

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 167**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2009 E 11005215 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2390323**

54 Título: **Variantes del Factor IX con actividad coagulante en ausencia de su cofactor y su uso para el tratamiento de alteraciones hemorrágicas**

30 Prioridad:

28.07.2008 EP 08013561

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

03.02.2014

73 Titular/es:

**DRK-BLUTSPENDEDIENST BADEN-
WÜRTTEMBERG-HESEN GMBH (100.0%)
Sandhofstrasse 1
60528 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es:

**SEIFRIED, ERHARD y
SCHÜTTRUMPF, JÖRG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 441 167 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

Variantes del Factor IX con actividad coagulante en ausencia de su cofactor y su uso para el tratamiento de alteraciones hemorrágicas

5 La presente invención se refiere a variantes del factor IX (F. IX), en las que la variante está caracterizada porque tiene actividad coagulante en ausencia de su cofactor. La presente invención se refiere adicionalmente al uso de estas variantes para el tratamiento y/o la profilaxis de alteraciones hemorrágicas, en particular de la hemofilia A y/o de la hemofilia B o de la hemofilia causada o complicada por anticuerpos inhibidores del F. VIII.

Antecedentes de la invención*Factor de coagulación IX*

10 El factor de coagulación sanguínea IX (F. IX) juega un papel central en la cascada de coagulación. El F. IX es una proteasa de serina tripsinoide dependiente de la vitamina K que circula en el plasma como un zimógeno inactivo de cadena única (DiScipio y col., 1977; Davie y col., 1991). El Factor IX es activado por el factor XIa o por el factor VIIa-factor tisular de una forma dependiente de Ca^{2+} . La activación requiere la escisión de dos enlaces peptídicos por parte del complejo factor VII activado (F. VIIa)-factor tisular o el factor XI activado (F. XIa) (Fujikawa y col., 1974; Lindquist y col., 1978) para eliminar un péptido de activación de 35 residuos.

15 El F. IX es una proteína multidominio. Un dominio de ácido glutámico N-terminal γ -carboxi (GLA) está seguido por dos repeticiones del factor de crecimiento de tipo epidérmico (EGF), el péptido de activación (AP) y un dominio de proteasa de serina C-terminal con un sitio activo tripsinoide (DiScipio y col., 1978). Esta estructura de dominio define la familia de proteasas de serina de los factores de coagulación (Furie y Furie, 1988), incluyendo también el factor II (F. II), el factor VII (F. VII), el factor X (F. X), el factor XI (F. XI), el factor XII (F. XII) y la proteína C (PC). Dentro de esta familia, el F. IXa tiene unas propiedades proteolíticas únicas. La formación del complejo del F. IXa con el F. VIIIa en una superficie de fosfolípidos aumenta 10^6 veces la reactividad frente al sustrato natural del F. X (Duffy y Lollar, 1992), mientras que no se observó prácticamente ninguna escisión de los péptidos con las correspondientes secuencias del F. X (McRae y col., 1981).

20 El factor IX activado (F. IXa) activa entonces el factor X (F. X) en una reacción que es dependiente de la presencia de iones de calcio, una superficie de membrana (fosfolípidos) y una proteína de cofactor no enzimática, el factor VIII activado (F. VIIIa) (Davie y col., 1991).

25 La importancia del F. IXa en la hemostasia está reflejada por la aparición de la alteración hemorrágica hemofilia B en individuos portadores de mutaciones en el gen del F. IX (Gianelli y col., 1998). El F. IXa muestra sólo una pequeña actividad proteolítica frente a sustratos naturales o sintéticos en ausencia de su cofactor el F. VIIIa. La unión del F. VIIIa da como resultado un aumento de 10^6 veces en la actividad proteolítica para el F. X, mientras que la actividad con sustratos peptídicos permanece menos afectada (Duffy y Lollar, 1992; McRae y col., 1981). La última actividad dependiente de sustrato de la modulación del F. IXa se observa de forma similar para las enzimas de coagulación relacionadas activadas PC (Proteína cofactor S), F. Xa (Factor cofactor Va), F. VIIa (factor cofactor tisular) y FIIa (cofactor trombomodulina), que en presencia de sus cofactores, consiguen una actividad significativa o un cambio específico con sus sustratos naturales. (Mann y col. 2003). Todas las proteasas de serina de la coagulación comparten una amplia homología estructural y funcional.

30 Adicionalmente, los factores de coagulación IXa (F. IXa) y Xa (F. Xa) escinden, ambos, sustratos naturales eficazmente únicamente con un cofactor en una superficie de fosfolípidos. Hopfner y col. (1997) investigaron variantes del F. IXa (rf9a) y del F. Xa (rf10a) truncadas en *E. coli* para identificar determinantes de la diferencia en la actividad amidolítica del F. IXa, que es 10^4 veces menor que la del F. Xa. Basándose en las estructuras cristalinas del F. IXa y del F. Xa, subsiguientemente se intercambiaron cuatro componentes característicos del sitio activo (a saber Glu219, el bucle 148, Ile213, el bucle 99, basándose en la numeración de la quimotripsina) entre rf9a y rf10a. Adicionalmente, la combinación de las cuatro mutaciones introdujo esencialmente unas propiedades del F. Xa en el rf9a, es decir, la actividad amidolítica aumentó 130 veces con la selectividad de sustrato del F. Xa.

35 Enzimáticamente, el F. IXa se caracteriza por su muy baja actividad amidolítica, que no mejora en presencia del cofactor, el factor VIIIa (F. VIIIa), lo que distingue al F. IXa de todos los demás factores de coagulación. La activación del complejo F. IXa-F. VIIIa requiere su sustrato macromolecular, el factor X (F. X). El bucle 99 ubicado cerca del sitio activo justifica parcialmente la baja actividad del F. IXa debido a que adopta una conformación que interfiere con la unión del sustrato canónico en los subsitios S2 - S4. Sichler y col. (2003) desvelan que los residuos Lys-98 y Tyr-99 (numeración de la quimotripsina) están críticamente relacionados con las propiedades amidolíticas del F. IXa. El intercambio de la Tyr-99 por residuos menores dio como resultado no sólo una disminución global de la actividad sino también un deterioro en la unión del S1. La sustitución de la Lys-98 por residuos menores y sin carga aumentó la actividad. La mutagénesis simultánea de Lys-98, Tyr-177 y Tyr-94 (rf9-Y94F / K98T / Y177T, numeración de la quimotripsina) produjo una enzima con una actividad aumentada 7.000 veces y una especificidad alterada hacia el factor Xa. Sichler y col. (2003) concluyeron que estos residuos justifican la baja actividad del factor IXa. Sichler y col. (2003) concluyeron que esta triple mutante rf9-Y94F / K98T / Y177T (numeración de la quimotripsina)

probablemente mimetiza los cambios conformacionales que son inducidos fisiológicamente por la unión del cofactor y del sustrato.

Hemofilia

5 Los trastornos de los factores de coagulación mejor conocidos son las hemofilias. La hemofilia es el nombre de una familia de alteraciones genéticas hereditarias que deteriora la capacidad del cuerpo para controlar la coagulación de la sangre. La hemofilia A, la forma más común, está provocada por una mutación en el gen del factor VIII (F. VIII), que produce una deficiencia en el F. VIII. La herencia es recesiva ligada a X; por lo tanto, los varones están afectados mientras que las hembras son portadoras o muy raramente muestran un fenotipo leve. 1 de cada 5.000 machos están afectados. La hemofilia B, también conocida como deficiencia del factor IX (F. IX), es el segundo tipo de hemofilia más común, pero la hemofilia B es bastante menos común que la hemofilia A.

10 Estas deficiencias genéticas pueden disminuir los niveles de los factores de coagulación en el plasma sanguíneo necesarios para un proceso de coagulación normal. Cuando se lesiona un vaso sanguíneo se forma una costra temporal, pero la ausencia de los factores de coagulación impide la formación de fibrina, que es necesaria para mantener el coágulo sanguíneo. Por lo tanto, un hemofílico no sangra más intensamente que una persona normal, 15 sino durante una cantidad mucho mayor de tiempo. En los hemofílicos graves, incluso una pequeña lesión podría dar como resultado una pérdida de sangre que durase días, semanas o que no curara nunca completamente. Aquí el riesgo crítico es con las pequeñas hemorragias normales, que debido a la ausencia del F. VIII tardan mucho tiempo en curar. En áreas tales como el cerebro o el interior de las articulaciones esto puede ser mortal o debilitante. La hemorragia con una lesión externa es normal, pero la incidencia de hemorragias de repetición tardías y de 20 hemorragias internas aumenta, especialmente en músculos, articulaciones o hemorragias en espacios cerrados. Las principales complicaciones incluyen hemartrosis, hemorragia, hemorragia gastrointestinal y menorragia.

Aunque no existe una cura para la hemofilia, puede ser controlada con infusiones regulares del factor de coagulación deficiente, es decir, el F. VIII en la hemofilia A o el F. IX en la hemofilia B.

25 En los países occidentales, los estándares habituales de tratamiento para la hemofilia entran en una de estas dos categorías: (i) profilaxis o (ii) a demanda. La profilaxis implica la infusión del factor de coagulación con una programación regular con objeto de mantener los niveles de coagulación lo suficientemente altos como para evitar episodios de hemorragias espontáneas. El tratamiento a demanda implica el tratamiento de episodios hemorrágicos una vez que aparecen.

30 Sin embargo, algunos hemofílicos desarrollan anticuerpos (inhibidores) contra los factores de sustitución que se les aportan, por lo que la cantidad del factor debe ser aumentada o deben proporcionarse productos no humanos, tales como el F. VIII porcino o variantes modificadas del mismo, véase, por ejemplo, el documento WO 01/68109 A1 (Universidad de Emory).

35 Si el paciente se vuelve resistente al factor de coagulación de sustitución como resultado de inhibidores circulantes, esto puede superarse con el factor humano recombinante VII (NovoSeven®), véase también el documento EP 1 282 438 B1 y el documento EP 1 282 439 B1 (Novo Nordisk). Hasta ahora, una limitación de esta metodología es la corta semivida del factor VIIa (de 2 a 3 horas) en comparación con la del factor VIII (de 10 a 14 horas) o la del factor IX (de 18 a 30 horas), respectivamente y dependiendo de la preparación, lo que hace difícil la terapia profiláctica con el factor VIIa. Además, los riesgos de usar una proteasa ya activada, como el factor VIIa, durante intervalos de tiempo prolongados puede acarrear riesgos, incluyendo riesgos trombóticos, riesgos por la constante activación del 40 endotelio vascular y el daño a los vasos, riesgo de que la señalización procoagulante podría promover el crecimiento o la metástasis tumoral, etc.

