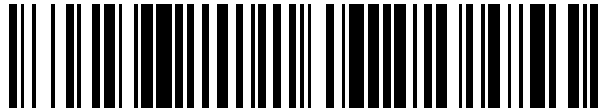


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 902 645**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2017 PCT/US2017/050887**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2018 WO18052827**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2017 E 17851361 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.10.2021 EP 3512876**

54 Título: **Glicoformas del factor VIIA**

30 Prioridad:

13.09.2016 US 201662393930 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.03.2022

73 Titular/es:

**COAGULANT THERAPEUTICS CORPORATION
(100.0%)
48-6, Gangnam-daero, 5F, Hansock Building,
Yangjae-dong, Seocho-gu
Seoul, KR**

72 Inventor/es:

FELDMAN, RICHARD IRA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 902 645 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Glicofomas del factor VIIA

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente divulgación se sitúa en el campo de la biotecnología y se refiere a la proteína humana de coagulación Factor VII. Más concretamente, se trata de las glicofomas del Factor VII y del Factor VIIa que tienen un elevado aclaramiento del cuerpo de los mamíferos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La coagulación de la sangre es un proceso que consiste en una compleja interacción de varios componentes sanguíneos (o factores) que finalmente da lugar a un coágulo de fibrina. Por lo general, los componentes sanguíneos, que participan en lo que se ha denominado la "cascada" de la coagulación, son proteínas enzimáticamente inactivas (proenzimas o zimógenos) que se convierten en enzimas proteolíticas por la acción de un activador (que a su vez es un factor de coagulación activado). Los factores de coagulación que han sufrido dicha conversión se denominan generalmente "factores activos" y se designan añadiendo la letra "a" al nombre del factor de coagulación (por ejemplo, Factor VIIa).

15 El inicio del proceso hemostático está mediado por la formación de un complejo entre el factor tisular, que se expone a la sangre circulante tras una lesión en la pared del vaso, y el Factor VIIa, que está presente en la circulación en una cantidad correspondiente a aproximadamente el 1 % de la masa proteica total del Factor VII. Este complejo se ancla a la célula portadora del factor tisular y convierte los Factores IX y X en sus formas activas Factor IXa y Factor Xa en la superficie celular. El factor Xa convierte la protrombina en trombina en la célula portadora del factor tisular, que
20 activa el factor VIII, el factor V, el factor XI y el factor XIII. Además, la cantidad limitada de trombina que se forma en este paso inicial de la hemostasia también activa las plaquetas. Tras la acción de la trombina sobre las plaquetas, las plaquetas cambian de forma y exponen fosfolípidos cargados en su superficie. Esta superficie plaquetaria activada constituye la plantilla para la posterior activación del Factor X y la generación completa de trombina. La posterior activación del Factor X en la superficie de la plaqueta activada se produce a través de un complejo de Factor IXa y
25 Factor VIIIa formado en la superficie de la plaqueta activada, y el Factor Xa convierte entonces la protrombina en trombina mientras sigue en la superficie. La trombina convierte entonces el fibrinógeno en fibrina, que es insoluble y que estabiliza el tapón plaquetario inicial. Este proceso se localiza en el lugar de exposición del factor tisular, minimizando así el riesgo de una activación sistémica del sistema de coagulación. Se ha descubierto que el factor VII y el factor tisular son los principales iniciadores de la coagulación sanguínea.

30 También se sabe que el Factor VIIa activa el Factor X directamente, sin el Factor VIIIa o IXa, si se administra a niveles suficientemente altos en los que actúa independientemente del factor tisular. Por lo tanto, el Factor VIIa se utiliza terapéuticamente, a niveles más altos que los fisiológicos, para promover la coagulación en pacientes con hemofilia A y B, en particular para los pacientes que tienen anticuerpos inhibitorios contra el Factor VIII o el Factor IX recombinantes que limitan la eficacia de la terapia de reemplazo con estos factores.

35 El Factor VIIa se produce a partir de su precursor, el Factor VII, que se sintetiza en el hígado y se secreta en la sangre, donde circula como una glicoproteína de cadena única (peso molecular de aproximadamente 50,000 Da). El Factor VII humano de tipo salvaje, tal y como se utiliza en el presente documento, tiene la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos que se muestran en las FIGs. 1 y 2 (SEQ ID NOs. 1 y 2, respectivamente). El Factor VII de tipo salvaje se escinde normalmente entre los residuos 152 y 153 para producir el Factor VIIa. Un polipéptido de Factor
40 VIIa producido recombinantemente se vende en los Estados Unidos bajo el nombre comercial de NOVOSEVEN por Novo Nordisk.

45 El término "Factor VII" se refiere a un polipéptido de Factor VII en su forma no escindida (la forma zimógena). El término "Factor VIIa" significa un polipéptido de Factor VIIa en su forma de dos cadenas activadas. Cuando la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 se utiliza aquí para describir la secuencia de aminoácidos del Factor VIIa se entenderá que una de las cadenas comprende los residuos de aminoácidos 1-152, y la otra cadena los residuos de aminoácidos 153-406.

El Factor VII de tipo salvaje es una glicoproteína con sitios de glicosilación ligados al N donde se unen residuos de azúcar, llamados glicanos. El Factor VII humano de tipo salvaje tiene dos glicanos ligados a N, uno en N145 y otro en N322.

50 En general, los glicanos de las glicoproteínas contribuyen al plegamiento de las cadenas polipeptídicas nacientes, por ejemplo, en el retículo endoplasmático, y sirven para proteger las fracciones proteicas de la acción de las proteasas, y sirven para modular las actividades biológicas de una glicoproteína. A diferencia de la síntesis de la cadena polipeptídica de una glicoproteína, que está regulada genéticamente, las unidades de oligosacáridos o glicanos se unen y procesan mediante una serie de reacciones enzimáticas. Por lo tanto, una glicoproteína aparece generalmente
55 como una mezcla de diferentes glicofomas resultantes de una actividad enzimática variable.

El componente oligosacárido de las estructuras de N-glicanos de las glicoproteínas puede influir en la eficacia terapéutica, la estabilidad física, la resistencia al ataque de las proteasas, la farmacocinética, la interacción con el sistema inmunitario y la actividad biológica específica. Véase, por ejemplo, Jenkins et al. (1996) Nature Biotechnol. 14:975-981.

5 La publicación de la solicitud de patente U.S. No. 20140363419 (Bauzon et al.) divulga polipéptidos de Factor VII de acción corta útiles para el tratamiento de hemorragias agudas y trastornos similares. Bauzon et al. divulga variantes del Factor VII en las que faltan las moléculas terminales de ácido siálico que se encuentran en los oligosacáridos del Factor VII de tipo salvaje o mutante, lo que se denomina Factor VII desialilado. Bauzon et al. divulga que dichas variantes desialiladas tienen un aclaramiento potencialmente reducido de la sangre y una disminución de la duración de la eficacia. Bauzon divulga que el Factor VIIa desialilado de tipo salvaje es eficaz en los ensayos de coagulación, pero no muestra ninguna coagulación sistémica observable. Debido a la gran necesidad médica de tratamiento de las hemorragias, en particular las hemorragias agudas, se desean mejoras y alternativas a las glicoproteínas del Factor VIIa de acción corta.

15 La publicación de la solicitud de patente U.S. No. 20080058255 (Bolt et al.) divulga variantes del Factor VII con alteración de la glicosilación, como las que tienen una sustitución que altera la glicosilación en N145 o N322, o en ambos N145 y N322. Appa et al, Thrombosis and Haemostasis 104.2/2010, pp. 243-251 informa de las investigaciones sobre los mecanismos de aclaramiento del Factor VIIa recombinante, en las que el asialo-rFactor VIIa se prepara a través de la hidrólisis enzimática del Factor VIIa recombinante utilizando agarosa neuraminidasa. Toso et. al. Blood (resumen), 16 de noviembre de 2000 divulga que el Factor VIIa tiene mutaciones que conducen a una glicosilación alterada, incluyendo la desialilación, en comparación con el Factor VIIa humano de tipo salvaje.

20 La desialilación de las glicoproteínas es conocida. Por ejemplo, la solicitud de patente U.S. No. 20080226681 (Glycotope GmbH) se refiere a la utilización de células mutantes (con una mutación en la síntesis del ácido siálico) para provocar la desialilación de las proteínas. El medio se complementa con el precursor del ácido siálico. Mediante el procedimiento descrito, un usuario puede determinar el grado adecuado de sialilación de una proteína específica para provocar la mayor actividad de la misma.

25 Se conocen los usos terapéuticos del Factor VIIa recombinante. Sin embargo, existe una gran necesidad de un tratamiento de acción rápida para las hemorragias agudas, como la hemorragia posparto. Es deseable contar con un Factor VIIa de acción rápida y eficaz que se elimine rápidamente del organismo y que tenga pocos efectos negativos sobre la coagulación en zonas distintas a la del traumatismo. En particular, se necesita una terapia procoagulante de acción rápida con pocos o ningún efecto sistémico sobre la coagulación. Para el tratamiento de las hemorragias agudas son deseables glicofórmulas mejoradas del Factor VIIa con actividad procoagulante y tasas de aclaramiento rápidas y/o altas.

30 Bohm, et al., (BMC Biotechnol. 2015 Sep 18;15:87. doi: 10.1186/s12896-015-0205-1. PMID: 26382581; PMCID: PMC4574471) describe las diferencias en la N-glicosilación del Factor VII de coagulación humano recombinante derivado de células BHK, CHO y HEK293.

35 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención tener glicofórmulas de Factor VIIa y composiciones de las mismas que muestren propiedades farmacocinéticas favorables para su uso en hemorragias agudas con respecto a la actividad de coagulación, la semivida y la tasa de aclaramiento, y que tengan una actividad de coagulación sistémica baja o no observable.

40 **SUMARIO**

La presente divulgación se refiere a una glicoproteína de Factor VII o Factor FVIIa que tiene un patrón de glicosilación ligado a N que comprende glicanos; en el que el patrón de glicosilación comprende:

- (1) sustancialmente no hay glicanos con ácido N-acetilneuramínico terminal y
- (2) un glicano sustancial que es un glicano de fórmula I: $(\text{GlcNAc})_4(\text{Man})_3(\text{Gal})_2(\text{Fuc})$ y
- 45 (3) cantidades traza o menos de uno o más glicanos seleccionados del grupo que consiste en un glicano de fórmula II: $(\text{GlcNAc})_5(\text{Man})_3(\text{Gal})(\text{Fuc})$ y un glicano de fórmula III: $(\text{GlcNAc})_6(\text{Man})_3(\text{Fuc})$ y;
- (4) un glicano de fórmula V: $(\text{GlcNAc})_6(\text{Gal})_4(\text{Man})_3(\text{Fuc})$.

50 La descripción comprende las anteriores glicoproteínas de Factor VII o Factor VIIa que comprenden además (1) un glicano de fórmula IV: $(\text{GlcNAc})_5(\text{Man})_3(\text{Gal})_3(\text{Fuc})$. En otra realización, la glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa descrita en el presente documento tiene cantidades traza o menos del glicano de fórmula II. En otra realización, la glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa descrita en el presente documento tiene cantidades traza o menos del glicano de fórmula III. En otra realización, la glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa descrita en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene tres o menos mutaciones en relación con la SEQ ID NO: 2. En otra realización, el Factor VII o el Factor VIIa es una glicoproteína del Factor VIIa y comprende una cadena pesada; en la que la cadena pesada tiene un patrón de glicosilación ligado a N que comprende glicanos; y además en

la que el patrón de glicosilación comprende: (1) sustancialmente no hay glicanos con ácido N-acetilneuramínico terminal y (2) un glicano sustancial que es un glicano de fórmula I: $(\text{GlcNAc})_4(\text{Man})_3(\text{Gal})_2(\text{Fuc})$; (3) cantidades mínimas de uno o más glicanos seleccionados del grupo que consiste en un glicano de fórmula II: $(\text{GlcNAc})_5(\text{Man})_3(\text{Gal})(\text{Fuc})$ y un glicano de fórmula III: $(\text{GlcNAc})_6(\text{Man})_3(\text{Fuc})$; en otra realización con cantidades traza o menores del glicano de fórmula III y del glicano de fórmula I.

En una realización, la glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa, tal como se ha descrito anteriormente y en el presente documento, tiene cantidades traza o menos del glicano de fórmula II y/o del glicano de fórmula III. La presente divulgación también incluye procedimientos de fabricación de las glicoproteínas de Factor VII o Factor VIIa descritas en el presente documento, procedimientos para tratar a un mamífero que tiene una enfermedad o un trastorno en el que es deseable la formación de coágulos de sangre mediante la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de las glicoproteínas de Factor VII o Factor VIIa descritas en el presente documento, y formulaciones farmacéuticas de las glicoproteínas de Factor VII y Factor VIIa descritas en el presente documento en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS DEL DIBUJO

La figura 1 establece la secuencia de ADNc del Factor VII humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos del Factor VII humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2).

La figura 2 establece una secuencia de ADN que codifica el Factor VII humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 3). La región que codifica el péptido señal está subrayada.

