see WO 01/47495) and/or by the use of appropriate formulation techniques, such as the use of solubility-enhancing agents.

Formulations for parenteral administration may be formulated to be immediate and/or modified release. Modified release formulations include delayed-, sustained-, pulsed-, controlled dual-, targeted and programmed release.

Topical Administration

The nicotinamide derivatives of the invention may also be administered topically to the skin or mucosa, either dermally or transdermally. Typical formulations for this purpose include gels, hydrogels, lotions, solutions, creams, ointments, dusting powders, dressings, foams, films, skin patches, wafers, implants, sponges, fibres, bandages and microemulsions. Liposomes may also be used. Typical carriers include alcohol, water, mineral oil, liquid petrolatum, white petrolatum, glycerin and propylene glycol. Penetration enhancers may be incorporated—see, for example, J Pharm Sci, 88 (10), 955–958 by Finnin and Morgan (October 1999).

Other means of topical administration include delivery by iontophoresis, electroporation, phonophoresis, sonophoresis and needle-free or microneedle injection.

Formulations for topical administration may be formulated to be immediate and/or modified release. Modified release formulations include delayed-, sustained-, pulsed-, controlled dual-, targeted and programmed release. Thus nicotinamide derivatives of formula (I) may be formulated in a more solid form for administration as an implanted depot providing long-term release of the active compound.

Inhaled/Intranasal Administration

The nicotinamide derivatives of formula (I) can also be administered intranasally or by inhalation, typically in the form of a dry powder (either alone, as a mixture, for example, in a dry blend with lactose in anhydrous or monohydrate form, preferably monohydrate, mannitol, dextran, glucose, maltose, sorbitol, xylitol, fructose, sucrose or trehalose, or as a mixed component particle, for example, mixed with phospholipids) from a dry powder inhaler or as an aerosol spray from a pressurised container, pump, spray, atomiser (preferably an atomiser using electrohydrodynamics to produce a fine mist), or nebuliser, with or without the use of a suitable propellant, such as dichlorofluoromethane.

The pressurised container, pump, spray, atomizer, or nebuliser contains a solution or suspension of the active compound comprising, for example, ethanol (optionally, aqueous ethanol) or a suitable alternative agent for dispersing, solubilising, or extending release of the active, the propellant(s) as solvent and an optional surfactant, such as sorbitan trioleate or an oligolactic acid.

Prior to use in a dry powder or suspension formulation, the drug product is micronised to a size suitable for delivery by inhalation (typically less than 5 microns). This may be achieved by any appropriate comminuting method, such as spiral jet milling, fluid bed jet milling, supercritical fluid processing to form nanoparticles, high pressure homogenisation, or spray drying.

A suitable solution formulation for use in an atomiser using electrohydrodynamics to produce a fine mist may contain from 1 μg to 20 mg of the nicotinamide derivative of formula (I) per actuation and the actuation volume may vary from 1 μl to 100 μl. A typical formulation may comprise a nicotinamide derivative of formula (I), propylene glycol, sterile water, ethanol and sodium chloride. Alternative solvents which may be used instead of propylene glycol include glycerol and polyethylene glycol.

Capsules, blisters and cartridges (made, for example, from gelatin or HPMC) for use in an inhaler or insufflator may be formulated to contain a powder mix of the nicotinamide derivative of formula (I), a suitable powder base such as lactose or starch and a performance modifier such as l-leucine, mannitol, or magnesium stearate.

In the case of dry powder inhalers and aerosols, the dosage unit is determined by means of a valve which delivers a metered amount. Units in accordance with the invention are typically arranged to administer a metered dose or "puff" containing from 1 μg to 4000 μg of the nicotinamide derivative of formula (I). The overall daily dose will typically be in the range 1 μg to 20 mg which may be administered in a single dose or, more usually, as divided doses throughout the day.

Formulations for inhaled/intranasal administration may be formulated to be immediate and/or modified release. Modified release formulations include delayed-, sustained-, pulsed-, controlled dual-, targeted and programmed release. Sustained or controlled release can be obtained by using for example poly(D,L-lactic-co-glycolic acid).

Flavouring agents, such as methol and levomethol and/or sweeteners such as saccharing or saccharin sodium can be added to the formulation.

Rectal/Intravaginal Administration

The nicotinamide derivatives of formula (I) may be administered rectally or vaginally, for example, in the form of a suppository, pessary, or enema. Cocoa butter is a traditional suppository base, but various alternatives may be used as appropriate.

Formulations for rectal/vaginal administration may be formulated to be immediate and/or modified release. Modified release formulations include delayed-, sustained-, pulsed-, controlled dual-, targeted and programmed release.

Ocular/Andial Administration

The nicotinamide derivatives of formula (I) may also be administered directly to the eye or ear, typically in the form of drops of a micronised suspension or solution in isotonic, pH-adjusted, sterile saline. Other formulations suitable for ocular and andial administration include ointments, biodegradable (e.g. absorbable gel sponges, collagen) and non-biodegradable (e.g. silicone) implants, wafers, lenses and particulate or vesicular systems, such as niosomes or liposomes. A polymer such as crossed-linked polyacrylic acid, polyvinylalcohol, hyaluronic acid, a cellulosic polymer, for example, hydroxypropylmethylcellulose, hydroxyethylcellulose, or methyl cellulose, or a heteropolysaccharide polymer, for example, gelan gum, may be incorporated together with a preservative, such as benzalkonium chloride. Such formulations may also be delivered by iontophoresis.

Formulations for ocular/andial administration may be formulated to be immediate and/or modified release. Modified release formulations include delayed-, sustained-, pulsed-, controlled dual-, targeted, or programmed release.

Enabling Technologies

The nicotinamide derivatives of formula (I) may be combined with soluble macromolecular entities such as cyclodextrin or polyethylene glycol-containing polymers to improve their solubility, dissolution rate, taste-masking, bioavailability and/or stability.

Drug-cyclodextrin complexes, for example, are found to be generally useful for most dosage forms and administration routes. Both inclusion and non-inclusion complexes may be used. As an alternative to direct complexation with the drug, the cyclodextrin may be used as an auxiliary additive, i.e. as a carrier, diluent, or solubiliser. Most commonly used for these purposes are alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins, examples of which may be found in International Patent Applications Nos. WO 91/11172, WO 94/02518 and WO 98/55148.

Dosage

For administration to human patients, the total daily dose of the nicotinamide derivatives of formula (I) is typically in the range 0.001 mg/kg to 100 mg/kg depending, of course, on the mode of administration. The total daily dose may be administered in single or divided doses. The physician will readily be able to determine doses for subjects depending on age, weight, health state and sex or the patient as well as the severity of the disease.

According to another embodiment of the present invention, the nicotinamide derivatives of the formula (I), their pharmaceutically acceptable salts and/or their derived forms, can also be used as a combination with one or more additional therapeutic agents to be co-administered to a patient to obtain some particularly desired therapeutic end result. The second and more additional therapeutic agents may also be a nicotinamide derivatives of the formula (I), their pharmaceutically acceptable salts and/or their derived forms, or one or more PDE4 inhibitors known in the art. More typically, the second and more therapeutic agents will be selected from a different class of therapeutic agents.

As used herein, the terms "co-administration", "co-administered" and "in combination with", referring to the nicotinamide derivatives of formula (I) and one or more other therapeutic agents, is intended to mean, and does refer to and include the following:

- simultaneous administration of such combination of nicotinamide derivative(s) and therapeutic agent(s) to a patient in need of treatment, when such components are formulated together into a single dosage form which releases said components at substantially the same time to said patient,
- substantially simultaneous administration of such combination of nicotinamide derivative(s) and therapeutic agent(s) to a patient in need of treatment, when such components are formulated apart from each other into separate dosage forms which are taken at substantially the same time by said patient, whereupon said components are released at substantially the same time to said patient,
- sequential administration of such combination of nicotinamide derivative(s) and therapeutic agent(s) to a patient in need of treatment, when such components are formulated apart from each other into separate dosage forms which are taken at consecutive times by said patient with a significant time interval between each administration, whereupon said components are released at substantially different times to said patient; and
- sequential administration of such combination of nicotinamide derivative(s) and therapeutic agent(s) to a patient in need of treatment, when such components are formulated together into a single dosage form which releases said components in a controlled manner whereupon they are concurrently, consecutively, and/or overlappingly administered at the same and/or different times by said patient.

Suitable examples of other therapeutic agents which may be used in combination with the nicotinamide derivatives of the formula (I), their pharmaceutically acceptable salts and/or their derived forms include, but are by no mean limited to:

(a) 5-Lipoxygenase (5-LO) inhibitors or 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) antagonists,

(b) Leukotriene antagonists (LTRAs) including antagonists of LTB4, LTC4, LTD4, and LTE4,

(c) Histaminic receptor antagonists including H1, H3 and H4 antagonists,
(d) α1- and α2-adrenoceptor agonist vasoconstrictor sympathomimetic agents for decongestant use,
(e) Muscarinic M3 receptor antagonists or anticholinergic agents,
(f) β2-adrenoceptor agonists,
(g) Theophylline,
(h) Sodium cromoglycate,
(i) COX-1 inhibitors (NSAIDs) and COX-2 selective inhibitors,
(j) Oral or inhaled Glucocorticosteroids,
(k) Monoclonal antibodies active against endogenous inflammatory entities,
(l) Anti-tumor necrosis factor (anti-TNF-a) agents,
(m) Adhesion molecule inhibitors including VLA-4 antagonists,
(n) Kinin-B1—and B2-receptor antagonists,
(o) Immunosuppressive agents,
(p) Inhibitors of matrix metalloproteases (MMPs),
(q) Tachykinin NK1, NK2 and NK3 receptor antagonists,
(r) Elastase inhibitors,
(s) Adenosine A2a receptor agonists,
(t) Inhibitors of urokinase,
(u) Compounds that act on dopamine receptors, e.g. D2 agonists,
(v) Modulators of the NFkb pathway, e.g. IKK inhibitors,
(w) Agents that can be classed as mucolytics or anti-tussive,
(x) antibiotics, and
(y) p38 MAP kinase inhibitors

According to the present invention, combination of the nicotinamide derivatives of formula (I) with:

- muscarinic M3 receptor agonists or anticholinergic agents including in particular ipratropium salts, namely bromide, tiotropium salts, namely bromide, oxitropium salts, namely bromide, perenzepine, and telenzepine,
- p38 MAP kinase inhibitors,
- H3 antagonists,
- β2-adrenoceptor agonists including albutarol, salbutamol, formoterol and salmeterol,
- glucocorticosteroids, in particular inhaled glucocorticosteroids with reduced systemic side effects, including prednisone, prednisolone, flunisolide, triamcinolone acetonide, beclomethasone dipropionate, budesonide, fluticasone propionate, and mometasone furoate,
- or adenosine A2a receptor agonists,

are preferred.

It is to be appreciated that all references herein to treatment include curative, palliative and prophylactic treatment. The description which follows concerns the therapeutic applications to which the nicotinamide derivatives of formula (I) may be put.

The nicotinamide derivatives of formula (I) inhibit the PDE4 isozyme and thereby have a wide range of therapeutic applications, as described further below, because of the essential role, which the PDE4 family of isozymes plays in the physiology of all mammals. The enzymatic role performed by the PDE4 isozymes is the intracellular hydrolysis of adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) within pro-inflammatory leukocytes. cAMP, in turn, is responsible for mediating the effects of numerous hormones in the body, and as a consequence, PDE4 inhibition plays a significant role in a variety of physiological processes. There is extensive literature in the art describing the effects of PDE inhibitors on various inflammatory cell responses, which in addition to cAMP increase, include inhibition of superoxide production, degranulation, chemotaxis and tumor necrosis factor (TNF) release in eosinophils, neutrophils and monocytes.

Therefore, a further aspect of the present invention relates to the use of the nicotinamide derivatives of formula (I), their pharmaceutically acceptable salts and/or derived forms, in the treatment of diseases, disorders, and conditions in which the PDE4 isozymes are involved. More specifically, the present invention also concerns the use of the nicotinamide derivatives of formula (I), their pharmaceutically acceptable salts and/or derived forms, in the treatment of diseases, disorders, and conditions selected from the group consisting of:

- asthma of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular asthma that is a member selected from the group consisting of atopic asthma, non-atopic asthma, allergic asthma, atopic bronchial IgE-mediated asthma, bronchial asthma, essential asthma, true asthma, intrinsic asthma caused by pathophysiologic disturbances, extrinsic asthma caused by environmental factors, essential asthma of unknown or inapparent cause, non-atopic asthma, bronchitic asthma, emphysematous asthma, exercise-induced asthma, allergen induced asthma, cold air induced asthma, occupational asthma, infective asthma caused by bacterial, fungal, protozoal, or viral infection, non-allergic asthma, incipient asthma and wheezy infant syndrome,
- chronic or acute bronchoconstriction, chronic bronchitis, small airways obstruction, and emphysema,
- obstructive or inflammatory airways diseases of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular an obstructive or inflammatory airways disease that is a member selected from the group consisting of chronic eosinophilic pneumonia, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), COPD that includes chronic bronchitis, pulmonary emphysema or dyspnea associated therewith, COPD that is characterized by irreversible, progressive airways obstruction, adult respiratory distress syndrome (ARDS) and exacerbation of airways hyperreactivity consequent to other drug therapy
- pneumoconiosis of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular pneumoconiosis that is a member selected from the group consisting of aluminosis or bauxite workers' disease, anthracosis or miners' asthma, asbestosis or steam-fitters' asthma, chalicosis or flint disease, ptilosis caused by inhaling the dust from ostrich feathers, siderosis caused by the inhalation of iron particles, silicosis or grinders' disease, byssinosis or cotton-dust asthma and talc pneumoconiosis;
- bronchitis of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular bronchitis that is a member selected from the group consisting of acute bronchitis, acute laryngotracheal bronchitis, arachidic bronchitis, catarrhal bronchitis, croupus bronchitis, dry bronchitis, infectious asthmatic bronchitis, productive bronchitis, staphylococcus or streptococcal bronchitis and vesicular bronchitis,
- bronchiectasis of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular bronchiectasis that is a member selected from the group consisting of cylindric bronchiectasis, sacculated bronchiectasis, fusiform bronchiectasis, capillary bronchiectasis, cystic bronchiectasis, dry bronchiectasis and follicular bronchiectasis,
- seasonal allergic rhinitis or perennial allergic rhinitis or sinusitis of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular sinusitis that is a member selected from the

group consisting of purulent or nonpurulent sinusitis, acute or chronic sinusitis and ethmoid, frontal, maxillary, or sphenoid sinusitis,

rheumatoid arthritis of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular rheumatoid arthritis that is a member selected from the group consisting of acute arthritis, acute gouty arthritis, chronic inflammatory arthritis, degenerative arthritis, infectious arthritis, Lyme arthritis, proliferative arthritis, psoriatic arthritis and vertebral arthritis,

gout, and fever and pain associated with inflammation,

an eosinophil-related disorder of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular an eosinophil-related disorder that is a member selected from the group consisting of eosinophilia, pulmonary infiltration eosinophilia, Loffler's syndrome, chronic eosinophilic pneumonia, tropical pulmonary eosinophilia, bronchopneumonic aspergillosis, aspergilloma, granulomas containing eosinophils, allergic granulomatous angiitis or Churg-Strauss syndrome, polyarteritis nodosa (PAN) and systemic necrotizing vasculitis,

atopic dermatitis, allergic dermatitis, contact dermatitis, or allergic or atopic eczema,

urticaria of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular urticaria that is a member selected from the group consisting of immune-mediated urticaria, complement-mediated urticaria, urticariogenic material-induced urticaria, physical agent-induced urticaria, stress-induced urticaria, idiopathic urticaria, acute urticaria, chronic urticaria, angioedema, cholinergic urticaria, cold urticaria in the autosomal dominant form or in the acquired form, contact urticaria, giant urticaria and papular urticaria,

conjunctivitis of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular conjunctivitis that is a member selected from the group consisting of actinic conjunctivitis, acute catarrhal conjunctivitis, acute contagious conjunctivitis, allergic conjunctivitis, atopic conjunctivitis, chronic catarrhal conjunctivitis, purulent conjunctivitis and vernal conjunctivitis,

uveitis of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular uveitis that is a member selected from the group consisting of inflammation of all or part of the uvea, anterior uveitis, iritis, cyclitis, iridocyclitis, granulomatous uveitis, nongranulomatous uveitis, phacoantigenic uveitis, posterior uveitis, choroiditis; and chorioretinitis,

multiple sclerosis of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular multiple sclerosis that is a member selected from the group consisting of primary progressive multiple sclerosis and relapsing remitting multiple sclerosis,

autoimmune/inflammatory diseases of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular an autoimmune/inflammatory disease that is a member selected from the group consisting of autoimmune hematological disorders, hemolytic anemia, aplastic anemia, pure red cell anemia, idiopathic thrombocytopenic purpura, systemic lupus erythematosus, polychondritis, scleroderma, Wegner's granulomatosis, dermatomyositis, chronic active hepatitis, myasthenia gravis, Stevens-Johnson syndrome, idiopathic sprue, autoimmune inflammatory bowel diseases, ulcerative colitis, endocrin opthamopathy, Grave's disease, sarcoidosis, alveolitis, chronic hypersensitivity pneumonitis, primary biliary cirrhosis, juvenile diabetes or diabetes mellitus type I, keratoconjunctivitis sicca, epidemic keratoconjunctivitis, diffuse interstitial pulmonary fibrosis or interstitial lung fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis, cystic fibrosis, glomerulonephritis with and without nephrotic syndrome, acute glomerulonephritis, idiopathic nephrotic syndrome, minimal change nephropathy, inflammatory/hyperproliferative skin diseases, benign familial pemphigus, pemphigus erythematosus, pemphigus foliaceus, and pemphigus vulgaris,

prevention of allogeneic graft rejection following organ transplantation,

inflammatory bowel disease (IBD) of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular inflammatory bowel disease that is a member selected from the group consisting of collagenous colitis, colitis polyposa, transmural colitis, ulcerative colitis and Crohn's disease (CD),

septic shock of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular septic shock that is a member selected from the group consisting of renal failure, acute renal failure, cachexia, malarial cachexia, hypophysial cachexia, uremic cachexia, cardiac cachexia, cachexia suprarenalis or Addison's disease, cancerous cachexia and cachexia as a consequence of infection by the human immunodeficiency virus (HIV),

liver injury,

pulmonary hypertension of whatever type, etiology or pathogenesis including primary pulmonary hypertension/essential hypertension, pulmonary hypertension secondary to congestive heart failure, pulmonary hypertension secondary to chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary venous hypertension, pulmonary arterial hypertension and hypoxia-induced pulmonary hypertension,

bone loss diseases, primary osteoporosis and secondary osteoporosis,

central nervous system disorders of whatever type, etiology, or pathogenesis, in particular a central nervous system disorder that is a member selected from the group consisting of depression, Alzheimers disease, Parkinson's disease, learning and memory impairment, tardive dyskinesia, drug dependence, arteriosclerotic dementia and dementias that accompany Huntington's chorea, Wilson's disease, paralysis agitans, and thalamic atrophies,

infection, especially infection by viruses wherein such viruses increase the production of TNF-α in their host, or wherein such viruses are sensitive to upregulation of TNF-α in their host so that their replication or other vital activities are adversely impacted, including a virus which is a member selected from the group consisting of HIV-1, HIV-2, and HIV-3, cytomegalovirus (CMV), influenza, adenoviruses and Herpes viruses including Herpes Zoster and Herpes Simplex,

yeast and fungus infections wherein said yeast and fungi are sensitive to upregulation by TNF-α or elicit TNF-α production in their host, e.g., fungal meningitis, particularly when administered in conjunction with other drugs of choice for the treatment of systemic yeast and fungus infections, including but are not limited to, polymixins, e.g. Polymycin B, imidazoles, e.g. clotrimazole, econazole, miconazole, and ketoconazole, triazoles, e.g. fluconazole and itranazole as well as amphotericins, e.g. Amphotericin B and liposomal Amphotericin B,

ischemia-reperfusion injury, ischemic heart disease, autoimmune diabetes, retinal autoimmunity, chronic lymphocytic leukemia, HIV infections, lupus erythe-

matosus, kidney and ureter disease, urogenital and gastrointestinal disorders and prostate diseases,

scar formation in the human or animal body, such as scar formation in the healing of acute wounds, and

psoriasis, other dermatological and cosmetic uses, including antiphlogistic, skin-softening, skin elasticity and moisture-increasing activities.

According to one aspect the present invention relates in particular to the treatment of a respiratory disease, such as adult respiratory distress syndrome (ARDS), bronchitis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cystic fibrosis, asthma, emphysema, bronchiectasis, sinusitis and rhinitis.

According to another aspect the present invention relates in particular to the treatment of gastrointestinal (GI) disorders, in particular inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn's disease, ileitis, collagenous colitis, colitis polyposa, transmural colitis and ulcerative colitis.

According to a further aspect the present invention relates also to the reduction of scars formation.

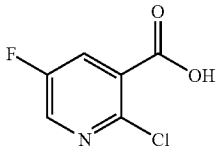
A still further aspect of the present invention also relates to the use of the nicotinamide derivatives of formula (I), their pharmaceutically acceptable salts and/or derived forms, for the manufacture of a drug having a PDE4 inhibitory activity. In particular, the present inventions concerns the use of the nicotinamide derivatives of formula (I), their pharmaceutically acceptable salts and/or derived forms, for the manufacture of a drug for the treatment of inflammatory, respiratory, allergic and scar-forming diseases, disorders, and conditions, and more precisely for the treatment of diseases, disorders, and conditions that are listed above.

As a consequence, the present invention provides a particularly interesting method of treatment of a mammal, including a human being, with a PDE4 inhibitor including treating said mammal with an effective amount of a nicotinamide derivative of formula (I), its pharmaceutically acceptable salts and/or derived forms. More precisely, the present invention provides a particularly interesting method of treatment of a mammal, including a human being, to treat an inflammatory, respiratory, allergic and scar-forming disease, disorder or condition, including treating said mammal with an effective amount of a nicotinamide derivative of formula (I), its pharmaceutically acceptable salts and/or derived forms.

The following examples illustrate the preparation of the compounds of the formula (I):

PREPARATION 1

2-Chloro-5-fluoro nicotinic acid



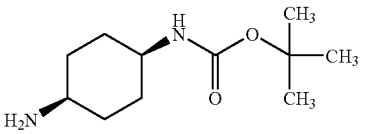
Ethyl-2-chloro-5-fluoro-nicotinoate (50.4 g, 0.247 mol) (J. Med. Chem., 1993, 36(18), 2676–88) was dissolved in tetrahydrofuran (350 mL) and a 2M aqueous solution of lithium hydroxide (247 mL, 0.495 mol) added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 days. The pH of the solution was reduced to pH1 by addition of 6M hydrochloric acid and then extracted with dichloromethane (×3). The combined extracts were dried over magnesium sulphate and the solvent concentrated in vacuo to give a solid which was triturated with diethyl ether and then dried to give the title compound as a white solid, 40.56 g.

^{1}H NMR (DMSO-D_6, 400 MHz): δ: 8.20 (s, 1H), 8.62 (s, 1H)

MS ES+m/z 174 $[MH]^+$

PREPARATION 2

Syn-tert-Butyl4-aminocyclohexylcarbamate



5% Palladium on charcoal (5 g) was mixed with toluene (10 mL) and was added to syn-(4-azido-cyclohexyl)-carbamic acid tert-butyl ester (170 g, 0.71 mol) (WO 99/54284, pg 80, prep 77(1)) in methanol (400 mL). The mixture was hydrogenated (80 atmospheres) at room temperature for 18 hours and then filtered. The solvent was evaporated in-vacuo and the residue was triturated with ethyl acetate (50 mL) and then with hexane (200 mL). The solid obtained was isolated by filtration, dissolved in ethyl acetate (600 mL) and filtered through Celite®. The filtrate was concentrated in-vacuo to give a slush that was diluted with hexane (300 mL). The solid obtained was isolated by filtration and was washed with ethyl acetate in hexane (20:80). The mother liquors were combined and evaporated in-vacuo, the residue was purified by chromatography on silica gel using ethyl acetate and then methanol as eluant. The material obtained was crystallised from ethyl acetate and hexane and combined with the first crop to give the title compound as a white solid, 76.0 g.