El documento WO 02/40544 A2 desvela el factor humano mutante IX que comprende mutaciones en el dominio de unión a la heparina, que disminuye la afinidad del F. IX humano mutante por la heparina en comparación con el F. IX natural, y su uso a la intervención terapéutica de la hemofilia B.

45 *Terapia génica*

La hemofilia es ideal para una metodología terapéutica génica dado que la coagulación requerida está circulando en el torrente sanguíneo y puede ser expresada por lo tanto básicamente en cualquier parte del cuerpo. Además, los estudios con tratamientos profilácticos de pacientes con una forma graves de la enfermedad han demostrado que una mínima elevación del factor de coagulación circulante por encima del 1% ya puede mejorar el resultado clínico y evitar la mayoría de las lesiones provocadas por la enfermedad, es decir, la destrucción articular. Se han desarrollado varias metodologías de terapia génica, pero su ensayo todavía está en etapas clínicas tempranas. Las metodologías más prometedoras son actualmente para el tratamiento de la hemofilia B con vectores víricos adeno- 50 asociados (AAV).

La inyección intramuscular de AAV en el músculo esquelético de seres humanos con hemofilia B es segura, pero se requieren dosis mayores para conseguir unos niveles terapéuticos del factor IX. Sin embargo, el ajuste de la dosis no es posible en esta metodología, dado que el riesgo de formación de anticuerpos inhibidores depende de la cantidad de antígeno de F. IX expresado en el músculo por sitio de inyección. Una estimación en un modelo canino

de hemofilia B permitió concluir que serían necesarias más de 400 inyecciones intramusculares para obtener unos niveles de expresión del F. IX de aproximadamente el 1% en seres humanos (Arruda y col., 2004). Este procedimiento no es por lo tanto aplicable en seres humanos. La eficacia de esta metodología está obstaculizada por la retención del F. IX en los espacios extracelulares musculares y por la capacidad limitante del músculo de sintetizar el F. IX completamente activo a unas elevadas tasas de expresión. Para superar estas limitaciones, Schuettrumpf y col. (2005) construyeron vectores de AAV que codifican para variantes del F. IX para una expresión dirigida en músculo o en hígado en ratones con hemofilia B. Los niveles circulantes de F. IX tras la inyección intramuscular de AAV - F. IX - K5A / V10K (numeración del F. IX), una variante con baja afinidad por la matriz extracelular, eran entre 2 y 5 veces mayores en comparación con el F. IX natural, mientras que las actividades proteicas específicas permanecían similares. La expresión de F. IX - R338A generó una proteína con una actividad específica entre 2 y 6 veces mayor que la del F. IX natural tras el suministro del vector al músculo esquelético o el hígado, respectivamente. Las formas natural y variante del F. IX proporcionan una hemostasia eficaz *in vivo* tras su exposición al ensayo de pinzamiento de la cola. Importantly, la inyección intramuscular de variantes de AAV - F. IX no desencadenó la formación anticuerpos contra el F. IX en ratones tolerantes al F. IX natural. Además de la mencionada variante R338A, descrita en primer lugar por Chang y col. (1998), se ha descrito otra variante, V86A, con una mayor actividad específica de F. IX (Chang y col. 2002).

La aplicación de estrategias de terapia génica para la hemofilia A en comparación con la hemofilia B está adicionalmente complicada por la mayor inmunogenicidad y el mayor tamaño del F. VIII en comparación con el F. IX.

Lin y col., 2002 desvelan en un resumen la mutagénesis de cribado de la alanina en 19 posiciones (en los residuos 185 - 301) del dominio catalítico del factor IX, esas mutaciones en K265 y E277 del F. IX produjeron un F. IX con una actividad coagulante 2 - 3 veces mejor en comparación con la del tipo natural. Adicionalmente establecen que el F. IX con Ala en K265 mostraba un aumento de 10 veces en la unión al TFPI, lo que sugiere que este residuo puede representar la función del bucle 99 implicada en la especificidad de sustrato en la familia de proteasas de serina.

El documento WO 2007/149406 A2 desvela péptidos modificados del factor IX que comprenden una modificación de aminoácido en un polipéptido no modificado del F. IX en la posición F192 y que contiene una o más modificaciones de aminoácido adicionales. En un ejemplo (Ejemplo 3, Tablas 12a y 12b), se muestra la actividad coagulante medida mediante un ensayo de coagulación de aPTT en una etapa usando plasma humano inmunoempobrecido en F. IX de las proteínas mutantes V181N, V181Q y V181H en comparación con el F. IX natural.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de proporcionar medios y procedimientos mejorados para el tratamiento y/o la profilaxis de alteraciones hemorrágicas, en particular de la hemofilia A y/o B.

Por lo tanto, la presente invención aspira a mejorar los procedimientos y los medios para el tratamiento y/o la profilaxis de alteraciones hemorrágicas presentes en la técnica anterior, y es, por lo tanto, un objetivo de la presente invención proporcionar procedimientos y medios mejorados que permitan un tratamiento y/o una profilaxis eficaz, específica y dirigida de las alteraciones hemorrágicas, en particular de la hemofilia A y/o B.

La presente invención resuelve este objeto según se reivindica en las reivindicaciones.

La presente invención describe variantes de proteasas de serina dependientes de la vitamina K de la cascada de coagulación en las que la variante está caracterizada porque tiene actividad coagulante en ausencia de su cofactor.

Los factores de coagulación VII (F. VII), IX (F. IX) y X (F. X), así como la proteína C inhibidora del cofactor (que degrada los cofactores F. Va y F. VIIIa) y la trombina, son proteasas de serina dependientes de la vitamina K de la cascada de la coagulación. La vitamina K es un factor esencial para una gamma-glutamil carboxilasa hepática que añade un grupo carboxilo a residuos de ácido glutámico (en el dominio de Gla) en los factores II (trombina), VII, IX y X, así como la proteína S, la proteína C y la proteína Z.

Como se ha analizado anteriormente, la familia de las proteasas de serina de los factores de coagulación, que incluye el factor II (F. II), el factor VII (F. VIII), el factor IX (F. IX), el factor X (F. X) y la proteína C (PC), está definida por una estructura de dominio específica (Furie y Furie, 1988).

Las proteasas de serina se caracterizan por la presencia de un residuo de serina en el sitio activo de la enzima. Las proteínas mencionadas circulan en forma de zimógeno y son activadas por la escisión de un sitio de activación. Hay una gran homología entre todas las proteasas de la coagulación dependientes de la vitamina K. Varias de ellas muestran el aumento en la actividad únicamente acopladas en un complejo que consiste en la proteasa, los cofactores y membranas de fosfolípidos. El efecto molecular de la unión del cofactor y los sitios de unión son similares entre estas proteínas. La última actividad dependiente de sustrato de la modulación del F. IXa se observa de forma similar para las enzimas de la coagulación PC activadas relacionadas (cofactor Proteína S), F. Xa (cofactor del factor Va), F. VIIa (cofactor del factor tisular) y F. IIa (cofactor trombomodulina), que en presencia de sus cofactores, consiguen una actividad significativa o un cambio específico con sus sustratos naturales (Hockin y col. 2002).

Por lo tanto, una variante de una proteasa de serina dependiente de la vitamina K de la cascada de coagulación es una variante del factor VII (F. VII), del factor IX (F. IX), del factor X (F. X), de la proteína C o de la trombina.

5 El término "variantes" se refiere preferiblemente a variantes por sustitución, adición (inserción) o deleción de aminoácidos o derivados de la proteína natural. Las variantes comprenden adicionalmente una secuencia de aminoácidos que comprende aminoácido(s) modificado(s), aminoácido(s) no natural(es) o peptidomiméticos(s) o compuestos adicionales que pueden mimetizar una estructura/esqueleto peptídico. Las variantes también pueden comprender la sustitución o el acoplamiento con parte que otras moléculas, o el acoplamiento con otras moléculas.

Las sustituciones de aminoácidos comprenden tanto conservativas como no conservativas por otros aminoácidos o por isoésteres (aminoácidos modificados que portan una estrecha similitud estructural y espacial con aminoácidos proteicos), adiciones de aminoácidos o adiciones de isoésteres.

10 Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren típicamente a sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Estas clases incluyen, por ejemplo,

- aminoácidos con cadenas laterales polares sin carga, tales como asparragina, glutamina, serina, treonina y tirosina;
- aminoácidos con cadenas laterales básicas, tales como lisina, arginina e histidina;
- aminoácidos con cadenas laterales ácidas, tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y
- 15 - aminoácidos con cadenas laterales no polares, tales como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano y cisteína.

Proteínas variantes del factor IX

20 La presente invención proporciona una variante de la proteasa de serina dependiente de la vitamina K, el factor IX (F. IX) o se proporciona el factor XI activado (F. IXa), en la que la variante del F. IX se caracteriza porque tiene una actividad coagulante en ausencia de su cofactor, en la que el cofactor es el factor VIII (F. VIII) o el factor VIII activado (F. VIIIa), comprendiendo dicha variante del factor IX o del factor IX activado al menos una sustitución de aminoácido en la posición 265 en combinación con la sustitución de aminoácido V181I.

El factor IX (F. IX) de esta solicitud de patente se refiere a la proteína humana F. IX y al ADNc descrito por Kurachi y Davie, 1982.

25 Refseq NM_000133 para ARNm/ADNc (ID. SEC. N° 1), y
Refseq NP_000124 para la secuencia de proteínas (ID. SEC. N° 2).

La secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. N° 2 contiene el péptido de señalización y el pro-péptido del F. IX. La numeración real comienza en la -46 (Met); +1 es Tyr.