La figura 3 establece una tabla que correlaciona los números romanos con las estructuras de glicosilación. "Fórmula" se refiere a una fórmula química que puede ser determinada por la masa global del glicano, tal como se mide por espectroscopia de masas. "Estructura ejemplar" muestra un ejemplo de posibles enlaces de glicanos dentro del ámbito de la Fórmula identificados por la masa. Las Estructuras Ejemplares son probables en vista de los estudios publicados anteriormente sobre los glicanos que proporcionaron un orden determinado experimentalmente de los azúcares del glicano y cómo están enlazados.

La figura 4 establece una secuencia de ADN optimizada por codones del dominio catalítico de la sialidasa de *Artherobacter urefaciens* (SEQ ID NO: 4).

La figura 5 establece la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de la sialidasa de *Artherobacter urefaciens* (SEQ ID NO: 5). Se ha añadido una secuencia de señal de secreción del gen de la hormona de crecimiento humana (matgsrtslllafgllclpwlqegsa), que aparece subrayada.

La figura 6 es un mapa de plásmidos para el plásmido de expresión de sialidasa pMB279. El vector de expresión base es el vector UCOE de 3 Kb (Millipore) que utiliza un promotor CMV humano. El gen de la resistencia a la puromicina se cambió por el de la resistencia a la blasticidina (secuencia de aminoácidos del GenBank D83710.1) que se optimizó en codones para la expresión en mamíferos.

La figura 7 muestra los datos de espectroscopia de masas MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz) de los N-glicanos neutros de los clones de Factor VIIa producidos en células CHO K-1 transfectadas con ácidos nucleicos que codifican la sialidasa y el Factor VIIa (subclones 9 y 11), y los datos MALDI de la preparación de referencia, que es el Factor VIIa recombinante de NOVOSEVEN, denominado "NOVO 7" en este documento, desialilado por contacto con una sialidasa.

La figura 8 son datos de HPLC que analizan los N-glicanos del Factor VIIa producido en células CHO K-1 (subclones 9, 11 y 9 DS) y del producto de referencia desialilado NOVO 7, después de etiquetarlo con 2-AA (ácido 2-aminobenzoico). El subclon 9 DS se refiere al subclon 9 que ha sido purificado.

La figura 9 muestra el espectro de masas de la cadena pesada del Factor VIIa que resuelve los glicanos presentes en la molécula. El panel superior muestra la distribución del N-glicano para la cadena pesada del Factor VIIa en el Factor VIIa de la presente invención que fue producido en células CHO que también expresan sialidasa. La figura 9 (panel inferior) muestra la distribución del N-glicano de la cadena pesada del Factor VIIa para el Factor VIIa recombinante NOVOSEVEN desializado por contacto con una sialidasa. Las flechas hacia abajo marcan ciertas diferencias entre los glicanos del Factor VIIa desialilado según la presente divulgación y los glicanos del Factor VIIa desialilado de NOVOSEVEN.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En el presente documento se describen las glicoproteínas del Factor VII y del Factor VIIa que tienen patrones específicos de glicosilación ligada a la N, los procedimientos para su fabricación y uso, las composiciones farmacéuticas que las comprenden, los procedimientos de tratamiento de trastornos en los que se desea la coagulación de la sangre y las líneas celulares para producirlas. Las glicoproteínas del Factor VII y del Factor VIIa tienen un contenido reducido de ácido siálico con referencia al Factor VII humano de tipo salvaje, y un rápido aclaramiento.

Los solicitantes han descubierto glicoproteínas recombinantes de Factor VII y Factor VIIa que se eliminan rápidamente del cuerpo humano y cuyas propiedades farmacocinéticas las hacen adecuadas para su uso terapéutico en trastornos hemorrágicos agudos. El rápido aclaramiento de las glicoproteínas reduce la exposición innecesaria a una molécula pro-trombótica una vez resuelta la hemorragia. La glicoproteína de la presente divulgación tiene un perfil de glicosilación distinto cuando se compara con el Factor VIIa recombinante NOVOSEVEN (Novo Nordisk) y cuando se compara con el Factor VIIa recombinante NOVOSEVEN que ha sido desialilado por contacto con sialidasa según enseñanzas anteriores.

Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen generalmente el mismo significado que se entiende comúnmente por una persona con conocimientos normales en la técnica a la que pertenece esta divulgación. En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en el cultivo de células, la genética molecular, la química orgánica y la química e hibridación de ácidos nucleicos son los conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para la síntesis de ácidos nucleicos y polipéptidos. La nomenclatura utilizada en este documento y los procedimientos de laboratorio en química analítica y síntesis orgánica descritos a continuación son los conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Las técnicas estándar, o sus modificaciones, se utilizan para las síntesis y los análisis químicos. Los procedimientos utilizados para la ingeniería genética son bien conocidos y pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.

El término "ácido siálico" o "sialilo" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es el ácido N-acetil-neuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-dideoxi-D-glicero-D-galactonulopiranos-1-ónico (a menudo abreviado como Neu5Ac, NeuAc o NANA)).

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen mediante enlaces amida. Tal y como se utiliza aquí, "polipéptido" y "proteína" se refieren a polipéptidos y proteínas glicosiladas y no glicosiladas, respectivamente.

El término "glicoproteína" se refiere a una proteína que tiene al menos un glicano unido. Se entiende que los glicanos se crean y forman a través de procesos enzimáticos en la célula.

El término "glicoforma", tal y como se utiliza aquí, se refiere a una glicoproteína que contiene una estructura o estructuras de carbohidratos particulares. Una glicoproteína que tenga más de un sitio de glicosilación puede tener la misma especie de glicano unida a cada sitio de glicosilación, o puede tener diferentes especies de glicano unidas a diferentes sitios de glicosilación. De este modo, diferentes patrones de unión de glicanos dan lugar a diferentes glicoformas de una glicoproteína.

Los términos "patrón de glicosilación" y "perfil de glicosilación" se utilizan indistintamente en el presente documento y significan la "huella digital" característica de las especies representativas de N-glicanos que se han liberado de una composición de glicoproteínas o de un producto de glicoproteínas, ya sea enzimática o químicamente, y luego se han analizado para determinar su estructura de carbohidratos, por ejemplo, utilizando LC-HPLC, o MALDI-TOF MS, y similares. Véase, por ejemplo, la reseña en *Current Analytical Chemistry*, Vol. 1, No. 1 (2005), pp. 28-57.

El término "cantidad traza" de un glicano significa que están presentes niveles muy bajos de ese glicano en comparación con la cantidad de otros glicanos en la glicoproteína. Sin limitación, una "cantidad traza o menor" de un glicano significa que una prueba analítica de MALDI-TOF MS, LC-HPLC o similar muestra un perfil de glicosilación en el que el glicano está presente en menos del 10 %, preferentemente en menos del 5 %, preferentemente en menos del 4 %, en menos del 3 %, en menos del 2 %, en menos del 1 %, y en menos del 0,5 % o en menos del 0,1 % de la cantidad total de especies de N-glicanos que aparecen en el perfil, o que no es detectable en la prueba analítica.

El término "glicano significativo" o "glicano sustancial" se refiere a un glicano que se observa bajo MALDI-TOF MS, LC-HPLC o pruebas analíticas similares para estar presente en el perfil de glicosilación como más del 10 %, más del 20 %, más del 25 %, o más del 30 % de la cantidad total de especies de N-glicanos que aparecen en el perfil. Una determinación cuantitativa de los glicanos puede hacerse, por ejemplo, mediante un análisis LC-MS en el que se compara el área bajo la curva (AUC) de los picos para determinar la cantidad relativa de cada glicano en un lote de proteínas. Alternativamente, el "glicano significativo" o "glicano sustancial" puede estar presente en el perfil de glicosilación como 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 % o más de la cantidad total de especies de N-glicanos que aparecen en el perfil de glicosilación para el producto.

"N-glicano", "glicano ligado a N" y "glicano" se utilizan indistintamente y se refieren a un oligosacárido ligado a N, por ejemplo, uno que está o estaba unido por un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) ligado al nitrógeno amida de un residuo de asparagina en una proteína. Los azúcares predominantes en las glicoproteínas son la glucosa, la galactosa (Gal), la manosa (Man), la fucosa (Fuc), la N-acetilgalactosamina (GalNAc), la N-acetilglucosamina (GlcNAc) y el ácido siálico (por ejemplo, el ácido N-acetil-neuramínico (NeuAc)). Un "*" al final de un glicano representa el extremo reductor de la cadena de azúcares que se une a la asparagina. Un glicano ligado al N puede mostrarse

mediante una representación simbólica como la de la figura 3. Los símbolos que se muestran en la figura 3 se utilizan en otras figuras y tienen el mismo significado en todo su uso.

Por "estructura del núcleo oligomanosídico" o "estructura del núcleo de la trimanosa" de un N-glicano complejo se entiende la estructura del núcleo que comprende tres residuos de manosa (Man) y dos residuos de monosacáridos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) que están unidos al residuo de asparagina de la glicoproteína. Los pasos posteriores de glicosilación dan lugar a la estructura final del complejo N-glicano.

Los N-glicanos unidos a las glicoproteínas difieren con respecto al número de ramas (antenas) que comprenden azúcares periféricos (por ejemplo, GlcNAc, galactosa, fucosa y ácido siálico) que se añaden a la estructura del núcleo de trimanosa. Los N-glicanos se suelen clasificar según sus componentes ramificados (por ejemplo, complejos, con alto contenido de manosa o híbridos). Un N-glicano de tipo "complejo" suele tener al menos un GlcNAc unido al brazo de la 1,3 manosa y al menos un GlcNAc unido al brazo de la 1,6 manosa de un núcleo de "trimanosa". Cuando un GlcNAc está unido a cada brazo de manosa, la especie de glicano ligado al N se denota como "GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂". Cuando sólo hay un GlcNAc unido, la especie de N-glicano se denota como "GlcNAcMan₃GlcNAc₂", donde el GlcNAc está unido al brazo de 1,3 manosa (denotado "MGn") o al brazo de 1,6 manosa (denotado "GnM"). Los N-glicanos complejos también pueden tener residuos de azúcares de galactosa ("Gal") o N-acetilgalactosamina ("GalNAc") que están opcionalmente modificados con ácido siálico o derivados (por ejemplo, "NeuAc", donde "Neu" se refiere al ácido neuramínico y "Ac" al acetilo). Cuando un residuo de azúcar de galactosa está unido a cada GlcNAc en cada brazo de manosa, la especie de glicano ligado al N se denota como "Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂". Los N-glicanos complejos también pueden tener sustituciones intracadena que comprenden GlcNAc "bisecante" y fucosa central ("Fuc"). Los N-glicanos complejos también pueden tener múltiples antenas en el "núcleo de la trimanosa", a menudo denominadas "glicanos de antenas múltiples". Un glicano N de tipo "alto en manosa" tiene cinco o más residuos de manosa. Un N-glicano "híbrido" tiene al menos un GlcNAc en el terminal del brazo de manosa 1,3 del núcleo de la trimanosa y cero o más manosas en el brazo de manosa 1,6 del núcleo de la trimanosa.

Muchas moléculas de la presente divulgación tienen un aclaramiento muy alto de la circulación en un ser humano. El aclaramiento puede medirse por medios conocidos por los expertos en la materia, como por ejemplo midiendo la semivida terminal, que se mide después de que se produzca cualquier distribución inicial de la molécula.

La semivida puede determinarse en animales de experimentación, por ejemplo, administrando una dosis de aproximadamente 25-250 microgramos/kg del preparado; obteniendo muestras de plasma en momentos predeterminados después de la administración; y determinando el contenido del polipéptido del Factor VIIa en las muestras utilizando uno o más de un ensayo de coagulación (o cualquier bioensayo), un inmunoensayo, o un equivalente. Los datos pueden representarse gráficamente y entonces la biodisponibilidad se determinará como el área bajo la curva. En ciertos ejemplos, se utilizan modelos de rata o murinos para las mediciones de la semivida. La biodisponibilidad relativa de un polipéptido del Factor VIIa o de su composición se refiere a la relación del área bajo la curva del polipéptido del Factor VIIa de acción corta con la del Factor VIIa de tipo natural u otro polipéptido o proteína de comparación apropiado.

Las glicoproteínas de la presente divulgación pueden producirse en células huésped. Una célula puede ser "derivada de" una célula huésped cuando se obtiene a partir de la célula huésped mediante cualquiera de las técnicas normales de crecimiento y cultivo conocidas por los expertos en la materia, como la división celular mitótica normal, la clonación, como la clonación por dilución de una sola célula, etc. "Derivado de" una célula huésped también incluye las modificaciones recombinantes hechas a la célula huésped que no afectan a la función primaria de expresar el Factor VII y la sialidasa. Una proteína heteróloga es una proteína que una célula ha sido diseñada para producir.