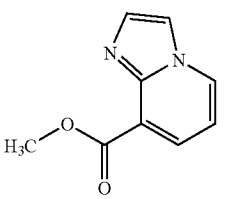
Mpt 88–90° C.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ: 1.41 (s, 9H), 1.52–1.77 (m, 8H), 1.82 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 2.61 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 4.59 (m, 1H),

MS ES+m/z 215 $[MH]^+$

PREPARATION 3

Methyl imidazo[1,2-a]pyridine-8-carboxylate



A mixture of methyl 2-aminonicotinate (WO 89/01488 pg33, prep 17) (1 g, 6.56 mmol), and chloroacetaldehyde (1.05 mL, 6.56 mmol) in ethanol (5 mL) was heated under reflux for 18 hours. The cooled mixture was diluted with

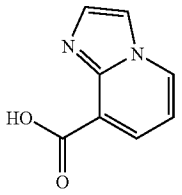
water (10 mL), 0.88 ammonia (1 mL) added and the solution concentrated in vacuo. The residue was dissolved in methanol and the dark solution treated with charcoal, the mixture filtered and the filtrate concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel using dichloromethane:methanol:0.88 ammonia (97:2.5:0.5) as eluant, and the product triturated with ether, to afford the title compound, 768 mg.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz): δ: 4.02 (s, 3H), 6.83 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 8.00 (d, 1H), 8.31 (d, 1H).

MS TSP+m/z 177.2 [MH^+]

PREPARATION 4

Imidazo[1,2-a]pyridine-8-carboxylic acid



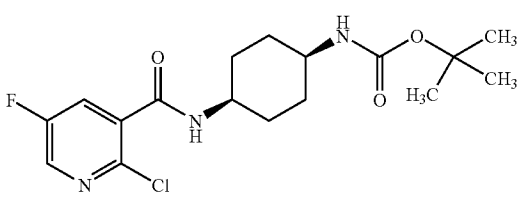
Lithium hydroxide solution (2.5 ml, 1M in water) was added to a solution of the ester from preparation 3 (400 mg, 2.27 mmol) in methanol (5 ml) and the solution stirred at room temperature for 90 minutes. The solution was concentrated in vacuo to remove the methanol, the aqueous solution acidified using 2M hydrochloric acid, and the mixture evaporated under reduced pressure to give the title compound as a yellow solid.

^{1}H NMR (DMSO-D_6, 400 MHz): δ: 7.60 (dd, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.41 (d, 1H), 8.55 (s, 1H), 9.18 (d, 1H)

MS TSP+m/z 163 [$MH]^+$

PREPARATION 5

Syn-{4-[(2-chloro-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl)-amino]-cyclohexyl}-carbamic acid tert-butyl ester



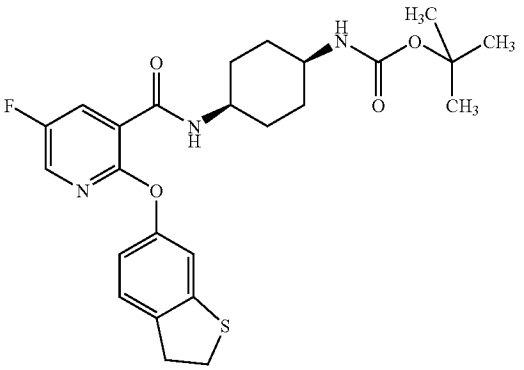
A solution of the acid of preparation 1 (8.75 g, 49 mmol) and N,N-dimethylformamide (5 drops) in dichloromethane (200 mL) was cooled to 0° C. and treated with oxalyl chloride (10.4 mL, 119 mmol) over 10 minutes. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 hours. The reaction mixture was concentrated in vacuo and the residue azeotroped with dichloromethane (2×). The product was taken up in dichloromethane (200 mL) and the solution treated with N-ethyldiisopropylamine (17.1 mL, 98 mmol) and the amine of preparation 2 (11.55 g, 54 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 hours and then washed with 10% citric acid solution (2×) and saturated sodium hydrogencarbonate solution (2×). The mixture then was dried over magnesium sulphate and concentrated in vacuo to yield the title product as a yellow solid, 18.02 g.

^{1}H NMR(DMSO-D_6, 400 MHz): δ: 1.21 (m, 2H), 1.32 (s, 9H), 1.51 (m, 2H), 1.73–1.88 (m, 4H), 2.63 (m, 1H), 2.83 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 6.63 (m, 1H), 7.86 (m, 1H), 8.44 (m, 1H)

MS ES−m/z 370 [$M-H]^-$

PREPARATION 5

Syn-(4-{[2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-carbamic acid tert-butyl ester



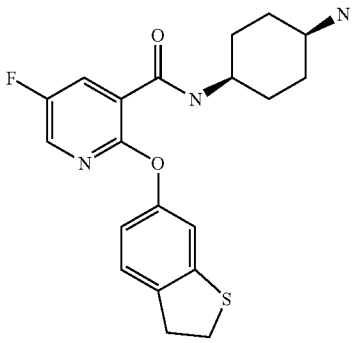
The chloro compound of preparation 5 (600 mg, 1.62 mmol), 2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-ol (WO 02/18333, pg. 67, preparation 7) (245 mg, 1.62 mmol) and caesium carbonate (526 mg, 1.62 mmol) were dissolved in acetonitrile (20 mL) and the reaction mixture heated to reflux for 18 hours. The reaction mixture was concentrated in vacuo and the residue partitioned between ethyl acetate (40 mL) and water (30 mL). The organic layer was washed with brine (20 mL), dried over magnesium sulphate and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel eluting with pentane:ethyl acetate 75:25. The crude product was triturated with ethyl acetate to yield the title product as a white solid, 589 mg.

^{1}H NMR($CDCl_3$, 400 MHz): δ: 1.45 (m, 11H), 1.70 (m, 2H), 1.80 (m, 4H), 3.35 (t, 2H), 3.45 (t, 2H), 3.60 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 6.65 (m, 1H), 7.00 (s, 1H), 7.25 (d, 1H), 8.00 (m, 1H), 8.05 (d, 1H), 8.35 (m, 1H)

MS ES+m/z 510 [$MNa]^+$

PREPARATION 7

Syn-N-(4-amino-cyclohexyl)-2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-nicotinamide



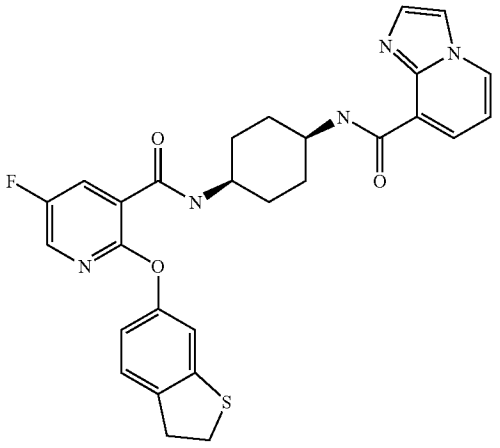
The protected product of preparation 6 (580 mg, 1.19 mmol) was dissolved in dichloromethane (4 mL) and the solution treated with trifluoroacetic acid (2 mL). The reaction mixture was then stirred at room temperature for 4 hours. The reaction mixture was diluted with toluene (5 mL) and concentrated in vacuo. The residue was partitioned between saturated sodium hydrogencarbonate solution (10 mL) and ethyl acetate (60 mL) and the organic layer washed with brine, dried over magnesium sulphate and concentrated in vacuo to yield the title product as a white solid, 500 mg.

^{1}H NMR($CDCl_3$, 400 MHz): δ: 1.40 (m, 2H), 1.65–1.90 (m, 6H), 2.95 (m, 1H), 3.30 (t, 2H), 3.40 (t, 2H), 4.15 (m, 1H), 6.75 (m, 1H), 7.00 (s, 1H), 7.20 (d, 1H), 8.05 (m, 2H), 8.30 (m, 1H)

MS ES+m/z 388 $[MH]^+$

EXAMPLE 1

Syn-imidazo[1,2-a]pyridine-8-carboxylic acid (4-{[2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-amide



The amine of preparation 7 (150 mg, 0.39 mmol), the carboxylic acid of preparation 4 (87 mg, 0.43 mmol), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (58 mg, 0.43 mmol), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (82 mg, 0.43 mmol) and 4-methylmorpholine (47 μL, 0.43 mmol) were dissolved in dichloromethane (20 mL) and the reaction mixture stirred at room temperature for 18 hours. The reaction mixture was concentrated in vacuo and the residue dissolved in N,N-dimethylformamide (10 mL) and stirred at room temperature for 18 hours. The reaction mixture was concentrated in vacuo, the residue partitioned between ethyl acetate (50 mL) and water (30 mL) and the organic layer washed with brine, dried over magnesium sulphate and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel eluting with pentane:ethyl acetate 85:15 to 0:100. The crude product was purified by column chromatography on silica gel again, eluting with ethyl acetate to yield the title product as a white solid, 130 mg (63%).

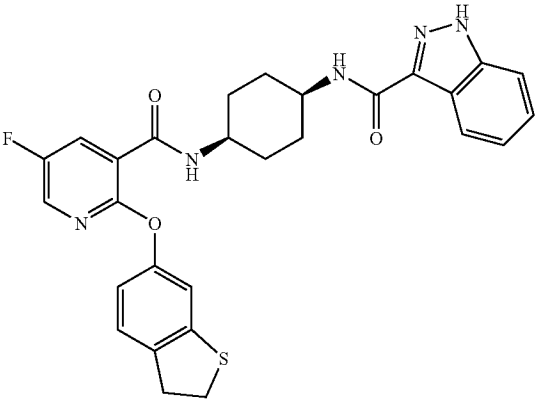
^{1}H NMR($CDCl_3$, 400 MHz): δ: 1.90 (m, 8H), 3.30 (t, 2H), 3.40 (t, 2H), 4.20 (m, 1H), 4.30 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 7.00 (t, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.20 (d, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 8.05 (m, 2H), 8.25 (m, 2H), 8.35 (m, 1H), 10.50 (m, 1H)

MS ES+m/z 554 $[MNa]^+$

Microanalysis: Observed—C=61.99%, H=4.90%, N=12.86% $C_{28}H_{26}FN_5O_3S$ Calculated—C=62.00%, H=5.05%, N=12.91%

EXAMPLE 2

Syn-1H-indazole-3-carboxylic acid (4-{[2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-amide



The title compound was prepared by a method similar to that described for example 1 using indazole-3-carboxylic acid in 73% yield.

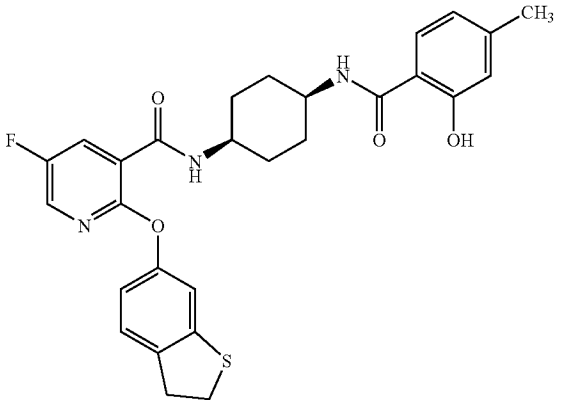
^{1}H NMR($CDCl_3$, 400 MHz): δ: 1.61–1.97(m, 10H), 2.98 (m, 2H), 3.20 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.97 (m, 1H), 7.14 (m, 2H), 7.23 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.46 (m, 1H), 8.34 (d, 2H)

MS ES+m/z 554 $[MNa]^+$

Microanalysis: Observed—C=61.27%, H=5.26%, N=13.17% $C_{28}H_{26}FN_5O_3S$ Calculated—C=61.38%, H=4.83%, N=12.67%

EXAMPLE 3

Syn-2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-[4-(2-hydroxy-4-methyl-benzoylamino)-cyclohexyl]-nicotinamide



The amine of preparation 7 (150 mg, 0.39 mmol), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (58 mg, 0.43 mmol), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (82 mg, 0.43 mmol) and 4-methylmorpholine (47 μL, 0.43 mmol) were dissolved in dichloromethane (5 mL) and the solution treated with 2-hydroxy-4-methyl-benzoic acid (65 mg, 0.43 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 hours. The reaction mixture was partitioned between dichloromethane (40 mL) and water (20 mL) and the organic layer dried over magnesium sulphate and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in tetrahydrofuran (5 mL), treated with 1M sodium hydroxide solution (5 mL) and stirred for 2 hours at 50° C. The reaction mixture was concentrated in vacuo and the residue taken up in ethyl acetate (50 mL) and treated with 2M hydrochloric acid (5 mL). The organic layer was washed with brine (20 mL), dried over magnesium sulphate and concentrated in vacuo. The residue was triturated with ethyl acetate to yield the title product as a white solid, 159 mg.

^{1}H NMR($CDCl_3$, 400 MHz): δ: 1.60 (m, 2H), 1.85 (m, 4H), 1.95 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 3.30 (t, 2H), 3.45 (t, 2H), 4.05 (m, 1H), 4.25 (m, 1H), 5.95 (m, 1H), 6.65 (d, 1H), 6.80 (m, 2H), 7.05 (s, 1H), 7.10 (d, 1H), 7.25 (d, 1H), 8.05 (m, 2H), 8.35 (m, 1H)

MS ES+m/z 544 $[MNa]^+$

Microanalysis: Observed—C=63.75%, H=5.49%, N=7.72% $C_{28}H_{28}FN_3O_4S$ Calculated—C=63.72%, H=5.57%, N=7.74%

In Vitro Activity of the Compounds of Formula (I)

The PDE4 inhibitory activity of the nicotinamide derivatives of the formula (I) is determined by the ability of compounds to inhibit the hydrolysis of cAMP to AMP by PDE4 (Thompson J W, Teraski W L, Epstein P M, Strada S J., "Assay of nucleotidephosphodiesterase and resolution of multiple molecular forms of the isoenzyme", *Advances in cyclic nucleotides research*, edited by Brooker G, Greengard P, Robinson G A. Raven Press, New York 1979, 10, p. 69–92). Tritium labelled cAMP is incubated with PDE4. Following incubation, the radiolabelled AMP produced is able to bind yttrium silicate SPA beads. These SPA beads subsequently produce light that can be quantified by scintillation counting. The addition of a PDE4 inhibitor prevents the formation of AMP from cAMP and counts are diminished. The IC_{50} of a PDE4 inhibitor can be defined as the concentration of a compound that leads to a 50% reduction in counts compared to the PDE4 only (no inhibitor) control wells.

The anti-inflammatory properties of the nicotinamide derivatives of the formula (I) are demonstrated by their ability to inhibit TNFα release from human peripheral blood mononuclear cells (see also Yoshimura T, Kurita C, Nagao T, Usami E, Nakao T, Watanabe S, Kobayashi J, Yamazaki F, Tanaka H, Nagai H., "Effects of cAMP-phosphodiesterase isozyme inhibitor on cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells", *Gen. Pharmacol.*, 1997, 29(4), p. 63). Venous blood is collected from healthy volunteers and the mononuclear cells purified by centrifugation through Histopaque (Ficoll) cushions. TNFα production from these cells is stimulated by addition of lipopolysaccharide. After 18 hours incubation in the presence of LPS, the cell supernatant is removed and the concentration of TNFα in the supernatant determined by ELISA. Addition of PDE4 inhibitors reduces the amount of TNFα produced. An IC_{50} is determined which is equal to the concentration of compound that gives 50% inhibition of TNFα production as compared to the LPS stimulated control wells.

All the examples were tested in the assay described above and found to have an IC_{50} (TNFα screen) of less than 300 nM. And for most of the tested compounds, they were found to have an IC_{50} (TNFα screen) of even less than 100 nM.

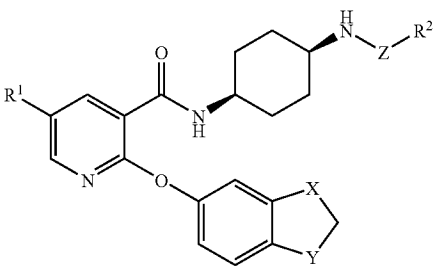
For illustrating purpose, the following table indicates the exact IC_{50} (TNFα screen) of some representative examples of the present invention:

Example N°	IC_{50} (nM)
1	0.6
3	0.8

What is claimed is:

1. A compound of formula (I):

(I)



or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:

R^1 is H, halo or (C_1–C_4) alkyl;

X is S and Y is —CH_2—;

Z is CO or SO_2;

R^2 is selected from the group consisting of pyrazolyl, indazolyl, imidazolyl, and benzimidazolyl, each of which may be optionally substituted by one to three moieties independently selected from the group consisting of methyl, $N(CH_3)SO_2CH_3$, $NHSO_2CH(CH_3)_2$, hydroxyl, hydroxymothyl, chioro, fluoro, ethyl, isopro-

pyl, methoxy, OC_2H_4OH, C_2H_4OH, $O(CH_2)_3OH$, trifluoromethyl, ethoxy, cyclopropylmethoxy and cyclopentyloxy; and

R^3 and R^4 are each independently H, $(C_1–C_4)$alkyl or $SO_2(C_1–C_4$alkyl).

2. A compound of claim **1**, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein R^1 is H, halo, CH_3 or C_2H_5.

3. A compound of claim **2**, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein R^1 is H, F, Cl or CH_3.

4. A compound of claim **3**, or a pharmaceutically acceptable salt thereof wherein R^1 is F.

5. A compound of claim **1** wherein R^2 is indazolyl which may be optionally substituted by one to three moieties independently selected from the group consisting of methyl, $N(CH_3)SO_2CH_3$, $NHSO_2CH(CH_3)_2$, hydroxyl, hydroxymethyl, chloro, fluoro, ethyl, isopropyl, methoxy, OC_2H_4OH, C_2H_4OH, $O(CH_2)_3OH$, trifluoromethyl, ethoxy, cyclopropylmethoxy and cyclopentyloxy.

6. A compound of claim **5**, or a pharmaceutically acceptable salt thereof wherein R^2 is indazolyl which may be optionally substituted by one to three moieties independently selected from the group consisting of methyl and hydroxyl.

7. A compound of claim **6**, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein R^2 is indazol-3-yl.

8. A compound of claim **1** or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein Z is CO.

9. A compound of claim **1**, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:

X is S and Y is $—CH_2—$;

R^1 is H, halo, CH_3 or C_2H_5;

R^2 is selected from the group consisting of imidazolyl, indazolyl, pyrazolyl, and benzimidazolyl, each of which may be optionally substituted by one to three moieties independently selected from the group consisting of methyl, $N(CH_3)SO_2CH_3$, $NHSO_2CH(CH_3)_2$, hydroxyl, hydroxymethyl, chloro, fluoro, ethyl, isopropyl, methoxy, OC_2H_4OH, C_2H_4OH, $O(CH_2)_3OH$, trifluoromethyl, ethoxy, cyclopropylmethoxy and cyclopentyloxy; and

Z is CO.

10. A compound of claim **1**, or a pharmaceutically acceptable salt thereof wherein:

X is S and Y is $—CH_2—$;

R_2 is phenyl or indazolyl, each of which may be optionally substituted with one to three moieties independently selected from the group consisting of methyl and hydroxyl; and

Z is CO.

11. A compound of claim **1**, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:

X is S and Y is $—CH_2—$;

R^1 is F;

R^2 is indazol-3-yl;

and Z is CO.

12. A compound selected from the group consisting of

Syn-1H-indazole-3-carboxylic acid (4-{[2-(2,3-dihydrobenzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl]amino}-cyclohexyl)-amide;

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-N-(4-{[5-ethyl-1-(2-hydroxy-ethyl)-1H-pyrazole-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-5-fluoro-nicotinamide;

Syn-2-(2,3-Dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-N-(4-{[1-(2-hydroxy-ethyl)-5-isopropyl-1H-pyrazole-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-nicotinamide; and

Syn-1-(2-Hydroxy-ethyl)-1H-indazole-3-carboxylic acid (4-{[2-(2,3-dihydrobenzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl]-amino}cyclohexyl)-amide;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

13. Syn-1H-indazole-3-carboxylic acid (4-{[2-(2,3-dihydro-benzo[b]thiophen-6-yloxy)-5-fluoro-pyridine-3-carbonyl]-amino}-cyclohexyl)-amide

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

14. A pharmaceutical composition comprising a compound of claim **1** or a pharmaceutically acceptable salt thereof and a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier.

* * * * *

US 20030195150A1

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2003/0195150 A1**

Reynolds et al. (43) **Pub. Date: Oct. 16, 2003**

(54) **ANTIMICROBIAL PEPTIDES**

(76) Inventors: **Eric Charles Reynolds**, North Balwyn (AU); **Stuart Geoffrey Dashper**, Hawthorn (AU); **Neil Martin O'Brien-Simpson**, Brunswick (AU); **Gert Hoy Talbo**, Viewbank (AU); **Marina Malkoski**, Nunawading (AU)

Correspondence Address:
BOZICEVIC, FIELD & FRANCIS LLP
200 MIDDLEFIELD RD
SUITE 200
MENLO PARK, CA 94025 (US)

(21) Appl. No.: **10/280,833**

(22) Filed: **Oct. 24, 2002**

Related U.S. Application Data

(63) Continuation of application No. 09/554,997, filed on Aug. 9, 2000, now abandoned, filed as 371 of international application No. PCT/AU98/00972, filed on Nov. 24, 1998.

(30) **Foreign Application Priority Data**

Nov. 24, 1997 (AU) ..... PP 0514

Publication Classification

(51) **Int. Cl.**[7] **A61K 38/17**; C07K 14/00

(52) **U.S. Cl.** **514/12**; 530/324

(57) **ABSTRACT**

The present invention provides antimicrobial peptides. The peptides are non-glycosylated, less than about 100 amino acids in length, and include an amino acid sequence selected from: AVESTVATLEAΣPEVIESPPE (SEQ ID NO:3), AVESTVATLEDΣPEVIESPPE (SEQ ID NO:4), AVESTVATLEASPEVIESPPE (SEQ ID NO:5), AVESTVATLEDSPEVIESPPE (SEQ ID NO:6), DMPIQAFLLYQQPVLGPVR (SEQ ID NO:7), and conservative substitutions therein. These peptides can be produced synthetically; however, they can most conveniently be derived from casein.