30 Existen muchos polimorfismos que aparecen de forma natural en el gen, así como en la secuencia de aminoácidos del F. IX. A continuación se muestra una lista de la Base de Datos de Mutaciones de la Hemofilia B, King's College de Londres (véase <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haem-Bdatabase.html>). Por ejemplo, el polimorfismo más frecuente está en la posición 147, en la que puede encontrarse treonina en un 67% y alanina en 33% de la población. Interesantemente, la menos frecuente alanina está presente en el único F. IX recombinante terapéutico disponible.

Nombre	Nº de nuc	Cambio de base	Cambio de AA	Frecuencia
	-1186	C → T		52%
	-793	G → A		4%
Msel	-698	C → T		4%
BamHI (i)	-561	T → G		6%
	25	A → G		Notificada una vez
	37	G → A	-44, R → H	Notificada una vez
	48	A → T	-40, I → F	Notificada una vez
	181	C → A		rara
	192	A → G		19%
	353	C → T		rara
	709	A → G		rara
	1778	C → T		3/10
	2627	T → C		6/10
	3747	C → A		6/10
	3756	T → C		6/10
TaqI (iii)	3797	C → T		6/10
	3905	A → T		6/10

35

(continuación)				
Nombre	Nº de nuc	Cambio de base	Cambio de AA	Frecuencia
Ddel	5505	-50		76%
	6550	G → C		Notificada una vez
	6575	C → G		polimórfica en Brasil
Pointe-a-Pitre (Guadeloupe)	6596	G → T		Notificada una vez
	Xmnl	G →		71%
TaqI (ii)	9731	?		Notificada una vez
	10512	A → G		Notificada 5 veces
TaqI (i)	11111	T →		65%
	13275	C → T		1/10
Mspl	15625	A → G		78%
	17397	T → G		1/10
	20002	C → >A		4/10
	MnII (Malmo)	20421	G → A	147, A → T
	20512	T → C	178, F → L	Notificada una vez
	27731	C → G		5/10
	28364	T → C		rara
	29335	G → A		1/10
	29497	G → T		1/10
	29509	T → C		rara
	29532	C → T		4/10
	29648	G → A		4/10
	29650	A → G		rara
	30134	T → C	227, V → V	Notificada 7 veces
	30802	+A		Notificada 4 veces
	30890	C → T	257, H → Y	Notificada 3 veces
	31012	C → T	297, N → N	Notificada una vez
	31093	G → A	324, Q → Q	Notificada una vez
	31103	G → A	328, V → I	Notificada una vez
	32770	T → C		19%
	32847	T → C		Alelo "c" frecuente; alelo "t" observado 4 veces

El factor IX activado (F. IXa) en esta solicitud de patente se refiere a la molécula del F. IX activada por la escisión del péptido de activación de 35 aminoácidos, como se ha descrito anteriormente.

- 5 Dado que ambos factores de coagulación F. IX y F. VIII siempre deben ser activados antes de que puedan mostrar sus funciones, tanto F. IX / F. IXa como F. VIII / F. VIIIa pueden usarse como sinónimos.

Para la numeración de los residuos de aminoácidos se usa el sistema de numeración del F. IX (según Kurachi y Davie, 1982, excepto cuando se indique de otro modo. Algunos autores de la técnica usan la numeración del quimotripsinógeno para la descripción de ciertos aminoácidos en homología con la proteasa de serina quimotripsina.

- 10 Para la presente invención, la numeración de la quimotripsina sólo se usa cuando se indique explícitamente en este documento.

La "actividad coagulante" o "actividad funcional" del F. IX también puede denominarse actividad específica del F. IX, que habitualmente se mide en unidades/miligramo (U/mg). Dado que una Unidad (1 U) de F. IX se refiere a la cantidad de F. IX en 1 mililitro (ml) de plasma humano normal, que se corresponde con 5.000 ng de F. IX, la actividad específica habitual es de aproximadamente 200 U/mg. Dado que la actividad específica del F. IX se define como la actividad de proteasa en el plasma en presencia de F. VIII, no hay ninguna definición usada en la técnica para la actividad (coagulante) en ausencia del cofactor F. VIII. Por lo tanto, la actividad coagulante en ausencia del

15

F. VIII, también denominada "actividad de tipo F. VIII", es expresada en este documento como un porcentaje de la actividad que una cantidad igual de F. IX natural mostraría en presencia de F. VIII.

5 Por lo tanto, una variante del F. IX tiene "actividad coagulante" en ausencia de su cofactor, cuando corrige una deficiencia en la coagulación sanguínea provocada por la ausencia del F. VIII de coagulación en la sangre, que en el caso de una enfermedad, puede ser debida a la ausencia de la proteína F. VIII, a la presencia de una proteína F. VIII defectuosa o a la inhibición de la proteína F. VIII, por ejemplo, por anticuerpos inhibidores.

10 El sistema de ensayo usado en la presente invención para la determinación de la "actividad coagulante" o de la "actividad funcional" de las variantes de una proteasa de serina dependiente de vitamina K de la cascada de la coagulación, preferiblemente de variantes del F. IX, es un ensayo en una etapa basado en el aPTT. El tiempo parcial de tromboplastina activada (aPTT o APTT) es un indicador de rendimiento que mide la eficacia de ambas vías de coagulación común e "intrínseca" (ahora denominada *vía de activación por contacto*). Aparte de detectar anomalías en la coagulación sanguínea, también se usa para monitorizar los efectos del tratamiento con heparina, un importante anticoagulante. Para la determinación de los niveles de actividad del F. VIII o del F. IX en una muestra, el ensayo se realiza añadiendo la muestra a un plasma deficiente en F. VIII o en F. IX para medir la actividad del F. VIII o del F. IX, respectivamente. Este ensayo se denomina ensayo en una etapa del F. VIII o del F. IX. Ahora puede determinarse la actividad independiente del F. VIII de una variante del F. IX mediante un ensayo en una etapa y usando plasma deficiente en F. VIII.

20 Resumidamente, se recoge sangre con oxalato o citrato que detienen la coagulación uniéndose al calcio. El plasma se separa de las partículas corpusculares de la sangre mediante centrifugación. En el caso de proteínas expresadas recombinantemente y purificadas, la proteína se diluye en tampón de imidazol.

25 La muestra se mezcla y se añade a un plasma deficiente en un factor estandarizado (VIII ó IX). Con objeto de activar la vía intrínseca se mezcla con un fosfolípido, un activador (tal como sílice, celita, caolín, ácido elálgico) y calcio (para revertir el efecto anticoagulante del oxalato) en la muestra de plasma. Se mide el tiempo hasta que se forma un trombo (coágulo). La prueba se denomina "parcial" debido a la ausencia de factor tisular en la mezcla de reacción (véase Langdell y col., 1953).

Preferiblemente, las variantes del factor IX según la invención tienen la actividad coagulante clínica pertinente (o actividad coagulante con relevancia clínica), es decir, una actividad coagulante que hace que las variantes sean adecuadas para aplicaciones clínicas, según se desvela a continuación en este documento.

30 Una actividad coagulante preferida con relevancia clínica es una actividad coagulante del 1% o más de la variante en ausencia del cofactor F. VIII, en la que el 100% se refiere a la actividad del F. IX natural en presencia del cofactor F. VIII o F. VIIIa.

35 Alrededor de un 1% de unos niveles sostenidos del factor VIII o del factor IX son suficientes en regímenes de tratamiento profilácticos para prevenir las principales complicaciones por hemorragias en pacientes con hemofilia grave. Para alcanzar un nivel del 1% en un paciente con hemofilia A grave con una variante del factor IX que tiene un "1% de actividad de tipo F. VIII" en ausencia de la variante del F. VIII, serían necesarios unos niveles de F. IX del 100% de lo normal (alrededor de 5.000 ng/ml) adicionales a los ya presentes fisiológicamente de F. IX. Dicho tratamiento parece posible, y por lo tanto la actividad del clínicamente relevante "factor de tipo VIII" se estima en el 1%.

40 La presente invención describe variantes del factor IX que comprenden una modificación del bucle 99, preferiblemente mediante sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos. Una modificación del bucle 99 también puede conseguirse afectando la estructura del bucle con sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos adyacentes a los residuos de aminoácidos o residuos que interactúan de otra forma con el bucle 99.

45 El bucle 99 o el bucle de inserción 80 - 90 (según la numeración del quimotripsinógeno) del factor IX engloba los residuos de aminoácidos 256 a 268 (numeración del F. IX). El bucle 99 esta posicionado cerca del sitio activo y juega un papel en la activación del F. IX. Según Sichler y col. (2003), la Tyr-177 cierra el bucle 99 en una conformación inactiva, lo que, en el complejo fisiológico, es liberado por el cofactor F. VIIIa. El F. X es entonces capaz de reorganizar el bucle 99 desbloqueado y subsiguientemente se une en la hendidura del sitio activo.

La variante del factor IX (F. IX) o del factor IX activado (F. IXa) de la presente invención comprende al menos una sustitución de aminoácido en la posición 265 junto con la sustitución de aminoácido V181I.

50 En una forma de realización preferida, la sustitución de aminoácido de la posición 265 se elige de entre K265T, K265A, K265D, K265E, K265F, K265G, K265H, K265I, K265N, K265S y K265V.

En una forma de realización preferida, la sustitución de aminoácido de la posición 265 se elige de entre K265T, K265A, K265G, K265V, K265N y K265D.

55 En una forma de realización preferida, la variante del factor IX comprende adicionalmente una sustitución de aminoácido en la posición 383.

Preferiblemente, la sustitución de aminoácido en la posición 383 es 1383V.

En una forma de realización preferida, la variante del factor IX comprende adicionalmente una sustitución de aminoácido en la posición 338 y/o 377, preferiblemente comprende adicionalmente una sustitución de aminoácido seleccionada de entre R338A, R338L y S377W, más preferiblemente comprende una sustitución de aminoácido en la posición 265 junto con una sustitución de aminoácido seleccionada de entre R338A, R338L y S377W.

- Variante básica del F. IX (Grupo A)

Los inventores han encontrado una variante del F. IX que permite una terapia de las alteraciones hemorrágicas independiente del F. VIII: una variante con una sustitución de aminoácido en la posición 265, preferiblemente K265T (K98T según la numeración de la quimotripsina). La K265T se ha descrito en un contexto diferente en Sichler y col. 2003. Kolkman y Mertens (2000) describen una variante K265A.