Realizaciones preferidas

En una realización, la glicoproteína del Factor VII o VIIa comprende uno o dos, preferentemente dos, glicanos ligados a N y tiene un patrón de glicosilación caracterizado por una sialilación reducida en comparación con el Factor VII o VIIa humano de tipo salvaje. Preferentemente, los moles de ácido siálico conjugado por mol de glicano ligado a N en la glicoproteína son inferiores a 0,05, menos de 0,1, menos de 1,0, menos de 2,0, menos de 3,0, menos de 4,0, menos de 5,0 o menos de 6,0, o la relación de moles de ácido siálico conjugado por mol de glicano ligado a N está dentro de un intervalo seleccionado del grupo que consiste en (1) de 0 a 8; (2) de 0 a 7; (3) de 0 a 6; (4) de 0 a 5; (5) de 0 a 4; (6) de 0 a 3; (7) de 0 a 2; (8) de 0 a 1 y (9) de 0 a 0,5, o bien relaciones de 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, 2 a 4, 2 a 3, 3 a 8, 3 a 7, 3 a 6, 3 a 5, 3 a 4, 4 a 8, 4 a 7, 4 a 6, 4 a 5, y 0,1 a 1. La relación es una medida de los moles de ácido siálico unidos a una glicoproteína en relación con el número de glicanos en la glicoproteína. Lo más preferible es que la glicoproteína tenga uno o dos glicanos ligados al N y cantidades mínimas de ácido siálico unido covalentemente a estos glicanos. Aún más preferentemente, la glicoproteína no tiene sustancialmente ningún glicano con ácido N-acetilneuramínico terminal, y tiene dos glicanos ligados a N. El número de glicanos se refiere al número de fracciones de azúcares unidas a un glicano ligado a N en la glicoproteína, donde un sitio de glicosilación ligado a N puede soportar sólo un glicano como se define aquí a efectos de esta relación.

La relación se determina utilizando un kit de etiquetado fluorescente de ácido siálico como el vendido por Takara Bio Inc. #4400). Dicho kit de etiquetado fluorescente de ácido siálico incluye un paso para la liberación del ácido siálico de la glicoproteína unida, como por ejemplo por hidrólisis ácida parcial o por el uso de sialidasa, como la sialidasa de

5 Arthrobacter ureafaciens. A continuación, los ácidos siálicos libres se marcan con un fluoróforo como el 1,2-diamino-4,5-metilenooxibenceno ("DMB"). A continuación, los ácidos siálicos marcados se miden cuantitativamente mediante HPLC y comparando las alturas de los picos con una curva de calibración. Así, la relación medida es una relación de moles de ácido siálico por mol de glicano liberado de todas las glicoproteínas del Factor VII o del Factor VIIa de la composición.

Al tener una sialilación reducida, las glicoproteínas del Factor VII y VIIa tienen una semivida terminal más corta que el Factor VII o VIIa de tipo salvaje.

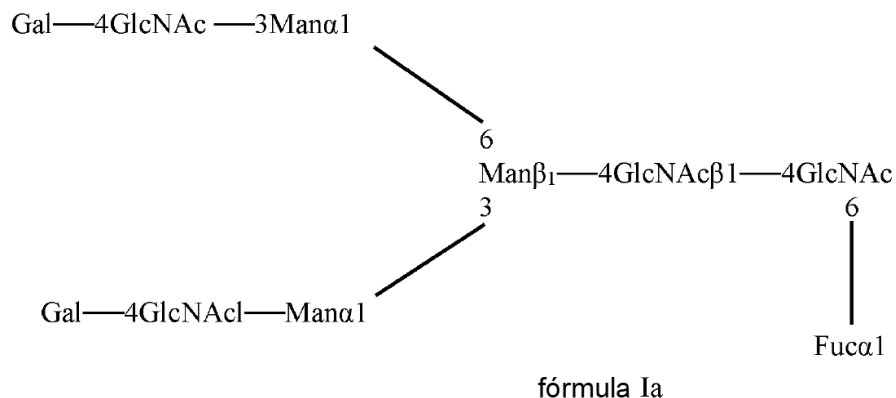
10 En una serie de realizaciones, las composiciones de glicoproteínas de Factor VII o Factor VIIa o los propios polipéptidos aislados tienen una semivida terminal medida en plasma humano o de mamífero, por ejemplo plasma murino o de rata, de menos de 2 horas, menos de 1,5 horas, menos de 1 hora, menos de 0,75 horas, menos de 0,5 horas, menos de 0,25 horas, menos de 0,1 horas, o tan corta que no puede medirse razonablemente.

15 La glicoforma del Factor VII o del Factor VIIa tiene preferentemente un patrón de glicosilación ligado a N que tiene una sialilación sustancialmente reducida como se ha divulgado anteriormente, como por ejemplo, sustancialmente sin glicanos con un ácido N-acetilneuramínico terminal, y tiene un glicano sustancial que es un glicano de fórmula I y cantidades traza o menos del glicano de fórmula II y/o del glicano de fórmula III. En otra realización, la glicoforma del Factor VII o del Factor VIIa tiene cantidades traza o menos de glicanos de fórmula III, en otra realización tiene cantidades traza o menos de glicanos de fórmulas II y III, y en otra realización tiene glicanos de fórmula I y cantidades traza o menos de glicanos de fórmulas II y III. En otra realización, la glicoforma del Factor VII o del Factor VIIa tiene un patrón de glicosilación ligado a N que tiene una sialilación sustancialmente reducida como se ha divulgado anteriormente, como por ejemplo, sustancialmente ningún glicano con un ácido N-acetilneuramínico terminal, y tiene glicanos de fórmula IV, en otra realización tiene glicanos de fórmula IV y fórmula V, en otra realización tiene glicanos de fórmulas IV, V y XI, y en otra realización tiene glicanos de fórmulas IV, V, XI y I. En una realización, la glicoforma del Factor VII o del Factor VIIa tiene un patrón de glicosilación ligado a N que tiene una sialilación sustancialmente reducida como se ha descrito anteriormente, como por ejemplo, sustancialmente sin glicanos con un ácido N-acetilneuramínico terminal, y tiene cantidades traza o menos de glicanos de fórmula II y/o de fórmula III.

20 Los patrones de glicanos descritos en el presente documento se describen mediante fórmulas derivadas de la masa que pueden ser genéricas para abarcar más de una estructura que tenga la misma masa pero diferentes enlaces entre el glicano. La columna "Estructura ejemplar" de la Figura 3 muestra los posibles enlaces de los glicanos para las estructuras de cada una de las fórmulas I-XI.

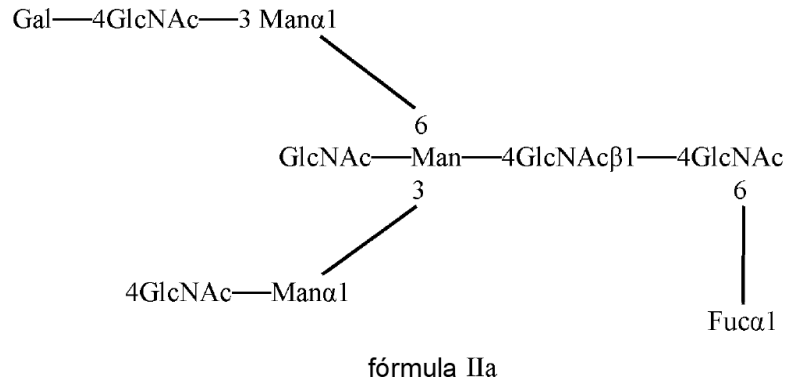
30 Utilizando la nomenclatura que identifica los enlaces específicos de los glicanos, y que es coherente con los datos de masa de los glicanos descritos en el presente documento, una realización de la invención es una glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa que tiene un patrón de glicosilación ligado a N que comprende glicanos; en el que el patrón de glicosilación comprende:

- 35 (1) sustancialmente no hay glicanos con ácido N-acetilneuramínico terminal y
(2) un glicano sustancial que es un glicano de la siguiente fórmula Ia

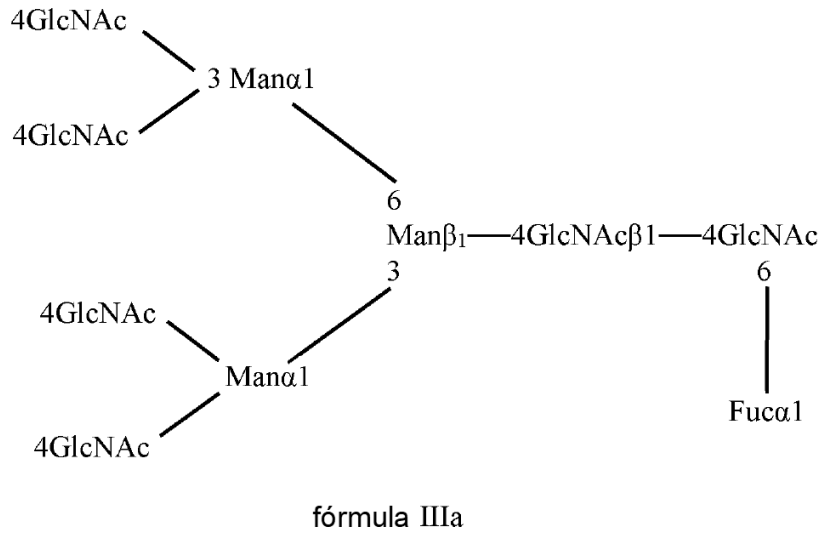


y

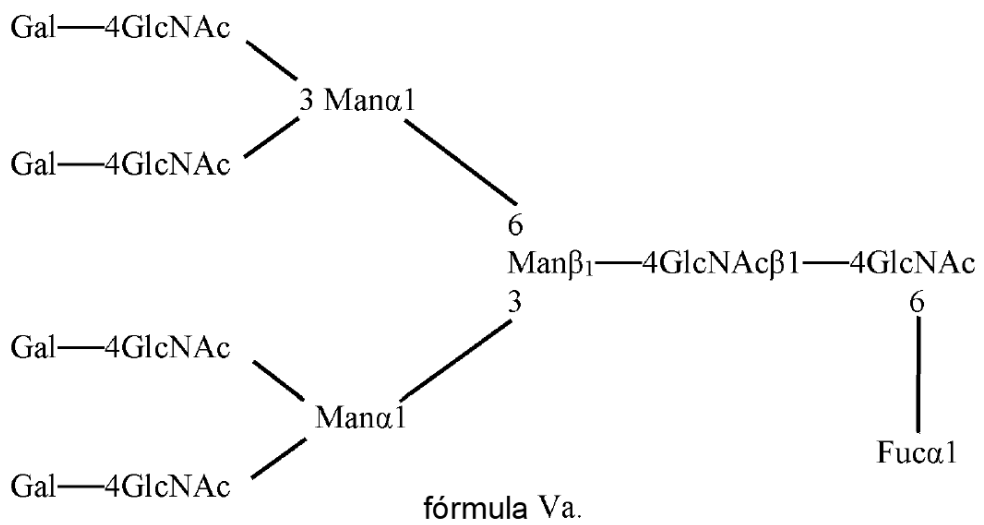
- (3) cantidades traza o menos de uno o más glicanos seleccionados del grupo que consiste en un glicano de fórmula IIa:



y un glicano de fórmula IIIa:



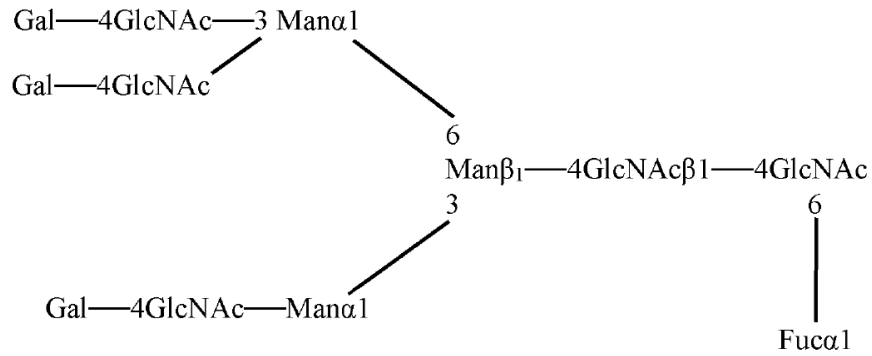
y un glicano de fórmula Va



5

En otra realización, la glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa descrita inmediatamente antes tiene un patrón de glicosilación que comprende además:

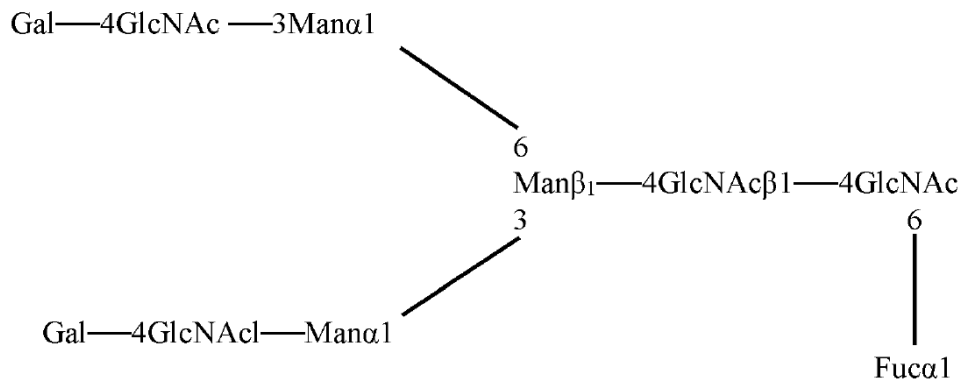
(1) un glicano de fórmula IVa



La glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa descrita anteriormente puede tener cantidades traza o menos del glicano de fórmula IIa y/o del glicano de fórmula IIIa. En otra realización de la invención, la glicoproteína del Factor VIIa comprende una cadena pesada; en la que la cadena pesada tiene un patrón de glicosilación ligado a N que comprende glicanos; y además en la que el patrón de glicosilación comprende:

5

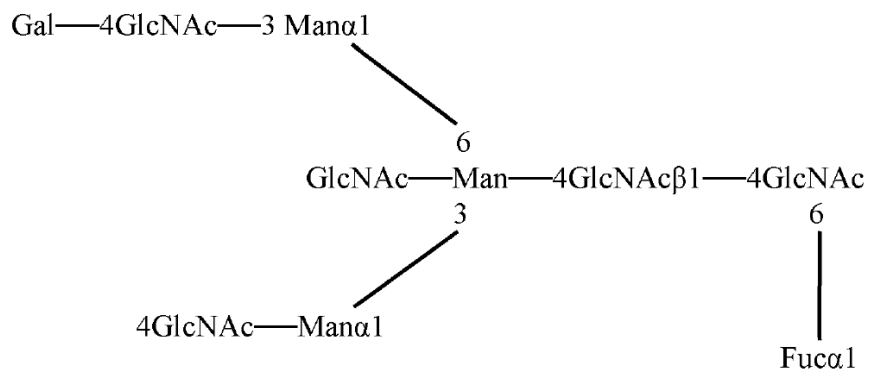
- (1) sustancialmente no hay glicanos con ácido N-acetilneuramínico terminal y
- (2) un glicano sustancial que es un glicano de fórmula Ia:



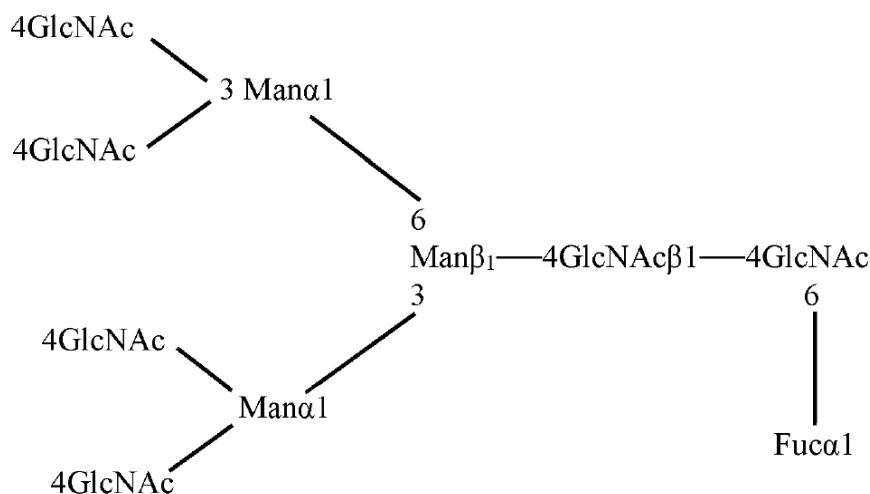
y

10

- (3) cantidades traza o menos de uno o más glicanos seleccionados del grupo que consiste en un glicano de fórmula IIa:



y un glicano de fórmula IIIa



fórmula IIIa.

En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa comprende, contiene, consiste esencialmente o consiste en la secuencia de aminoácidos del Factor VII o del Factor VIIa humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2). En una realización, la glicoproteína tiene una secuencia de aminoácidos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y preferentemente tiene sustituciones de aminoácidos conservadoras cuando hay sustituciones. En otra realización, la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa comprende, contiene, consiste esencialmente o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y tiene una secuencia de aminoácidos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, siempre que la secuencia de aminoácidos no comprenda o consista en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que tiene las mutaciones P10Q, K32E, A34E, R36E, T106N y V253. En una realización, la glicoproteína tiene una secuencia de aminoácidos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos no comprende ni consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que tienen sólo las mutaciones P10Q, K32E, T106N y V253N, o sólo las mutaciones P10Q, K32E, A34E, R36E, T106N y V253N. Debe entenderse que "tener sólo las mutaciones" significa que las secuencias de aminoácidos con mutaciones adicionales, así como las mutaciones enumeradas, están fuera del alcance de la limitación de responsabilidad.

En otra realización, la glicoproteína tiene una secuencia de aminoácidos que tiene 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 75, o 70 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y tiene actividad del Factor VII o del Factor VIIa. En otra realización, la glicoproteína tiene una secuencia de aminoácidos que tiene 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 75, o 70 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y tiene actividad de factor VII o factor VIIa, siempre que la secuencia de aminoácidos no comprenda o consista en SEQ ID NO: 2 que sólo tienen las mutaciones P10Q, K32E, A34E, R36E, T106N y V253. En otra realización, la glicoproteína tiene una secuencia de aminoácidos que tiene 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 75, o 70 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos no comprende ni consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 con mutaciones sólo en P10Q, K32E, T106N y V253N, o sólo en P10Q, K32E, A34E, R36E, T106N y V253N.

En otra realización, la glicoproteína del factor VII o del factor VIIa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, o codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 75, o 70 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y con actividad del Factor VII o del Factor VIIa. En otra realización, la glicoproteína de Factor VII o Factor VIIa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, o codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 75, o 70 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que tiene actividad de Factor VII o Factor VIIa, y la secuencia de aminoácidos no comprende ni consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que tengan las mutaciones P10Q, K32E, T106N y V253N, o que tengan las mutaciones P10Q, K32E, T106N y V253N y P10Q, K32E, A34E, R36E, T106N y V253N.

En una realización, la glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa está codificada por un ácido nucleico que comprende, contiene, consiste esencialmente en, o consiste en la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor VII humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1). En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la glicoproteína

5 tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 diferencias de ácidos nucleicos con respecto a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 y codifica un polipéptido que tiene actividad de Factor VII o Factor VIIa, en una realización siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido no consista en SEQ ID NO: 2 que tenga sólo las mutaciones P10Q, K32E, A34E, R36E, T106N y V253; y en otra realización siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido no tenga sólo las mutaciones P10Q, K32E, T106N y V253N. En otra realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la glicoproteína tiene una secuencia de nucleótidos que tiene 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 75, o 70 % de homología con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 y codifica una proteína que tiene actividad de Factor VII o Factor VIIa, en una realización siempre que la secuencia de aminoácidos de la proteína no consista en SEQ ID NO: 2 que tenga sólo las mutaciones P10Q, K32E, A34E, R36E, T106N y V253N; y en otra realización siempre que la secuencia de aminoácidos no tenga sólo las mutaciones P10Q, K32E, T106N y V253N. En otra realización, la glicoproteína del Factor VII está codificada por un ácido nucleico que codifica el Factor VII humano de tipo salvaje y cuya secuencia está determinada por la optimización del codón para la célula huésped. En una realización, el ácido nucleico que codifica la glicoproteína del Factor VII de la presente divulgación comprende, contiene o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 3 o una secuencia de ácido nucleico que comprende, contiene o consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 75 o 70 % de homología con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y codifica una proteína con actividad de Factor VII o Factor VIIa, en una realización siempre que la secuencia de aminoácidos de la proteína no consista en SEQ ID NO: 2 que sólo tiene las mutaciones P10Q, K32E, A34E, R36E, T106N y V253N; y en otra realización siempre que la secuencia de aminoácidos de la proteína no consista en la SEQ ID NO: 2 que sólo tienen las mutaciones P10Q, K32E, T106N y V253N.

10 Las glicoproteínas de la presente divulgación pueden producirse recombinantemente en una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que sea una línea celular CHO K-1 o CHO-S en condiciones como las de los ejemplos o en otras condiciones de cultivo que permitan una productividad celular adecuada para la expresión y recuperación de la proteína recombinante. Otras líneas celulares CHO adecuadas pueden ser identificadas por un experto en la materia mediante pruebas rutinarias, teniendo en cuenta el conocimiento de las diversas líneas celulares CHO. Véase, por ejemplo, Wurm, Florian, "CHO Quasispecies - Implications for Manufacturing Processes", Processes (2013), 1, 296-311; doi: 10.3390/pr1030296. La célula huésped CHO se transfecta recombinantemente con un ácido nucleico que codifica el Factor VII y un ácido nucleico que codifica la sialidasa. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de la sialidasa es de la especie *Artherobacter urefaciens* o derivado de ella, como por optimización de codones, por ejemplo, teniendo la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, expresando en ambos casos una sialidasa que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 como se muestra en la Figura 5 con o sin la secuencia de señal de secreción. En otra realización, la célula huésped se transfecta con un ácido nucleico que codifica la sialidasa que tiene al menos un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 % u 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 con o sin la secuencia de señal de secreción. La célula huésped transfectada puede cultivarse en las siguientes condiciones: Medio CD-Fusion (Sigma-Aldrich) con 6 mM de medio GlutaMAX® (Gibco), que contiene L-glutamina, y 30 ng/ml de vitamina K. Se cree que las glicoproteínas de la presente divulgación pueden producirse a partir de células huésped CHO cultivadas en medio de cultivo celular ActiCHO (GE Healthcare) complementado con glutamina y vitamina K según sea apropiado para la línea celular CHO. Otros medios en los que pueden crecer las células CHO también pueden ser potencialmente adecuados (por ejemplo, el medio CD-CHO de ThermoFisher Scientific).

15 También son útiles las formulaciones farmacéuticas de las glicoproteínas de Factor VII o Factor VIIa y las composiciones de las mismas que comprenden el polipéptido de Factor VII o Factor VIIa y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. En ciertos ejemplos, las formulaciones farmacéuticas son para administración parenteral, como por ejemplo por administración intravenosa, subcutánea o intramuscular, y la dosificación puede ser como una dosis única en bolo, dosificación intermitente o como infusión intravenosa continua. Las formulaciones tópicas también son útiles. Una realización comprende una formulación farmacéutica que comprende una glicoproteína de Factor VII o Factor VIIa como se describe en el presente documento en una preparación liofilizada que se reconstituye en el momento de su uso. Alternativamente, la formulación farmacéutica puede ser una formulación líquida estable lista para usar que no requiere reconstitución. La formulación farmacéutica puede ser un polvo liofilizado en viales de un solo uso de 1, 2, 5 u 8 mg de polipéptido de Factor VII. Tras la reconstitución con un volumen específico de líquido, como agua estéril con histidina, la solución final puede contener cualquier cantidad adecuada de Factor VII o de glicoproteína de Factor VIIa que produzca un efecto terapéutico, como, sin limitación, 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml (1000 microgramos/ml), 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 1-2 mg/ml, 1-3 mg/ml, 1-5 mg/ml, 1-10 mg/ml, 0,2-1,0 mg/ml, 0,5-1 mg/ml, 0,5-2 mg/ml, 0,5-5 mg/ml, 0,5-4 mg/ml, o 0,5-10 mg/ml de Factor VIIa o glicoproteína de Factor VII. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente la dosis adecuada para la administración a un paciente basándose, por ejemplo, en el peso del paciente, el tipo de trastorno o episodio hemorrágico que se está tratando y la actividad del Factor VIIa o del polipéptido del Factor VII que se está empleando. En ciertos ejemplos, la dosificación puede estar en el intervalo de 70-110 microgramos/kg, 70-90 microgramos/kg, o 80-100 microgramos/kg y puede ser de 90 microgramos/kg. El polvo liofilizado puede reconstituirse con un portador acuoso, como agua, agua tamponada, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 %, etc. Los procedimientos reales para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen con más detalle en, por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1990). La aplicación tópica, como puede ser aconsejable en el caso de un traumatismo, puede llevarse a cabo mediante un aerosol, perfusión, catéteres, stent, injerto vascular o stent, pomada u otra preparación conocida en la técnica. En ciertos

ejemplos, la administración tópica puede ser por medio de una matriz vendida o semisólida, como una esponja quirúrgica o una matriz de colágeno, que ha sido tratada, infundida, recubierta o empapada con una composición que comprende la variante del Factor VIIa. Los procedimientos de preparación de dichas matrices son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Thrombosis/Hemostasis 12:445, 2006) y el artesano experto sería capaz de determinar fácilmente una dosis y un procedimiento de aplicación adecuados de la composición sobre la matriz dada.

La presente divulgación se refiere a kits que comprenden la glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa. En ciertos ejemplos, el kit contiene un vial con un líquido listo para usar que contiene la glicoproteína en una composición farmacéutica adecuada. En otros ejemplos, el kit contiene un vial que contiene la glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa liofilizada, o una formulación liofilizada que comprende la glicoproteína, y también un diluyente para la reconstitución. En otros ejemplos, el kit contiene una formulación tópica del Factor VII o de la glicoproteína del Factor VIIa, por ejemplo, una pomada, un aerosol o un líquido, y una matriz como una esponja u otra matriz médica a la que se puede aplicar la formulación tópica antes de su administración al paciente.