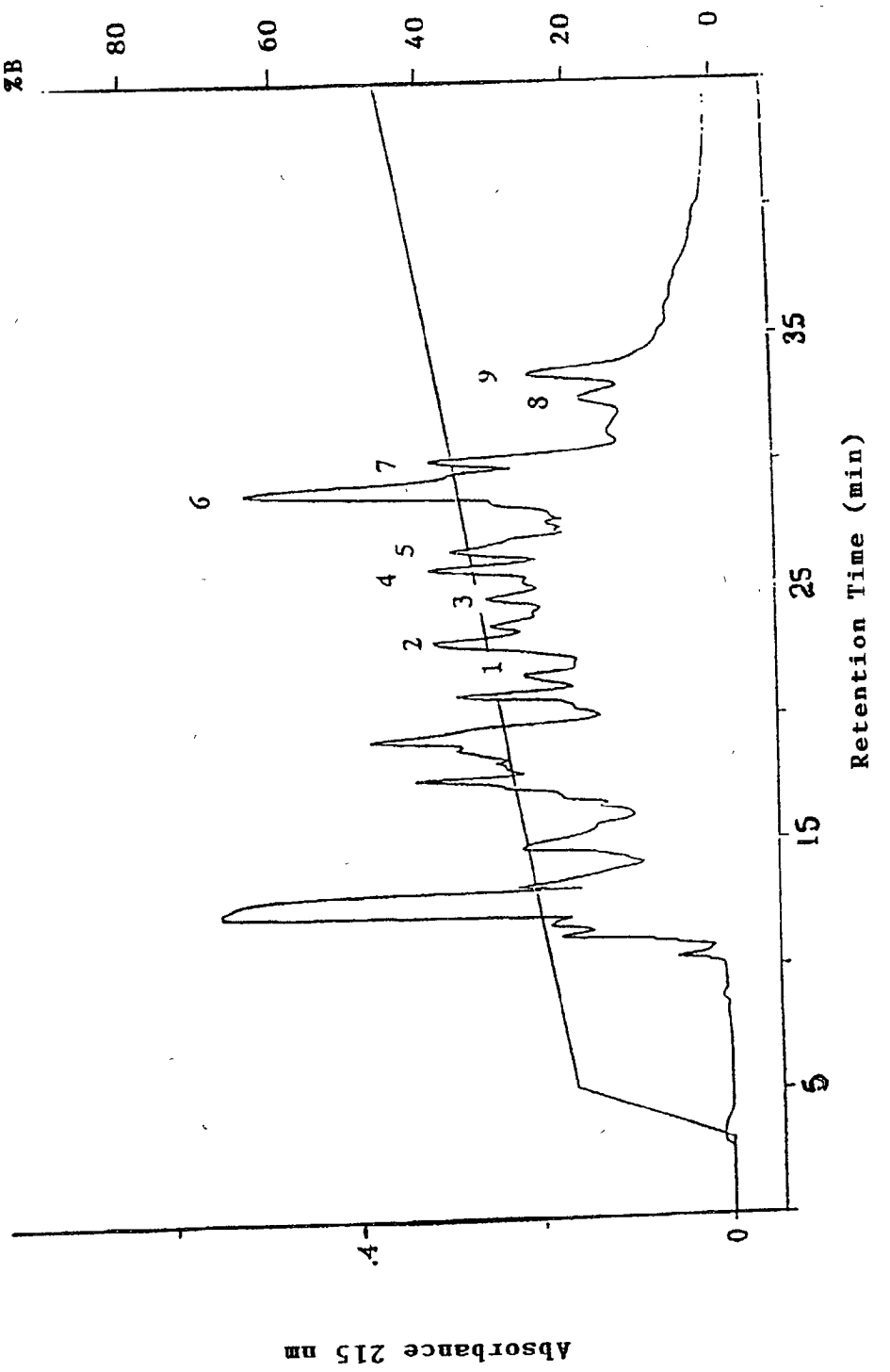

%B
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
35
25
15
5
Retention Time (min)
.4
0
Absorbance 215 nm

Figure 1

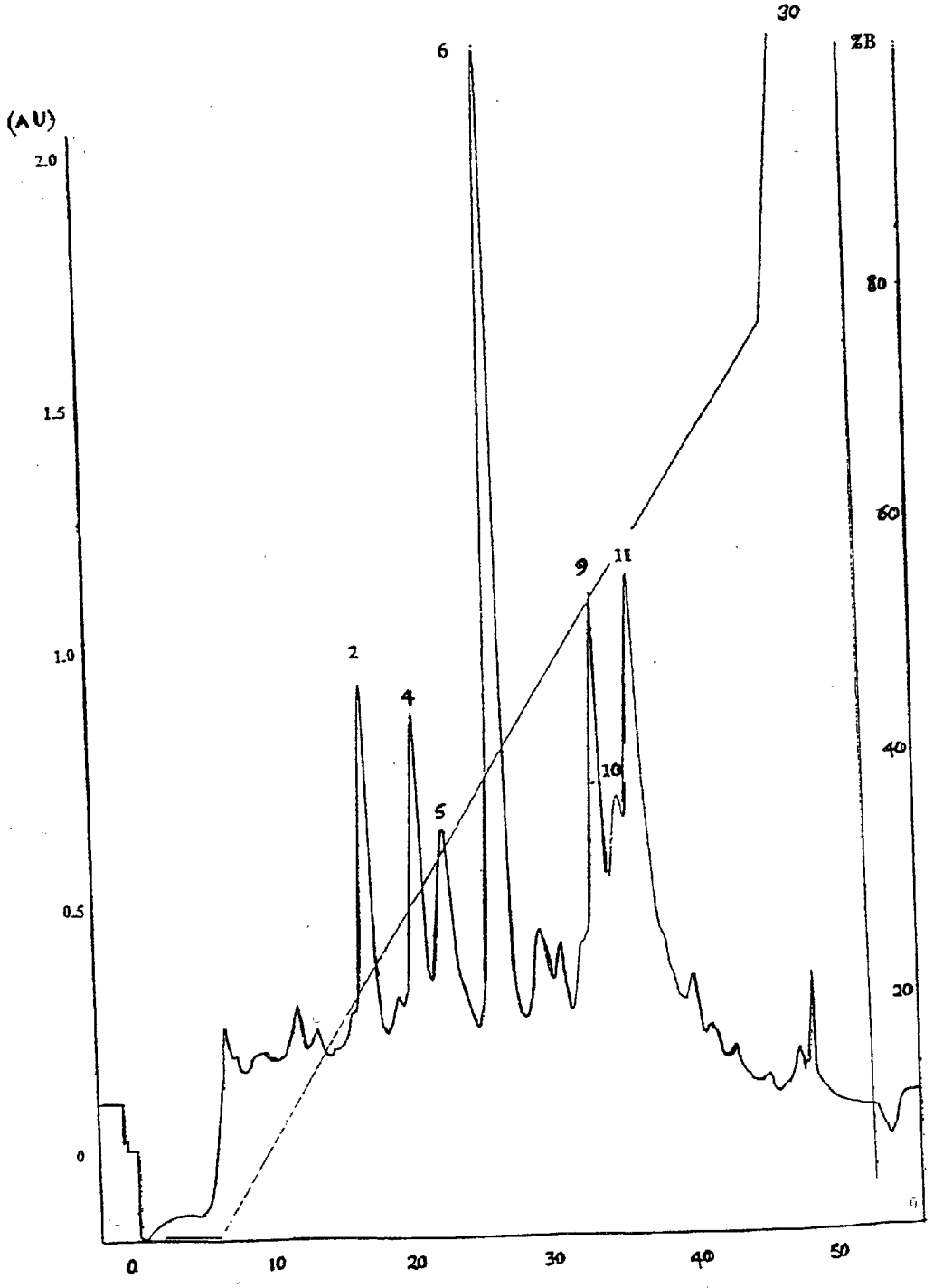


FIGURE 2

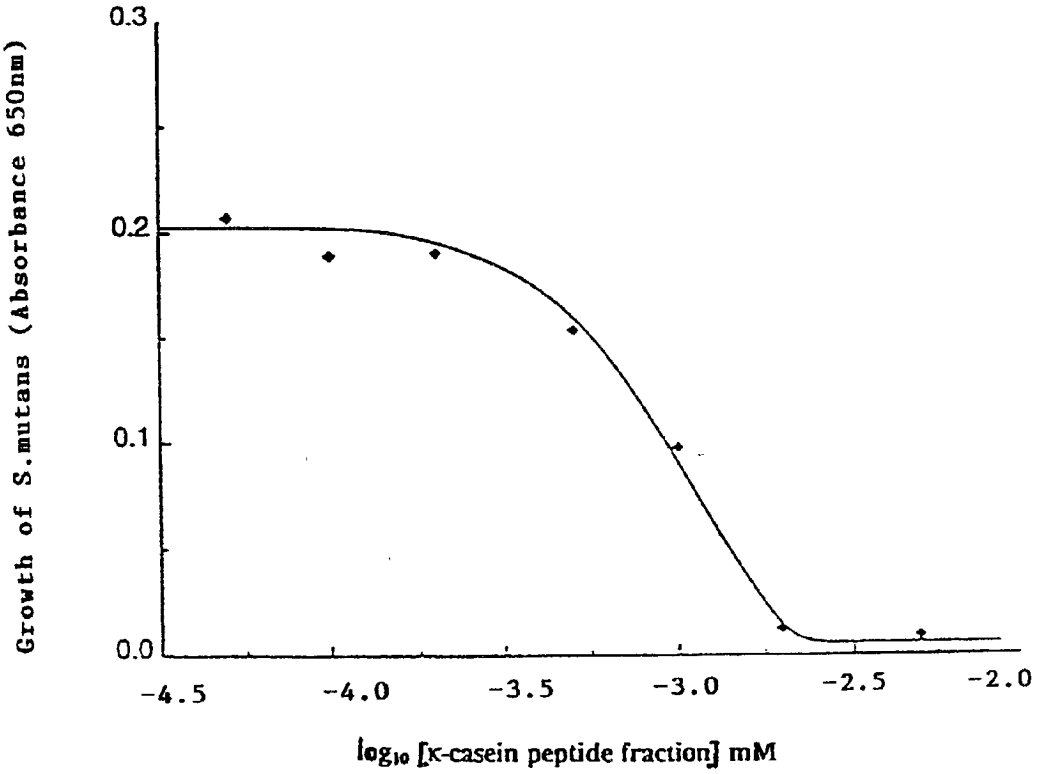

Growth of S.mutans (Absorbance 650nm)
0.3
0.2
0.1
0.0
-4.5
-4.0
-3.5
-3.0
-2.5
-2.0
log10 [κ-casein peptide fraction] mM

Figure 3

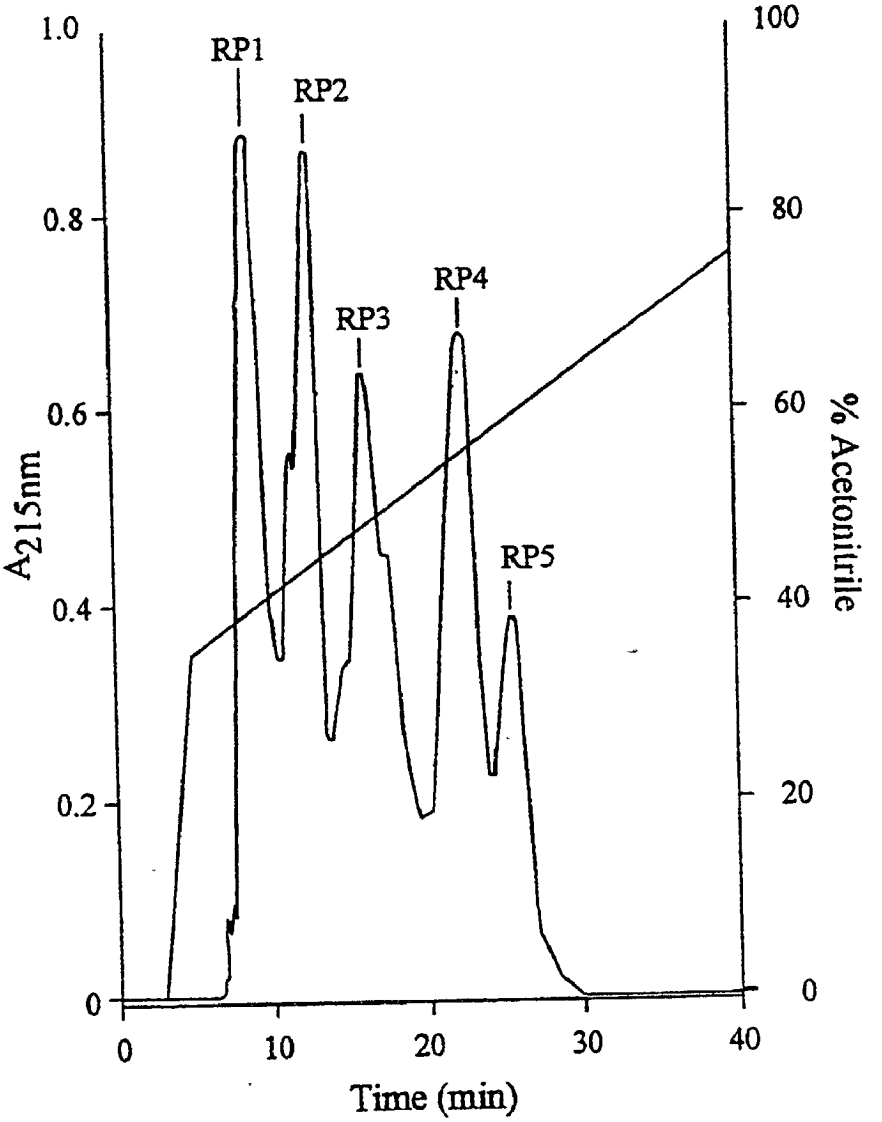

RP1
RP2
RP3
RP4
RP5
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
A215nm
100
80
60
40
20
0
% Acetonitrile
0
10
20
30
40
Time (min)

Figure 4

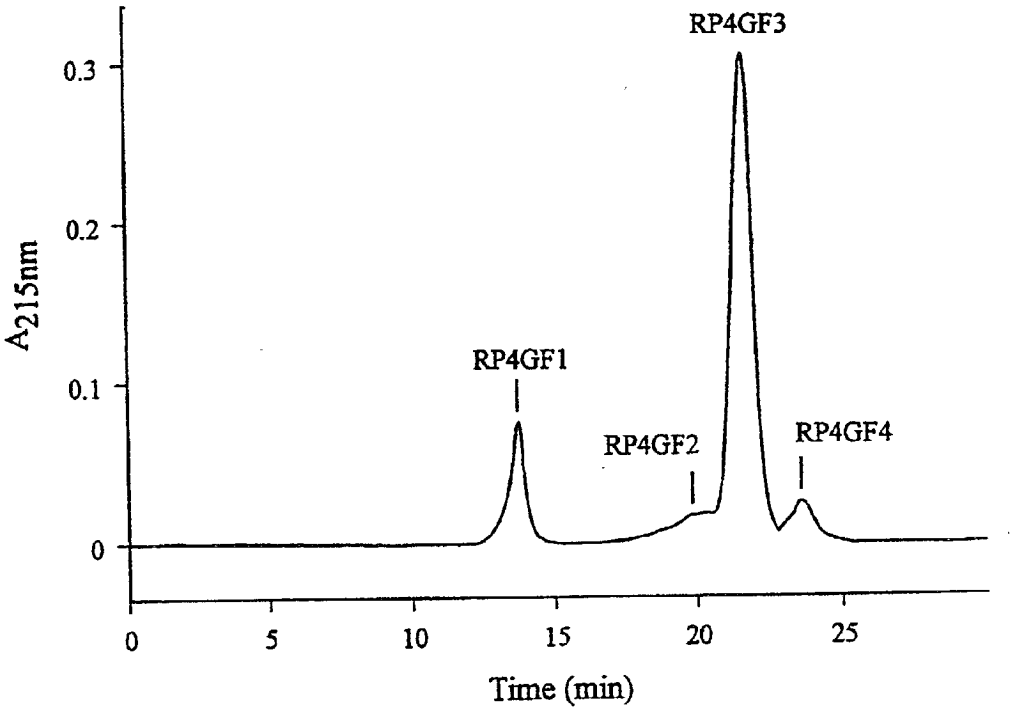

RP4GF3
0.3
0.2
A_{215nm}
RP4GF1
0.1
RP4GF2
RP4GF4
0
0
5
10
15
20
25
Time (min)

Figure 5

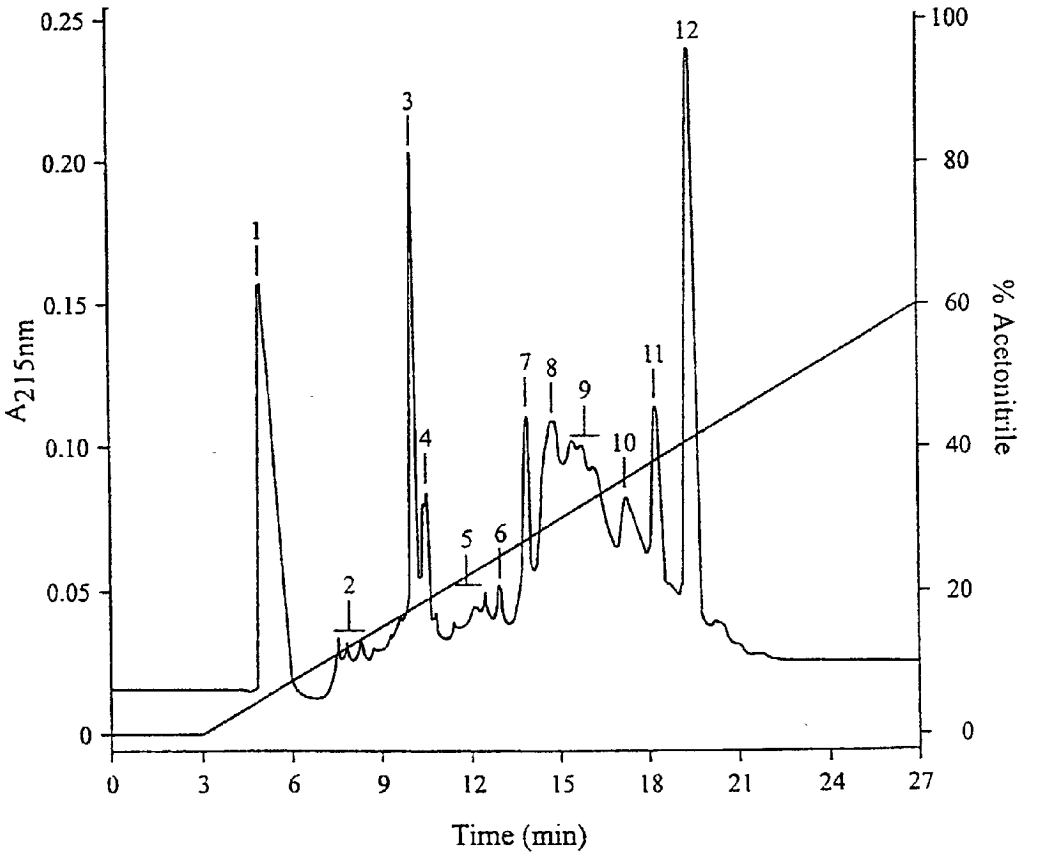

0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
A215nm
100
80
60
40
20
0
% Acetonitrile
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
Time (min)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Figure 6

ANTIMICROBIAL PEPTIDES

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention relates to novel antimicrobial peptides which can be obtained from the milk protein casein or chemically synthesised or produced by recombinant DNA technology. These peptides can be used in foods as antimicrobial preservatives, in oral care products (eg. toothpaste, mouthwash, dental floss) for the control of dental plaque and suppression of pathogens associated with dental caries and periodontal diseases. The antimicrobial peptides may also be used in pharmaceutical preparations for topical or parenteral application or oral administration for the control of oro-pharangeal and gastrointestinal pathogens as well as systemic or localised infections.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Periodontal diseases are bacterial-associated inflammatory diseases of the supporting tissues of the teeth and are a major public health problem. Nearly all of the human population is affected by periodontal diseases to some degree. In a recent Melbourne survey (Spencer et al., 1985) only 20% of the adult dentate sample did not require periodontal treatment while 62% required intermediate treatment and 18% required complex treatment. Brown et al. (1989), from an extensive US Dental Health survey reported that only 15% of the studied population was free of periodontal diseases. The major form of periodontal disease is gingivitis which is associated with the non-specific accumulation of dental plaque at the gingival margin. In contrast, the less prevalent, destructive form of periodontal disease (periodontitis) is associated with a subgingival infection of specific Gram-negative bacteria. Periodontitis is a major cause of tooth loss in Australian adults.

[0003] Although gingivitis may not be a necessary precondition for the development of periodontitis (Christersson et al., 1989) gingivitis is likely to predispose susceptible sites to more serious forms of periodontal disease since the specific Gram-negative bacteria that predominate in periodontitis, but which are not detectable in the healthy periodontium, have been found in low proportions in gingivitis (Moore et al., 1987). Further, the environmental conditions that develop during gingivitis are likely to favour the subsequent colonisation or growth of the species implicated in periodontitis. The control of supragingival plaque is therefore considered an important part of a preventive strategy for the control of periodontal diseases and in fact various plaque control programs have proven to be successful in the prevention of periodontal diseases (Loesche, 1976). In the majority of individuals the customary oral hygiene method of toothbrushing is usually insufficient by itself over long periods to provide a level of plaque control compatible with oral health. Consequently the incorporation of antimicrobial agents into dental products as an aid to controlling dental plaque and gingivitis has been advocated (Addy, 1988; Marsh, 1991) and is of considerable interest to toothpaste and mouthwash companies. A number of agents have been suggested as antiplaque toothpaste additives (eg. bisbiguanides, phenols, metal ions, quartenary ammonium salts) but have either negligible intra-oral activity, undesirable side-effects (eg. mucosal irritation, tooth discolouration) and/or an incompatibility with toothpaste formulations. Triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxy diphenyl ether) an antimicrobial agent used extensively in deodorants, soaps and other dermatological preparations is currently being used as an antiplaque toothpaste additive in some countries however there is considerable interest to find a clinically efficacious, safe and natural antiplaque agent.

[0004] Antimicrobial peptides are widely distributed in nature and play a role in the host defence of plants and animals (Boman and Hultmark, 1987; Bevins and Zasloff, 1990). They include amongst others, the amphipathic channel forming peptides, for example the cecropins isolated from the cecropia moth (Boman and Hultmark, 1987), the magainins isolated from skin secretions of the African clawed frog *Xenopus laevis* (Bevins and Zasloff, 1990), the dermaseptins isolated from the skin of the arboreal frog (Mor and Nicolas, 1994) and the bombinins from the skin of *Bombina variegata* (Simmnaco et al., 1991). Other antimicrobial peptides include the cyclic cationic peptides containing an intramolecular disulphide, for example ranalexin from bullfrog skin (Clark et al., 1994) and bactenecin from bovine neutrophils (Romeo et al., 1988). Proline-containing antimicrobial peptides also have been identified and these include the apidaecins from the lymph fluid of the honeybee (Casteels et al., 1989) and the pig myeloid antimicrobial peptide PMAP-23 (Zanetti et al., 1994).

[0005] It is now well established that the milk protein casein should be considered not only as a nutrient but also as a protecting agent against bacterial infection of the neonate mucosa as specific peptides released by tryptic or ill situ digestion have been shown to possess marked biological activity. These bioactive peptides are relatively resistant to further proteolytic breakdown and have been detected in the distal portion of the small intestine and blood of humans after ingestion of cow's milk (Svedberg et al., 1985). Migliore-Samour et al. (1989) have shown that peptides β-casein(63-68) PGPIPN and α_{s1}-casein(194-199) TTNPLW at concentrations as low as 0.1 μM exert a significant protective effect in mice against *Klebsiella pneumoniae* infection when injected intravenously at 0.3 mg/kg, before lethal infectious challenge. An antibacterial peptide from bovine α_{s2}-casein [α_{s2}-casein (f172-203)] released by treatment of milk with glacial acetic acid has recently been characterised and shown to inhibit the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus carnosus* (Zucht et al., 1995).

[0006] Antimicrobial peptides having activity against a range of Gram-positive and Gram-negative bacteria have potential in the area of oral care, functional foods, food preservatives and pharmaceuticals. Oral care products include toothpaste, mouthwash, dental floss and professionally applied materials. Functional foods include chewing gum, confectionery, breakfast cereals, infant formula, beverages, lozenges etc. Food preservatives application could include dairy products, soups, salad dressings, processed meats, baked goods, sauces etc. Pharmaceutical use would include systemic and topically applied antibiotics and anti-infectives and medications for the treatment of ulcers and other gastro-intestinal tract diseases.

[0007] For food applications, natural antimicrobials are typically used for the maintenance and extension of shelf-life in sauces, wet salads, baked goods and pastries, processed meats, refrigerated dairy products, salad dressings-

and soaps. Nisin has limited application as a food preservative due to a relatively narrow spectrum of antimicrobial activity and high cost. Food manufacturers using casein antimicrobial peptides as a preservative may use "all natural" label claims which are not allowed when using artificial or chemical preservatives. A major trend in the food industry is the increasing demand for low fat products which in general tend to have increased moisture levels. This creates a demand for better food preservation systems such as the incorporation of natural antimicrobials.

[0008] The global market for medications for wound healing, treatment of upper gut ulcers and inflammatory based disease represents a major pharmaceutical market. Clinicians working in the area of duodenal and gastric ulcers currently focus on the bacterium *Helicobacter pylori* as the causative agent in upper gut ulcers. Channel forming antimicrobial peptides that allow H^+ to enter the bacterial cell have the potential for treatment of *H. pylori* infections by enhancing the sensitivity of the bacterium to the acid secretions of the stomach.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0009] The present inventors have developed new peptides which have antimicrobial activity. These peptides can be produced synthetically, however, they can most conveniently be derived from casein.

[0010] Accordingly, in a first aspect the present invention consists in an antimicrobial peptide, the peptide being non-glycosylated, less than about 100 amino acids, preferably less than about 70 amino acids, and including an amino acid sequence selected from the group consisting of:

AVESTVATLEAΣZPEVIESPPE,

AVESTVATLEDΣPEVIESPPE,

AVESTVATLEASPEVIESPPE,

AVESTVATLEDSPEVIESPPE,

DMPIQAFLLYQQPVLGPVR,

[0011] and conservative substitutions therein.

[0012] In a preferred embodiment of the present invention the peptide includes an amino acid sequence selected from the group consisting of:

[0013] AVESTVATLEAΣPEVIESPPE, AVESTVATLEDΣPEVIESPPE, AVESTVATLEASPEVIESPPE, AVESTVATLEDSPEVIESPPE, and DMPIQAFLLYQQPVLGPVR, preferably AVESTVATLEAΣPEVIESPPE, AVESTVATLEDΣPEVIESPPE, or DMPIQAFLLYQQPVLGPVR.

[0014] In a further preferred embodiment of the present invention the peptide includes an amino acid sequence selected from the group consisting of:

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIES
PPEINTVQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTWAVESTVATLEAΣPEVIESP
PEINTVQVTSTAV;

-continued

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIES
PPEINTVQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIES
PPEINTVQVTSTAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINTVQVTS
TAV;

TEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINTVQVTS
TAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTS
TAV;

TEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTS
TAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIES
PPEINTVQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIES
PPEINTVQVTSTAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIESPPEINTVQVTS
TAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINTVQVTS
TAV;

[0015] and conservative substitutions therein.