Las mutaciones/variaciones del F. IX evaluadas por los inventores se basan en la observación de que el F. IXa tiene una baja actividad en comparación con otras proteasas de serina como el F. Xa. De hecho, el intercambio de sólo unos pocos aminoácidos que afecten al bucle 99 del F. IX por las correspondientes secuencias del F. X dio como resultado una mejora drástica de la actividad (de hasta varios miles de veces) en estudios genéticos con variantes recombinantes truncadas del F. IXa usando sustratos peptídicos (véase Hopfner y col., 1997 y Sichler y col., 2003)). Al mismo tiempo se observó un cambio en la especificidad hacia la función "de tipo F. X". Dado que estos estudios modelan el F. IXa en una forma no ensamblada al complejo intrínseco de tenasa, los inventores hipotetizaron que una proteína variante con las mismas mutaciones podría permitir la propagación intrínseca de la formación del coágulo en ausencia de F. VIII. Para ensayar esto, los inventores introdujeron las mutaciones Y259F / K265T / Y345T (FTT) en el F. IX y expresaron la proteína en cultivo tisular. Básicamente no se observó ningún efecto sobre la actividad específica del F. IX; sin embargo, la actividad en plasma deficiente en F. VIII disminuyó drásticamente.

Kolkman y Mertens (2000) ya mencionaron que una variante de K265A podría aumentar la actividad del F. IX independiente del F. VIII en un factor de 20. Sin embargo, el F. IX con Y259F / K265T / Y345T ensayado dio como resultado una actividad del 2% a unos niveles de antígeno anormales (100%) en ausencia del F. VIII (Figura 2). Teniendo en consideración que la presencia del F. VIII aumenta la actividad del F. IX en un factor de 10⁶, la triple mutante dio como resultado un aumento de 20.000 veces en la actividad independiente de F. VIII. Esto coloca la actividad coagulante de la variante en ausencia de F. VIII en un marco en el que esto también tendría importancia fisiológica en el momento de la formación del coágulo o como posible terapéutico. Dado que esta actividad es todavía una pequeña fracción de la actividad específica del F. IX en presencia del F. VIII (el 100% del antígeno de F. IX se corresponde con un 2% de la actividad "de tipo F. VIII", es decir, la "actividad coagulante en ausencia del cofactor F. VIII"), los inventores incluyeron mutaciones adicionales elegidas por las propiedades estructurales y las comparaciones de homología con otras proteasas de serina. Adicionalmente ensayaron las mutaciones Y259F, K265T y Y345T independientemente entre sí y pudieron identificar una única mutación de aminoácido (K265T, es decir K98T en la numeración de la quimotripsina) que dio como resultado una enzima con una actividad coagulante del 191% del F. IX y del 6,7% del "de tipo F. VIII" y determinaron que otras mutaciones individuales sólo disminuían la actividad de proteasa en presencia y en ausencia del F. VIII (véase la Tabla 1).

Los inventores han demostrado que la posición 265 es el principal determinante para la actividad de puenteo del F. VIII de las variantes del F. IX. Los inventores demostraron que la reversión de residuo 265 desde T a la natural K (V181I / 265K / I383V, IKV) dio como resultado una pérdida prácticamente completa de la actividad independiente del F. VIII. Sorprendentemente, otras sustituciones de aminoácidos, especialmente en las variantes K265A / V181I / I383V, K265G / V181I / I383V, K265V / V181I / I383V, K265N / V181I / I383V, o K265D / V181I / I383V, dieron como resultado una actividad de puenteo similar del F. VIII que las K265T / V181I / I383V, siendo las mayores para K265A / V181I / I383V. Este resultado era inesperado, dado que la actividad independiente del F. VIII para una variante del factor IX portadora de una única sustitución K265A que había sido descrita previamente estaba en un intervalo bastante menor (Kolkman y Mertens, 2000).

Por lo tanto, en una forma de realización preferida adicional, la variante del factor IX está caracterizada porque tiene actividad coagulante en ausencia del cofactor F. VIII y tiene una sustitución de aminoácido en la posición 265, seleccionada preferiblemente de entre K265T, K265A, K265G, K265V, K265N y K265D u otros aminoácidos, junto con la sustitución de aminoácido V181I.

Los inventores han encontrado adicionalmente que la actividad proteica del F. IX puede ser modificada adicionalmente mediante la introducción de una sustitución de aminoácido adicional a la sustitución de aminoácido del Grupo A en combinación con la sustitución de aminoácido V181I, con objeto de obtener una variante del F. IX con las propiedades deseadas, que se describen en este documento:

Posición del aminoácido	Sustitución del aminoácido
Grupo A 265	K265T u otra sustitución de aminoácido (seleccionada preferiblemente de entre K265T, K265A, K265G, K265V, K265N y K265D) pero no sólo de K265A

(continuación)

	Posición del aminoácido	Sustitución del aminoácido
<i>Grupo B</i>	383, 181, 290	I383V, V181I, I290L
<i>Grupo C</i>	388, 34, 25, 353, 358, 383	E388G, N34D, F25Y, F353Y, R358A, 1383V
<i>Grupo D</i>	338, 377, 4, 86, 217, 277	R338A, R338L, S377W, G4Y, V86A, V217L, E277A

La modificación de las posiciones de los aminoácidos descritos anteriormente (por ejemplo, mediante una sustitución de aminoácido) pueden combinarse entre sí, tal como de la siguiente forma. Sin embargo, son posibles combinaciones adicionales.

5

<i>Grupo A solo</i>	- actividad coagulante en ausencia del cofactor F. VIII (actividad independiente del F. VIII) aumentado en comparación con el tipo natural
<i>Grupo D solo</i>	- actividad coagulante aumentada en presencia de cofactor F. VIII (actividad dependiente del F. VIII) en comparación con el tipo natural
<i>Grupo A + B</i>	- actividad coagulante en ausencia del cofactor F. VIII, en la que la actividad coagulante independiente del F. VIII está aumentada en comparación con la respectiva actividad coagulante de la variante básica (<i>Grupo A</i>).
<i>Grupo A + C</i>	- actividad coagulante en ausencia del cofactor F. VIII y actividad disminuida en presencia de cofactor F. VIII en la que la actividad dependiente del F. VIII está disminuida en comparación con el tipo natural y preferiblemente con la actividad respectiva de la variante básica (<i>Grupo A</i>).
<i>Grupo A + B + C</i>	- actividad coagulante en ausencia del cofactor F. VIII y actividad coagulante disminuida en presencia del cofactor F. VIII, en la que la actividad coagulante independiente del F. VIII está aumentada en comparación con la respectiva actividad coagulante de la variante básica (<i>Grupo A</i>) y en la que la actividad dependiente del F. VIII está disminuida en comparación con el tipo natural y preferiblemente con la actividad respectiva de la variante básica (<i>Grupo A</i>).
<i>Grupo A + D</i>	- actividad coagulante en ausencia del cofactor y actividad coagulante aumentada en presencia del cofactor, en la que la actividad dependiente del F. VIII está aumentada en comparación con el tipo natural, y preferiblemente con la actividad respectiva de la variante básica (<i>Grupo A</i>).
<i>Grupo A + B + D</i>	- actividad coagulante en ausencia del cofactor y actividad coagulante aumentada en presencia del cofactor, en la que la actividad coagulante independiente del F. VIII está aumentada en comparación con la respectiva actividad coagulante de la variante básica (<i>Grupo A</i>) en la que la actividad dependiente del F. VIII está aumentada en comparación con el tipo natural, y preferiblemente con la actividad respectiva de la variante básica (<i>Grupo A</i>).

En las formas de realización preferidas de la invención, la variante del factor IX comprende adicionalmente:

- 10
- una sustitución de aminoácido en la posición 383, preferiblemente I383V, y/o
 - una sustitución de aminoácido en la posición 338 y/o 377, seleccionada preferiblemente de entre R338A, R338L y S377W.

15

Con la intención de generar variantes del F. IX con la mayor actividad posible en ausencia del F. VIII, los inventores añadieron adicionalmente dos sustituciones de aminoácidos adicionales (*Grupo B*), dando como resultado una proteína (V181I / K265T / I383V) con una actividad del 167% del F. IX y del 16% del "de tipo F. VIII". La variante tiene consecuentemente una actividad coagulante 160.000 veces mayor en ausencia del F. VIII en comparación con la proteína natural. Estas sustituciones de aminoácidos adicionales se eligieron de forma que aumentarían al máximo la actividad del F. IX independiente del F. VIII sin aumentar exorbitantemente la actividad específica del F. IX. La justificación que subyace en esta metodología era que demasiada actividad específica del F. IX en presencia del F. VIII podría aumentar el riesgo de complicaciones trombóticas, y suponer por lo tanto una preocupación para el uso de las variantes propuestas del F. IX como compuestos terapéuticos. También son posibles otras combinaciones de las sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos del *Grupo C* pueden restringir adicionalmente la actividad de una proteína variante en presencia del F. VIII, mientras que sólo afectan mínimamente a la actividad en ausencia del F. VIII. De forma análoga, la actividad tanto en presencia como en ausencia del F. VIII puede mejorarse mediante el uso de sustituciones de aminoácidos del *Grupo D*. De esta forma se generó una variante con las cinco mutaciones V181I / K265T / R338A / S377W / I383V que muestra una actividad aumentada en ausencia del F. VIII (22% de la actividad del "de tipo F. VIII" correspondiente a 220.000

20

25

veces mayor que la del F. IX natural) y en presencia del F. VIII natural (16 veces mayor comparada con el F. IX). Las actividades del F. IX y del "de tipo F. VIII" de las variantes ensayadas se ilustran en la Tabla 1.

La posibilidad de estas modificaciones adicionales es importante, dado que permite el diseño y la concepción de variantes del F. IX para aplicaciones específicas, tales como

5 (1) se desea una baja afinidad del F. IX en presencia del F. VIII (actividad dependiente del F. VIII) con una alta actividad del F. IX en ausencia del F. VIII (actividad independiente del F. VIII) (es decir *Grupos A + C*) para disminuir la trombogenicidad de un compuesto terapéutico para tratar la hemofilia A o en pacientes con anticuerpos inhibidores contra el F. VIII.

10 (2) una proteína con una elevada actividad de proteasa independientemente de la presencia del F. VIII o del F. IX podría tener el potencial de tratar todos los tipos de deficiencias de F. IX o de F. VIII (es decir *Grupo A + B + D*).