Las glicoproteínas del Factor VII o del Factor VIIa y las composiciones aquí descritas son útiles para el tratamiento de los trastornos de la coagulación de la sangre, y de aquellos trastornos que se benefician de la coagulación de la sangre, en particular para la coagulación con un fármaco que tiene una semivida más corta que el Factor VII de tipo salvaje, y son útiles en la fabricación de medicamentos para tratar estos trastornos. En consecuencia, las glicoproteínas del Factor VII o del Factor VIIa y las composiciones aquí presentes son útiles para hemorragias, lesiones traumáticas penetrantes; lesiones traumáticas contundentes; hemorragias en cirugía electiva; hemorragias en cirugía cardíaca; hemorragias en cirugía espinal; cirugía ortopédica; neurocirugía; cirugía oncológica; cirugía posparto; hemorragia posparto; menorragia; hemorragia en el trasplante de células madre; hemorragia en el trasplante de hígado; hemorragia gastrointestinal; hemorragia variceal activa en la cirrosis; hemorragia no variceal en la cirrosis; hemorragia alveolar difusa; aneurisma aórtico; hemorragia intracerebral; lesión cerebral traumática; contusión cerebral; reversión de warfarina; reversión de heparina; reversión de anticoagulantes; reversión de antitrombóticos; deficiencia de Factor VII; quemaduras; profilaxis en pacientes con hemofilia con inhibidores; hepatectomía parcial para pacientes no cirróticos y cirróticos; hemofilia adquirida; púrpura trombocitopénica idiopática; trombastenia de Glanzmann; trombastenia de Glanzmann refractaria a la transfusión de plaquetas y síndrome de Bernard-Soulier. En ciertas realizaciones, las glicofomas del Factor VII de la presente divulgación son útiles para tratar hemorragias, hemorragias gastrointestinales, hemorragias incontroladas, hemorragias en un mamífero sometido a trasplante o resección o cirugía, hemorragias por varices, trombocitopenia, hemofilia, hemorragias intracraneales, aneurismas aórticos y sobreadministración de un anticoagulante.

La hemorragia posparto es una de las principales causas de mortalidad materna. Por lo tanto, existe la necesidad de un tratamiento eficaz que puede ser satisfecho por las glicofomas del Factor VII de la presente divulgación. La hemorragia posparto se ha definido como una pérdida de sangre de más de 500 ml tras un parto vaginal o de más de 1.000 ml tras un parto por cesárea. Una mujer con anemia preexistente o con algunos otros trastornos puede tener menos capacidad para hacer frente a esa pérdida de sangre y, por tanto, puede sufrir una hemorragia posparto con cantidades de sangre inferiores a las señaladas anteriormente. En vista de ello, algunos clínicos sugieren que la hemorragia posparto debería definirse para incluir cualquier cantidad de pérdida de sangre que amenace la estabilidad hemodinámica de la mujer. El reconocimiento y el diagnóstico rápidos de la hemorragia posparto, seguidos del inicio rápido del tratamiento adecuado, son esenciales para el éxito de la gestión del trastorno.

Ejemplos

Se utilizó una línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1) adquirida en SAFC (Sigma-Aldrich) como línea celular madre para la transfección. Se preparó un banco celular criopreservado de esta línea celular CHO-K1 en medio CD-Fusión y se comprobó la esterilidad, el micoplasma y los virus no endógenos (virus adventicio y virus diminuto del ratón) antes de utilizarlo para la construcción de la línea celular.

La construcción de la línea celular se realizó en medio CD-Fusion con 6 mM de medio GlutaMAX® (Gibco), y 30 ng/ml de vitamina K. Las células CHO-K1 se transfectaron con ADN plasmídico pMB246 linealizado utilizando un dispositivo Amaxa Nucleofector II con un kit Amaxa Cell Line Nucleofector V (Lonza Biologics, Slough, Reino Unido) utilizando el programa U-023. El plásmido pMB246 contenía una secuencia de ácido nucleico que codificaba el Factor VII humano de tipo salvaje de la SEQ ID NO: 2. El ácido nucleico fue optimizado por codones. Veinticuatro horas después de la transfección, las transfectantes se sembraron directamente en placas de 96 pocillos con medio de selección CD-Fusion que contenía 10 ug/ml de puomicina (Invitrogen). Tras la selección de fármacos y el cribado, se seleccionaron para su expansión las células de los pozos de focos individuales que mejor producían y eran resistentes a los fármacos. Tras una caracterización adicional de los mejores clones basada en la actividad cromogénica específica, se seleccionó la línea celular candidata final y se produjo un Banco de Células de Investigación (RCB). Estas células fueron supertransfectadas con ADN plasmídico pMB279 linealizado (véase la figura 6) utilizando un procedimiento similar al descrito anteriormente. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se sembraron directamente en placas de 96 pocillos y con medio de selección CD-Fusion que contenía 30 o 50 ug/ml de antibiótico de selección blasticidina (Invitrogen). Tras la selección y el cribado de los fármacos, se seleccionaron los pozos de focos únicos resistentes a los fármacos para su expansión. Tras la caracterización de los ocho mejores clones en función de la calidad y la productividad de las proteínas, se seleccionaron las cinco líneas celulares candidatas finales y se generaron bancos celulares de investigación (RCB) de esas cinco líneas celulares.

Tanto la sialidasa como el Factor VII son secretados por la línea celular diseñada. Como se discute en detalle más adelante, el zimógeno del Factor VII en la cosecha fue purificado y activado a Factor VIIa activo utilizando una modificación de los procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo la publicación de solicitud de patente U.S. 20090047723, "Method for Purification of Factor VII" (Rikke Bolding Jensen y Frank Bech Nygaard).

- 5 El Factor VII expresado en células de mamíferos tiene una serie de modificaciones postraduccionales, incluyendo la modificación de hasta 10 residuos de glutamato dentro de su dominio Gla N-terminal por carboxilación dependiente de la vitamina K para formar residuos de γ -carboxiglutamato (Gla). Dado que el Factor VII puede expresarse con un número variable de residuos Gla, un objetivo clave de la purificación es aislar el Factor VII desialilado con un alto contenido de modificaciones Gla (principalmente de 9 a 10 para el tipo salvaje).
- 10 En el primer paso de la purificación, el medio de cosecha se convirtió en una solución tampón, se concentró y se congeló para su posterior procesamiento. La segunda etapa, la captura del producto mediante cromatografía de intercambio aniónico (AIEC), permite una mayor concentración del producto y la preparación para la tercera etapa, la cromatografía de hidroxiapatita (HAC). Este paso posterior proporciona una purificación sustancial del producto, y también puede eliminar formas de FVII presentes con un bajo contenido de modificaciones Gla. Una cuarta etapa es
- 15 una segunda AIEC, que prepara el producto proteico para la etapa de activación en solución, por ejemplo, modificando la concentración de proteínas y cambiando el tampón.

Dado que el Factor VII se expresa en forma de zimógeno de cadena simple, es necesario un paso de activación para activar la proteína mediante la escisión entre la R y la I (residuo 153 de la proteína madura). Se utilizó un "paso de activación en solución" que implica una incubación de la proteína a temperatura ambiente bajo condiciones que

20 promueven la escisión autoproteolítica del Factor VII a Factor VIIa. A la etapa de activación le siguió una etapa de pulido (tercera AIEC) y la diálisis del producto final en el tampón de formulación. La proteína final se almacena a -70 grados C.

Los glicanos ligados al N se eliminaron mediante un tratamiento enzimático, y los glicanos se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI. Los resultados se muestran en la figura 7. La leyenda de los números romanos

25 utilizados en la figura 7 se encuentra en la figura 3. Como se muestra en la Figura 7, los glicanos ligados al N de los clones desialilados son en su mayoría estructuras fucosiladas bi-antenarias (véase, por ejemplo, el pico de la fórmula I) y tri- y tetra-antenarias (véase, por ejemplo, los picos de la fórmula IV y V). La masa y la intensidad del pico pueden utilizarse para determinar la composición de los glicanos y la abundancia relativa de las estructuras de glicanos detectables. Los datos de las figuras 7 y 8 corresponden a los subclones 9, 11 y (para la figura 8) 9 DS de la línea

30 celular CHO-K1, que es el subclón 9 purificado en mayor medida que la muestra marcada como subclón 9, en comparación con el NOVOSEVEN desialilado. El subclon 9 y el subclon 11 fueron purificados y autoactivados. El subclon 9 DS se purificó aún más mediante filtración de flujo tangencial. Por lo tanto, todas las muestras estaban activadas (es decir, el FVIIa de tipo salvaje desialilado).

La figura 8 muestra el análisis de los glicanos de NOVOSEVEN y de los clones de la célula CHO K-1 de ingeniería por

35 el procedimiento de HPLC después del etiquetado con 2-AA. Los glicanos ligados al N se liberan enzimáticamente, se etiquetan con 2-AA mediante procedimientos estándar y se analizan por HPLC. "ds", como en el título de la figura 8, se refiere a una glicoproteína sustancialmente desialilada. Los glicanos se cuantificaron como se indica en la siguiente tabla:

Clon de FVIIa	Porcentaje de glicanos totales			
	I	IV	V	otros
Novo7	45 %	nd*	nd	35
Clon 9	34,1	35,7	24,2	6
Clon 11	45,8	28,0	13,9	12,2
Clon 9 DS	27,1	26,9	18,0	28
nd= no detectable				

- 40 El patrón de N-glicosilación de la cadena pesada del Factor VIIa recombinante se analizó mediante espectrometría de masas LC para la caracterización estructural, resuelta por HPLC tras la reducción de la molécula de Factor VIIa activada. Por lo tanto, estos datos muestran sólo aquellos glicanos ligados a la N en el HC, que son un subconjunto del conjunto total de glicanos ligados a la N presentes en el heterodímero HC y HL intacto. La figura 9 muestra el perfil de glicosilación de la cadena pesada desialilada ("HC") del producto de referencia, el Factor VIIa recombinante
- 45 NOVOSEVEN y el de una glicoproteína de Factor VIIa de la presente divulgación. El Factor VIIa recombinante desialilado NOVOSEVEN puede producirse mezclando suavemente una suspensión de perlas de neuraminidasa-agarosa (Sigma N5254) y una solución tampón de rFVIIa a temperatura ambiente durante unas 16-24 horas. Una persona con conocimientos normales puede prever procedimientos adicionales para generar tal desialilación enzimática. La glicosilación ligada al N en la cadena pesada del producto de referencia del Factor VIIa desialilado de

NOVOSEVEN es mayoritariamente de estructura bi-antenaria con bisección y diferente sialilación (contenido de ácido siálico terminal: 0, 1 o 2). Se observaron cantidades muy pequeñas de estructura tri-antenaria.

5 Por el contrario, la cadena pesada de la glicoproteína del Factor VIIa de la presente divulgación tiene un patrón de glicosilación diferente al del producto NOVOSEVEN desialilado de referencia. La figura 9 (panel superior) muestra la distribución de N-glicanos para la HC en un Factor VIIa desialilado según la presente invención producido en una línea celular de investigación utilizando una célula CHO-S transfectada con nucleótidos que codifican el Factor VII humano recombinante de tipo salvaje y el dominio activo de sialidasa de *A urefaciens*. En la Figura 9, las flechas hacia abajo muestran dos glicanos presentes en el NOVOSEVEN desialilado pero sustancial o completamente ausentes en las glicoformas del Factor VII de la presente invención. Como se muestra en la Figura 9, la glicoproteína de la presente invención, cuando se analiza por LC-MS, no muestra ninguna glicoforma correspondiente a la fórmula II y a la fórmula III. Sin embargo, la HC del producto de referencia muestra cantidades significativas de cada una de estas glicoformas.

10 El subclon 9 DS conservó la actividad in vitro medida por la activación del factor Xa fosfolípido (PL-Xa). La actividad del Factor VIIa también puede evaluarse utilizando condiciones estándar de ensayo de generación de trombina en plasma humano normal. El factor tisular de 1 pM es el activador y la muestra se ejecuta bajo una concentración de lípidos de 4 micromolar. El aclaramiento puede medirse en un ensayo de aclaramiento de hepatocitos in vitro. El aumento del aclaramiento puede medirse in vivo en ratas y en un estudio PK de HemA.