[0016] It is further preferred that the peptide includes an amino acid sequence selected from the group consisting of:

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIES
PPEINTVQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIES
PPEINTVQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIES
PPEINTVQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIES
PPEINTVQVTSTAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINTVQVTSTA
V;

TEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINTVQVTS
TAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTS
TAV;

TEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTS
TAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIES
PPEINTVQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIES
PPEINTVQVTSTAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIESPPEINTVQVTS
TAV; and

TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINTVQVTS
TAV.

[0017] In yet a further preferred embodiment of the present invention the peptide is selected from the group consisting of:

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIES PPEINTVQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIES PPEINTVQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIES PPEINTVQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIES PPEINTVQVTSTAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINTVQVTS TAV;

TEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINTVQVTS TAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTS TAV;

TEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTS TAV;

AVESTVATLEAΣPEVIESPP;

AVESTVATLEDΣPEVIESPP;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIES PPEINTVQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIES PPEINTVQVTSTAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIESPPEINTVQVTS TAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINTVQVTS TAV;

AVESTVATLEASPEVIESPP;

AVESTVATLEDSPEVIESPP; and

DMPIQAFLLYQQPVLGPVR.

[0018] As will be understood by those skilled in this field the peptide of the present invention can be conjugated to other molecules, such as acyl derivatives, to alter the delivery profile or pharmacokinetics of the peptide. Such conjugates are described in PCT/AU90/00599, the disclosure of which is incorporated herein by reference.

[0019] In a second aspect the present invention consists in a chimeric compound, the compound including the peptide of the first aspect of the present invention conjugated to a non-peptide molecule. It is preferred that the non-peptide molecule includes acyl groups.

[0020] In a third aspect the invention provides an antimicrobial compositions including the peptide of the first aspect of the present invention together with a pharmaceutically-acceptable carrier. Such compositions may be dental, intra-oral compositions, therapeutic anti-infective compositions for topical and systemic application. Dental compositions or therapeutic compositions may be in the form of a gel, liquid, solid, powder, cream or lozenge. Therapeutic compositions may also be in the form of tablets or capsules.

[0021] In a fourth aspect, there is provided a method of treating or preventing dental caries or periodontal disease in a subject, the method comprising the step of administering a peptide or composition of the present invention to the teeth or gums of a subject in need of such treatments. Topical administration of the peptide is preferred.

[0022] Without wishing to be bound by scientific theory it is believed that the peptides of the present invention exert their antimicrobial activity by virtue of their amphipathic nature. It is believed that the peptides are incorporated into the bacterial membrane where they form aggregates. These aggregates provide or form pores or channels through the membrane through which ions may pass. The uncontrolled passage of ions across the bacterial membrane results in the death of the bacterial cell.

[0023] As it is the physical nature of the peptides rather than the specific sequence of the peptide which results in their antimicrobial activity so called conservative substitutions may be made in the peptide sequence with no substantial loss of activity. It is intended that such conservative substitutions which do not result in a substantial loss of activity are encompassed in the present invention.

[0024] Whilst the concept of conservative substitution is well understood by the person skilled in the art, for the sake of clarity conservative substitutions are those set out below.

[0025] G, A, V, I, L, M;

[0026] D, E, S;

[0027] N, Q;

[0028] S, T;

[0029] K, R, H;

[0030] F, Y, W, H; and

[0031] P, Nα-alkalamino acids.

[0032] Where Σ is a phosphoseryl residue.

[0033] The peptides of the present invention have a number of applications, for example, they can be used in foods as antimicrobial preservatives, in oral care products (toothpastes and mouthrinses) for the control of dental plaque and suppression of pathogens associated with dental caries and periodontal diseases. The antimicrobial peptides of the present invention may also be used in pharmaceutical preparations (eg, topical and systemic anti-infective medicines).

[0034] Throughout this specification the word "comprise", or variations such as "comprises" or "comprising", will be understood to imply the inclusion of a stated element or integer or group of elements or integers but not the exclusion of any other element or integer or group of elements or integers.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0035] The present invention relates to the novel antimicrobial peptides. These peptides were initially derived from casein, κ-casein (106-169) and β-casein (184-202) [Table 1]. These peptides have potential to be used for the following micro-organisms inter alia.

[0036] *Streptococcus mutans*

[0037] *Staphylococcus aureus*

[0038] *Streptococcus sanguinis*

[0039] *Escuerichia coli*

[0040] *Salmonella typhimurium*

[0041] *Pseudomonas aeruginosa*

[0042] *Porphyromonas gingivalis*

[0043] *Campylobacter jejuni*

[0044] *Listeria monocytogenes*

[0045] *Helicobacter pylori*

[0046] *Clostridium botulinum*

[0047] *Streptococcus pyogenes*

[0048] *Streptococcus pneumoniae*

[0049] *Candida albicans*

[0050] The antimicrobial peptides Ser(P)^{149} κ-casein B (106-169) and Ser(P)^{149} κ-casein B (117-169) both had a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2.4 μM against the oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* and at a ten-fold lower concentration (0.24 μM) inhibited growth of these bacteria by 41%.

[0051] The antimicrobial peptides Ser(P)^{149} κ-casein (117-169) and Ser(P)^{127}, Ser(P)^{149} κ-casein (117-169) and β-casein (184-202) can be purified from a tryptic digest of bovine casein using standard chromatographic procedures of anion exchange and reversed-phase chromatography (HPLC). Ser(P)^{149} κ-casein (106-169) and Ser(P)^{127}, Ser(P)^{149} κ-casein (106-169) can also be prepared from cheese whey and rennet whey by removal of the whey proteins by ultrafiltration, or acid precipitation followed by reversed-phase HPLC purification of the phosphopeptides. The peptides can be prepared from casein of other species, eg. goat, sheep etc.

TABLE 1

Casein Antimicrobial Peptides

Peptide	Sequence[a]
Ser(P)^{149} κ-casein B (106–169)	MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVA TLEAΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV
Ser(P)^{127}, Ser(P)^{149} κ-casein B (106–169)	MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVA TLEAΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV
Ser(P)^{149}, κ-casein A (106–169)	MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVA TLEDΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV
Ser(P)^{127}, Ser(P)^{149} κ-Caein A (106–169)	MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTV ATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV
Ser(P)^{149} κ-casein B (117–169)	TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPP EINTVQVTSTAV
Ser(P)^{127}, Ser(P)^{149} κ-casein B (117–169)	TEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESP PEINTVQVTSTAV
Ser(P)^{149} κ-casein A (117–169)	TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESP PEINTVQVTSTAV
Ser(P)^{127}, Ser(P)^{149} κ-casein A (117–169)	TEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESP PEINTVQVTSTAV
Ser(P)^{149} κ-casein B (138–158)	AVESTVATLEAΣPEVIESPP
Ser(P)^{149} κ-casein A (138–158)	AVESTVATLEDΣPEVIESPP
κ-casein B (106–169)	MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVA TLEASPEVIESPPEINTVQVTSTAV
κ-casein A (106–169)	MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVA TLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTAV
κ-casein B (117–169)	TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIESPP EINTVQVTSTAV
κ-casein A (117–169)	TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESP PEINTVQVTSTAV
κ-casein B (138–158)	AVESTVATLEASPEVIESPP
κ-casein A (138–158)	AVESTVATLEASPEVIESPP
κ-casein (184–202)	DMPIQAFLLYQQPVLGPVR

[a]Sequence identified using the one letter amino acid code where Σ=Ser(P)

[0052] The peptide κ-casein (106-169) is present in cheese whey or rennet whey in several different forms. The peptide has two major genetic variants (A and B) and is post-

translationally modified by glycosylation and phosphorylation. The glycosylated forms, known as the Kappa-caseinoglycopeptide or glycomacropeptide have been described by Neeser [U.S. Pat. Nos. 4,992,420 and 4,994,441] as anti-plaque and anti-caries agents by virtue of the oligosaccharide chains linked to threonine residues of the peptide. Neeser claims that the oligosaccharide chains of the glycopeptide, by specifically binding to plaque-forming oral bacteria, block the adherence of these bacteria onto salivary-coated tooth enamel. The glycosylated forms of κ-casein (106-169) can be separated from the non-glycosylated forms by chromatography (eg. anion exchange and reversed-phase HPLC) or by selective precipitation or ultrafiltration. Only the non-glycosylated forms of κ-casein (117-169) or κ-casein (106-169) showed antimicrobial activity. As glycosylation destroys antimicrobial activity it is desirable to separate the glyco- and aglyco-forms of κ-casein (117-169) or κ-casein (106-169) which can be achieved using chromatography, selective precipitation or ultrafiltration. Phosphorylation of Ser^{149} and to a lesser extent Ser^{127} are important for antimicrobial activity and the phosphorylated forms of the two major genetic variants (A and B) appear to possess equal activity [Table 1]. The Neeser patents do not disclose the antimicrobial activity of κ-casein(106-169) nor the use of the non-glycosylated forms of the peptide for the suppression of bacterial pathogens.

[0053] In a particularly preferred embodiment of the invention, the antimicrobial peptide is incorporated into dentifrices such as toothpaste, mouth washes or formulations for the mouth to aid in the prevention and/or treatment of dental caries and periodontal diseases. The peptide may comprise 0.01-50% by weight of the composition, preferably 0.1-10%. For oral compositions it is preferred that the amount of the peptide administered is 0.01-50% by weight, preferably 0.1-10% by weight of the composition. The oral composition of this invention which contains the above-mentioned peptides may be prepared and used in various forms applicable to the mouth such as dentifrice including toothpastes, toothpowders and liquid dentifrices, mouthwashes, troches, chewing gums, dental pastes, gingival massage creams, gargle tablets, lozenges, dairy products and other foodstuffs. The oral composition according to this invention may further include additional well known ingredients depending on the type and form of a particular oral composition.

[0054] In certain highly preferred forms of the invention the oral composition may be substantially liquid in character, such as a mouthwash or rinse. In such a preparation the vehicle is typically a water-alcohol mixture desirably including a humectant as described below. Generally, the weight ratio of water to alcohol is in the range of from about 1:1 to about 20:1. The total amount of water-alcohol mixture in this type of preparation is typically in the range of from about 70 to about 99.9% by weight of the preparation. The alcohol is typically ethanol or isopropanol. Ethanol is preferred.

[0055] The pH of such liquid and other preparations of the invention is generally in the range of from about 4.5 to about 9 and typically from about 5.5 to 8. The pH is preferably in the range of from about 6 to about 8.0, preferably 7.4. The pH can be controlled with acid (e.g. citric acid or benzoic acid) or base (e.g. sodium hydroxide) or buffered (as with sodium citrate, benzoate, carbonate, or bicarbonate, disodium hydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate, etc).

[0056] Other desirable forms of this invention, the oral composition may be substantially solid or pasty in character, such as toothpowder, a dental tablet or a dentifrice, that is a toothpaste (dental cream) or gel dentifrice. The vehicle of such solid or pasty oral preparations generally contains dentally acceptable polishing material. Examples of polishing materials are water-insoluble sodium metaphosphate, potassium metaphosphate, tricalcium phosphate, dihydrated calcium phosphate, anhydrous dicalcium phosphate, calcium pyrophosphate, magnesium orthophosphate, trimagnesium phosphate, calcium carbonate, hydrated alumina, calcined alumina, aluminium silicate, zirconium silicate, silica, bentonite, and mixtures thereof. Other suitable polishing material include the particulate thermosetting resins such as melamine-, phenolic, and urea-formaldehydes, and cross-linked polyepoxides and polyesters. Preferred polishing materials include crystalline silica having particle sized of up to about 5 microns, a mean particle size of up to about 1.1 microns, and a surface area of up to about 50,000 $cm^2/gm.$, silica gel or colloidal silica, and complex amorphous alkali metal aluminosilicate.

[0057] When visually clear gels are employed, a polishing agent of colloidal silica, such as those sold under the trademark SYLOID as Syloid 72 and Syloid 74 or under the trademark SANTOCEL as Santocel 100, alkali metal alumino-silicate complexes are particularly useful since they have refractive indices close to the refractive indices of gelling agent-liquid (including water and/or humectant) systems commonly used in dentifrices.

[0058] Many of the so-called "water insoluble" polishing materials are anionic in character and also include small amounts of soluble material. Thus, insoluble sodium metaphosphate may be formed in any suitable manner as illustrated by Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry, Volume 9, 4th Edition, pp. 510-511. The forms of insoluble sodium metaphosphate known as Madrell's salt and Kurrol's salt are further examples of suitable materials. These metaphosphate salts exhibit only a minute solubility in water, and therefore are commonly referred to as insoluble metaphosphates (IMP). There is present therein a minor amount of soluble phosphate material as impurities, usually a few percent such as up to 4% by weight. The amount of soluble phosphate material, which is believed to include a soluble sodium trimetaphosphate in the case of insoluble metaphosphate, may be reduced or eliminated by washing with water if desired. The insoluble alkali metal metaphosphate is typically employed in powder form of a particle size such that no more than 1% of the material is larger than 37 microns.

[0059] The polishing material is generally present in the solid or pasty compositions in weight concentrations of about 10% to about 99%. Preferably, it is present in amounts from about 10% to about 75% in toothpaste, and from about 70% to about 99% in toothpowder. In toothpastes, when the polishing material is silicious in nature, it is generally present in amount of about 10-30% by weight. Other polishing materials are typically present in amount of about 30-75% by weight.

[0060] In a toothpaste, the liquid vehicle may comprise water and humectant typically in an amount ranging from

about 10% to about 80% by weight of the preparation. Glycerine, propylene glycol, sorbitol and polypropylene glycol exemplify suitable humectants/carriers. Also advantageous are liquid mixtures of water, glycerine and sorbitol. In clear gels where the refractive index is an important consideration, about 2.5-30% w/w of water, 0 to about 70% w/w of glycerine and about 20-80% w/w of sorbitol are preferably employed.

[0061] Toothpaste, creams and gels typically contain a natural or synthetic thickener or gelling agent in proportions of about 0.1 to about 10, preferably about 0.5 to about 5% w/w. A suitable thickener is synthetic hectorite, a synthetic colloidal magnesium alkali metal silicate complex clay available for example as Laponite (e.g. CP, SP 2002, D) marketed by Laporte Industries Limited. Laponite D is, approximately by weight 58.00% SiO_2, 25.40% MgO, 3.05% Na_2O, 0.98% Li_2O, and some water and trace metals. Its true specific gravity is 2.53 and it has an apparent bulk density of 1.0 g/ml at 8% moisture.

[0062] Other suitable thickeners include Irish moss, iota carrageenan, gum tragacanth, starch, polyvinylpyrrolidone, hydroxyethylpropylcellulose, hydroxybutyl methyl cellulose, hydroxypropyl methyl cellulose, hydroxyethyl cellulose (e.g. available as Natrosol), sodium carboxymethyl cellulose, and colloidal silica such as finely ground Syloid (e.g. 244). Solubilizing agents may also be included such as humectant polyols such propylene glycol, dipropylene glycol and hexylene glycol, cellosolves such as methyl cellosolve and ethyl cellosolve, vegetable oils and waxes containing at least about 12 carbons in a straight chain such as olive oil, castor oil and petrolatum and esters such as amyl acetate, ethyl acetate and benzyl benzoate.

[0063] It will be understood that, as is conventional, the oral preparations are to be sold or otherwise distributed in suitable labelled packages. Thus, a jar of mouthrinse will have a label describing it, in substance, as a mouthrinse or mouthwash and having directions for its use; and a toothpaste, cream or gel will usually be in a collapsible tube, typically aluminium, lined lead or plastic, or other squeeze, pump or pressurized dispenser for metering out the contents, having a label describing it, in substance, as a toothpaste, gel or dental cream.

[0064] Organic surface-active agents are used in the compositions of the present invention to achieve increased prophylactic action, assist in achieving thorough and complete dispersion of the active agent throughout the oral cavity, and render the instant compositions more cosmetically acceptable. The organic surface-active material is preferably anionic, nonionic or ampholytic in nature which does not denature the antimicrobial peptide of the invention, and it is preferred to employ as the surface-active agent a detersive material which imparts to the composition detersive and foaming properties while not denaturing the peptide. Suitable examples of anionic surfactants are water-soluble salts of higher fatty acid monoglyceride monosulfates, such as the sodium salt of the monosulfated monoglyceride of hydrogenated coconut oil fatty acids, higher alkyl sulfates such as sodium lauryl sulfate, alkyl aryl sulfonates such as sodium dodecyl benzene sulfonate, higher alkylsulfo-acetates, higher fatty acid esters of 1,2-dihydroxy propane sulfonate, and the substantially saturated higher aliphatic acyl amides of lower aliphatic amino carboxylic acid compounds, such as those having 12 to 16 carbons in the fatty acid, alkyl or acyl radicals, and the like. Examples of the last mentioned amides are N-lauroyl sarcosine, and the sodium, potassium, and ethanolamine salts of N-lauroyl, N-myristoyl, or N-palmitoyl sarcosine which should be substantially free from soap or similar higher fatty acid material. The use of these sarconite compounds in the oral compositions of the present invention is particularly advantageous since these materials exhibit a prolonged marked effect in the inhibition of acid formation in the oral cavity due to carbohydrates breakdown in addition to exerting some reduction in the solubility of tooth enamel in acid solutions. Examples of water-soluble nonionic surfactants suitable for use with peptides are condensation products of ethylene oxide with various reactive hydrogen-containing compounds reactive therewith having long hydrophobic chains (e.g. aliphatic chains of about 12 to 20 carbon atoms), which condensation products ("ethoxamers") contain hydrophilic polyoxyethylene moieties, such as condensation products of poly (ethylene oxide) with fatty acids, fatty alcohols, fatty amides, polyhydric alcohols (e.g. sorbitan monostearate) and polypropyleneoxide (e.g. Pluronic materials).

[0065] Surface active agent is typically present in amount of about 0.1-5% by weight. It is noteworthy, that the surface active agent may assist in the dissolving of the peptide of the invention and thereby diminish the amount of solubilizing humectant needed.

[0066] Various other materials may be incorporated in the oral preparations of this invention such as whitening agents, preservatives, silicones, chlorophyll compounds and/or ammoniated material such as urea, diammonium phosphate, and mixtures thereof. These adjuvants, where present, are incorporated in the preparations in amounts which do not substantially adversely affect the properties and characteristics desired.

[0067] Any suitable flavouring or sweetening material may also be employed. Examples of suitable flavouring constituents are flavouring oils, e.g. oil of spearmint, peppermint, wintergreen, sassafras, clove, sage, eucalyptus, marjoram, cinnamon, lemon, and orange, and methyl salicylate. Suitable sweetening agents include sucrose, lactose, maltose, sorbitol, xylitol, sodium cyclamate, perillartine, AMP (aspartyl phenyl alanine, methyl ester), saccharine, and the like. Suitably, flavour and sweetening agents may each or together comprise from about 0.1% to 5% more of the preparation.

[0068] In the preferred practice of this invention an oral composition according to this invention such as mouthwash or dentifrice containing the composition of the present invention is preferably applied regularly to the gums and teeth, such as every day or every second or third day or preferably from 1 to 3 times daily, at a pH of about 4.5 to about 9, generally about 5.5 to about 8, preferably about 6 to 8, for at least 2 weeks up to 8 weeks or more up to a lifetime.

[0069] The compositions of this invention can be incorporated in lozenges, or in chewing gum or other products, e.g. by stirring into a warm gum base or coating the outer surface of a gum base, illustrative of which may be mentioned jelutong, rubber latex, vinylite resins, etc., desirably with conventional plasticisers or softeners, sugar or other sweeteners or such as glucose, sorbitol and the like.

[0070] In another embodiment, the peptide of the invention is formulated in foods to act as a preservative preferably comprising 0.01-10% w/w, more preferably 0.1-5% w/w, most preferably 1-5% and particularly 2% w/w.

[0071] The present invention provides compositions including pharmaceutical compositions comprising the antimicrobial peptide as described together with a pharmaceutically-acceptable carrier. Such compositions may be selected from the group consisting of dental, intra-oral compositions, therapeutic anti-infective compositions for topical and systemic application. Dental compositions or therapeutic compositions may be in the form of a gel, liquid, solid, powder, cream or lozenge. Therapeutic compositions may also be in the form of tablets or capsules.

[0072] The present invention also provides a method of treating or preventing dental caries or periodontal disease comprising the step of administering a peptide or composition of the invention to the teeth or gums of a subject in need of such treatments. Topical administration of the peptide is preferred.

[0073] The invention also provides a method of producing the antimicrobial peptide from casein or whey. κ-casein (106-169) can be obtained from cheese or rennet whey by ultrafiltration or acid precipitation. Ultrafiltration of whey through a 10,000-30,000 nominal molecular weight cut off (NMCO) membrane filter at neutral or preferably acidic pH (3-5) retains the majority of whey proteins producing a permeate rich in casein peptides, lactose and minerals. Ultrafiltration and concentration of the permeate using a 1000 NMCO membrane filter produces a fraction rich in κ-casein (106-169). This fraction is then incubated with trypsin and the resulting hydrosylate subjected to reversed-phase HPLC producing a relatively pure κ-casein (117-169) peptide. Alternatively the peptides κ-casein (117-169) and β(184-202) can be obtained from a tryptic digest of casein using reversed-phase HPLC. Peptide κ-casein (138-158) can be obtained by a partial endo-Glu-C digest of κ-casein (106-169) followed by purification using reversed-phase HPLC.

[0074] It will be clearly understood that, although this specification refers specifically to applications in humans, the invention is also useful for veterinary purposes. Thus in all aspects the invention is useful for domestic animals such as cattle, sheep, horses and poultry; for companion animals such as cats and dogs; and for zoo animals.

[0075] In order that the nature of the present invention may be more clearly understood preferred forms thereof will now be described with reference to the following non-limiting examples.

FIGURE LEGENDS

[0076] **FIG. 1**. Reversed-phase HPLC of a tryptic digest of a Whey Protein Concentrate (WPC). The WPC tryptic digest (8 mg) was applied to a Brownlee RP-300 C_8 column. The sample was eluted using a stepwise linear gradient of 0-20% B in 2 min followed by 20-45% B in 40 min at a flow rate of 1 ml/min. Eluant A was 0.1% (v/v) TFA in water and eluant B was 80% (v/v) acetonitrile in 0.1% (v/v) TFA in water.

[0077] **FIG. 2**. Anion exchange chromatography of peak 9 from RP-HPLC of the WPC tryptic digest. Peak 9 was applied to a Mono Q column attached to a SMART™ system and eluted using 0-75% elutant B in 40 min at a flow rate of 100 μl/min. Elutant A was 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM KCl and elutant B was 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl.

[0078] $_{149}$ **FIG. 3**. Determination of the MIC of κ-casein A Ser(P) (f117-169) for *Streptococcus mutans* Ingbritt. The MIC was 2.4 μM.

[0079] **FIG. 4**. Analytical reversed-phase HPLC elution profile of UF-whey. A sample of UF-whey was dissolved in solvent A and applied to an analytical column (C18) and then eluted using a linear gradient from 0-35% Solvent B in 5 min followed by 35-80% Solvent B in 40 min at a flow rate of 1.0 ml/min. Solvent A consisted of 0.1% TFA in water and Solvent B contained 90% acetonitrile (v/v/0.1% TFA in water). Peaks were detected at 215 nm, collected manually at 215 nm and lyophilised.

[0080] **FIG. 5**. Purification of peak 4 (from RP-HPLC) using gel filtration. Peak 4 was applied to a gel filtration column connected to an ABI system. Material was eluted using 30% acetonitrile (v/v)/0.1% TFA at a flow rate of 1 ml/min and monitored at 215 nm.

[0081] **FIG. 6**. Purification of peptides generated by the hydrolysis of TCA-soluble UF-whey by endopeptidase Glu-C. A sample was dissolved in Solvent A (0.1% TFA v/v in water) and applied to an analytical column (C18). Peaks were eluted using a gradient of 0-20% Solvent B (90% acetonitrile v/v/0.1% TFA in water) in 4 min followed by 20%-40% Solvent B in 40 min. Peaks were monitored at 215 nm.

[0082] Specific examples of formulations containing the antimicrobial peptide of the invention are provided below.