15 Dado que los efectos de las sustituciones individuales de aminoácidos enumeradas tienen una fuerza diferenciada con respecto a su efecto sobre la actividad del F. IX en ausencia o en presencia del F. VIII, también pueden combinarse sustituciones de aminoácidos de diferentes *Grupos* para conseguir un efecto global deseado sobre la actividad del F. IX para aplicaciones específicas. Por ejemplo, la combinación de la variante K265T (*Grupo A*) con las sustituciones de aminoácidos V181I y 1383V (*Grupo B*), da como resultado una proteína con una elevada actividad en ausencia del F. VIII, pero con una actividad básicamente normal en presencia del F. VIII, lo que se corresponde con la aplicación (1). Para los detalles, por favor véase Tabla 1.

20 Todas las variantes del *Grupo A* y en combinación con el *Grupo A* son especialmente adecuadas para la terapia de pacientes con hemofilia A con anticuerpos inhibidores u otros trastornos hemorrágicos, así como para el tratamiento de la hemofilia B. Con más detalle:

- *variantes del FIX que junto con la variante básica aumentan adicionalmente la actividad coagulante en ausencia del F.VIII (Grupo A combinado con el Grupo B)*

25 Según la invención, una variante del factor IX está caracterizada porque tiene actividad coagulante en ausencia del cofactor F. VIII, y comprende al menos una sustitución de aminoácido en la posición 265 junto con la sustitución de aminoácido V181I.

En una forma de realización, la variante del factor IX comprende adicionalmente una sustitución de aminoácido en la posición 383, preferiblemente 1383V.

30 Una sustitución de aminoácido en la posición 265 se elige preferiblemente de entre K265T, K265A, K265G, K265V, K265N y K265D.

Estas variantes del F. IX del *Grupo A + B* tienen una actividad coagulante independiente del F. VIII que está aumentada en comparación con la respectiva actividad coagulante de la variante básica (*Grupo A*).

- *variantes del FIX que junto con la variante básica restringen la actividad coagulante en presencia del F. VIII (Grupo A combinado con el Grupo C)*

35 La invención describe adicionalmente una variante del factor IX que está caracterizada porque tiene actividad coagulante en ausencia del cofactor F. VIII, pero una actividad disminuida en presencia del cofactor F. VIII, y comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre el grupo de 265, 383, 388, 34, 25, 353 y/o 358.

40 Por ejemplo, la variante del factor IX comprende la sustitución de aminoácido K265T y la(s) sustitución(es) de aminoácido(s) en una posición seleccionada de entre el grupo de 388, 34, 25, 383, 353 y/o 358 (*Grupo C*), tal que comprende la sustitución de aminoácido K265T y la(s) sustitución(es) de aminoácido(s) seleccionadas de entre E388G, N34D, F25Y, F353Y, I383V y/o R358A.

45 Estas variantes del F. IX del *Grupo A + C* tienen una actividad dependiente del F. VIII que está disminuida en comparación con el tipo natural y la respectiva actividad de la variante básica (*Grupo A*) (o disminuida en comparación con la(s) variante(s) del *Grupo A + B*). Por lo tanto, estas variantes del F. IX del *Grupo A + C* restringen la actividad dependiente del F. VIII y minimizan los posibles riesgos trombogénicos.

- *variantes del FIX que junto con la variante básica aumentan adicionalmente la actividad coagulante en ausencia del F. VIII así como restringen la actividad coagulante en presencia del F. VIII (Grupo A combinado con el Grupo B y el Grupo C)*

50 En esta forma de realización de la invención, una variante del factor IX está caracterizada porque tiene actividad coagulante en ausencia del cofactor F. VIII, pero una actividad disminuida en presencia del cofactor F. VIII y comprende al menos una sustitución de aminoácido en la posición 265 junto con la sustitución de aminoácido V181I y comprende adicionalmente una sustitución de aminoácido en la posición 383, preferiblemente I383V.

Estas variantes del F. IX del *Grupo A + B + C* combinan las características de los tres grupos:

- tienen una actividad coagulante independiente del F. VIII,
- tienen una actividad coagulante independiente del F. VIII que esta aumentada en comparación con la respectiva actividad coagulante de la variante básica (*Grupo A*) y
- 5 - tienen una actividad dependiente del F. VIII que está disminuida en comparación con el tipo natural y preferiblemente con la respectiva actividad de la variante básica (*Grupo A*) (o preferiblemente disminuida en comparación con la(s) variante(s) del *Grupo A + B*).

Por lo tanto, estas variantes del F. IX del *Grupo A + B + C* aumentan la actividad independiente del F. VIII, restringen la actividad dependiente del F. VIII y minimizan posibles riesgos trombogénicos.

- 10 - *proteínas variantes del factor IX con una actividad coagulante aumentada en presencia del cofactor F. VIII (Grupo D)*

La presente invención describe adicionalmente una variante del factor IX (F. IX) que está caracterizada porque tiene actividad una actividad coagulante aumentada en presencia de su cofactor en comparación con el tipo natural, en la que el cofactor es el factor VIII (F. VIII) o el factor VIII activado (F. VIIIa).

- 15 Por ejemplo, una variante respectiva del factor IX comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre el grupo de 338, 377, 4, 86, 217 y/o 277, tal que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de entre R338A, R338L, S377W, G4Y, V86A, V217L y/o E277A.

Las variantes del *Grupo D* y las variantes que se combinan con el *Grupo D* son especialmente adecuadas para el tratamiento de la hemofilia B.

- 20 Una proteína con una alta actividad aislada del F. IX en presencia del F. VIII es un buen compuesto terapéutico para el tratamiento de la deficiencia en F. IX. Para este propósito no se requiere una elevada actividad en ausencia del F. VIII, es decir del Grupo A, tal como la mutación K265T. Las sustituciones de aminoácidos del Grupo D también aumentan la actividad del F. IX en presencia del F. VIII en ausencia de la anteriormente mencionada mutación K265T (Grupo A). Una lista de las variantes ensayadas con este propósito sin la introducción de la mutación K265T se muestra en la Tabla 2.

- *proteínas variantes del factor IX con actividad coagulante en ausencia del cofactor y una actividad coagulante aumentada en presencia del cofactor (Grupo A combinado con el Grupo D)*

- 30 La invención describe adicionalmente una variante del factor IX que está caracterizada porque tiene actividad coagulante en ausencia del cofactor F. VIII y una actividad coagulante aumentada en presencia del cofactor F. VIII en comparación con el tipo natural, y comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre el grupo de 265, 338, 377, 4, 86, 217 y/o 277.

- 35 Por ejemplo, la variante del factor IX comprende la sustitución de aminoácido K265T y la(s) sustitución(es) de aminoácido(s) en una posición seleccionada de entre el grupo de 338, 377, 4, 86, 217 y/o 277 (grupo D), tal que comprende la sustitución de aminoácido K265T y la(s) sustitución(es) de aminoácido(s) seleccionada(s) de entre R338A, R338L, S377W, G4Y, V86A, V217L y/o E277A.

Estas variantes del F. IX del *Grupo A + D* tienen una actividad coagulante dependiente del F. VIII que está aumentada en comparación con la respectiva actividad coagulante dependiente del F. VIII de tipo natural, y de la variante básica (*Grupo A*). También tienen una potencia aumentada para el tratamiento de la hemofilia B.

- 40 - *proteínas variantes del factor IX con una actividad coagulante aumentada tanto en ausencia como en presencia del cofactor (Grupo A combinado con el Grupo B y con el Grupo D)*

- 45 En esta forma de realización preferida de la invención, una variante del factor IX está caracterizada porque tiene actividad coagulante (aumentada) en ausencia del cofactor F. VIII y una actividad coagulante aumentada en presencia del cofactor F. VIII, y comprende al menos una sustitución de aminoácido en la posición 265 junto con la sustitución de aminoácido V181I y adicionalmente comprende una sustitución de aminoácido en la posición 383 y/o una sustitución de aminoácido en la posición 338 y/o 377.

- 50 Preferiblemente, la variante del factor IX comprende al menos una sustitución de aminoácido en la posición 265, preferiblemente la sustitución de aminoácido K265T, junto con V181I y sustitución(es) de aminoácido(s) en una(s) posición(es) seleccionada(s) de entre el grupo de 383, 338, y/o 377, más preferiblemente comprende la sustitución de aminoácido K265T/V181I y la(s) sustitución(es) de aminoácido(s) seleccionada(s) de entre I383V, R338A, R338L y/o S377W.

Estas variantes del F. IX del *Grupo A + B + D* combinan las características de los tres grupos:

- tienen una actividad coagulante independiente del F. VIII,

- tienen una actividad coagulante independiente del F. VIII que está aumentada en comparación con la respectiva actividad coagulante de la variante básica (*Grupo A*) y
- tienen una actividad coagulante dependiente del F. VIII que está aumentada en comparación con el tipo natural, y preferiblemente con la respectiva actividad coagulante de la variante básica.

5 La variante del factor IX según la invención se selecciona más preferiblemente de entre la variante K265T / V181I,
la variante K265T / V181I / I383V,
la variante K265T / V181I / I383V / R338A / S377W,
la variante K265A / V181I,
10 la variante K265A / V181I / I383V, o
la variante K265A / V181I / I383V / R338A / S377W.

En una forma de realización preferida, la variante del factor IX según la invención se elige de entre una variante con una sustitución de aminoácido en la posición 265, preferiblemente se selecciona de entre K265T, K265A, K265D, K265E, K265F, K265G, K265H, K265I, K265N, K265S y K265V, más preferiblemente se selecciona de entre K265T, K265A, K265G, K265V, K265N y K265D, en combinación con la sustitución de aminoácido V181I, preferiblemente
15 junto con una sustitución de aminoácido en la posición 383 (preferiblemente I383V),

Más preferiblemente, la variante del factor IX según la invención es
la variante K265T / V181I / I383V,
la variante K265A / V181I / I383V,
20 la variante K265G / V181I / I383V,
la variante K265V / V181I / I383V,
la variante K265N / V181I / I383V, o
la variante K265D / V181I / I383V,
la variante K265E / V181I / I383V,
25 la variante K265F / V181I / I383V,
la variante K265H / V181I / I383V,
la variante K265I / V181I / I383V, o
la variante K265S / V181I / I383V.