15 Las glicoproteínas del Factor VII y del Factor VIIa de la presente divulgación tienen glicanos que pueden servir como ligandos para los receptores de limpieza, como el receptor de asialoglicoproteína (ASGPR) en el hígado. Este receptor se une a los glicanos que tienen residuos terminales de galactosa. En particular, ASGPR se une a glicanos con múltiples brazos que terminan en man-GlcNAc-Gal. Las glicoproteínas actualmente divulgadas tienen niveles reducidos de glicanos que se encuentran en otras moléculas de Factor VII y Factor VIIa recombinantes, como el Factor VIIa recombinante NOVOSEVEN, o glicanos que terminan en GlcNAc. Estos glicanos tienen el potencial de interactuar con otros receptores celulares, como los receptores Man/GlcNAc que facilitan la captación en macrófagos y otras células, como las dendríticas. Sin querer estar limitado por la teoría de ninguna manera, se cree que tales glicanos pueden promover un mecanismo diferente de aclaramiento, en comparación con las glicoproteínas actualmente divulgadas, y por lo tanto, tienen una utilidad clínica diferente. Por ejemplo, la tasa de captación en los macrófagos puede ser diferente a la captación por el ASGPR, lo que da lugar a una duración de las acciones y una biodistribución diferentes. Es importante destacar que la captación en las células dendríticas a través de los receptores Man/GlcNAc se ha asociado con mayores índices de inmunogenicidad. El papel de las diferentes estructuras de los glicanos puede ser particularmente importante para el aclaramiento de las moléculas alteradas para eliminar el ácido siálico, como las de la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Bayer HealthCare LLC Feldman, Richard I
 <120> GLICOFORMAS DEL FACTOR VIIa
 <130> 0081563-000234
 <160> 5
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 40 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400>1

ES 2 902 645 T3

gccaacgcgt tcctggagga gctgcgccg ggctccctgg agagggagtg caaggaggag 60
 cagtgtcctc tcgaggaggc ccgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc 120
 tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gcctcaagtc catgccagaa tgggggctcc 180
 tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac 240
 tgtgagacgc acaaggatga ccagctgatc tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag 300
 tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg 360
 ctggcagacg ggggtgcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt 420
 ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc 480
 aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg 540
 accctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggccact gtttcgacaa aatcaagaac 600
 tggaggaacc tgatcgcggt gctgggcgag cacgacctca gcgagcacga cggggatgag 660
 cagagccggc gggggcgca ggtcatcatc cccagcacgt acgtcccggg caccaccaac 720
 cacgacatcg cgctgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcaactgacca tgtgtgtccc 780
 ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgctgg ccttcgtgcg cttctcattg 840
 gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtcctc 900
 aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc 960
 ccaaataatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc 1020
 aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggtg cctgacgggc 1080
 atcgtcagct ggggccaggg ctgcaaacgt gtggccact ttgggggtgta caccagggtc 1140
 tcccagtaca tcgagtggct gcaaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtctc 1200
 ctgcgagccc catttccc 1218

<210> 2

<211> 406

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400>2

ES 2 902 645 T3

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30

Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110

Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140

Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160

Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175

Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190

His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205

Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220

Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn

ES 2 902 645 T3

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

<210> 3

<211> 1332

<212> ADN

5

<213> Homo sapiens

<400>3

atggtcagcc aagcccttcg cctcctctgt ctctcctcgc gccttcaagg atgtctcgca	60
gcagtgttcg tgactcaaga agaggccac ggagtgtcgc acaggcgcgc gagagcgaac	120
gcgttcctcg aggagttgag gcccgctca ctggaacggg aatgcaagga ggagcagtgc	180
tcatttgaag aggccagaga gattttcaag gatgcagaac gcaccaagtt gttctggatc	240
tcctactcag acggagatca gtgcgcctcg tcgccgtgcc aaaacggagg ctcatgcaaa	300

ES 2 902 645 T3

gaccagctcc agtcctacat ctgcttctgc ctgccggcgt tcgaagggcg gaactgtgaa 360
 actcacaagg atgaccagct catctcgtt aacgaaaacg ggggatgcga acagtactgt 420
 agcgaccata ccggaaccaa gcgctcgtgc agatgccacg aaggttactc cctgcttgcc 480
 gacggcgtgt cgtgtactcc aaccgtcgag taccogtgcg gaaagatccc tatcctggag 540
 aaacgcaacg catccaagcc tcagggacgg atcgtggggg ggaaggtctg tccaaaagga 600
 gaatgccctt ggcaagtgct gtcctcgtg aacggagctc agctgtgcgg gggaaacgctc 660
 atcaatacca tctgggtggt gtcggccgcg cactgcttcg ataagatcaa gaactggcgg 720
 aatctgatcg ccgtgctggg agagcatgac ttgtccgagc acgacggcga tgaacagtcc 780
 agacgcgtcg cgcaagtgat catcccgtcg acttacgtgc cggggaccac caatcacgac 840
 atcgcccttt tgcgactcca tcagcctggt gtgctgactg accacgtcgt cccgctctgt 900
 ctgccagaac ggacgttctc cgaaagaacc ctggcctttg tgaggtttag cctggtgagc 960
 ggatggggac aactgctgga caggggcgcg actgctctgg aactgatggt gcttaatgtg 1020
 ccacggctga tgacgcaaga ctgcctgcag cagtctcgta aggtcggcga ctgcgccaat 1080
 atcactgagt acatgttctg cgctggctac agcgatggca gcaaggattc atgtaaagga 1140
 gatagcgggt gccacatgc aactcactat cgcggtacct ggtacctgac cggaattgtc 1200
 tcgtggggac aaggttgcgc taccgtcggg catttcggag tgtatactcg cgtgtcgcag 1260
 tacattgaat ggttgcaaaa actcatgcgc tccgagcctc ggccgggagt gctgctgaga 1320
 gccccctttc cg 1332

<210> 4

<211> 1563

<212> ADN

5

<213> *Arthrobacter ureafaciens*

<400>4

atggcaactg gttcgcggac ctccttgctt ctgccttcg gcctgctctg tctgccttgg 60
 ttgcaagagg gaagcgtgc ccctaccct ccgaacagcc cgactctccc gccaggatcc 120
 ttcagcgaaa ctaatctggc tgcagatcgg actgcccga actttttcta ccgcatocca 180
 gccctgacct acttgggcaa cgacgtggtg ctggccgcat gggacggacg gcctggatca 240
 gcggccgatg ctccaaacct gaactcgatc gtccagaggc gctccaccga tggcggaaaa 300
 acttggggcc cagtgcaagt gatcgtgct ggccatgtcg ccgacgcgtc cggaccgagg 360
 tacggatact cagaccctc gtacatctac gacgcagaag cgaacaaggt gttcgccttc 420
 ttcgtctact ccaaggatca aggctttggc ggctcccagt tcggaaatga cgatgccgat 480
 cgcaacgtga tttcgtcggc cgtgatcga agctcggacg cgggagtgac ctggtcccag 540
 cctcggctca tcacctcgtg gactaagccg ggtacgtcaa agaccaatcc ggcagcaggg 600

ES 2 902 645 T3

gatgtgagat ccaatttcgc ctcatcgggc gaggggattc agctcaagta cggaccgcat 660
aagggtcgcc tgatccaaca gtacgcggga gatgtcagac aggctgacgg atcaaacaaa 720
atccaagcgt attccgtgta ctcgacgac cacggcgtga cctggcacia aggtgccaat 780
gtcggagata ggatggacga aaacaagacc gtggaactga gcgacggacg ggtcctgctt 840
aattcgcgcg acaacgctaa tcgcggctat agaaagggtg cgggtgctgac tgatggaggg 900
gcaacttacg gaccgggtcag ccaggacacc gagctgccag acccggcgaa caatgggtgca 960
attgctgcga tgttcccga tgcgcgcag ggtccgcgg atgcgaaaaa gctgatcttc 1020
accaacgcca attcaaagac tggacgggaa aacgtgtccg ctgcgctgtc atcgatgac 1080
ggagagactt ggccgggagt gcgcaccatc aggagcggat tcagcgcata ctccaccgtg 1140
accggctgg ccgacggaaa gttcggagtc ctctacgagg ggaattacac cgataacatg 1200
ccatttgcca cttttgatga cgcttggtg aactacgtgt gcgctcctct cgcggtcctt 1260
gctgtgaaca tcgccccgtc cgcaacccaa gaagtgccag tcaactgtcac caaccaggag 1320
gccacgacct tttcgggagc aaccgctact gtgtacacc cgagcggctg gtcggccact 1380
actgtcccgg tgcctgacgt ggcccctggt gcctccgtga cggtgacggt cgcgctgacc 1440
gcaccagcgg acgcctcggg cccaagaagc ctgaacgccg cttcacgac cgccgatggt 1500
agagtgtcac agtttacctt tactgcaact actcccgtcg ctcccaagt gggactgacc 1560
atc 1563

<210> 5

<211> 521

<212> PRT

5

<213> *Arthrobacter ureafaciens*

<400>5

Met	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu	Leu
1				5				10						15	
Cys	Leu	Pro	Trp	Leu	Gln	Glu	Gly	Ser	Ala	Ala	Pro	Thr	Pro	Pro	Asn
			20					25					30		
Ser	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Phe	Ser	Glu	Thr	Asn	Leu	Ala	Ala
		35					40					45			
Asp	Arg	Thr	Ala	Ala	Asn	Phe	Phe	Tyr	Arg	Ile	Pro	Ala	Leu	Thr	Tyr
	50					55					60				
Leu	Gly	Asn	Asp	Val	Val	Leu	Ala	Ala	Trp	Asp	Gly	Arg	Pro	Gly	Ser
65					70					75					80
Ala	Ala	Asp	Ala	Pro	Asn	Pro	Asn	Ser	Ile	Val	Gln	Arg	Arg	Ser	Thr

ES 2 902 645 T3

85					90					95					
Asp	Gly	Gly	Lys	Thr	Trp	Gly	Pro	Val	Gln	Val	Ile	Ala	Ala	Gly	His
			100					105						110	
Val	Ala	Asp	Ala	Ser	Gly	Pro	Arg	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Asp	Pro	Ser	Tyr
		115					120					125			
Ile	Tyr	Asp	Ala	Glu	Ala	Asn	Lys	Val	Phe	Ala	Phe	Phe	Val	Tyr	Ser
	130					135					140				
Lys	Asp	Gln	Gly	Phe	Gly	Gly	Ser	Gln	Phe	Gly	Asn	Asp	Asp	Ala	Asp
145				150						155					160
Arg	Asn	Val	Ile	Ser	Ser	Ala	Val	Ile	Glu	Ser	Ser	Asp	Ala	Gly	Val
			165						170					175	
Thr	Trp	Ser	Gln	Pro	Arg	Leu	Ile	Thr	Ser	Val	Thr	Lys	Pro	Gly	Thr
			180					185						190	
Ser	Lys	Thr	Asn	Pro	Ala	Ala	Gly	Asp	Val	Arg	Ser	Asn	Phe	Ala	Ser
		195					200					205			
Ser	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	Leu	Lys	Tyr	Gly	Pro	His	Lys	Gly	Arg	Leu
	210					215					220				
Ile	Gln	Gln	Tyr	Ala	Gly	Asp	Val	Arg	Gln	Ala	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys
225					230					235					240
Ile	Gln	Ala	Tyr	Ser	Val	Tyr	Ser	Asp	Asp	His	Gly	Val	Thr	Trp	His
				245					250					255	
Lys	Gly	Ala	Asn	Val	Gly	Asp	Arg	Met	Asp	Glu	Asn	Lys	Thr	Val	Glu
			260					265					270		
Leu	Ser	Asp	Gly	Arg	Val	Leu	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Asn	Arg
		275					280					285			
Gly	Tyr	Arg	Lys	Val	Ala	Val	Ser	Thr	Asp	Gly	Gly	Ala	Thr	Tyr	Gly
	290					295					300				
Pro	Val	Ser	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Pro	Asp	Pro	Ala	Asn	Asn	Gly	Ala
305					310					315					320
Ile	Ala	Arg	Met	Phe	Pro	Asn	Ala	Ala	Gln	Gly	Ser	Ala	Asp	Ala	Lys
				325					330					335	