EXAMPLE 1

[0083] Preparation of Antimicrobial Peptides from a Tryptic Digest of Whey Protein Concentrate

[0084] Whey protein concentrate (50 mg/ml) in water (pH 8.0) was hydrolysed using Novo trypsin (1 mg/ml) at 50° C. for 2 h with the pH maintained at 8.00±0.01 by the addition of 1N NaOH. Hydrolysis was terminated by the addition of 1M HCl to pH 4.6. The hydrolysate was centrifuged (11,600 g for 10 min) and then filtered through a 0.2 μm PVDF filter before being applied to a 7 μm C_8 (Brownlee) reversed-phase column (4.6×220 mm). The sample was eluted using an Applied Biosystems 140 A Solvent Delivery System to generate a stepwise linear gradient from 0-20% B in 2 min followed by 20-45% B in 40 min at a flow rate of 1 ml/min. Eluant A was 0.1% (v/v) TFA in water and eluant B was 80% (v/v) acetronitrile, 0.1% (v/v) TFA in water. The eluant was monitored using an Applied Biosystems 1000S Diode Array detector at a primary wavelength of 215 nm. The chromatogram obtained is shown in **FIG. 1**. Peaks were collected and assayed for antimicrobial activity. Antimicrobial assays were carried out in liquid growth medium using sterile 96 well plates, each well having a capacity of 300 μL. The growth medium consisted of Todd Hewit broth (36.4 g/L), Yeast Extract (5.0 g/L) with 100 mmol/L potassium phosphate buffer. Routinely the pH of the growth medium was adjusted to 6.3. An inoculum of approximately 1.5×10^2 cells (*Streptococcus sanguis, Streptococcus mutans, Porphyromonas gingivalis*) that had been harvested during the

exponential phase of growth, was added to each well. The ionophore gramicidin (40 μmol/L final concentration) was added to a series of wells as a negative control. Positive controls contained only the inoculum and the growth medium. Growth was determined over a 30 hour period after inoculation by measuring the optical density of the cell suspensions at a wavelength of 650 nm (OD_{650}), using a microplate reader (Biorad, model 450). Growth was determined by subtracting the initial reading, taken immediately after inoculation from the final reading (maximum culture OD).

[0085] Antimicrobial assays were also carried out on agar plates containing suitable growth media that had been inoculated with a lawn of the test bacterial species. Filter paper discs (6 mm diameter), to which was added 50 μL of the peptide solution, were placed on the surface of the agar plate. The diameter of the zone of growth inhibition around each disc was determined after three days of incubation and compared to a control that only had buffer added. Growth conditions depended on the bacterial species being tested, however they were routinely cultured in an anaerobic work station at 37° C. Only peak 9 of **FIG. 1** exhibited antimicrobial activity. Analysis of this peak using amino acid sequence analysis (Hewlett Packard automated protein sequencer) and mass analysis (Perseptive Voyager MALDI-TOF mass spectrometer) revealed that the peak was heterogenous and so the sample was subjected to anion exchange chromatography on a Mono Q PC 1.6/5 (10 μm) column attached to a SMART™ (Pharmacia) system. The sample was eluted using a linear gradient from 0-75% B in 40 min at a flow rate of 100 μl/min. Eluant A was 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM KCl. Eluant B was 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl. The eluant was monitored at 215 and 280 nm using the μ Peak monitor. The anion exchange chromatogram for peak 9 from RP-HPLC is shown in **FIG. 2**. Peaks were collected and assayed for antimicrobial activity and only peaks 9, 10 and 11 exhibited activity. N-terminal sequence and mass analyses revealed that fraction 9 contained Ser(P)^{149} κ-casein A (113-169), fraction 10 contained Ser(P)^{149} κ-casein A (124-169) and fraction 11 contained Ser(P)^{149} κ-casein A (117-169). Mass analysis revealed that none of the peptides were glycosylated. The minimum inhibitory concentration (MIC) of pure Ser(P)^{149} κ-casein A (117-169) was then determined for the bacterium *Streptococcus mutans* and is shown in **FIG. 3**. The MIC obtained was 2.4 μM.

EXAMPLE 2

[0086] A. Preparation of Antimicrobial Peptides from Cheese Whey

[0087] Cheese whey was ultrafiltered (UF) though a 20,000 molecular weight cut off membrane. The filtrate was collected and proteins were precipitated by addition of trichloroacetic acid (TCA) to a final concentration of 11% w/v. Precipitated proteins were removed by centrifugation (10,000 g, 5 min) and the neutralised supernatant was lyophilised. The dried TCA-soluble UF whey was dissolved in 0.1% TFA in water and subjected to RP-HPLC. The sample was applied to a Brownlee aquapore analytical (C18) reversed-phase column (220×4.6 mm) or a Brownlee (C18) preparative column (25 cm×10 mm). Solvent B consisted of 90% acetonitrile containing 0.1% v/v TFA and solvent A consisted of 0.1% TFA in water. The eluant was monitored using an Applied Biosystems Incorporated (ABI; Melbourne, Vic., Australia) 1000S diode array detector at a wavelength of 215 nm.

[0088] The sample was applied to the Brownlee analytical column and eluted using a gradient from 0-35% solvent B in 2 min, 35% solvent B in 2 min followed by 35-80% solvent B in 40 min at a flow rate of 1.0 ml/min. Fractions collected were assayed for antibacterial activity. Fractions were tested with the Gram-positive bacteria *Streptococcus mutans* Ingbritt, *Streptococcus sanguinis* (formerly S. sanguis), *Streptococcus sobrinus* 6715 WT15, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and the Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* NCTC 10418, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619. The bacteria were stored in 30% glycerol broths at −20° C.

[0089] The antibacterial assay was conducted in sterile 96 well plates (Becton Dickinson, Melbourne, Australia). The growth media for the Gram-positive bacteria consisted of Todd Hewitt broth (TH; 36.4 g/l), Yeast extract (YE; 5 g/l) and 100 mM potassium phosphate, pH 6.28 (TYPB). The media for Gram-negative bacteria consisted of Nutrient broth at pH 6.28 and for *P. gingivalis,* Brain Heart Infusion media (with 1 μg/ml haeme and 0.5 g/l cysteine) at pH 7.0. An inoculum was prepared by diluting exponentially growing cells in growth media, such that the inoculum contained approximately 2.7×10^4 viable cells/ml. To each well was added 250 μl media containing the peptide in varying concentrations and 50 μl of bacterial inoculum. Control assays contained all components except peptide. The negative control wells each contained 250 μl media, 50 μl inoculum and 5 μl of gramicidin D (2.5 mM). Growth of the bacterium was determined as the difference between the final and initial Optical Density (OD) 650 nm readings using a microplate reader (BIORAD, model 450, NSW, Australia). The final OD represented the maximum culture OD and was recorded normally 20-30 h after inoculation, during which time the cells were incubated at 37° C. in aerobic conditions except for *P. gingivalis* which was incubated in anaerobic conditions at the same temperature. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration of peptide required to inhibit the growth of the bacterium. The peptide concentration varied between 0.05 μM-500 μM

[0090] The antimicrobial activity of the neutralised starting material (TCA-soluble UF whey) is shown in Table 2.

TABLE 2

Growth inhibition of Gram-positive and Gram-negative bacteria by TCA-soluble UF-whey. Microbial growth was determined by optical density at a wavelength of 650 nm after 30 h incubation at 37° C.

	Growth Inhibition by TCA-soluble UF-whey %	
Species	3.7 mg/ml	1.9 mg/ml
Gram-positive bacteria		
S. mutans	89 ± 6[a]	42 ± 11
S. aureus	47 ± 18	18 ± 18
S. sanguinis	NI[b]	NI

TABLE 2-continued

Growth inhibition of Gram-positive and Gram-negative bacteria by TCA-soluble UF-whey. Microbial growth was determined by optical density at a wavelength of 650 nm after 30 h incubation at 37° C.

	Growth Inhibition by TCA-soluble UF-whey %	
Species	3.7 mg/ml	1.9 mg/ml
Gram-negative bacteria		
E. coli	14 ± 8	12 ± 15
S. typhimurium	8 ± 7	NI
P. aeruginosa	9 ± 6	NI

[a]% mean inhibition of growth ± standard deviation (n = 3–6)
[b]no inhibition

[0091] **FIG. 4** shows the RP-HPLC of the TCA-soluble UF whey. Five peaks were collected and analysed for antibacterial activity. Peak 4 exhibited the highest specific antimicrobial activity as shown in Table 3. Peak 4 (RP4) was further subjected to gel filtration chromatography using a gel filtration column (Supelco 30×7.8 cm) and eluted using 30% acetonitrile v/v 0.1% TFA in water at a flow rate of 1 ml/min.

TABLE 3

Growth inhibition of streptococcal species by RP-HPLC peaks of UF-whey. The peaks generated were tested in the antibacterial assay. Microbial growth was determined by optical density at a wavelength of 650 nm after 30 h incubation at 37° C.

		Assay	% Growth Inhibition		
Sample	Amount[†] (mg)	concentration[∞] (mg/ml)	*S. mutans*	*S. sobrinus*	*S. sanguinis*
RP1 + RP2	1.7	1.4	23 ± 16[a]	—[b]	NI[c]
RP3	1.0	0.90	17 ± 16	23 ± 20	17 ± 7
RP4	0.64	0.53	91 ± 3	81 ± 5	26 ± 7
RP5	0.60	0.50	79 ± 7	79 ± 14	23 ± 5

[a]% mean inhibition of growth ± standard deviation (n = 3–6)
[b]not determined
[c]no inhibition
[†]Amount of each peak estimated by 215 nm absorbance
[∞]Concentration of peak in antibacterial assay

[0092] **FIG. 5** shows the gel filtration chromatography of peak 4 (RP4) from RP-HPLC of the TCA-soluble UF whey. Four peaks from the chromatography were collected and assayed for antimicrobial activity against *S. mutans* as shown in Table 4.

TABLE 4

The inhibition of growth of *S. mutans* by gel filtration peaks of peak 4 from RP-HPLC of TCA-soluble whey.

Peak	Amount[†] (mg)	Assay Concentration[∞] (mg/ml)	% Growth inhibition
RP4GF1	3.12	2.6	46 ± 9[a]
RP4GF2	—[b]	—	NI[c]

TABLE 4-continued

The inhibition of growth of *S. mutans* by gel filtration peaks of peak 4 from RP-HPLC of TCA-soluble whey.

Peak	Amount[†] (mg)	Assay Concentration[∞] (mg/ml)	% Growth inhibition
RP4GF3	19.2	16	26 ± 12
RP4GF4	2.88	2.4	41 ± 11

[a]% mean inhibition of growth ± standard deviation (n = 3–6)
[b]not determined
[c]no inhibition
[†]Amount of each peak estimated by 215 nm absorbance
[∞]Concentration of peak in antibacterial assay

[0093] The four peaks were also analysed by amino acid sequence analysis and by mass spectrometry.

[0094] Mass spectrometric analysis (MS) of peptides was performed using a Perspective Biosystems (Framingham, Mass., USA) Voyager linear matrix assisted laser desorption/ionisation Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometer equipped with delayed extraction. Samples were mixed (1:1 v/v) on the sample analysis plate with a 5 mg/ml solution of 2-5, dihydroxybenzoic acid in 50% aqueous acetonitrile, containing 0.25% v/v TFA in water. All spectra were obtained in linear, positive mode with an accelerating voltage of 20 kV, grid voltage of 92% and pulse delay time of 125 ns. Calibration was performed using bovine insulin (MW 5733.54 Da). For sequence analysis peptides were applied to a preconditioned Hewlett-Packard (HP; Blackburn, Vic, Aust.) sequencing column in 1 ml of sample loading solution (2% v/v TFA in water) and then analysed using a HP G1005A Protein sequencer.

TABLE 5

Comparison of the peaks from gel filtration chromatography of peak 4 (RP4) of TCA-soluble UF whey as determined by sequence and mass spectrometric analysis.

Peak	Measured Mass (Da)	Calculated Mass (Da)	Assignment[†]
RP4GF1	6756	6755	Ser(P)^{149}κ-casein-B-(106-169)
	6788	6787	Ser(P)^{149}κ-casein-A-(106-169)
	6736	6835	Ser(P)^{127}, Ser(P)^{149}κ-casein-B-(106-169)
	6869	6867	Ser(P)^{127}, Ser(P)^{149}κ-casein-A-(106-169)
RP4GF2	—	—	β-lactoglobulin, minor traces of α-lactalbumin and κ-casein (106-169)
RP4GF3	—	—	α-lactalbumin
RP4GF4	6758	6755	Ser(P)^{149}κ-casein-B-(106-169)
	6788	6787	Ser(P)^{149}κ-casein-A-(106-169)
	6738	6835	Ser(P)^{127}, Ser(P)^{149}κ-casein-B-(106-169)
	6869	6867	Ser(P)^{127}, Ser(P)^{149}κ-casein-A-(106-169)

[†]Assigned by N-terminal amino acid sequencing

[0095] The two gel filtration peaks with the same specific antimicrobial activity RP4 GF1 and RP4 GF4 (Table 4) contained the same peptides, presumably the higher molecular weight fraction RP4 GF1, represented an aggregated state of the phosphopeptides. The active peptides were identified as:

[0096] Ser(P)^{149}κ-casein-B-(106-169)

[0097] Ser(P)^{149}κ-casein-A-(106-169)

[0098] $Ser(P)^{127}$, $Ser(P)^{149}$κ-casein-B-(106-169)

[0099] $Ser(P)^{127}$, $Ser(P)^{149}$κ-casein-A-(106-169)

[0100] The identification of antimicrobial activity with the phosphorylated, non-glycosylated form of κ-casein (106-169) is consistent with the identification of the tryptic casein peptide $Ser(P)^{149}$ κ-casein (117-169) as an antimicrobial peptide in Example 1.

[0101] B. Preparation of Antimicrobial Peptides from TCA-Soluble UF Whey Treated with Endopeptidase Glu-C

[0102] Endopeptidase Glu-C (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo., USA) was added (5.0 μg/ml) to a solution of TCA-soluble UF-whey (1.0 mg/ml), in ammonium acetate (0.05 M, pH 4.0) and incubated at 37° C. for 24 h. The reaction was stopped by lowering the pH to 3.0 by the addition of glacial acetic acid. Enzymatic digestion products were separated by RP-HPLC.

TABLE 6

Antimicrobial activity against *S. mutans* of lyophilised peaks 9–12 from RP-HPLC of an endo Glu-C hydrolysate of TCA-soluble UF-whey.

Peak	Amount† (mg)	Assay Concentration∞ (mg/ml)	% Growth inhibition
9	0.64	0.53	NI[a]
10	0.30	0.25	NI
11	0.32	0.27	NI
12	0.40	0.34	84 ± 9[b]

[a]no inhibition
[b]% mean inhibition of growth ± standard deviation (n = 3)
†Amount of each peak estimated by 215 nm absorbance
∞Concentration of peak in antibacterial assay

[0104]

TABLE 7

Composition of peaks 9–12 from RP-HPLC of an endo Glu-C hydrolysate of TCA-soluble UF-whey.

Peak	Measured Molecular mass (Da)[a]	Calculated Molecular mass (Da)	Assignment
9	3056.5	3050.2	Ser $(P)^{149}$ κ-casein-B-(141-151)
	4080.9	4076.2	κ-casein-A-1 GalNAc, 1 Gal-(106-140)
	4373.7	4367.2	κ-casein-A-1 GalNAc. 1Gal, 1NeuAc-(106-140) + methionine sulfoxide
	4750.9	4748.0	κ-casein-A-2 GalNAc, 2Gal, 1NeuAc-(106-140)
	5040.8	5039.0	κ-casein-A-2 GalNAc. 2Gal, 2NeuAc-(106-140) + methionine sulfoxide
10	2438.2	2432.4	κ-casein-A-1 GalNAc-(119-140)
	2481.9	2474.0	Ser $(P)^{149}$ κ-casein-A-1 GalNAc. 1 NeuAc-(141-158)
	3423.8	3423.0	κ-casein-B-(106-137)
	4092.5	4092.2	κ-casein-A-1 GalNAc, 1 Gal-(106-140) + methionine sulfoxide
	4383.7	4383.2	κ-casein-A-1 GalNAc, 1 Gal, 1 NeuAc-(106-140) + methionine sulfoxide
11	1890.1	1884.1	κ-casein-A-(152-169) and k-casein-B-(152-169)
	2938.4	2931.2	κ-casein-A-(119-147)
	3427.4	3423.8	κ-casein-B-(106-137)
	4094.2	4088.0	κ-casein-B-1 GalNAc, 1 Gal-(106-140)
	4385.3	4379.0	κ-casein-B-1 GalNAc, 1 Gal, 1 NeuAc-(106-140)
12	2285.6	2279.3	Ser $(P)^{149}$ κ-casein-A-(138-158)
	2356.8	2348.4	Ser $(P)^{149}$ κ-casein-B-(148-169)
	2398.3	2392.5	Ser $(P)^{149}$ κ-casein-A-(148-169)

[a]molecular mass determined by MS

[0103] **FIG. 6** shows the RP-HPLC of the endo Glu-C digest of TCA-soluble UF whey. Twelve peaks were collected and only peak 12 exhibited antimicrobial activity against *S. mutans* as shown in Table 6. Peak 12 contained three peptides as shown by sequence and mass spectrometric analyses (Table 7). These peaks were further purified by analytical RP-HPLC and only peptide $Ser(P)^{149}$ κ-casein A (138-158) exhibited antimicrobial activity with a 100 μM concentration giving close to 100% growth inhibition of *S. mutans*.

[0105] These results showed that only a 20 residue fragment of $Ser(P)^{149}$ κ-casein A (106-169), $Ser(P)^{149}$ κ-casein A (138-158) displayed antimicrobial activity albeit less potent (100 μM MIC) compared with the longer peptide (2.5 μM MIC). The twenty residue fragment of the two major genetic variants A and B are shown:

$Ser(P)^{149}$ κ-casein A (138–158)
AVESTVATLEDΣPEVIESPP

-continued

Ser(P)^{149} κ-casein B (138–158)

AVESTVATLEAΣPEVIESPP

[0106] The twenty residue fragment is amphipathic and has the potential to form an amphipathic helix and therefore a channel in the bacterial membrane. A molecular model of κ-casein (130-158) as a hexamer forming a polar channel with a non-polar exterior that could allow the passage of cations (Na^+, K^+, H^+ etc.) through a bacterial cell membrane thereby dissipating transmembrane electrochemical gradients was constructed. It was interesting to note that the molecular model of the glycosylated form of κ-casein (130-158), which has no antimicrobial activity, has the channel blocked by sugar residues perhaps thereby possibly explaining the lack of activity with the glycosylated peptides.

[0107] C. Synthesis of Ser(P)^{149} κ-casein (138-160)

[0108] To confirm antimicrobial activity of Ser(P)^{149} κ-casein (138-158) related peptides were synthesised with and without the phosphorylation and assayed for antimicrobial activity.

[0109] A peptide corresponding to Ser(P)^{149} κ-casein A (138-160), containing a phosphoryl group on Ser 149, and κ-casein A (130-158) were synthesised manually by standard solid-phase peptide synthesis protocols for Fmoc chemistry. The peptides were assembled as the carboxyl form using Pac-Peg-PS resin (PerSeptive Biosystems). Subsequent additions of the remaining Fmoc amino acids including Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)—OH were accomplished with HBTU/HOBt activation using 4 equiv of Fmoc-amino acid and 6 equiv of DIPEA. The Fmoc group was removed with a continuous flow of 2% v/v DBU in DMF containing 2% v/v piperidine for 5 min. Cleavage of the peptide from the resin support was performed using TFA:TIPS:water (95:2.5:2.5) cleavage cocktail for 2.5 h under N_2, in darkness. After cleavage the resin was removed by filtration and the filtrate concentrated under a stream of nitrogen. After the peptide products were precipitated in cold ether, they were centrifuged and washed three times. The peptide precipitate was then dissolved in water containing 0.1% v/v TFA and insoluble residue removed by centrifugation.

[0110] Purification of synthesised peptides was performed using a Brownlee C18 preparative column. Chromatograms were developed at a flow rate of 4.0 ml/min and peptides were eluted using a gradient of 0-100% solvent B in 43 min. Peptide fractions collected from the column were applied to the Brownlee C18 analytical column and eluted using a gradient of 0-100% solvent B in 40 min.

[0111] All collected peptide fractions were lyophilised and subjected to analysis by MS.

[0112] Table 8 shows the antimicrobial activity of the two synthetic peptides. These results show that the phosphorylation of Ser^{149} is essential for full antimicrobial activity. The phosphoseryl residue Ser(P)^{149} may be necessary for the formation of an ion channel in the bacterial membrane or maybe necessary for solubility. Further, the higher MIC (100-150 μM) for the Ser(P)^{149} κ-casein A (138-160) compared with the larger peptide Ser(P)^{149} κ-casein A (117-169) (2.5 μM MIC) suggests that the flanking residues of Ser(P)^{149} κ-casein (138-158) may be necessary for solubility and/or interaction with the bacterial cell and formation of the ion channel.

TABLE 8

Inhibition of *S. mutans* growth by synthetic peptides κ-casein-A-(130–158) (non-phosphorylated) and Ser (P)^{149} κ-casein-A-(138–160).

		% Growth inhibition Concentration of synthetic peptides (mM)				
Peptide	MIC	100	75	50	25	10
κ-casein-A-(130–158)	1.2 mM	17 ± 13[a]	—[b]	14 ± 13	11 ± 7	NI[c]
Ser (P)^{149} κ-casein-A-(138–160)	150 μM	—	69 ± 6	52 ± 5	17 ± 9	6 ± 10

[a]% mean inhibition of growth ± standard deviation (n = 3–6)
[b]not determined
[c]no inhibition

EXAMPLE 3

[0113] A. Trypsin Hydrolysis

[0114] Sodium caseinate was dissolved in 150 mM NH_4HCO_3 pH 8.0 at 10% (w/v) and hydrolysed using Novo trypsin (2 g/L) at 50° C. for 2 h. Hydrolysis was terminated by the addition of 1N HCl to pH 4.6 and the undigested protein removed by centrifugation. A sample of the hydrolysate was applied to a 7 μm Applied Biosystems C_8 column (4.6×220 mm) and eluted as described in Example 1. Peaks were collected and assayed for antimicrobial activity against *Streptococcus sanguinis*. Two peptides showed activity, Ser(P)^{149} κ-casein (117-169) and β-casein (184-702).

[0115] B. Rennet Hydrolysis

[0116] Casein HCl (5 g) was dissolved in 100 ml of 100 mM ammonium bicarbonate pH 8.0. Once the casein had dissolved the pH was lowered to 6.3 with 1 M HCl and 1 mg of rennet (chymosin, Sigma) was added and the mixture incubated for 1 h at 37° C. TCA (11% w/v) was added to the solution or the pH was lowered to 4.5 by the addition of 1 M HCl and the precipitated proteins were removed by centrifugation. The supernatant was collected, neutralised and lyophilised. The dried sample was dissolved in solvent A (0.1% TFA in water) and applied to a Brownlee C18 preparative RP-HPLC column. The column was eluted using a gradient of 15% solvent B for 5 min 15-60% solvent B in 225 min followed by 60-100% solvent B in 1 min at a flow rate of 4.0 ml/min. The eluant was monitored at 215 nm. Four peaks were obtained two of which had antimicrobial activity and corresponded to the non-glycosylated, phosphorylated κ,-casein (106-169).

[0117] The active peptides were identified as:

[0118] Ser(P)^{149} κ-casein A (106-169).

[0119] Ser(P)^{127}, Ser(P)^{149} κ-casein A (106-169) and

[0120] Ser(P)^{149} κ-casein B (106-169).

[0121] Ser(P)^{127}, Ser(P)^{149} κ-casein B (106-169).