La expresión, por ejemplo, "K265T / V181I / I383V" se refiere a una variante que contiene estas sustituciones de aminoácidos en combinación, es decir K265T y V181I y I383V en combinación. La expresión "K265T / V181I / I383V / R338A / S377W" se refiere a una variante que contiene estas sustituciones de aminoácidos en combinación, es decir K265T y V181I y I383V y R338A y S377W en combinación, etc.
30

La modificación del bucle 99 se ha intentado repetidamente como estrategia para modificar la actividad del F. IX (Hopfner y col., 1997, Sichler y col., 2003). Las variantes más prometedoras Y259F (/A261K) y K265T) han sido
35 adicionalmente investigadas para evaluar su posible actividad en ausencia del F. VIII (Hartmann y col., 2007 así como en el documento WO 2008/092644 y en el documento WO 2008/092643). La idea que subyace en esta metodología era modificar la conformación del bucle 99 específico del F. IX modificando los residuos en ambos extremos del bucle. El hallazgo sorprendente en nuestra investigación fue que, al contrario que los modelos de F. IX descritos, en los que el F. IX estaba parcialmente truncado y/o era producido en bacterias en lugar de en células
40 eucariotas, la actividad independiente del F. VIII sólo depende de una mutación en la posición 265. Adicionalmente, la mutación en la posición Y259F estaba impidiendo la actividad global e independiente del F. VIII y únicamente excluyendo la mutación de la posición Y259F podrían obtenerse unas actividades independientes lo suficientemente altas del F. VIII para perseguir adicionalmente una metodología que use variantes del F. IX como compuestos terapéuticos.

45 En el caso de las mutaciones I383V y E388G, el caso era similar. Ambas mutaciones se observaron como una unidad en la primera descripción de Hopfner y col. (1997) y posteriormente en las descripciones de Baxter (véase Hartmann y col., 2007, así como el documento WO 2008/092644 y el documento WO 2008/092643)). Hopfner y col. (1997) informaron incluso de que la I383V sólo tenía un efecto moderado sobre el sistema de expresión bacteriano del F. IX y por lo tanto se propagaba únicamente con E388G. Nuestros experimentos sugirieron lo contrario.
50 Solamente la mutación I383V añadió al F. VIII una actividad independiente del F. IX, mientras que la E388G alteraba la actividad. Creemos que estas diferencias son cruciales para el potencial desarrollo de un nuevo agente de puenteo basado en el F. IX. En primer lugar, las actividades necesarias para mejorar la hemostasia mejoran varias veces excluyendo estas mutaciones, y en segundo lugar, las cifras de las mutaciones introducidas en el F. IX serán la primera preocupación sobre seguridad, dado que el riesgo de formación de anticuerpos inhibidores contra el F. IX probablemente aumentaría con la cantidad de cambios que se introducen en la proteína.
55

- *Conjugados*

En una forma de realización preferida, las variantes del factor IX según la invención comprenden un compuesto o fracción adicional, que está preferiblemente unida covalentemente a la variante (conjugado).

Preferiblemente, el compuesto o fracción adicional se elige de entre

- una proteína, tal como albúmina,
- un marcador, tal como un cromóforo, un fluoróforo, un isótopo, y/o
- un polímero, tal como PEG.

5 *Ácidos nucleicos de las variantes del F. IX y composiciones farmacéuticas*

Según la presente invención, el objeto anterior se resuelve adicionalmente proporcionando ácidos nucleicos que codifican para la variante del factor IX según la presente invención.

Un "ácido nucleico" se refiere a ADN, ARN y derivados de los mismos, ADN y/o ARN que comprenden nucleótidos/nucleósidos codificados.

- 10 Preferiblemente, el ácido nucleico está unido operativamente a una secuencia promotora y/o de terminación. Las secuencias promotoras y/o de terminación preferidas son el promotor de la alfa anti-tripsina humana, la región 1 de control del locus hepático o el promotor de citomegalovirus y una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana o bovina del Virus Simianese 40.

El experto en la técnica será capaz de seleccionar las secuencias promotoras y/o de terminación adecuadas.

- 15 Un ácido nucleico está "unido operativamente" a una secuencia promotora y/o de terminación cuando la transcripción/traducción del ácido nucleico está controlada por el respectivo promotor/terminador, preferiblemente en una célula y por la maquinaria de transcripción/traducción celular, tal que, por ejemplo, la proteína codificada puede ser obtenida a partir del ácido nucleico.

- 20 Preferiblemente, el ácido nucleico es un plásmido de expresión, un constructo de terapia génica, una secuencia codificada por un vector de transferencia génica, una secuencia génica usada para la modificación o la reparación del ADN, o similar.

Los constructos de terapia génica preferidos son vectores víricos y no víricos, tales como vectores víricos adeno-asociados (AAV), vectores de plásmidos o vectores minicirculares, según se describe, por ejemplo, en (Schuettrumpf y col., 2005).

- 25 Según la presente invención, el objeto se resuelve adicionalmente proporcionando una composición farmacéutica que comprende al menos una variante del factor IX (F. IX) de la invención o al menos un ácido nucleico de la invención, y opcionalmente portador(es) y/o excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s).

El (los) portador(es) y/o excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s) adecuado(s) es (son) conocidos en la técnica.

- 30 El experto en la técnica seleccionará el (los) portador(es) y/o excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s) dependiendo de la aplicación prevista de la composición farmacéutica, tal como la alteración que se va a tratar, el paciente que se va a tratar, el régimen de tratamiento etc.

Usos médicos

- 35 Según la presente invención, el objeto se resuelve adicionalmente proporcionando las variantes del factor IX, como se desvela en la presente invención o los ácidos nucleicos que codifican para las mismas o las composiciones farmacéuticas de la invención, para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de enfermedades.

- 40 La enfermedad que se va a diagnosticar, prevenir y o a tratar es preferiblemente una alteración hemorrágica una hemorragia. Una "alteración hemorrágica" es preferiblemente la hemofilia A y/o la hemofilia B, hemofilia causada o complicada por anticuerpos inhibidores contra el factor VIII, por una deficiencia en el factor VIII o en el factor IX, o por la presencia de una proteína no funcional del factor VIII o del factor IX, o cualquier otra hemorragia o tendencia hemorrágica.

Preferiblemente, la alteración hemorrágica es la hemofilia A, hemofilia causada o complicada por anticuerpos inhibidores contra el factor F. VIII o el F. VIIIa, hemofilia B.

- 45 Preferiblemente, la alteración hemorrágica o la hemorragia es una alteración hemorrágica en la que se usan agentes de puenteo, incluyendo, por ejemplo, coagulopatías neonatales; enfermedad hepática grave; procedimientos quirúrgicos de alto riesgo; pérdida de sangre traumática; trasplante de médula ósea; trombocitopenias y alteraciones en la función plaquetar; reversión urgente de una anticoagulación oral; deficiencias congénitas en los factores V, VII, X, y XI; y enfermedad de von Willebrand con inhibidores contra el factor de von Willebrand, pérdida de sangre relacionada con grandes heridas, hemorragias cerebrales, alteraciones en las funciones de los trombocitos.

- 50 Preferiblemente, la variante del factor IX (F. IX), el ácido nucleico o la composición farmacéutica de la invención, se usan para una terapia de infusión de proteínas, terapia celular, terapia génica y/o la profilaxis de una alteración hemorrágica o una hemorragia.

El diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento en los que la enfermedad es la hemofilia A o la hemofilia causada o complicada por anticuerpos inhibidores contra el factor F. VIII o el F. VIIIa:

preferiblemente mediante

- 5 - una variante del *Grupo A* según se describe en este documento, tal como la variante K265T
- variantes del *Grupo A* junto con el *Grupo B* y/o *C* y/o *D*
Grupo A + B según se define en este documento
Grupo A + C según se describe en este documento
Grupo A + B + C según se define en este documento
Grupo A + D según se describe en este documento
- 10 - *Grupo A + B + D* según se define en este documento
- los respectivos ácidos nucleicos, composiciones farmacéuticas.

Los inventores son los primeros en aplicar una variante del Grupo A, en particular K265T, para el tratamiento de la hemofilia A o de la hemofilia causada o complicada por anticuerpos inhibidores contra el factor F. VIII o el F. VIIIa.

- 15 Las moléculas variantes del F. IX con una mayor actividad de proteasa/coagulante en ausencia del F. VIII podrían ser una alternativa a los habituales agentes de puenteo, con la ventaja de ser activadas directamente en el sitio de la lesión. Esto se asemejaría a la formación fisiológica del coágulo, evitaría la infusión de proteasas ya activadas, como es habitual en los agentes de puenteo actuales, y haría la terapia más segura.

- 20 Una variante del cimógeno del F. IX probablemente tendría también una semivida bastante larga, permitiendo una terapia de sustitución profiláctica también en pacientes inhibidores. Curiosamente, los pacientes que carecen del F. VIII podrían incluso ser adecuados para una metodología de transferencia génica mediante el uso de un F. IX más pequeño y menos inmunógeno, por lo que los estudios de terapia génica son bastante más prometedores actualmente. Pensando en el relativamente pequeño número de pacientes y en los grandes esfuerzos necesarios para llevar la terapia génica para la hemofilia a la práctica clínica, las variantes propuestas del F. IX podrían incluso
- 25 conjugarse los esfuerzos de ofrecer una terapia para los pacientes con hemofilia A y hemofilia B, o con anticuerpos inhibidores contra el F. VIII. Finalmente, la variante podría ser también útil en el tratamiento de otras alteraciones hemorrágicas.

- 30 Otro aspecto de las variantes descritas es que sin necesidad del F. VIIIa ni de una mayor actividad hacia ambos, la escisión del F. X y la escisión del sustrato cromógeno, las variantes podrían ser usadas en sistemas de ensayo diagnósticos para el desarrollo y el cribado de sustancias inhibitoras directas del F. IXa, que desde hace mucho tiempo son deseadas como anticoagulantes, pero para las que no era posible un cribado eficaz debido a la baja eficacia del F. IXa sin su ensamblaje en el complejo de tenasa.

El diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento en los que la enfermedad es la hemofilia B, mediante todas las variantes descritas en este documento preferiblemente mediante

- 35 - una variante del *Grupo A* según se describe en este documento, tal como la variante K265T
- variantes del *Grupo A* junto con el *Grupo B* y/o *C* y/o *D*
Grupo A + B según se define en este documento
Grupo A + C según se describe en este documento
Grupo A + B + C según se define en este documento
Grupo A + D según se describe en este documento
- 40 - *Grupo A + B + D* según se define en este documento
- *Grupo A + B + D* según se define en este documento
- una variante del *Grupo D* según se describe en este documento, tal como la variante K265T
- variantes del *Grupo D* junto con el *Grupo A* y/o *B*
Grupo A + D según se describe en este documento
- 45 - *Grupo A + B + D* según se define en este documento
- los respectivos ácidos nucleicos, composiciones farmacéuticas.

El diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de una alteración hemorrágica o de una hemorragia, en los que adicionalmente se minimizan los riesgos trombotogénicos preferiblemente mediante

- 50 - variantes junto con el *Grupo C*
Grupo A + C según se describe en este documento
Grupo A + B + C según se define en este documento
- los respectivos ácidos nucleicos, composiciones farmacéuticas.

El diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de ambas, la, hemofilia A y la B, mediante todas las variantes descritas en este documento excepto el *Grupo D* solo.

El diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de la hemofilia A o de la hemofilia causada o complicada por anticuerpos inhibidores contra el factor F. VIII, así como de la hemofilia B, mediante todas las variantes descritas en este documento excepto el *Grupo D* solo.

5 Las variantes de la presente invención son herramientas adecuadas para tratar pacientes con alteraciones hemorrágicas mediante el uso de la administración de proteínas o la administración terapéutica de células o genes (vírico, ADN, ARN u otros vectores). Las enfermedades en tratamiento son la hemofilia A y la B, también causadas o complicadas por anticuerpos inhibidores contra el F. VIII, para el tratamiento de hemorragias y para una terapia profiláctica.

Los inventores han demostrado que las variantes de la presente invención

- 10 - corrigen el tiempo de coagulación en presencia de anticuerpos inhibidores contra el F. VIII (confirmando la función de las variantes ensayadas del F. IX también en presencia de elevados títulos de inhibidores del F. VIII),
- corrigen la coagulación *in vivo* (siendo la primera prueba de que las variantes del F. IX pueden servir como compuestos terapéuticos hemostáticamente activos *in vivo*),
- 15 - detienen la hemorragia en presencia de anticuerpos inhibidores contra el F. VIII (confirmando la funcionalidad de las variantes del F. IX tanto en ausencia como en presencia de anticuerpos inhibidores del F. VIII).

Para detalles adicionales, véanse los Ejemplos 6 - 8 y las Figuras 4 - 7.

Procedimiento de cribado

20 La presente invención describe adicionalmente un procedimiento para el cribado de compuestos anticoagulantes (anticoagulantes), tales como sustancias que inhiben directamente el F. IXa.

Dicho procedimiento comprende el uso de al menos una variante del factor IX de la presente invención, según se define en este documento.

25 En dicho procedimiento no son necesarios componentes adicionales del complejo de tenasa (en el que "tenasa" se refiere a un complejo de las formas activadas de los factores de coagulación sanguíneos factor VIII (F. VIIIa) y factor IX (F. IXa). Se forma sobre una superficie de fosfolípidos en presencia de calcio y es responsable de la activación del factor X).

30 Un aspecto ventajoso de las variantes descritas es que, sin necesidad del F. VIIIa y de una elevada actividad hacia ambos, la escisión del F. X y la escisión del sustrato cromógeno, las variantes son herramientas adecuadas en sistemas de ensayo diagnósticos para el desarrollo y el cribado de sustancias inhibitoras directas del F. IXa, que desde hace mucho tiempo son deseadas como anticoagulantes, pero para las que no era posible un cribado eficaz debido a la baja eficacia del F. IXa sin su ensamblaje en el complejo de tenasa.

Un procedimiento de cribado descrito en este documento es un procedimiento para la identificación de un compuesto que se une a una variante del factor IX de la presente invención y/o que modula su actividad, que puede comprender las siguientes etapas:

- 35 - proporcionar compuestos/sustancias que se van a ensayar,
- proporcionar al menos una variante del factor IX de la presente invención,
- poner en contacto un compuesto/sustancia que se va a ensayar con la al menos una variante del factor IX de la presente invención,
- determinar si el compuesto/sustancia se une a la al menos una variante del factor IX,
- 40 - opcionalmente, determinar si el compuesto/sustancia modula la actividad de la al menos una variante del factor IX.

Los siguientes ejemplos y dibujos ilustran la presente invención sin limitar, sin embargo, la misma a los mismos.

Breve descripción de los dibujos

45 **Figura 1** *Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos del Factor IX.* Las mutaciones introducidas están resaltadas.

Figura 2 *Actividad coagulante del factor IX natural (WT) o de la variante del F. IX que contiene las sustituciones FFT (FFT) en plasma deficiente en F. IX, F. X y F. VIII.*

- 50 (A) plasma deficiente en F. IX.
 (B) plasma deficiente en F. X.
 (C) plasma deficiente en F. VIII.

Los valores representan la actividad (%) dividida según los niveles de antígeno de F. IX (%) (+/- desviación estándar). Como se esperaba, el F. IX natural tiene un cociente de 1 cuando se ensayó la actividad en plasma deficiente en F. IX (véase A), pero no tiene actividad en plasma deficiente en F. X o en F. VIII (véanse B y C).

- 5 La variante que contiene las sustituciones FFT (FTT) muestra una actividad del 2% en plasma deficiente en F. VIII al 100% (5.000 ng/ml) de niveles de antígeno de F. IX (véase C), mientras que la actividad en plasma deficiente en F. X era insignificante (véase B).

Figura 3

- 10 Casetes de expresión del F. IX para la expresión del F. IX en cultivo tisular (A) o la expresión específica hepática en ratones (B). Se introdujeron mutaciones para crear variantes del F. IX mediante mutagénesis dirigida, resaltada para la sustitución de aminoácidos K265T.

Figura 4 *Ensayo en una etapa del F. VIII basado en aPTT en plasma de pacientes con una forma adquirida de hemofilia A causada por altos títulos de anticuerpos inhibidores del F. VIII.*

- 15 Se mezclaron plasma de control normal, F. IX natural o variantes K265T (T) o V181I / K265T / I383V (ITV) en plasma de pacientes a unos volúmenes iguales (1:1). La mezcla se incubó a 37°C durante dos horas y después se determinó la actividad coagulante en plasma deficiente en F. VIII. Mientras que el plasma de control normal no normalizó los tiempos de coagulación, o lo hizo insuficientemente, las variantes del F. IX T e ITV dieron lugar a una reducción significativa de los tiempos de coagulación a unos niveles del 50% o del 20 100% de los niveles normales del antígeno de F. IX humano, respectivamente. La función de coagulación observada en presencia de anticuerpos inhibidores anti-F. VIII está en buena concordancia con los valores mencionados previamente en plasma deficiente en F. VIII. El gráfico muestra los valores medios con el error estándar de la media como barras de error. * Prueba de la *t* de Student en comparación con el F. IX natural con $p < 0,05$

- 25 **Figura 5** *Las variantes del F. IX corrigen parcialmente los tiempos de coagulación en ratones con los genes del F. VIII inactivados*

- Se inyectaron vectores minicirculares no víricos para la expresión derivada hepática del F. IX a unas dosis de entre 10 y 50 µg/ratón, tanto natural como variante [K265T (T), V181I / K265T / I383V (ITV) o V181I / K265T / R338A / S377W / I383V (ITAWV)], en ratones con los genes del F. VIII inactivados mediante una técnica de inyección hidrodinámica. En el día 3 tras la inyección se extrajo sangre de los ratones para realizar mediciones de la actividad de puenteo del antígeno de F. IX (ELISA) y de F. VIII (ensayo en una etapa en plasma deficiente en F. VIII) en el plasma de ratón. Mientras que los ratones que expresaban el F. IX natural mostraron una actividad de puenteo alrededor de la línea de base en todos los niveles de expresión, se midió una actividad de puenteo del F. VIII de hasta el 35% del actividad normal del F. VIII para las variantes a altos niveles de expresión (de aproximadamente 20 mg/ml). Había una buena correlación entre los niveles de antígeno de F. IX y la actividad de puenteo del F. VIII para todas las variantes, mostrando el F. IX con ITAWV la mayor y el F. IX con T la menor actividad de puenteo del F. VIII. Cada punto de dato representa una medición de un único ratón.

- 35 **Figura 6** *Las variantes del F. IX detienen las hemorragias en ratones con los genes del F. VIII inactivados.*

- Se expusieron ratones con el gen del F. VIII inactivado que expresaban el F. IX natural o variantes [K265T (T), V181I / K265T / I383V (ITV) o V181I / K265T / R338A / S377W / I383V (ITAWV)] después de una transferencia génica no vírica, mediante un ensayo de pinzamiento en la cola. Brevemente, los ratones fueron anestesiados y la cola se precalentó a 37°C en una disolución salina. Después las colas se cortaron a un diámetro de 1,5 mm (A) o de 3 mm (B) y se recogió la sangre en disolución salina templada. Después de diez minutos, las colas de los ratones se suturaron y se cauterizaron para detener la hemorragia. La pérdida de sangre se cuantificó mediante una medición por densidad óptica (DO a 492 nm) de la pérdida de hemoglobina en la disolución salina. Se produjo una reducción significativa en la pérdida de sangre para todos los grupos de ratones tratados con la variante del F. IX en comparación con los ratones que expresaban el F. IX natural o no tratados con el vector en ambos modelos de hemorragia. Esta mejora era una corrección parcial, como se observa en el modelo más provocador de 3 mm en comparación con ratones hemostáticamente normales C57BL/6. Se muestran las cifras de los ratones y los niveles de expresión medios para cada grupo de ratones por debajo del gráfico. Cada columna representa los valores medios de la pérdida de sangre con el error estándar de la media como barras de error. * Prueba de la *t* de Student en comparación con el F. IX natural con $p < 0,05$.