ES 2 902 645 T3

Lys Leu Ile Phe Thr Asn Ala Asn Ser Lys Thr Gly Arg Glu Asn Val
 340 345 350

Ser Ala Arg Val Ser Cys Asp Asp Gly Glu Thr Trp Pro Gly Val Arg
 355 360 365

Thr Ile Arg Ser Gly Phe Ser Ala Tyr Ser Thr Val Thr Arg Leu Ala
 370 375 380

Asp Gly Lys Phe Gly Val Leu Tyr Glu Gly Asn Tyr Thr Asp Asn Met
 385 390 395 400

Pro Phe Ala Thr Phe Asp Asp Ala Trp Leu Asn Tyr Val Cys Ala Pro
 405 410 415

Leu Ala Val Pro Ala Val Asn Ile Ala Pro Ser Ala Thr Gln Glu Val
 420 425 430

Pro Val Thr Val Thr Asn Gln Glu Ala Thr Thr Leu Ser Gly Ala Thr
 435 440 445

Ala Thr Val Tyr Thr Pro Ser Gly Trp Ser Ala Thr Thr Val Pro Val
 450 455 460

Pro Asp Val Ala Pro Gly Ala Ser Val Thr Val Thr Val Ala Leu Thr
 465 470 475 480

Ala Pro Ala Asp Ala Ser Gly Pro Arg Ser Leu Asn Ala Ala Phe Thr
 485 490 495

Thr Ala Asp Gly Arg Val Ser Gln Phe Thr Phe Thr Ala Thr Thr Pro
 500 505 510

Val Ala Pro Gln Val Gly Leu Thr Ile
 515 520

REIVINDICACIONES

1. Una glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa que tiene un patrón de glicosilación ligado al N que comprende glicanos; en la que el patrón de glicosilación comprende:
- 5 (1) sustancialmente no hay glicanos con ácido N-acetilneuramínico terminal y
 (2) un glicano sustancial que es un glicano de fórmula I: $(\text{GlcNAc})_4(\text{Man})_3(\text{Gal})_2(\text{Fuc})$ y
 (3) cantidades mínimas de uno o más glicanos seleccionados del grupo que consiste en un glicano de fórmula II: $(\text{GlcNAc})_5(\text{Man})_3(\text{Gal})(\text{Fuc})$ y un glicano de fórmula III: $(\text{GlcNAc})_6(\text{Man})_3(\text{Fuc})$ y;
 (4) un glicano de fórmula V: $(\text{GlcNAc})_6(\text{Gal})_4(\text{Man})_3(\text{Fuc})$.
- 10 2. La glicoproteína de Factor VII o Factor VIIa de la reivindicación 1, en la que el patrón de glicosilación comprende además un glicano de fórmula IV: $(\text{GlcNAc})_5(\text{Man})_3(\text{Gal})_3(\text{Fuc})$.
3. La glicoproteína de Factor VII o Factor VIIa de la reivindicación 1 o 2, en la que el patrón de glicosilación tiene cantidades traza o menos del glicano de fórmula II.
4. La glicoproteína de Factor VII o Factor VIIa de la reivindicación 1 o 2, en la que el patrón de glicosilación tiene cantidades traza o menos del glicano de fórmula III.
- 15 5. La glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la glicoproteína comprende una secuencia de aminoácidos que tiene tres o menos mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 2.
6. La glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa de la reivindicación 1, en la que la glicoproteína es una glicoproteína del Factor VIIa y comprende una cadena pesada; en la que la cadena pesada tiene un patrón de glicosilación ligado al N que comprende glicanos; y además en la que el patrón de glicosilación comprende:
- 20 (1) sustancialmente no hay glicanos con ácido N-acetilneuramínico terminal y
 (2) un glicano sustancial que es un glicano de fórmula I: $(\text{GlcNAc})_4(\text{Man})_3(\text{Gal})_2(\text{Fuc})$; y
 (3) cantidades mínimas de uno o más glicanos seleccionados del grupo que consiste en un glicano de fórmula II: $(\text{GlcNAc})_5(\text{Man})_3(\text{Gal})(\text{Fuc})$ y un glicano de fórmula III: $(\text{GlcNAc})_6(\text{Man})_3(\text{Fuc})$.
- 25 7. La glicoproteína del Factor VIIa de la reivindicación 6, en la que el patrón de glicosilación tiene cantidades traza o menos del glicano de fórmula II.
8. La glicoproteína del Factor VIIa de la reivindicación 5 o 6, en la que el patrón de glicosilación tiene cantidades traza o menos del glicano de fórmula III.
- 30 9. La glicoproteína del Factor VIIa de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en la que la glicoproteína comprende una secuencia de aminoácidos que tiene tres o menos mutaciones con respecto a SEQ ID NO: 2.
10. Un procedimiento de fabricación de la glicoproteína de Factor VII o Factor VIIa de una de las reivindicaciones 2-9 que comprende:
- 35 expresar un ácido nucleico recombinante que codifica la secuencia de aminoácidos para la glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa en una célula huésped CHO K-1 que ha sido modificada por ingeniería recombinante para expresar sialidasa; y
 aislar la glicoproteína del Factor VII o del Factor VIIa así producida.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la sialidasa comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.
- 40 12. La glicoproteína de Factor VII de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento para tratar un mamífero que tiene una enfermedad o un trastorno en el que es deseable la formación de coágulos de sangre, en la que la enfermedad o el trastorno se selecciona del grupo que consiste en una hemorragia, una hemorragia gastrointestinal, una hemorragia incontrolada, una hemorragia en un mamífero sometido a trasplante o resección o cirugía, hemorragia por varices, trombocitopenia, hemofilia, hemorragia intracraneal, aneurisma de la aorta y sobreadministración de un anticoagulante, lesión traumática penetrante, lesión traumática contundente, hemorragia
- 45 en cirugía electiva, hemorragia en cirugía cardíaca, hemorragia en cirugía de la columna vertebral, cirugía ortopédica, neurocirugía, cirugía oncológica, cirugía posparto, hemorragia posparto, menorragia, hemorragia en el trasplante de células madre, hemorragia en el trasplante de hígado, hemorragia gastrointestinal, hemorragia variceal activa en la cirrosis, hemorragia no variceal en la cirrosis, hemorragia alveolar difusa, aneurisma aórtico, hemorragia intracerebral, lesión cerebral traumática, contusión cerebral, reversión de warfarina, reversión de heparina, reversión de
- 50 anticoagulantes, reversión de antitrombóticos, deficiencia de Factor VII, quemaduras, profilaxis en pacientes con hemofilia con inhibidores, hepatectomía parcial para pacientes no cirróticos y cirróticos, hemofilia adquirida, púrpura trombocitopénica idiopática, trombostenia de Glanzmann, trombostenia de Glanzmann refractaria a la transfusión de plaquetas y síndrome de Bernard-Soulier.

13. La glicoproteína de Factor VII para su uso según la reivindicación 12, en la que la enfermedad o el trastorno es una hemorragia que es una hemorragia posparto.

14. Una composición farmacéutica que comprende la glicoproteína de Factor VII o Factor VIIa de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5

ADNc del FACTOR VII HUMANO DE TIPO SALVAJE

GCCAACGGCGTTCCCTGGAGGAGCTGCGGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGC
AGTGCCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTC
TTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTC
CAGTCCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATGACCA
GCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACCACACGGGCACCAAGCGC
TCCTGTCCGTGCCACGAGGGTACTCTCTGCTGCCAGACGGGGTGTCTGCACACCCACAGTTGAATA
TCCATGTGGAAAAATACCTATTCTAGAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGG
GGCAAGGTGTGCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGT
GTGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCACTGTTTCGACAAAATCAAGAA
CTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGCGAGCAGACCTCAGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAG
CCGCGGGTGGCGCAGGTCAATCAATCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCAACGACATCCCG
CTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCCCTCACTGACCATGTGGTGGCCCTCTGCCTGCCCGAACGGAC
GTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACC
GTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCCCTCAACGTGCCCGGGTGTGATGACCCAGGACTGCCTGCA
GCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATATCAGCGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGAT
GGCAGCAAGGACTCCTGCAAGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACCTGGT
ACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTACACCAG
GGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCAGGAGTCTCTCTGC
GAGCCCCATTTCCC (SEQ ID NO: 1)

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEL FACTOR VII HUMANO DE TIPO SALVAJE

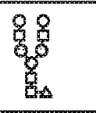
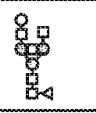
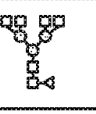
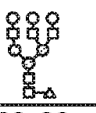
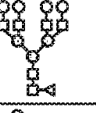
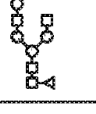
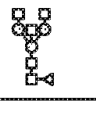
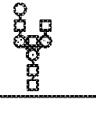
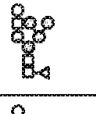
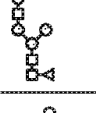
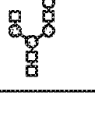
ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLEWISYSDGDCASSPCQNGGSKDQL
QSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGTRSCRCHEGYSLADGVSCTPTVEYPCG
KIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPRGECFWQVLLVNGAQLCGGTLINTIWWVSAAHCFDKIKNWRNLIAV
LGEHDLSEHDGDEQSRRAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRHQPVVLTDHVVP LCLPERTFSERTLAFVRF
LVSGWQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLOQSRKVGDSPNITEYMFACAGYSDGSKDSCKGDSSGP
HATHYRGTWYLTGIVSWGQCATVGHFVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP (SEQ ID NO: 2)

FIG. 1

UNA SECUENCIA DE ADN QUE CODIFICA EL FACTOR VII: HUMANO DE TIPO SALVAJE:

atggtcaagcccaagcccttcctctctctctctctctctctcaaggatctctggacagtggtcggtgactcaagaagagggcccaaggagtgtgca
 caggcgcgggagagcaagcgttcctggaggagttcaggcccgctcactggaacgggaatgcaaggaggagcagtgctcatcttgaaggagcccaq
 agagatttcaaggatgcagaaacgcaaacagttgtttctggatctctactcagaaggagatcagtgccctcgtcgccgtgccaaaacggaggctcatgc
 aagaccagctccagtcctacatctgcttctgctccggcgttcgaaggcgggaactggaactcacaaggatgaccagctcatctgcgttaacgaaa
 acgggggatgcgaaacagtactgtagcgaacataccggaacaaaggctctgtcagatgccacgaaggttactccctycttccggaaggcgtgtgctgt
 actccaaccgtcgagtagccgtgcggaaagatccctatcctggagaacgcaacgcacccaagcctcagggaaggatcgtgggggggaaggtctgtc
 caaaggagaatgcccctggaagtgtctctctgtgaaaggagctcagctgtcgggggaacgctcatcaataccatctgggtgtgtcggccgag
 cactgctcgataagatcaagaactggcgaatctgacggcgtctgggagagcatgactgtccgagcagcagcggcagatgaacagctccagaccgct
 cgcgcaagtgatcaccgtcgacttaagtcgggggacaaccaatcaggacatggcccttttggactccatcagcctgttctgctgactgaccaagctcg
 tccgcctctgtctccagaacggacgttctccsaaagaaacctggcctttgtgaggttagcctggtgagcggatggggacaactgctggacagggcgg
 cgcactgctctggaaactgatggtgttattgtccacggctgatgacgcaagactgctgcagcagctctcgttaaggtcggcactgcgcgaaatacactga
 gtacatgtctgcgctggctacagcagatggcagaaggattcatgtaaaggagatagcggtgcccacatgcaactcactatcggcgtacctggtacctg
 accggaattgtctcgtgggacaaggtttgcctaccctggctcatttcggagtgatatactcggctgttcagagtaacattgaaatggttgcagaaactcattgcgc
 tccgagcctcggccgggagtgctgctgagagccccctttccg (SEQ ID NO: 3)

FIG. 2

NÚMERO DE GLICANO	FÓRMULA	ESTRUCTURA EJEMPLAR
I	(GlcNAc) ₄ (Man) ₃ (Gal) ₂ (Fuc)	
II	(GlcNAc) ₅ (Man) ₃ (Gal)(Fuc)	
III	(GlcNAc) ₆ (Man) ₃ (Fuc)	
IV	(GlcNAc) ₅ (Man) ₃ (Gal) ₃ (Fuc)	
V	(GlcNAc) ₆ (Gal) ₄ (Man) ₃ (Fuc)	
VI	(GlcNAc) ₄ (Man) ₃ (Gal)(Fuc)	
VII	(GlcNAc) ₅ (Man) ₃ (Fuc)	
VIII	(GlcNAc) ₅ (Man) ₃ (Gal)	
IX	(Man) ₅ (GlcNAc) ₃ (Gal)(Fuc)	
X	(GlcNAc) ₃ (Man) ₃ (Gal)(Fuc)	
XI	(GlcNAc) ₄ (Man) ₃ (Gal)	

LEYENDA

- = GALACTOSA (Gal)
- = N-ACETILGALACTOSAMINA (GlcNAc)
- = MANOSA (Man)
- △ = FUCOSA (Fuc)

FIG. 3

UNA SECUENCIA DE ADN OPTIMIZADA POR CODONES DEL DOMINIO CATALITICO DE LA SIALIDASA DE ARTHEROBACTER UREFACIENS

atggcaactggttogggacctccttggcttetegecttggcctgctctgtctgccctggttgcaagaggggaagcgtgcccctaccctccgaacagccc
gactctcccgccaggatccttcagcgaactaatctggctgcagatcggactgccgccaaactttttctaccgcatacccagcctgacctacttgggcaacg
acgtggctgctggccgatgggacggacggcctggatcagcggccgatgctccaaccggactcgtccagagggctccaccgatggcggaa
aaactggggcccagtgcaagtgatcgtgctggccatgtgcggacgctccggacggctacggatactcagaccctcgtacatctacgacgca
gaaaggacaaggtgttcgctctctcgtctactccaaggatccaaggctttggcggctcccagttcggaaatgacgatgcccgatcgcaacgtgatttcgtc
ggcctgatcgaaagctcggacggcggagtgacctggtcccagcctggctcatcaactcggtaagccgggtactcgtcaaaagaccaatccggca
gcaggggatgtgagatccaatttcgctcatcggggcaggggatccagctcaagtaaggaccgcataaaggctgcctgatccaaacagtaacggggaga
tgtcagacaggtgacggatcaaacaaaatccaaggctattccgtgtactcggacgaccaaggctgacctggcacaaaggtgccaatgtcggagata
ggatggacgaaaaaagaccgtggaaactgacggacggagcgggtcctgcttaattcggcgcacaacgctaatcggcggctatagaaaggtggcgggtgtc
gactgatggaggggcaacttacggaccggtcagccagggacacggagctgccagaccggcggaaacaatggtgcaattgcggcgtatgtcccgaatgcc
gcgcaggggtccgcggatgcgaaaaagctgatcttcaccaacgccaatccaagactggacgggaaaaacgtgtccgttcggctgtcatgcgatgacgg
agagacttggccgggagtgccgaccatcaggagcggattcagggcatactccaacgtgacccggctggccgagggaaagttcggagtcctctacgag
gggaattacaccgataacatgccatttgcacttttgacagccttggttgaactcgtgtgcctcctcctcgggtccctgcttgaacatcgccccgtccg
caacccaagagtgccagtcactgtcaaccaaccagggagccacccttcgggagcaaccgctactgtgtacaccccagcggctggtcggccact
actgtcccgggtgcctgacgtggccccctggtgcctcgtcaaggtgacggtcgcgctgacccagcggacgctccggcccaagaagcctgaacg
ccgcttcacgaccgcccgatggtagagtgtcacagtttaacttactgcaactactcccgtcgtcccccaagtggtggatgaccatc (SEQ ID NO:
4)

FIG. 4

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEL DOMINIO CATALÍTICO DE LA SIALIDASA DE ARTHEROBACTER UREFACIENS. UNA SECUENCIA DE SEÑAL DE SECRECIÓN ESTÁ SUBRAYADA

Matgsrtslllafgllclbwlgegsaabtponsptlpogsfsetnlaadrtaanffripaltylgndvllawdgrgsaadapnpnsivgrrstdggk
twqvqviaaghvacasgprygsdosyidaeankvfaffvskdgfgsfgndadrnvissaviessdagvtwsqprlitsvtkpgtsktn
paagvrsnfassgegiqlkygphkgrliggyacdrqadgshkiqaysvsdhgvtwhkganvgdrmdenktvelsdgrvllnsrdnargy
rkvastdggatyqpvsqtelpdpanqaiarmfonaagsadakkiffnasktgrenvsarvscddgetwpgvtirsgfsaystvtrladgkf
gvlyegnytdnpfatfdawhycablavavniapsatqevpvtnoeatlsgatatvytpsgwsattvpdvappada
sgprsinaafttadgrvsgfttattpaqglti (SEQ ID NO: 5)

FIG. 5

MAPA DE PLÁSMIDOS PARA EL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN DE SIALIDASA pMB279.