EXAMPLE 4

[0122] Proposed Toothpaste Formulations

Formulation 1

Ingredient	% w/w
Dicalcium phosphate dihydrate	50.0
Glycerol	20.0
Sodium carboxymethyl cellulose	1.0
Sodium lauryl sulphate	1.5
Sodium lauroyl sarconisate	0.5
Flavour	1.0
Sodium saccharin	0.1
Chlorhexidine gluconate	0.01
Dextranase	0.01
Ser(P)^{149} κ-casein(106-169)	1.0
Water	balance

[0123]

Formulation 2

Ingredient	% w/w
Dicalcium phosphate dihydrate	50.0
Sorbitol	10.0
Glycerol	10.0
Sodium carboxymethyl cellulose	1.0
Sodium lauryl sulphate	1.5
Sodium lauroyl sarconisate	0.5
Flavour	1.0
Sodium saccharin	0.1
Sodium monofluorophosphate	0.3
Chlorhexidine gluconate	0.01
Dextranase	0.01
Ser(P)^{149} κ-casein(106-169)	2.0
Water	balance

[0124]

Formulation 3

Ingredient	% w/w
Dicalcium phosphate dihydrate	50.0
Sorbitol	10.0
Glycerol	10.0
Sodium carboxymethyl cellulose	1.0
Lauroyl diethanolamide	1.0
Sucrose monolaurate	2.0
Flavour	1.0
Sodium saccharin	0.1
Sodium monofluorophosphate	0.3
Chlorhexidine gluconate	0.01
Dextranase	0.01
Ser(P)^{149} κ-casein(106-169)	5.0
Water	balance

[0125]

Formulation 4

Ingredient	% w/w
Sorbitol	10.0
Irish moss	1.0
Sodium Hydroxide (50%)	1.0
Gantrez	19.0
Water (deionised)	2.69
Sodium monofluorophosphate	0.76
Sodium saccharin	0.3
Pyrophosphate	2.0
Hydrated alumina	48.0
Flavour oil	0.95
Ser(P)^{149} κ-casein(106-169)	1.0
Water	balance

[0126]

Formulation 5

Ingredient	% w/w
Sodium polyacrylate	50.0
Sorbitol	10.0
Glycerol	20.0
Sodium saccharin	0.1
Sodium monofluorophosphate	0.3
Chlorhexidine gluconate	0.01
Ethanol	3.0
Ser(P)^{149} κ-casein(106-169)	2.0
Linolic acid	0.05
Water	balance

EXAMPLE 5

[0127] Proposed Mouthwash Formulations

Formulation 1

Ingredient	% w/w
Ethanol	20.0
Flavour	1.0
Sodium saccharin	0.1
Sodium monofluorophosphate	0.3
Chlorhexidine gluconate	0.01
Lauroyl diethanolamide	0.3
Ser(P)^{149} κ-casein(106–169)	2.0
Water	balance

[0128]

Formulation 2

Ingredient	% w/w
Gantrez S-97	2.5
Glycerine	10.0
Flavour oil	0.4
Sodium monofluorophosphate	0.05
Chlorhexidine gluconate	0.01

-continued

Formulation 2

Ingredient	% w/w
Lauroyl diethanolamide	0.2
Ser(P)^{149} κ-casein(106–169)	2.0
Water	balance

EXAMPLE 6

[0129] Proposed Lozenge Formulation

Ingredient	% w/w
Sugar	75–80
Corn syrup	1–20
Flavour oil	1–2
NaF	0.01–0.05
Ser(P)^{149} κ-casein(106–169)	3.0
Mg stearate	1–5
Water	balance

EXAMPLE 7

[0130] Proposed Gingival Massage Cream Formulation

Ingredient	% w/w
White petrolatum	8.0
Propylene glycol	4.0
Stearyl alcohol	8.0
Polyethylene Glycol 4000	25.0
Polyethylene Glycol 400	37.0
Sucrose monostearate	0.5
Chlorohexidine gluconate	0.1
Ser(P)^{149} κ-casein(106–169)	3.0
Water	balance

EXAMPLE 8

[0131] Proposed Chewing Gum Formulation

Ingredient	% w/w
Gum base	30.0
Calcium carbonate	2.0
Crystalline sorbitol	53.0
Glycerine	0.5
Flavour oil	0.1
Ser(P)^{149} κ-casein(106–169)	2.0
Water	balance

[0132] It will be appreciated by persons skilled in the art that numerous variations and/or modifications may be made to the invention as shown in the specific embodiments without departing from the spirit or scope of the invention as broadly described. The present embodiments are, therefore, to be considered in all respects as illustrative and not restrictive.

[0133] References

[0134] Addy M (1988) Rationale for chemotherapy in the treatment of periodontal disease In: *Periodontology Today* Guggenheim B (ed) pp 281-289, Basel: Karger.

[0135] Bevins C L, Zasloff M (1990) Peptides from frog skin. *Ann Rev Biochem.* 59: 395-414.

[0136] Boman H G, Hultmark D (1987) Cell-free immunity in insects. *Ann Rev Microbiol* 41: 103-126

[0137] Brown L J, Oliver R C, Loe H (1989) Periodontal diseases in the US in 1981: Prevalence, severity, extent and role in tooth mortality. *J Periodontol* 60: 363-370.

[0138] Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J* 8: 2387-2391.

[0139] Christersson L A, Zambon J J, Dunford R G, Grossi S G, Genco R J (1989) Specific subgingival bacteria and diagnosis of gingivitis and periodontitis. *J Dent Res* 68: 1633-1639.

[0140] Clark D P, Durell S, Maloy W L, Zasloff M (1994) Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *J Biol Chem* 269: 10849-10855.

[0141] Loesch W J (1976) The Gingival Index, the plaque index and the retention index systems *J Periodontol* 38: 610-616.

[0142] Marsh P D (1991) Dentifrices containing new agents for the control of plaque and gingivitis: microbiological aspects. *J Clin Periodontol* 18: 462-467.

[0143] Migliore-Samour D, Floch F, Jolles P (1989) Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J Dairy Res* 56: 357-362.

[0144] Moore L V H, Moore W E C, Cato E P, Smibert R M, Burmeister J A, Best A M, Ranney R R (1987) Bacteriology of human gingivitis *J Dent Res* 66: 989-995.

[0145] Mor A, Nicolas P (1994) Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *Eur J Biochem* 219: 145-154.

[0146] Rogers A H, Reynolds E C (1990) The utilisation of casein and amino acids by *Streptococcus sanguis* P_4A_7 in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2545-2550.

[0147] Romeo D, Skerlavaj B, Bolognesi M, Gennaro R (1988) Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J Biol Chem* 263: 9573-9575.

[0148] Simmaco M, Barra D, Chiarini F, Noviello L, Melchiorri P, Kreil G, Richter K (1991) A family of bombinin-related peptides from the skin of Bombina variegate. *Eur J Biochem* 199: 217-222.

[0149] Spencer A J, Wright F A C, Brown D F, Hammond R H, Lewis J M (1985) A socio-dental study of

adult periodontal health: Melbourne, 1985 *Community Dental Health Monograph No* 5, Melbourne University Press.

[**0150**] Svedberg J, de Haas J, Leimenstoll G, Paul F, Teschemacher H (1985) Demonstration of β-casomorphin immunoreactive materials in in vivo digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans *Peptides* 6: 825-830.

[**0151**] Zanetti M, Storici P, Tossi A, Scocchi M, Gennaro R (1994) Molecular cloning and chemical synthesis of a novel antibacterial peptide derived from pig myeloid cells. *J Biol Chem* 269: 7855-7858.

[**0152**] Zucht H D, Raida M, Adermann K, Magert H J, Forssmann W G (1995) Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett.* 25, 372(2-3): 185-188.

SEQUENCE LISTING

<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 19

<210> SEQ ID NO 1
<211> LENGTH: 6
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine

<400> SEQUENCE: 1

Pro Gly Pro Ile Pro Asn
1 5

<210> SEQ ID NO 2
<211> LENGTH: 6
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine

<400> SEQUENCE: 2

Thr Thr Met Pro Leu Trp
1 5

<210> SEQ ID NO 3
<211> LENGTH: 21
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Bovine
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (12)...(12)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue

<400> SEQUENCE: 3

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser Pro Glu Val Ile
1 5 10 15

Glu Ser Pro Pro Glu
20

<210> SEQ ID NO 4
<211> LENGTH: 21
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (12)...(12)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue

<400> SEQUENCE: 4

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser Pro Glu Val Ile
1 5 10 15

Glu Ser Pro Pro Glu
20

<210> SEQ ID NO 5

-continued

<211> LENGTH: 21
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine

<400> SEQUENCE: 5

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser Pro Glu Val Ile
 1   5   10   15

Glu Ser Pro Pro Glu
            20

<210> SEQ ID NO 6
<211> LENGTH: 21
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine

<400> SEQUENCE: 6

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser Pro Glu Val Ile
 1   5   10   15

Glu Ser Pro Pro Glu
            20

<210> SEQ ID NO 7
<211> LENGTH: 19
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine

<400> SEQUENCE: 7

Asp Met Pro Ile Gln Ala Phe Leu Leu Tyr Gln Gln Pro Val Leu Gly
 1   5   10   15

Pro Val Arg

<210> SEQ ID NO 8
<211> LENGTH: 64
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (44)...(44)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue

<400> SEQUENCE: 8

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr
 1   5   10   15

Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu
            20   25   30

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser Pro Glu Val Ile
        35   40   45

Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val
    50   55   60

<210> SEQ ID NO 9
<211> LENGTH: 64
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (22)...(22)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (44)...(44)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue

-continued

<400> SEQUENCE: 9

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr
1 5 10 15

Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu
20 25 30

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser Pro Glu Val Ile
35 40 45

Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val
50 55 60

<210> SEQ ID NO 10
<211> LENGTH: 64
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (44)...(44)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue

<400> SEQUENCE: 10

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr
1 5 10 15

Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu
20 25 30

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser Pro Glu Val Ile
35 40 45

Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val
50 55 60

<210> SEQ ID NO 11
<211> LENGTH: 64
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (22)...(22)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (44)...(44)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue

<400> SEQUENCE: 11

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr
1 5 10 15

Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu
20 25 30

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser Pro Glu Val Ile
35 40 45

Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val
50 55 60

<210> SEQ ID NO 12
<211> LENGTH: 53
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (33)...(33)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue

-continued

<400> SEQUENCE: 12

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser
 1   5   10   15

Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala
            20   25   30

Ser Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val
        35   40   45

Thr Ser Thr Ala Val
    50

<210> SEQ ID NO 13
<211> LENGTH: 53
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (11)...(11)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (33)...(33)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue

<400> SEQUENCE: 13

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser
 1   5   10   15

Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala
            20   25   30

Ser Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val
        35   40   45

Thr Ser Thr Ala Val
    50

<210> SEQ ID NO 14
<211> LENGTH: 53
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (33)...(33)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue

<400> SEQUENCE: 14

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser
 1   5   10   15

Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp
            20   25   30

Ser Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val
        35   40   45

Thr Ser Thr Ala Val
    50

<210> SEQ ID NO 15
<211> LENGTH: 53
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (11)...(11)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue

-continued

<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: PHOSPHORYLATION
<222> LOCATION: (33)...(33)
<223> OTHER INFORMATION: phosphoseryl residue

<400> SEQUENCE: 15

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser
 1   5   10   15

Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp
            20   25   30

Ser Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val
        35   40   45

Thr Ser Thr Ala Val
    50

<210> SEQ ID NO 16
<211> LENGTH: 64
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine

<400> SEQUENCE: 16

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr
 1   5   10   15

Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu
            20   25   30

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser Pro Glu Val Ile
        35   40   45

Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val
    50   55   60

<210> SEQ ID NO 17
<211> LENGTH: 64
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine

<400> SEQUENCE: 17

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr
 1   5   10   15

Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu
            20   25   30

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser Pro Glu Val Ile
        35   40   45

Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val
    50   55   60

<210> SEQ ID NO 18
<211> LENGTH: 53
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine

<400> SEQUENCE: 18

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser
 1   5   10   15

Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala
            20   25   30

Ser Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val
        35   40   45

-continued

```
Thr Ser Thr Ala Val
    50


<210> SEQ ID NO 19
<211> LENGTH: 53
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: bovine

<400> SEQUENCE: 19

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser
 1               5                  10                  15

Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp
            20                  25                  30

Ser Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val
        35                  40                  45

Thr Ser Thr Ala Val
    50
```

1. An antimicrobial peptide, the peptide being non-glycosylated, less than about 100 amino acids and including an amino acid sequence selected from the group consisting of:

AVESTVATLEAΣPEVIESPPE, (SEQ. ID. NO. 1)

AVESTVATLEDΣPEVIESPPE, (SEQ. ID. NO. 2)

AVESTVATLEASPEVIESPPE, (SEQ. ID. NO. 3)

AVESTVATLEDSPEVIESPPE, (SEQ. ID. NO. 4)

DMPIQAFLLYQQPVLGPVR. (SEQ. ID. NO. 5)

and conservative substitutions therein.

2. An antimicrobial peptide as claimed in claim 1 in which the peptide includes an amino acid sequence selected from the group consisting of:

AVESTVATLEAΣPEVIESPPE, (SEQ. ID. NO. 1)

AVESTVATLEDΣPEVIESPPE, (SEQ. ID. NO. 2)

AVESTVATLEASPEVIESPPE, (SEQ. ID. NO. 3)

AVESTVATLEDSPEVIESPPE, and (SEQ. ID. NO. 4)

DMPIQAFLLYQQPVLGPVR. (SEQ. ID. NO. 5)

3. An antimicrobial peptide as claimed in claim 1 or claim 2 in which the peptide is less than about 70 amino acids.

4. An microbial peptide as claimed in any one of claims 1 to 3 in which the peptide includes an amino acid sequence selected from the group consisting of:

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINT VQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 6)

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINT VQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 7)

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINT VQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 8)

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINT VQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 9)

TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 10)

TEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 11)

TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 12)

TEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 13)

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIESPPEINT VQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 14)

-continued

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINT (SEQ. ID. NO. 15)
VQVTSTAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 16)

TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 17)

and conservative substitutions therein.

5. An microbial peptide as claimed in any one of claims 1 to 4 in which the peptide includes an amino acid sequence selected from the group consisting of:

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINT (SEQ. ID. NO. 6)
VQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINT (SEQ. ID. NO. 7)
VQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINT (SEQ. ID. NO. 8)
VQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINT (SEQ. ID. NO. 9)
VQVTSTAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 10)

TEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 11)

TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 12)

TEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 13)

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIESPPEINT. (SEQ. ID. NO. 14)
VQVTSTAV;

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINT (SEQ. ID. NO. 15)
VQVTSTAV;

TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIESPPEINTVQVTSTAV; and (SEQ. ID. NO. 16)

TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 17)

6. An antimicrobial peptide as claimed in any one of claims 1 to 5 in which the peptide is selected from the group consisting of:

AVESTVATLEAΣPEVIESPPE, (SEQ. ID. NO. 1)

AVESTVATLEDΣPEVIESPPE, (SEQ. ID. NO. 2)

AVESTVATLEASPEVIESPPE, (SEQ. ID. NO. 3)

AVESTVATLEDSPEVIESPPE, (SEQ. ID. NO. 4)

DMPIQAFLLYQQPVLGPVR. (SEQ. ID. NO. 5)

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINT (SEQ. ID. NO. 6)
VQVTSTAV;

-continued

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINT VQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 7)

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINT VQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 8)

MAIPPKKNQDKTEIPTNTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINT VQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 9)

TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 10)

TEIPTINTIAΣGEPTSTPTIEAVESTVATLEAΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 11)

TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 12)

TEIPTINTIAΣGEPTSTPTTEAVESTVATLEDΣPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 13)

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIESPPEINT VQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 14)

MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINT VQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 15)

TEIPTINTIASGEPTSTPTIEAVESTVATLEASPEVIESPPEINTVQVTSTAV; and (SEQ. ID. NO. 16)

TEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTAV; (SEQ. ID. NO. 17)

7. A chimeric compound, the compound including the peptide as claimed in any one of claims 1 to 6 conjugated to a non-peptide molecule.

8. A chimeric compound as claimed in claim 7 in which the non-peptide portion of the molecule includes acyl groups.

9. An antimicrobial composition, the composition including the peptide as claimed in any one of claims 1 to 6 and an acceptable carrier.

10. A method of treating or preventing dental caries or periodontal disease in a subject, the method comprising the step of administering a peptide as claimed in any one of claims 1 to 6 or the composition as claimed in claim 9 to the teeth or gums of the subject in need of such treatments.

* * * * *

US 20030206969A1

(19) United States

(12) Patent Application Publication (10) Pub. No.: US 2003/0206969 A1

Nidamarty et al. (43) Pub. Date: Nov. 6, 2003

(54) **PRENATAL MULTIVITAMIN/MULTIMINERAL SUPPLEMENT**

(75) Inventors: **Prasad Nidamarty**, Miamisburg, OH (US); **William R. Hurd**, Noblesville, IN (US); **Roland J. Bydlon**, Indianapolis, IN (US); **William C. Williams**, Indianapolis, IN (US); **Michael Dempsey**, Columbus, IN (US); **Amy Erbskorn**, Dublin, OH (US)

Correspondence Address:
G. Prabhakar Reddy
Wood, Herron & Evans, L.L.P.
2700 Carew Tower
441 Vine Street
Cincinnati, OH 45202-2917 (US)

(73) Assignee: **Integrity Pharmaceutical Corporation**, Fishers, IN (US)

(21) Appl. No.: **10/375,600**

(22) Filed: **Feb. 27, 2003**

Related U.S. Application Data

(60) Provisional application No. 60/377,339, filed on May 2, 2002.

Publication Classification

(51) **Int. Cl.**[7] **A61K 31/555**; A61K 31/295; A61K 33/26

(52) **U.S. Cl.** **424/648**; 514/184; 514/502

(57) **ABSTRACT**

Multivitamin/Multimineral supplements are provided for supplementing iron and desirable nutrients in the diet of mammals. The supplements include an iron-amino acid chelate, a form of iron more bioavailable than traditional iron salts. The supplements may further include a pharmaceutically accepted salt form of iron as well as other nutritional vitamins and minerals. The supplements are useful for providing iron for pregnant and lactating females as well as for persons suffering from anemia.

PRENATAL MULTIVITAMIN/MULTIMINERAL SUPPLEMENT

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0001] I. Field of the Invention

[0002] The present invention relates generally to a composition for a multivitamin/multimineral supplement and more specifically, to a composition useful as a prenatal iron supplement.

[0003] II. Description of the Prior Art

[0004] Iron is needed for the production of red blood cells and for a healthy circulatory system used to deliver nutrients and energy to muscles, organs, and other bodily tissue for maintaining a strong and healthy body. Particularly, iron occupies a central position in hemoglobin synthesis and erythropoiesis. An iron deficiency generally interferes with this process and, in time, often leads to anemia. The signs and symptoms of iron deficiency are generally attributable to the anemia it produces. Symptoms include weakness, fatigue, dizziness, heart palpitations, nausea, anorexia, constipation and menstrual irregularities. In the United States, it is estimated that about 2% of the men and more than about 15% of the women of child bearing age are deficient in iron. For example, a study estimated that about 38% of women of child bearing age in San Diego are iron deficient. It is therefore desirable to provide an iron supplement for reducing iron deficiency.

[0005] Blood loss is the most common cause of iron deficiency in adults. The high deficiency of iron in women is due to the obligatory blood loss of each menstrual cycle. Bleeding from the gastrointestinal tract (for example, because of peptic ulcer, diverticulosos, or malignancy) is the primary cause of iron deficiency in men. Impaired absorption of iron following total or partial gastrectomy and in patients with chronic diarrhea and/or malabsorption may also cause depletion of iron reserves. Increased demand for iron in infants, young children, adolescents, and adults may also lead to an iron-deficiency state. Lifestyle changes resulting from increased workloads, exercise, and/or routine physical activity for example, cause bodily changes generally leading to an increase in the demand for iron. For example, pregnancy generally increases the demands for iron in a woman's body. Particularly, during the second half of pregnancy, the demands for iron are significant. The increased demand for iron is frequently compounded by inadequate intake of iron because of an iron poor diet. It is therefore desirable to provide an iron supplement for addressing iron deficiency, anemia, and the increase in demands for iron.

[0006] Further related to pregnancy, a supplement of iron is important because many health problems with the mother and/or fetus may be associated with an inadequate amount of dietary iron. For example, anemia during pregnancy is associated with a significant increase in maternal mortality. Particularly, anemia in the third trimester can be dangerous if left untreated. Statistically, up to about 20% of all pregnant women suffer from anemia. Generally, as the pregnancy progresses, the demands for iron rise and, in many cases, these growing demands cannot be met by either the iron provided in a mother's normal diet or by her body's own iron reserves. Accordingly, iron supplementation is needed throughout the term of a pregnancy and for as long as a woman is lactating.

[0007] To address anemia as well as the increasing demands of iron, it has been recommended that a supplementation of iron be given to ensure that approximately 3 mg of iron is absorbed into the body per day. The prior art has provided supplementation of iron for the body through the use of caplets, tablets, soft/hard shell capsules, and suspensions including an iron salt. There are many iron salts included in supplements, such as ferric salts (Fe^{3+}), ferrous salts (Fe^{2+}) and carbonyl iron. Examples of ferrous iron salts include ferrous sulfate and ferrous fumarate

[0008] The use of iron salts, as with most metal salts, however, generally presents weaknesses and drawbacks. When supplements including commonly used ferric (Fe^{3+}) salts (also referred to as iron (III) salts) are ingested and exposed to gastric juices having an acidic pH of between 1 and 3 in the stomach, the ferric iron (Fe^{3+}) is converted to ferrous iron (Fe^{2+}). It is this ferrous state of the iron that is most absorbed by the small intestine. However, conversion of the ferric iron (Fe^{3+}) to the ferrous iron (Fe^{2+}) form causes gastric upset and abdominal pain. In fact, a large percentage of patients that consume common iron salts complain of gastrointestinal tract upset. Further, such conversion results in a small, unsatisfactory percentage of the total iron in the supplement being absorbed. It would, therefore, be desirable to have a supplement wherein the iron is absorbed without an accompanying gastrointestinal upset and discomfort.

[0009] Further, organic or inorganic salt forms of iron are difficult to absorb in the human body and, therefore, are needed in large amounts to satisfy the daily iron requirements and the increase in iron demand. More specifically, following ingestion and ionization of an iron salt, such as ferrous sulfate ($FeSO_4$), it is eventually transported to the small intestine where the majority of absorption takes place. Generally, absorption begins in the duodenum in a mildly acidic fluid environment (pH of about 5-6), and is maximal in the upper jejunum where the fluid is mildly basic (pH of about 7-8). The intestinal walls possess charges on the luminal surface that present a challenge for the passage or absorption of positively charged cationic metal species (Fe^{2+}) to pass through the intestinal wall. These charges, however, allow the negatively charged anionic counter ion species (SO_4^{-2}) to pass through the intestinal membrane. Thus, most of the vital metal (positive cationic metal) is generally excreted from the body through the intestinal tract while the absorbed anions are cleared hepatically and exit the body in the urine. Such metabolic pathways are further discussed in Kirchoff, H. W. *"The Treatment of Iron Deficiency Anemia with Iron Chelate Tablets"*, Therapiewoche 33(37), 4833-4842, 1983, the disclosure of which is herein incorporated by reference in its entirety.

[0010] Efforts have been made to increase the absorption and decrease the clearance of iron by the body. More specifically, increasing the concentration of the iron in salt forms utilizing organic or inorganic carriers associated with the iron have produced only limited success and have drawbacks associated therewith. For example, ferrous sulfate is the most widely used form of iron supplementation, particularly for pregnant and lactating females, and for treating various forms of iron deficiency anemia, as described in Schuette, S., et al., *"Comparison of Tolerability between Bisglycino-iron and Ferrous Sulfate in Normal Premenopausal Women"*, Final Report to Albion Labs, University of Chicago, 1989, the disclosure of which is

herein incorporated by reference in its entirety. However, while ferrous sulfate is absorbed into the blood stream and is widely prescribed, it too is sometimes not very well tolerated and produces abdominal discomfort and changes in bowel habits. This adversely affects treatment compliance in that patients frequently complain about gastric side effects such as diarrhea, constipation, abdominal pain, and nausea. Many times, this discomfort is the primary reason that a patient will stop taking a prescribed regimen. Thus, more tolerable forms of iron therapy would be desirable.

[0011] Further, patients may stop taking an iron-containing supplement as part of a prescribed regimen because the size of the supplement may be too large and, therefore, uncomfortable or difficult to swallow. Particularly, with respect to iron, due to the gastric conversion, low absorption, and high clearance rates of prior art forms of iron, large quantities of the iron need to be ingested in order to achieve the absorption of the recommended 3 mg of iron per day. In addition, the supplement itself may have a bad after taste. This is particularly true for expectant mothers, because upon becoming pregnant, the woman's sense of taste and smell and her ability to swallow certain foods changes. This often makes it difficult for a pregnant woman to maintain a regimen of ingesting prescribed supplements containing iron salts. Additionally, pregnant women generally consider a prenatal vitamin to be large and hard to swallow. For this reason, many women do not take prenatal vitamins according to the regimen their health care providers have prescribed or recommended.

[0012] As a result of the above drawbacks, many humans fail to take iron supplements as part of a required regimen. Consequently, iron levels often fall below those recommended, and the person may become anemic. Particularly, pregnant and lactating females failing to take prenatal vitamins as required may not get the nutrition that they and their developing fetus require. Consequently, many problems may arise with the pregnancy and/or with the child, up to and including mortality.

[0013] Thus, it would be desirable to provide a composition to supplement iron in a diet while avoiding deleterious side effects in the gastrointestinal tract. It would also be desirable to provide such a composition in a suitable dosage form, such as a tablet, containing iron in a form highly absorbed into the blood. It would be further desirable to reduce the size of the composition in order to facilitate adherence to a dosage regimen. To this end, it would be still further desirable that the regimen be satisfied by ingesting a single tablet once or only a few times per day. Compliance with a prenatal multivitamin/multimineral supplement is optimized with a once-a-day dosage. Finally, it would be desirable to accomplish the above while maintaining iron levels in pregnant females, particularly those suffering from anemia and/or in their third trimester, and lactating females at medically desirable levels.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0014] The present invention addresses the problems associated with the prior art supplements containing iron and reduces or eliminates their weaknesses and drawbacks previously described. In doing so, the present invention provides a composition including a bioavailable source of iron in the form of an iron-amino acid chelate, such as ferrous bis-glycinate chelate, which may be combined with a more concentrated pharmaceutically acceptable salt form of iron, such as ferrous fumarate, in a single dosage form, such as a pill, a tablet, a caplet, or a capsule. Both ferrous bis-glycinate chelate and ferrous fumarate reduce the gastrointestinal side effects caused by other commonly used iron salts. The present compositions are useful for supplementing iron to mammals in general, and in particular to pregnant and lactating females.

[0015] Inclusion of an iron-amino acid chelate as a source of iron provides many benefits. The iron-amino acid chelate is a coordinated complex wherein the iron atom is coordinated with one or more amino acids or peptides. By virtue of the coordinated nature of iron-amino acid chelate, the iron atom in the chelate is chemically neutral and not ionized or charged. To this end, the iron is more readily absorbed through the intestinal wall and into the blood stream. In one embodiment of the present invention, the iron-amino acid chelate is ferrous bis-glycinate chelate. One form of ferrous bis-glycinate chelate is commercially available from Albion Laboratories, Inc., of Clearfield, Utah, and sold under the trade name of Ferrochel®.

[0016] Ferrous bis-glycinate chelate generally has greater bioavailability relative to other conventional forms of iron. In addition, ferrous bis-glycinate chelate is stable, further contributing to its beneficial bioavailability properties. Further, ferrous bis-glycinate chelate presents fewer side effects than more commonly used iron salts, such as ferrous sulfate. The increased bioavailability and reduced side effects makes ferrous bis-glycinate chelate particularly attractive for inclusion in iron supplements, particularly those directed to pregnant females and especially to pregnant females in their third trimester and/or suffering from anemia. Moreover, the high oral bioavailability of ferrous bis-glycinate chelate allows the dosage amount to be generally smaller than prior art forms of iron. Consequently, the present composition may be small relative to the size of prior art supplements. Thus, the present invention provides compositions which are easier to swallow and more likely to be ingested.

[0017] In one aspect of the present invention, a combination of ferrous bis-glycinate chelate and ferrous fumarate is present in a pharmaceutically acceptable formulation to deliver elemental iron to a mammal in a single dosage. Generally, in order to properly supplement dietary iron to the recommended daily allowance of 3 mg, a once-a-day dosage of at least approximately 20 mg of a suitable form of iron is needed. Ferrous bis-glycinate chelate is approximately 20% elemental iron, whereas ferrous fumarate is approximately 33% elemental iron. By combining ferrous bis-glycinate chelate and ferrous fumarate in a single composition, a higher percentage of iron can be absorbed into the blood circulation with a corresponding reduction in the total weight and volume of the iron, and as a result, a reduction in the overall size of the dosage form. Thus, a combination of ferrous fumarate and ferrous bis-glycinate chelate in a composition may provide the iron supplementation needed by iron deficient patients as well as pregnant or lactating women in a small sized tablet without deleterious gastrointestinal side effects. To this end, this combination is useful as a pre-natal tablet for administration to pregnant or lactating females. Further, a smaller dosage size increases the likelihood of patient compliance with a regimen. In another aspect, the combination further includes vitamins

and minerals to form a multivitamin/multimineral supplement. In yet another aspect of the present invention, ferrous bis-glycinate chelate is combined with folic acid in a suitable formulation and used to treat anemia in pregnant females, particularly pregnant females in the third trimester.

[0018] These and other benefits and advantages of the composition of the present invention shall be apparent to persons of ordinary skill in the art with reference to the following detailed description of the invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0019] The present invention provides compositions including a bioavailable form of iron in an iron-amino acid chelate, in a single pharmaceutically acceptable dosage form, such as a pill, a tablet, a caplet, or a capsule, suitable for ingestion. The iron-amino acid chelate may be combined with a more concentrated, pharmaceutically acceptable salt form of iron, such as a ferrous iron salt (Fe^{2+}). In one embodiment of the present invention, the composition includes a combination of ferrous bis-glycinate chelate as an iron-amino acid chelate and ferrous fumarate as a pharmaceutically acceptable salt form of iron. Ferrous bis-glycinate chelate generally has greater bioavailability than previously disclosed iron salts. Also, both ferrous bis-glycinate chelate and ferrous fumarate alleviate the gastrointestinal side effects often present when using other common iron salts, as described in Schuett, Sally et al., *Comparison of Tolerability Between Bisglycino-iron and Ferrous Sulfate in Normal Premenopausal Women,* Final Report to Albion Laboratories, University of Chicago, 1989; Dawson, Earl B., et al., *Bioavailability of Iron in Two Prenatal Multivitamin/Multimineral Supplements,* The Journal of Reproductive Medicine, Vol. 45, No. 5, May 2000, pp. 403-409; and Coplin, Maggie et al., *Tolerability of Iron: A Comparison of Bis-Glycino Iron II and Ferrous Sulfate,* Clinical Therapeutics, Vol. 13, No. 5, 1991, the disclosures of which are herein incorporated by reference in their entireties. The high bioavailable properties of the iron-amino acid chelate in compositions of the present invention allows for a lower overall iron dosage and a smaller composition relative to the iron supplements of the prior art. This generally results in improved patient compliance with a dosage regimen.

[0020] The iron-amino acid chelate is more generally a metal-ligand chelate. A metal-ligand chelate is typically formed from the reaction of a metal or a metal ion in the form of a metal salt with one or more reactive ligands. The chelate will generally have a metal:ligand mole ratio of 1:1-3 depending on the metal and ligand in question and its valence or particular oxidation state. In one embodiment of the present invention, the metal:ligand mole ration is 1:2. The metal-ligand chelate is a complex or coordination compound comprising a metal ion associated with one or more ligands, such as amino acids, via electron donating groups on each ligand. The term "chelate" also refers to the mode of association between the metal and the ligand(s) and generally includes covalent bonds and ionic associations. Chelates comprising coordinate covalent bonds between the metal and the ligand are typically inert and uncharged. When a single electron donor ligand containing two or more donor groups is chelated to a single metal atom, the ligand is generally referred to as a polydentate ligand. For example, a bidentate ligand has two donor groups chelated to a single metal atom. Suitable ligands for metals include, without limitation, natural and unnatural amino acids, such as alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, cysteine, cystine, glutamine, glutamic acid, glycine, histidine, hydroxyproline, isoleucine, lysine, leucine, methionine, ornithine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, and valine. Suitable ligands also include combinations of the amino acids, such as in the form of dipeptides, tripeptides, quadrapeptides, or polypeptides for example. Amino acid ligands may chelate with a metal atom to form a sterically permissible four, five, and sometimes six-membered ring structure and neutralize the positive charge of the metal by the electron pairs available on the carboxylic acid and/or the amine functional groups. At least two and sometimes three amino acids can be bound to a single metal atom, depending on its oxidative state, to form a bicyclic and/or tricyclic ringed complex. A metal atom, such as iron, covalently bound to one or more amino acid ligands is chemically inert and may more easily be absorbed through the small intestine into the circulatory system.

[0021] The term "iron-amino acid chelate", as used herein, is intended to refer to iron complexes comprising at least one iron atom chelated to one or more amino acid ligands in a manner described above. Iron-amino acid chelates generally have greater bioavailability than other forms of iron by virtue of a chemically inert iron and enhanced absorption of the chelate through the intestinal wall due to a reduced or absence of charge interference. Suitable iron-amino acid chelates for the present invention include, for example, ferrous bis-glycinate chelate.

[0022] Ferrous bis-glycinate chelate is an iron complex having a single polyvalent cationic iron atom bound to lone electron pairs of the amine and carboxylic acid functional groups of two glycine ligands. Each glycine molecule forms a five-membered ring with the iron atom. Structurally, the ring also includes an active carboxyl oxygen atom, a carbonyl carbon atom, an alpha carbon atom, and an alpha nitrogen atom, with adjacent atoms bound by coordinate covalent bonding. The structure of ferrous bis-glycinate chelate is described in more detail in Ashmead, H. DeWayne, "*Comparative Intestinal Absorption and Subsequent Metabolism of Metal Amino Acid Chelates and Inorganic Metal Salts*", in Subramanian, K. S., et al., Biological and Trace Element Research, American Chemical Society, Washington D.C., pp. 306-319, 1991, the disclosure of which is herein incorporated by reference in its entirety.

[0023] One form of ferrous bis-glycinate chelate is commercially available from Albion Laboratories Incorporated of Clearfield, Utah, and sold under the trade name Ferrochel®. Ferrochel® is a free flowing, fine granular powder that provides a high bioavailable source of ferrous iron that is typically complexed or chelated with the amino acid glycine. In one embodiment of the present invention, a combination of ferrous bis-glycinate chelate, such as Ferrochel®, and ferrous fumarate is formulated in a multivitamin/multimineral supplement for delivering elemental iron to pregnant or lactating women. Ferrous bis-glycinate chelate is also a stable form of iron. In addition, data from human and animal studies indicate that the ferrous bis-glycinate chelate is more readily bioavailable with fewer side effects than more commonly used iron salts, such as ferrous sulphate. Commercially available Ferrochel® may also contain

iron-glycine chelation complexes other than the structure of ferrous bis-glycinate chelate described above, but in minute quantities.

[0024] Following ingestion, metal salts are generally ionized in the stomach upon exposure to the acidic gastric juices to form metal-cations and salt-anions depending on the particular metal, as described in Ashmead, H. DeWayne, *Comparative Intestinal Absorption and Subsequent Metabolism of Metal Amino Acid Chelates and Inorganic Metal Salts,* in Subramanian, K. S., et al., Biological Trace Element Research, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 306-319, 1991, the disclosure of which is herein incorporated by reference in its entirety. Assuming that no interfering chemical reactions occur, the cations enter the small intestine and typically bind to carrier proteins embedded in the lumigal membrane of the mucosal cells and are transported into the interior of the mucosal cell. The metals, also generally referred to as minerals, enter the cell either by active transport or by passive diffusion. This absorption can occur anywhere in the small intestine, but generally starts in the duodenum where solubility of the metal ion in the intestinal fluid improves due to a mildly acidic pH of the fluid (pH of about 5-6). Absorption is optimal in the upper jejunum where solubility is even greater in fluid having a mildly basic pH of about 7-8.

[0025] In the case of a metal-amino acid chelate, the metal ion, such as iron, in the chelate is chemically inert due to the coordinate covalent bonding of the amino acid ligands as described above. To this end, absorption of the chelate is not affected by precipitating salt-anions and free metal-cations as is the case with soluble metal salts. Furthermore, fats and fibers do not interfere with the absorption of the chelate due to the high formation constant (or the low dissociation constant). Thus, the iron uptake into circulation is increased by the use of an iron-amino acid chelate in accordance with the present invention. To this end, compositions including an iron-amino acid chelate, such as ferrous bis-glycinate chelate, provide increased bioavailability of the iron into the blood thereby providing greater efficiency in supplementing iron in a diet.

[0026] Besides the neutral state of a metal in a chelate, stability of the chelate is also a factor affecting bioavailability of the metal. Particularly, stability of the chelate to digestive enzymes and acid in the stomach plays a key role in bioavailability. To enhance stability in the digestive tract, it is advantageous for the chelate to have one or only a few amino acids forming a low molecular weight chelate, rather than having a multitude of amino acids forming a high molecular weight chelate. Beneficial low molecular weight chelates should have a total molecular weight, including the metal, of less than 1500. Low molecular weight metal-amino acid chelates, and particularly iron-amino acid chelates, are generally sufficiently stable and structurally survive enzymes and other elements of the digestive process. Moreover, smaller sized chelates generally resemble many of the characteristics of a dipeptide in terms of their stability properties. Ferrous bis-glycinate chelate, having only two glycine ligands bound to a single iron atom, is a suitable low molecular weight chelate. Without alteration in chemical structure during digestion, the ferrous bis-glycinate chelate can easily travel through the intestine, as would a dipeptide-like molecule. In addition, its relatively lower molecular weight facilitates the absorption of the chelate as an intact molecule, similar to that of a dipeptide molecule.

[0027] A high molecular weight metal-amino acid chelate, resulting from large molecular weight ligands such as polypeptides or proteins, has less chance of survival in the digestive tract. When a metal is "sequestered" in a chelate having a large, structural mass and a large molecular weight, the chelate may not be able to transport the metal ion through the mucosal membrane due to hydrolysis in the intestinal lumen. More specifically, increased hydrolysis of the amino acid polypeptide or protein ligands occur in the intestinal lumen leaving more free carboxylic acid and free amine fragments, rendering the chelate more hydrophilic and, therefore, more difficult to absorb. In addition, hydrolyzing enzymes may also break the links between the metal and the ligand further decreasing the ability of the chelate to transport the sequestered metal through the intestinal wall. The resulting free metal cation is subject to all the chemical reactions interfering with the absorption of the metal through the intestine.

[0028] Another reason that metal-amino acid chelates are a more bioavailable form of a metal than typical metal salts is because the structural complex of the chelate is generally capable of resisting the acidic pH of the stomach and surviving the digestive process better than commonly used metal salts. For example, the covalent complex of an iron-amino acid chelate is able to better resist the action of peptidases in the stomach, preventing breakage of internal peptide links and ionic associations between the ligand and iron atom, than most iron salts. To this end, an iron-amino acid chelate is less likely to be chemically degraded by the acidity in the stomach than other forms of iron. Moreover, a high stability constant for the iron-amino acid chelate also contributes to the bioavailability of the iron. Consequently, an intact metal-amino acid chelate is generally better absorbed through the intestinal membranes, thereby rendering the metal more bioavailable to the body, than less absorbed metal forms, as described in Ashmead, H. DeWayne, *Comparative Intestinal Absorption and Subsequent Metabolism of Metal Amino Acid Chelates and Inorganic Metal Salts.*

[0029] Iron-amino acid chelates, such as ferrous bis-glycinate chelate, may be used as the sole source of iron in the composition for supplementing dietary iron. However, it may also be combined with other bioavailable forms of iron. Alternate forms of bioavailabile iron include, without limitation, pharmaceutically acceptable salts. The term "pharmaceutically acceptable salts", as used herein, is intended to include all possible salt forms of iron that are government approved and, therefore, safe for ingestion. The term "salt", as used herein, is intended to refer to an ionic association of one or more charged species, either acids or bases, to one or more molecules of iron. Examples of suitable pharmaceutically acceptable salts of iron include, without limitation, ferric salts and ferrous salts. Examples of ferrous salts include, without limitation, ferrous fumarate, ferrous sulfate, ferrous succinate, ferrous gluconate, ferrous lactate, ferrous tartrate, and ferrous citrate. In one aspect of the present invention, the iron amino-acid chelate is combined with ferrous fumarate in a pharmaceutically acceptable dosage formulation for iron supplementation to mammals.

[0030] Ferrous fumarate ($C_4H_2FeO_4$) is the fumaric acid salt of elemental iron. More specifically, the carboxyl groups of both acids of a single fumaric acid molecule form a bi-dentate coordinate structure with iron to result in a stable,

bioavailable iron salt having an iron:fumaric acid mole ratio or 1:1. Ferrous fumarate is a relatively concentrated form of iron (33% by weight is elemental iron) and, therefore, may be used in a dietary supplement to treat and prevent iron deficiencies in the body and particularly, iron deficiency anemia in pregnant females. Ferrous fumarate may be prepared by conventional methods known in the art. For example, one method of preparing ferrous fumarate is by combining hot aqueous solutions of ferrous sulfate and sodium fumarate, both of which are commercially available, and filtering the ferrous fumarate formed from the resulting slurry for separation thereof.

[0031] Where ferrous bis-glycinate chelate is used as the sole source of iron in the composition, a certain weight of the chelate would be needed to provide the recommended daily allowance of iron, particularly for a female during pregnancy and lactation. The amount of each form of iron will generally affect the overall size of the resulting tablet or other dosage form. In order to properly supplement dietary iron to the recommended daily allowance of about 3 mg, a once-a-day dosage of at least about 20 mg of elemental iron is generally needed. Ferrous bis-glycinate chelate is approximately 20% elemental iron by weight. Therefore, to obtain an equivalent dose of 20 mg of elemental iron, 100 mg of ferrous bis-glycinate chelate would need to be consumed. However, many pharmaceutically acceptable salt forms of elemental iron are often more concentrated in iron than a chelate and, therefore, would be required in smaller amounts to obtain the equivalent dose. For example, ferrous fumarate is approximately 33% elemental iron by weight. Therefore, to obtain a dose of 20 mg of elemental iron, about 60.6 mg of ferrous fumarate would need to be consumed, thereby resulting in a reduction in the size of the tablet. However, the improved oral bioavailability of the iron-amino acid chelate relative that of the pharmaceutically acceptable salt form offsets some of the concentration benefits of the salt form. Thus, a combination of an iron-amino acid chelate, such as Ferrochel®, with a second bioavailable form of elemental iron, such as ferrous fumarate, provides advantages related to the size of the supplement and ultimately to compliance with a dosage regimen.

[0032] In one embodiment of the present invention, the composition includes iron having a total weight sufficient for proper dietary supplementation in accordance with recommended dosages. In another embodiment, the composition includes iron having a total weight in a range from about 5 mg to about 200 mg. The iron may be provided completely as an iron-amino acid chelate or in combination with one or more iron salts. In another embodiment, the composition includes an iron-amino acid chelate in an amount sufficient to provide at least about 25% of the total weight of the iron in the composition. In yet another embodiment, the iron-amino acid chelate provides at least about 75% of the total weight, and in yet a further embodiment, it provides at least about 90% of the total weight of iron. In still a further embodiment, the iron-amino acid chelate contains about 25% to about 75% of the total weight of the iron in the composition, with the remaining iron contained in an alternate form of iron. In yet another embodiment, the iron-amino acid chelate contains about 25% to about 90% of the total weight of the iron in the composition, with the remaining iron contained as ferrous fumarate. Further embodiments include a combination of ferrous bis-glycinate chelate and ferrous fumarate as the bioavailable forms of iron. In one further embodiment, the ferrous fumarate contains about 75% and ferrous bis-glycinate chelate contains about 25% of the total weight of the iron present in the composition.

[0033] Where the composition includes a combination of forms of iron, i.e., an iron-amino acid chelate with another form of iron, the weights of each form are considered in providing the total weight of the iron for a reasonably sized composition. In one embodiment of the present invention, the composition includes the iron-amino acid chelate in a range from about 10 mg to about 200 mg. For a pregnant or lactating female, the composition may be a prenatal supplementary composition including about 69 mg of ferrous fumarate, which is about 22 mg of free elemental iron, and about 37 mg of ferrous bis-glycinate chelate, which is about 7.2 mg of elemental iron. Such a composition has a weight ratio of ferrous fumarate to ferrous bis-glycinate chelate of about 2-3:1 for providing bioavailable iron to the female. Altering the amounts of the iron-amino acid chelate with other forms of iron balances the benefits between the final size of the composition and the total amount of iron included therein, while providing an iron dose sufficient to be ingested once a day and meet the daily requirements of iron.

[0034] While the present composition includes one or more bioavailable forms of iron, the composition may further include vitamins and minerals, or pharmaceutically acceptable forms thereof, for administration as a vitamin/mineral supplement. In one aspect of the present invention, the composition includes multiple vitamins and multiple minerals and may be administered as a multivitamin/multimineral supplement. The term "pharmaceutically acceptable", as used herein with reference to a vitamin or a mineral, generally refers to all biologically acceptable forms of the vitamin and mineral, such as salt forms. The term "biologically acceptable" generally refers to a form safe for mammalian consumption. Vitamins and minerals, in general, are desirable for health reasons. Examples of suitable vitamins and minerals are listed below along with their health benefits. Without limitation, exemplary vitamins include vitamin A, vitamin B complex vitamins, vitamin C, vitamin D, vitamin E, and vitamin K.

[0035] When vitamin A is present in the composition, it is present in a range of about 0.002 mg to about 15 mg, or in a range of about 1 IU to about 7500 IU in a single dosage form. The generally accepted conversion rate of vitamin A is about 500,000 IU per gram. In one embodiment of the present invention vitamin A is beta-carotene present in about 8 mg to about 9 mg.

[0036] Non-limiting exemplary vitamin B complex vitamins include thiamine (B_1), riboflavin (B_2), niacin (niacinamide), pyridoxine (B_6), cyanocobalamin (B_{12}), biotin, pantothenic acid, folic acid, inositol or combinations thereof. Vitamin B_1, or thiamine, is essential for growth and the prevention of beriberi. When vitamin B_1 is present in the composition, it is present in a range of about 0.5 mg to about 50 mg in a single dosage form. In one embodiment, the vitamin B_1 is a monohydrate or mononitrate and present in a range of about 2.0 mg to about 2.5 mg.

[0037] Vitamin B_2, or riboflavin, is known to promote growth, particularly by functioning as a flavoprotein in tissue respiration. When vitamin B_2 is present in the composition, it is present in a range of about 0.5 mg to about 50 mg in a single dosage form. In one embodiment, the vitamin B_2 is present in a range of about 4.5 mg to about 5.5 mg.

[0038] Vitamin B_6, or pyridoxine, is believed to be helpful for fat metabolism, for dehydration and desulfhydration of amino acids, and for normal trypsin metabolism. Vitamin B_6 is also known to be useful for the treatment of nausea. When vitamin B_6 is present in the composition, it is present in a range of about 0.1 mg to about 200 mg in a single dosage form. In one embodiment, the vitamin B_6 is the HCl salt of pyridoxine and present in the composition in a range of about 40 mg to about 45 mg.

[0039] Vitamin B_{12}, or one of the three active forms, i.e., cyanocobalamin, hydroxocobalamin, and nitrocobalamin, is believed to influence nucleic acid synthesis, fat metabolism, conversion of carbohydrate to fat, and metabolism of glycine, serine, methionine, and choline. When vitamin B_{12} is present in the composition, it is present in a range of about 2 mcg to about 250 mcg in a single dosage form. In one embodiment, the vitamin B12 is present as 1% spray dried on starch and in a range of about 1.2 mg to about 1.7 mg.

[0040] Niacin (nicotinic acid) or its amide form, niacinamide, is believed necessary, along with other vitamins, for the prevention and cure of pellagra in humans. In addition, it functions in protein and carbohydrate metabolism. When niacinamide is present in the composition, it is present in a range of about 1 mg to about 100 mg in a single dosage form.

[0041] Folic acid has many known advantages and may be included in the composition. Particularly, folic acid is useful for the prevention of neural tube defects, particularly in a developing fetus. In one embodiment of the present invention, it is included in a range of about 0.01 mg to about 5 mg in a single dosage form. In another embodiment, folic acid is present in the composition in combination with an iron-amino acid chelate, such as ferrous bis-glycinate chelate, to form a supplement for treating anemia in a pregnant female. Ferrous bis-glycinate chelate and folic acid are useful for administration to a pregnant female in the third trimester of the pregnancy when anemia and anemia related symptoms generally are dangerous to both the expectant mother and the fetus. In yet another embodiment, the supplement includes about 80 mg of Ferrochel® combined with about 1 mg of folic acid in the form of a tablet for supplementing iron in pregnant females.

[0042] Vitamin C is known to be essential for the prevention of scurvy in humans. It also increases resistance to infections. When vitamin C is present in the composition, it is present in a range of about 10 mg to about 1000 mg in a single dosage form. In one embodiment, the vitamin C (ascorbic acid) or the pharmaceutically acceptable salt thereof, such as calcium ascorbate and sodium ascorbate, is present in about 130 mg to about 160 mg.

[0043] When vitamin D is present in the composition, it is present in a range of about 0.001 mg to about 0.6 mg in a single dosage form. Suitable D vitamins include, for example, vitamin D_3 (cholecalciferol) present in range above, or in a range of about 1 IU to about 600 IU wherein the conversion rate of vitamin D_3 is about 1,000,000 IU per gram.