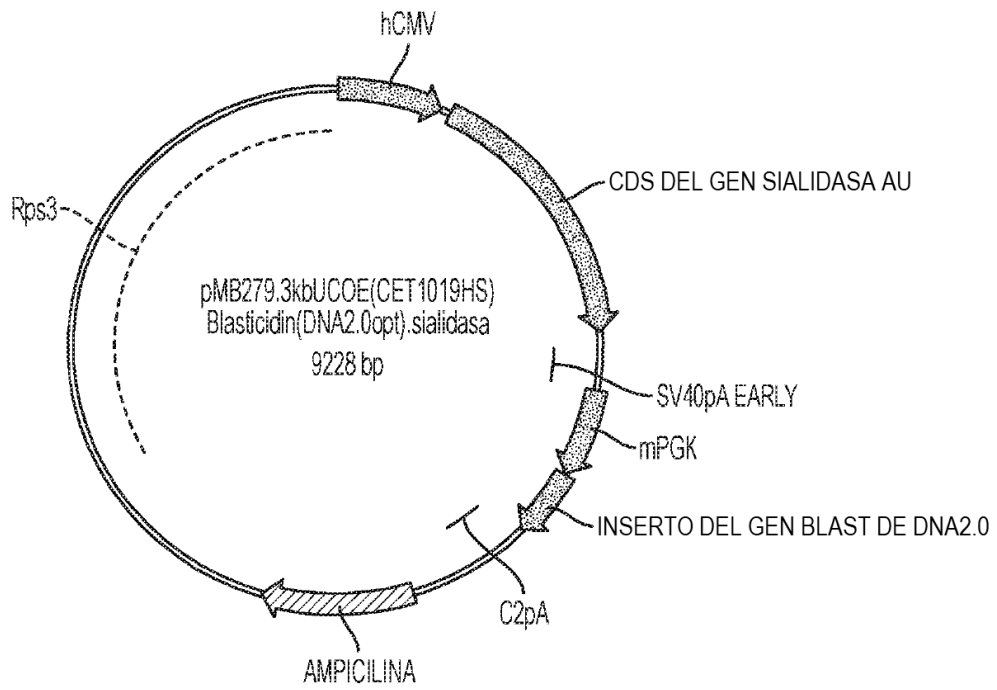


FIG. 6

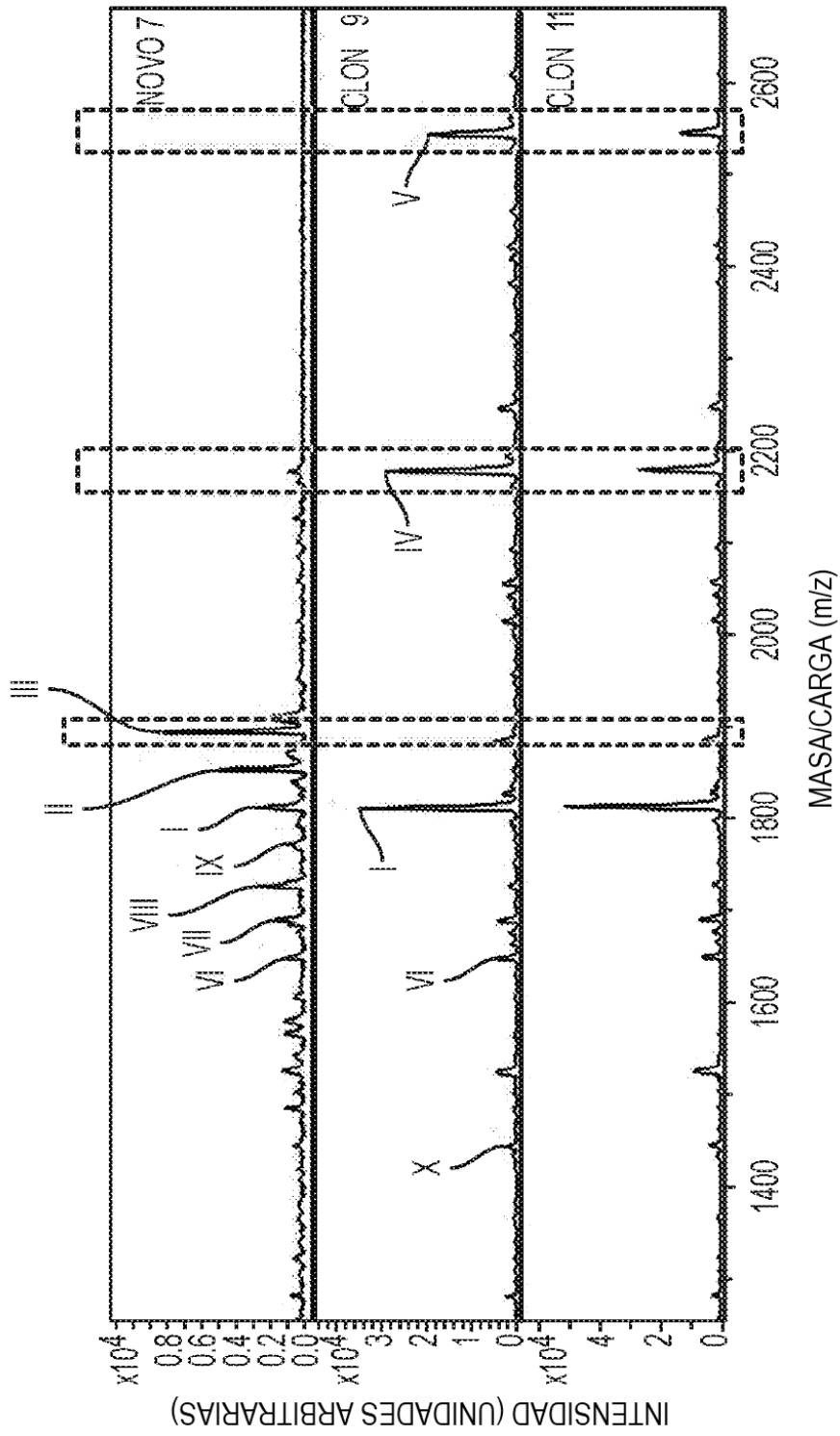


FIG. 7

PERFILADO 2A PARA N-GLICANO NEUTRO DE muestras de dsFVII

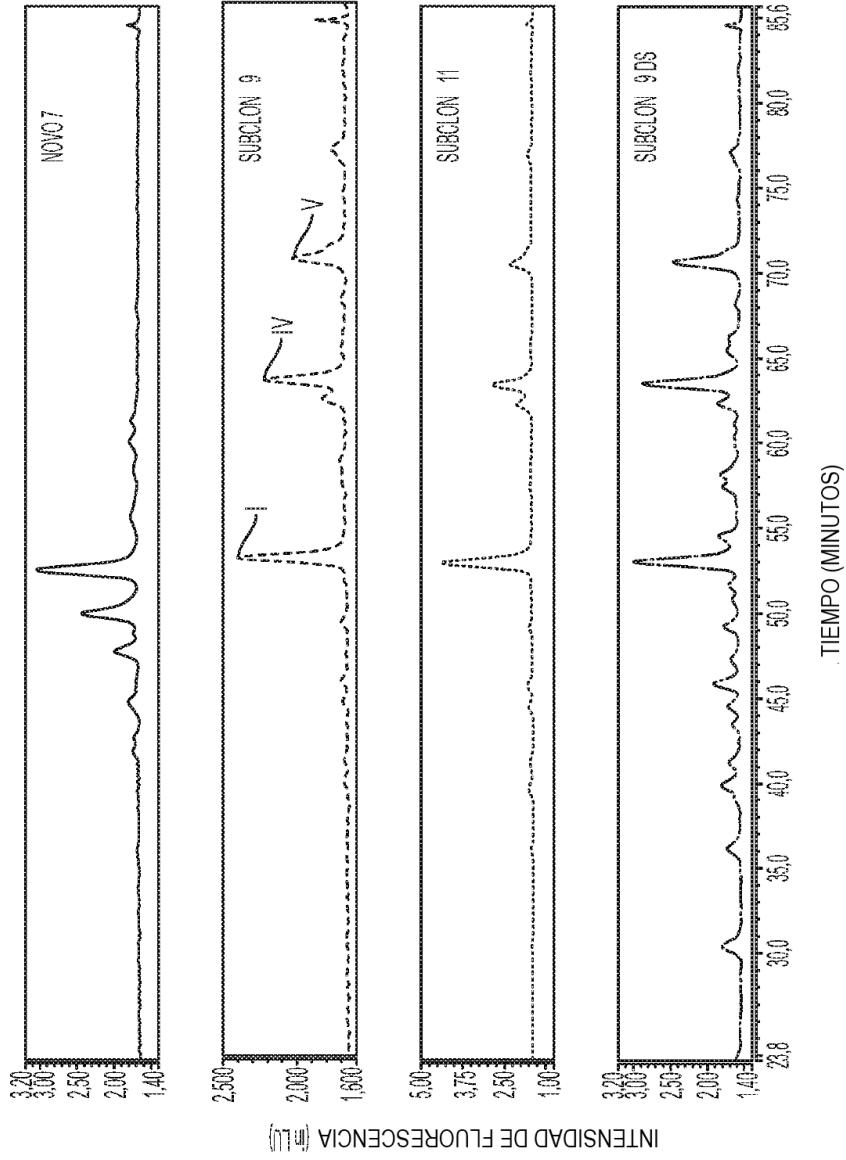


FIG. 8

DISTRIBUCIÓN DE N-GLICANO PARA COMPARACIÓN DE CADENA PESADA DE FVII DE dswtFVIIa y dsNOV07

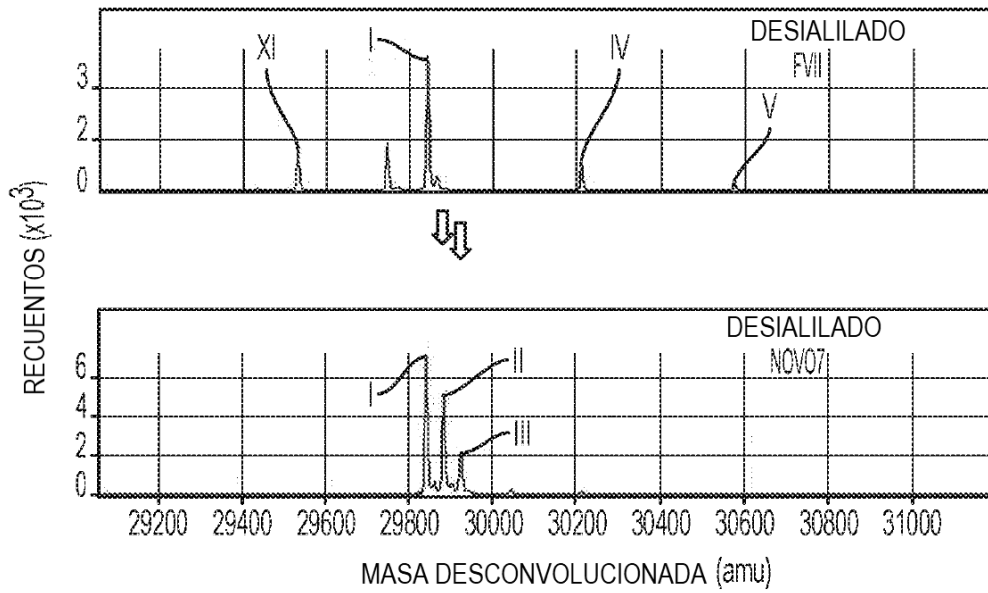


FIG. 9