[0044] When vitamin E is present in the composition, it is present in a range of about 1 mg to about 125 mg in a single dosage form. In one embodiment, the vitamin E (tocopherols) is a mixture of different tocopherols or the same tocopherol, such as di-alpha tocopheryl acetate, and present in the range above, or in a range of about 1 IU to about 100 IU wherein the conversion rate of vitamin E is about 800 IU per gram. In another embodiment, mixed tocopherols are present in about 45 mg in a single dosage of the composition.

[0045] Minerals that may be included in the present compositions are non-iron minerals. Non-limiting exemplary non-iron minerals include calcium, copper, zinc, magnesium, or their pharmaceutically accepted salts. Calcium is useful in the development of bones. When calcium is present in the composition, it is present in a range of about 20 mg to about 1000 mg in a single dosage form. In one embodiment, the calcium is a pharmaceutically acceptable form, such as calcium carbonate, and present in a range of about 80 mg to about 110 mg.

[0046] When copper is present in the composition, it is present in a range of about 0.1 mg to about 10 mg in a single dosage form. In one embodiment, the copper is a pharmaceutically acceptable form, such as cupric oxide, and present in a range of about 2.3 mg to about 3.0 mg.

[0047] When zinc is present in the composition, it is present in a range of about 5 mg to about 100 mg in a single dosage form. In one embodiment, the zinc is a pharmaceutically acceptable form, such as zinc oxide, and present in a range of about 30 mg to about 35 mg.

[0048] When magnesium is present in the composition, it is present in a range of 0.1 mg to about 400 mg in a single dosage form. Biologically acceptable forms of magnesium, such as magnesium oxide, are suitable for the compositions of the present invention.

[0049] In one exemplary embodiment, the multivitamin/multimineral supplement of the present invention contains iron in two bioavailable forms, an iron-amino acid chelate and a pharmaceutically acceptable salt form of iron, in combination with additional vitamins and minerals in the following ranges: vitamin A in the range of 0 IU to about 6,500 IU; vitamin B_1 in the range of about 0.5 mg to about 50 mg; vitamin B_2 in the range of about 0.5 mg to about 50 mg; vitamin B_6 being present in the range of about 0.1 mg to about 200 mg; vitamin B_{12} being present in the range of about 2 mcg to about 250 mcg; niacinamide in the range of about 1 mg to about 100 mg; folic acid in the range of about 0.1 mg to about 5 mg; vitamin C in the range of about 10 mg to about 1000 mg; vitamin D in the range of about 1 IU to about 600 IU; vitamin E in the range of about 1 mg to about 100 mg; calcium in the range of about 20 mg to about 2000 mg; copper in the range of 0 mg to about 10 mg; zinc in the range of about 5 mg to about 100 mg; and magnesium in the range of 0 mg to about 400 mg.

[0050] In another exemplary embodiment, the multivitamin/multimineral supplement includes the following ingredients in the amounts shown in table 1.

TABLE 1

	Amount
Vitamins	
A (beta carotene)	3,000 IU
D (cholecalciferol)	400 IU
E (provided by di-alpha tocopheryl acetate)	30 mg

TABLE 1-continued

	Amount
C (ascorbic acid, sodium ascorbate)	120 mg
Folic acid	1 mg
B_1 (thiamine mononitrate)	1.8 mg
B_2 (riboflavin)	4 mg
Niacinamide	20 mg
B_6 (pyridoxine hydrochloride)	25 mg
B_{12} (cyanocobalamin)	12 mcg
Minerals	
Calcium (calcium carbonate)	100 mg
Copper (cupric oxide)	2 mg
Iron (ferrous fumarate, ferrous bis-glycinate chelate)	29 mg
Zinc (zinc oxide)	25 mg
Magnesium (magnesium oxide)	25 mg

[0051] In yet another embodiment, the multivitamin/multimineral supplement includes the following ingredients in the amounts shown in Table 2.

TABLE 2

	Amount
Vitamins	
A (beta carotene)	3,000 IU
D (cholecalciferol)	400 IU
E (di-alpha tocopheryl acetate)	30 mg
C (ascorbic acid)	120 mg
Folic acid	1 mg
B_1 (thiamine mononitrate)	1.8 mg
B_2 (riboflavin)	4 mg
Niacinamide	20 mg
B_6 (pyridoxine hydrochloride)	25 mg
B_{12} (cyanocobalamin)	12 mcg
Minerals	
Calcium (calcium carbonate)	200 mg
Copper (cupric oxide)	2 mg
Iron (ferrous fumarate, ferrous bis-glycinate chelate)	29 mg
Zinc	25 mg
Magnesium (magnesium oxide)	25 mg

[0052] In the embodiments tabulated above, the 29 mg of elemental iron included in the composition may be provided in the form of 1-99% of ferrous fumarate and 1-99% of ferrous bis-glycinate chelate. Additionally, in either or both compositions, the ferrous bis-glycinate chelate may be provided by Ferrochel®.

[0053] In one embodiment of the present invention, the composition includes additives such as, for example, starches, saccharides, fats, antioxidants, amino acids, proteins, and derivatives or combinations thereof. Antioxidants generally improve the stability of the final composition. Additives used to formulate the final composition may also be included. For example, formulation additives such as natural oils, cellulose polymers, flavors, xylitol, corn starch, aspartame, acacia, sucrose, gelatin, citric acid, FB & C yellow #6, FD & C red #40, and flow agents may be included in the present composition as discussed herein below.

[0054] Additives included in the final dosage form of the composition, such as a tablet, are commonly referred to as excipients. Excipients provide physical or aesthetic properties to the dosage form for delivery of a compound or composition to the desired target location. For example, with respect to physical properties, tablets generally may need to have acceptable hardness, disintegration and dissolution rates for release of the therapeutic composition, as well as stability and size for effective delivery of the composition. With respect to aesthetics, the tablet may include additives that appeal to the senses, such as colorants, fragrances, texture modifiers, and/or flavoring agents.

[0055] By way of example, one or more lubricants may be added to the composition to assist in formulation by inhibiting sticking of the ingredients during compression of a pill or a tablet. Examples of suitable lubricants include, but are not limited to, stearic acid, palmitostearate, talc, and oils. Natural oils may be present as lubricants in the composition. Additionally, flavoring agents may be added to the composition. Flavoring agents include, for example, fruit flavors, or sweeteners, such as sodium saccharin, aspartame, confectionary sugar, sorbitol, sucrose, xylitol, or combinations thereof. Further, the composition may include disintegrants which are used to facilitate the breakup of the tablet after the tablet is administered to a patient. Examples of disintegrants include, but are not limited to, modified or unmodified starches such as corn starch, potato starch, or wheat starch or sodium croscarmellose. Additionally, suitable colorants, such as red beet powder, ferric oxides, FD & C dyes or combinations thereof, may be used in the present compositions. More specifically, the composition may include FD & C yellow #6, and FD & C red #40 for example.

[0056] In accordance with one aspect of the present invention, the composition of the present invention is formulated into single dosage forms suitable for ingestion. Without limitation, exemplary dosage forms include pills, tablets, caplets, and capsules, made by processes known in the art of pharmaceutical manufacturing. Generally, capsules may be formed by blending the constituents, including the forms of iron, vitamins and other minerals, and subsequently filling capsules with the mixture using conventional automatic filling equipment. Examples of capsules include, without limitation, soft gelatin capsules and hard gelatin capsules. The capsules may be prepared by methods well known to persons of ordinary skill in the art. For example, a soft gel or soft gelatin capsule may be prepared by dispersing the formulation in an appropriate vehicle (vegetable oils are commonly used) to form a high viscosity mixture. This mixture is then encapsulated with a gelatin-based film using technology and machinery known to those in the soft gel industry. The industrial units so formed are then dried to a constant weight.

[0057] Tablet compositions are commonly used to deliver therapeutic compounds to a patient such as a human or an animal. The term "tablet", as used herein, is meant to refer to a solid particle, containing or including compounds that are compressed under pressure into any shape. In one embodiment of the present invention, the final composition is formulated into a tablet. Examples of suitable tablet forms include, without limitation, chewable tablets, quick dissolve tablets, effervescent tablets, multi-layer tablets, and bi-layer tablets. Tablets are convenient and may be produced using conventional techniques.

[0058] To produce a tablet, the composition is typically formed into a compactable granular mixture. One skilled in the art will recognize that there are various ways to form a compactable granular mixture. Conventional methods of combining the components of the composition and other desired additives to form a compactable granular mixture may be used. For example, a compactable granular mixture may be formed by first blending the iron-amino acid chelate, and other forms of iron if desired, with desired vitamins, additional minerals and suitable excipients to form a dry blend. Alternatively, the desired components of the composition may be partially or completely dissolved in a suitable liquid, after which the liquid is removed to form a compactable granular mixture. Persons of ordinary skilled in the art readily appreciate that the desired method chosen for forming the compactable granular mixture will depend on many factors including, for example, the selection of the specific forms of iron, vitamins, minerals, and additives for the composition.

[0059] The compactable granular mixture may then be further processed using conventional techniques to form the final tablet. For example, a compactable granular mixture may be compressed into a tablet according to any technique known to those skilled in the art, such as placing the compactable granular mixture into a die and compressing the mixture into a tablet having the desired shape and weight. The application of an external lubricant to the wall of the die prior to adding the granular mixture to the die is generally helpful. Further, the mixture may be compressed at a pressure and temperature suitable to form a tablet having the desired properties such as strength, hardness, disintegration, and release of the therapeutic compounds of the composition upon administration. In one embodiment, the tablet is soft and chewable. Depending upon the amount of iron included in the composition, a chewable form of a tablet would otherwise overcome difficulties in swallowing a hard, solid tablet. This is especially true for children and adults having small oral and pharyngeal cavities. In any event, the compaction conditions should be such that there is minimal, if any, degradation of the therapeutic compounds of the composition. In addition, the compaction conditions should be performed at below the melting points of the therapeutic compounds of the composition to prevent a reduction in tablet hardness and to reduce or eliminate other tablet-making process problems, such as glazing for example.

[0060] The tablets produced may be further processed as desired. For example, the tablet may be coated by a technique known to those skilled in the art. Coating the single dosage formulation provides the benefits of delaying or sustaining the release of the ingredients in the composition. Coatings further reduce or minimize degradation and clearance of the composition prior to absorption. For example, specific coatings are designed to optimize survival of the composition in the stomach while other coatings are designed to prevent gastrointestinal tract upset. Particularly, enteric coatings provide useful advantages. Particularly, enteric coatings are known for the ability to resist acidic pH of the stomach and readily dissolve as the pH of the surrounding media increases into the range of about 4-8, which is generally found in the duodenum and upper jejunum of the small intestine. Accordingly, enteric coatings enhance absorption and bioavailability. Further, coatings generally provide a cohesive, compact film around the composition for resistance to permeation of moisture and water vapor into the composition. Moreover, coatings in general, and enteric coatings in particular, provide this barrier with a minimal increase in weight of the composition (about 6-8% for an Opadry® enteric coating system) depending upon overall size of the composition. Suitable coatings generally comprise polymers in combination with an excipient, such as a plasticizer, and/or in combination with a colorant, such as a pigment.

[0061] The present invention also provides methods of supplementing iron in a mammal by administering the compositions described above to the mammal. The composition is advantageously formulated into a single dosage form as described above for administration to the mammal. In one embodiment of the present invention, the formulation is enterically coated for providing sustained release characteristics to the single dosage form. The dosage form may be a prenatal supplement for administration to a pregnant and lactating female or a general supplement available for self-administration.

[0062] By virtue of the foregoing, there are provided compositions and methods for supplementing iron in the diet. The compositions include a highly bioavailable form of iron in an iron-amino acid chelate, such as ferrous bisglycinate chelate, and may further include a bioavailable salt form of iron, such as ferrous fumarate. The present compositions may further serve as multivitamin/multimineral dietary supplements by inclusion of additional vitamins and minerals. A combination of the two forms of iron above provides a balance between the oral bioavailability of the iron and the size of the composition, and does so without producing undesirable gastrointestinal side effects following ingestion. The present invention is useful for supplementing iron in mammals having iron deficient diets, and in particular, in pregnant and lactating females suffering from anemia. Smaller dosage forms, such as tablets and capsules for example, that are easier to swallow than the otherwise relatively large prior art prenatal vitamin or dietary supplements are more likely to be ingested in compliance with a regimen.

[0063] While the present invention has been illustrated by the description of the embodiments thereof, and while the embodiments have been described in considerable detail, it is not the intention of the applicant to restrict or in any way limit the scope of the appended claims to such detail. Additional advantages and modifications will readily appear to those skilled in the art. For example, as other bioavailable forms of an iron-amino acid chelate become apparent and to those skilled in the art, the present invention may be include such forms, and not be limited to the forms listed herein. Therefore, the invention in its broader aspects is not limited to the specific details, methods and examples described. Accordingly, departures may be made from such details without departure from the spirit or scope of applicant's general inventive concept.

What is claimed is:

1. A composition comprising iron in a form of an iron-amino acid chelate and a pharmaceutically acceptable salt, the composition in a pharmaceutically acceptable single dosage formulation.

2. The composition of claim 1 wherein the iron-amino acid chelate comprises an iron chelated to at least one amino acid.

3. The composition of claim 2 wherein the at least one amino acid is selected from the group consisting of alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, cysteine, cystine, glutamine, glutamic acid, glycine, histidine, hydroxyproline, isoleucine, lysine, leucine, methionine, ornithine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine, and combinations thereof.

4. The composition of claim 1 wherein the iron-amino acid chelate is ferrous bis-glycinate chelate.

5. The composition of claim 1 wherein the pharmaceutically acceptable salt form of iron is selected from the group consisting of ferrous fumarate, ferrous sulfate, ferrous succinate, ferrous gluconate, ferrous lactate, ferrous tartarate, ferrous citrate, and combinations thereof.

6. The composition of claim 1 further comprising a non-iron mineral or pharmaceutically acceptable salt thereof.

7. The composition of claim 6 wherein the mineral is selected from the group consisting of calcium, copper, zinc, magnesium and combinations thereof.

8. The composition of claim 1 further comprising a vitamin or pharmaceutically acceptable salt thereof.

9. The composition of claim 8 wherein the vitamin is selected from the group consisting of vitamin A, vitamin B, vitamin C, vitamin D, vitamin E, niacinamide, folic acid, and combinations thereof.

10. The composition of claim 9 wherein the Vitamin B is selected from the group consisting of Vitamins B_1, B_2, B_6, B_{12} and combinations thereof.

11. The composition of claim 1 wherein the single dosage formulation is selected from the group consisting of a pill, a tablet, a caplet, and a capsule.

12. The composition of claim 1 wherein the iron has a total weight in a range from about 5 mg to about 200 mg in the composition.

13. The composition of claim 12 wherein the pharmaceutically acceptable salt form of iron comprises from about 25% to about 75% of the total weight of the iron in the composition.

14. The composition of claim 12 wherein the iron-amino acid chelate comprises at least about 25% of the total weight of the iron in the composition.

15. The composition of claim 12 wherein the iron-amino acid chelate comprises at least about 75% of the total weight of the iron in the composition.

16. The composition of claim 1 wherein the iron-amino acid chelate comprises at least about 90% of the total weight of the iron in the composition.

17. The composition of claim 1 further comprising:

a vitamin or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of Vitamin A, Vitamin B, Vitamin C, Vitamin D, Vitamin E, folic acid, niacinamide and combinations thereof; and

a second mineral or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of calcium, copper, zinc magnesium, and combinations thereof.

18. A composition comprising iron in a form consisting essentially of an iron-amino acid chelate, the composition in a pharmaceutically acceptable single dosage formulation.

19. The composition of claim 18 wherein the iron amino acid chelate has a weight in the range from about 5 mg to about 200 mg.

20. The composition of claim 18 further comprising a vitamin or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of Vitamin A, Vitamin B, Vitamin C, Vitamin D, Vitamin E, folic acid, niacinamide and combinations thereof.

21. The composition of claim 18 wherein the iron-amino acid chelate is ferrous bis-glycinate chelate having a weight in the range from about 10 mg to about 200 mg.

22. The composition of claim 21 further comprising folic acid having a weight in the range from about 0.01 mg to about 5 mg.

23. The composition of claim 18 wherein the single dosage formulation is selected from the group consisting of a pill, a tablet, a caplet, and a capsule.

24. The composition of claim 23 wherein the single dosage formulation comprises an enteric coating.

25. A composition consisting essentially of an iron-amino acid chelate and folic acid in a pharmaceutically acceptable single dosage formulation.

26. The composition of claim 25 wherein the iron-amino acid chelate is ferrous bis-glycinate chelate and has a weight in the range from about 10 mg to about 200 mg.

27. The composition of claim 25 wherein the folic acid a weight in the range from about 0.01 mg to about 5 mg.

28. The composition of claim 25 wherein the single dosage formulation is selected from the group consisting of a pill, a tablet, a caplet, and a capsule.

29. The composition of claim 25 wherein the single dosage formulation is an enteric coated tablet.

30. A multivitamin/multimineral supplement comprising:

iron in a form consisting essentially of an iron-amino acid chelate and a pharmaceutically acceptable salt;

a vitamin or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of vitamins A, B_1, B_2, B_6, B_{12}, C, D, E and a combination thereof;

folic acid;

niacinamide; and

a non-iron mineral or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of calcium carbonate, cupric oxide, zinc oxide magnesium oxide and a combination thereof,

the supplement in a single dosage formulation selected from the group consisting of a pill, a tablet, a caplet, and a capsule.

31. The supplement of claim 30 wherein the iron-amino acid chelate comprises at least one molecule of iron chelated to at least one amino acid.

32. The supplement of claim 30 wherein the iron-amino acid chelate is ferrous bis-glycinate chelate.

33. The supplement of claim 30 wherein the iron-amino acid chelate has a weight in the range from about 10 mg to about 200 mg.

34. The supplement of claim 30 wherein the pharmaceutically acceptable salt form of iron is selected from the group consisting of ferrous fumarate, ferrous sulfate, ferrous succinate, ferrous gluconate, ferrous lactate, ferrous tartarate, ferrous citrate, and combinations thereof.

35. The supplement of claim 30 wherein the pharmaceutically acceptable salt form of iron has a weight in the range from about 10 to about 200 mg.

36. The supplement of claim 35 wherein the pharmaceutically acceptable salt form of iron is ferrous fumarate.

37. The supplement of claim 30 wherein the iron is provided in a once-a-day dose.

38. The supplement of claim 30 wherein the combination of vitamins comprises

vitamin A in a weight range from about 0.002 mg to about 15 mg;

vitamin B_1 in a weight range from about 0.5 mg to about 50 mg;

vitamin B_2 in a weight range from about 0.5 mg to about 50 mg;

vitamin B_6 in a weight range from about 0.1 mg to about 200 mg;

vitamin B_{12} in a weight range from about 2 mcg to about 250 mcg;

niacinamide in a weight range from about 1 mg to about 100 mg;

folic acid in a weight range from about 0.01 mg to about 5 mg;

vitamin C in a weight range from about 10 mg to about 1000 mg;

vitamin D in a weight range from about 0.001 mg to about 0.6 mg; and

vitamin E in a weight range from about 1 mg to about 125 mg, and

wherein the combination of non-iron minerals comprises:

calcium carbonate in a weight range from about 10 mg to about 1000 mg;

cupric oxide in a weight range from about 0.1 mg to about 10 mg;

zinc oxide in a weight range from about 5 mg to about 100 mg; and

magnesium oxide in a weight range from about 0.1 mg to about 400 mg.

39. The supplement of claim 30 wherein the single dosage formulation is a chewable tablet.

40. A method for supplementing iron to a mammal, the method comprising administering to the mammal a composition comprising iron in a form of an iron-amino acid chelate and a pharmaceutically acceptable salt.

41. The method of claim 40 wherein the iron-amino acid chelate administered comprises a molecule of iron chelated to at least one amino acid.

42. The method of claim 40 wherein the amino acid is selected from the group consisting of alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, cysteine, cystine, glutamine, glutamic acid, glycine, histidine, hydroxyproline, isoleucine, lysine, leucine, methionine, ornithine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine, and combinations thereof.

43. The method of claim 40 wherein the iron-amino acid chelate is ferrous ferrous bis-glycinate chelate.

44. The method of claim 40 wherein the pharmaceutically acceptable salt form of iron is selected from the group consisting of ferrous fumarate, ferrous sulfate, ferrous succinate, ferrous gluconate, ferrous lactate, ferrous tartarate, ferrous citrate, and combinations thereof

45. The method of claim 40 further comprising formulating the composition into a pharmaceutically acceptable single dosage form selected from the group consisting of a pill, a tablet, a caplet, and a capsule.

46. The method of claim 40 wherein the composition administered further comprises a vitamin or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of vitamin A, vitamin B_1, vitamin B_2, vitamin B_6, vitamin B_{12}, vitamin C, vitamin D, vitamin E, folic acid, niacinamide and a combination thereof.

47. The method of claim 40 wherein the composition administered further comprises a non-iron mineral or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of calcium, copper, zinc, magnesium, and a combination thereof.

48. The method of claim 40 wherein the mammal is a pregnant or lactating female.

49. The method of claim 40 wherein the composition administered comprises:

ferrous bis-glycinate chelate in a weight range from about 10 mg to about 200 mg;

ferrous fumarate in a weight range from about 10 mg to about 200 mg;

a vitamin or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of vitamin A, vitamin B_1, vitamin B_2, vitamin B_6, vitamin B_{12}, vitamin C, vitamin D, vitamin E, folic acid, niacinamide and a combination thereof; and

a non-iron mineral or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of calcium, copper, zinc, magnesium, and a combination thereof.

50. The method of claim 49 further comprising formulating the composition into a pharmaceutically acceptable single dosage form selected from the group consisting of a pill, a tablet, a caplet, and a capsule.

51. The method of claim 50 wherein the mammal is a pregnant or lactating female.

52. The method of claim 50 wherein the composition is administered for treating anemia in the mammal.

53. The method of claim 50 wherein the composition is administered for treating anemia in a pregnant female.

54. A method for supplementing iron in a pregnant or lactating female comprising administering to the pregnant or lactating female in a pharmaceutically acceptable single dosage formulation a composition comprising iron in a form consisting essentially of an iron-amino acid chelate.

55. The method of claim 54 wherein the iron-amino acid chelate is ferrous bis-glycinate chelate having a weight in the range from about 10 mg to about 200 mg.

56. The method of claim 54 wherein the composition administered further comprises a vitamin or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of Vitamin A, Vitamin B, Vitamin C, Vitamin D, Vitamin E, folic acid, niacinamide and a combination thereof.

57. The method of claim 54 wherein the composition administered further comprises a non-iron mineral or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of calcium, copper, zinc, magnesium, and a combination thereof

58. A method for supplementing iron in a mammal comprising administering to the mammal in a pharmaceutically acceptable single dosage formulation a multivitamin/multimineral supplement comprising

iron in a form consisting essentially of an iron-amino acid chelate and a pharmaceutically acceptable salt;

a vitamin or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of vitamins A, B_1, B_2, B_6, B_{12}, C, D, E and a combination thereof;

folic acid;

niacinamide; and

a non-iron mineral or pharmaceutically acceptable salt thereof selected from the group consisting of calcium carbonate, cupric oxide, zinc oxide magnesium oxide and a combination thereof.

59. The method of claim 58 wherein the iron-amino acid chelate comprises at least about 75% of the total weight of the iron in the administered supplement.

60. The method of claim 58 wherein the iron-amino acid chelate comprises at least about 90% of the total weight of the iron in the administered supplement.

61. The method of claim 58 wherein the iron-amino acid chelate is ferrous bis-glycinate chelate in a weight range from about 10 mg to about 200 mg.

62. The method of claim 58 wherein the mammal is a pregnant or lactating female.

63. The method of claim 58 wherein the supplement is administered for the treatment of anemia.

64. The method of claim 58 further comprising enterically coating the single dosage formulation for providing delayed release of ingredients in the supplement administered to the mammal.

65. A method for reducing iron deficiency in a mammal comprising administering to the mammal in a pharmaceutically acceptable single dosage formulation a composition consisting essentially of iron in the form of an iron-amino acid chelate and folic acid.

66. The method of claim 65 wherein the iron-amino acid chelate is ferrous bis-glycinate chelate in a weight range from about 10 mg to about 200 mg.

67. The method of claim 65 wherein the folic acid has a weight in the range from about 0.01 mg to about 5 mg.

68. The method of claim 65 wherein the mammal is a pregnant female or lactating female.

69. The method of claim 65 wherein the mammal is anemic.

70. The method of claim 65 wherein the single dosage formulation is selected from the group consisting of a pill, a tablet, a caplet, and a capsule an enteric coated tablet.

71. The method of claim 70 further comprising enterically coating the single dosage formulation for providing delayed release of the composition administered to the mammal.

* * * * *