- 55 **Figura 7** *Las variantes del F. IX detienen las hemorragias en ratones con los genes del F. VIII inactivados con altos títulos de anticuerpos inhibidores contra el F. VIII.*

Se indujeron anticuerpos inhibidores contra el F. VIII en ratones con el gen del F. VIII inactivado mediante una transferencia génica no vírica en el hígado usando una transferencia génica del F. VIII con un vector

5 plasmídico. La transferencia génica fue determinada mediante una medición del F. VIII el día 3 tras la
inyección. 6 semanas después confirmamos la presencia de unos elevados títulos (entre 20.000 y 100.000
ng/ml) de anticuerpos anti-FVIII y la ausencia de antígeno residual de F. VIII y la actividad mediante un
ensayo en una etapa y un ELISA. Después los ratones se trataron mediante transferencia génica minicircular
para la expresión del F. IX natural o variante y se expusieron mediante un ensayo de pinzamiento de cola tres
días después. El número de ratones de cada grupo y los niveles de expresión media del F. IX se muestran
por debajo del gráfico. Aunque había una cierta variación en la pérdida de sangre entre los grupos de control
(ratones sin vector y tratados con F. IX natural), la pérdida de sangre en los tres grupos con variantes [K265T
(T), V181I / K265T / I383V (ITV) o V181I / K265T / R338A / S377W / I383V (ITAWV)] estaba
10 significativamente reducida. Cada columna representa los valores medios de la pérdida de sangre con el error
estándar de la media como barras de error. * Prueba de la *t* de Student $p < 0,05$.

Figura 8 *La posición 265 es el principal determinante para la actividad de puenteo del F. VIII de las variantes del F. IX.*

15 Para investigar el papel de la posición 265 en las variantes del F. IX con una actividad independiente del F.
VIII, se introdujeron todo los aminoácidos proteinógenos en esta posición en una molécula de F. IX que tenía
las sustituciones adicionales V181I y I383V. Las variantes fueron expresadas en células HEK 293, se
determinaron los niveles de antígeno de F. IX mediante ELISA, y la actividad del F. IX en plasma deficiente
en F. IX y en F. VIII se determinó mediante un ensayo en una etapa, como se ha descrito anteriormente.
Cada punto representa el valor medio de una única variante con los errores estándar de la media como
barras de error. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos dos veces.

20 El tipo natural (WT) se refiere a V181 / K265 / I383, ITV se refiere a V181I / K265T / I383V, IAV se refiere a
V181I / K265A / I383V. El eje Y muestra la actividad específica del F. IX (la actividad del F. IX dividida por el
antígeno de F. IX en porcentaje), estableciendo el F. IX natural como el 100%. El eje X muestra la misma
proporción, pero esta vez la medición de la actividad se realizó en plasma deficiente en F. VIII. La reversión
del residuo 265 desde Treonina a hasta la Lisina natural (V181I / 265K / I383V, IKV) dio como resultado una
pérdida prácticamente completa de la actividad independiente del F. VIII. Sorprendentemente, otra sustitución
de aminoácidos, especialmente en las variantes K265A / V181I / I383V, K265G / V181I / I383V, K265V /
V181I / I383V, K265N / V181I / I383V, o K265D / V181I / I383V, dio como resultado una actividad de puenteo
del F. VIII similar a la de K265T / V181I / I383V, siendo la mayor para K265A / V181I / I383V. Este resultado
era inesperado, dado que la actividad independiente del F. VIII para una variante del factor IX portadora de
una única sustitución K265A que había sido previamente descrita estaba en un intervalo bastante menor
(Kolkman y Mertens, 2000).

Ejemplos

Ejemplo 1

35 Los inventores exploraron la prótesis de que la modificación de la conformación del sitio activo del F. IX hacia un
estado observado más probablemente cuando se ensambla en el complejo de tenasa daría como resultado una
proteína con una actividad aumentada en ausencia del F. VIII.

Las mutaciones se eligieron basándose en los estudios estructurales de comparación y sustitución de los residuos
del F. IX por el F. X disponibles en la bibliografía (Hopfner y col., 1997; Sichler y col., 2003).

40 Los inventores introdujeron en primer lugar las mutaciones Y259F / K265T / Y345T (FTT) en el F. IX y expresaron la
proteína en cultivo tisular. Básicamente no se observó ningún efecto sobre la actividad específica del F. IX; sin
embargo, la actividad en plasma deficiente en F. VIII aumentó drásticamente. Dado que esta actividad es todavía
una pequeña fracción de la actividad específica del F. IX (el 100% del antígeno de F. IX se corresponde con un 2%
de la actividad "de tipo F. VIII"), los inventores concentraron las proteínas variantes hasta unas concentraciones de
45 entre 20.000 y 40.000 ng/ml (un 400 - 800% de la concentración plasmática normal). A esta concentración pudieron
medirse actividades del "de tipo F. VIII" de hasta más del 30%, mientras que no se detectó actividad para el F. IX
natural ni en los controles negativos.

La comparación de las actividades de la variante FTT en plasma deficiente en F. VIII, en F. IX o en F. X en
comparación con la proteína natural (WT) se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 2

Para mejorar adicionalmente las propiedades de la variante FTT, los inventores combinaron la variante FTT con
otras diversas mutaciones con objeto de generar moléculas de F. IX con diferentes propiedades.

La Tabla 1 proporciona una visión general de las mutaciones ensayadas y de la actividad de las variantes en plasma
deficiente en F. VIII o en F. IX.

Ejemplo 3

Dado que (13) describía un afecto aumentado del F. IX truncado (rf9) sobre sustratos cromógenos únicamente cuando las tres sustituciones (Y94F, K98T y Y177T, numeración de la quimotripsina) de la variante FTT estaban presentes al mismo tiempo, los inventores usaron inicialmente la variante combinada para los experimentos.

5 Sin embargo, los inventores también ensayaron las mutaciones individuales y sorprendentemente averiguaron que la única sustitución necesaria es la variante K265T (es decir K98T) y que las demás empeoraban incluso la actividad de proteasa en presencia y en ausencia del F. VIII (Tabla 1).

Ejemplo 4

Los inventores ensayaron adicionalmente las variantes y sus combinaciones para obtener moléculas con una elevada actividad del F. IX en presencia del F. VIII.

10 La Tabla 3 muestra varias mutantes con un incremento en la actividad de más de 10 veces. También se aprecia a partir de esta tabla el hecho de que la combinación de las mutaciones con el aumento de actividad deseado conduce a variantes combinadas con los mayores niveles de actividad. También se ensayaron algunas de las variantes, como R338A / S377W, para comprobar su actividad en ausencia del F. VIII (Tabla 1). Sin embargo, únicamente junto con la variante K265T puede observarse un aumento en el efecto de la actividad del F. IX independiente del F. VIII.

15 Ejemplo 5

Para construir variantes con las propiedades deseadas los inventores combinaron mutaciones individuales con un efecto deseado para obtener variantes con unas altas actividades deseadas adicionalmente aumentadas. Por ejemplo, la variante K265T tiene una actividad del 6,6% en ausencia del F. VIII y una actividad del 191% en presencia del F. VIII. Para obtener la mayor actividad posible en ausencia del F. VIII pero ningún aumento o moderado en presencia del F. VIII, los inventores combinaron la mutación K265T bien con la mutación 1383V o bien con la V181I. Las variantes resultantes V181I / K265T y K265T / 1383V tenían una actividad del 9,0% y del 8,7% en ausencia del F. VIII, y una actividad del 219% y del 139% en presencia del F. VIII. Este aumento moderado en la actividad en ausencia del F. VIII podría mejorarse adicionalmente significativamente combinando las tres mutaciones en la variante V181I / K265T / I383V sin aumentar la actividad en presencia del F. VIII al 16,4% y al 209%, respectivamente.

En la Tabla 1 se muestra un resumen de las combinaciones ensayadas, y los efectos de las variantes individuales se resumen en la Tabla 2.

Ejemplo 6

Las variantes del F. IX corrigen el tiempo de coagulación en presencia de anticuerpos inhibidores

30 Para confirmar la funcionalidad de las variantes del F. IX en presencia de anticuerpos inhibidores dirigidos contra el F. VIII realizamos ensayos en una etapa del F. VIII basados en aPTT en plasma de pacientes con una forma adquirida de hemofilia A (Figura 4). Se mezclaron plasma normal de control, F. IX natural o variantes K265T (T) o V181I / K265T / I383V (ITV) en plasma de pacientes a unos volúmenes iguales (1:1). La mezcla se incubó a 37°C durante dos horas y después se determinó la actividad coagulante en plasma deficiente en F. VIII. Mientras que el plasma normal de control no normalizó los tiempos de coagulación o lo hizo suficientemente, las variantes T e ITV del F. IX condujeron a un acortamiento significativo de los tiempos de coagulación a unos niveles del 50% o del 100% de los niveles normales del antígeno F. IX humano, respectivamente. La función coagulante observada en presencia de anticuerpos inhibidores anti-F. VIII está en buena concordancia con los valores previamente mencionados en plasma deficiente en F. VIII (Tabla 1). Los resultados confirman por lo tanto la función de las variantes ensayadas del F. IX también en presencia de altos títulos de inhibidores del F. VIII.

Ejemplo 7

Las variantes del F. IX corrigen la coagulación in vivo

En los siguientes experimentos aspirábamos a ensayar si las variantes del F. IX podrían mejorar de hecho la hemostasia *in vivo* y proporcionar por lo tanto una prueba del concepto para la viabilidad de una metodología que use variantes del F. IX como compuestos terapéuticos de puenteo. Para el ensayo usamos un sistema de vector minicircular no vírico para la expresión derivada en hígado del F. IX. Se inyectaron vectores para el F. IX natural o la variante [K265T (T), V181I / K265T / I383V (ITV) o V181I / K265T / R338A / S377W / I383V (ITAWV)] en las venas de la cola de ratones con el gen del F. VIII inactivado usando una técnica de inyección hidrodinámica. En el día 3 tras la inyección se extrajo sangre de los ratones para las mediciones de la actividad de puenteo del antígeno F. IX (ELISA) y de F. VIII (ensayo en una etapa en plasma deficiente en F. VIII) en plasma de ratón. Mientras que los ratones que expresaban el F. IX natural mostraron una actividad de puenteo alrededor de la línea de base en todos los niveles de expresión, se midió una actividad de puenteo del F. VIII de hasta el 35% de la actividad normal del F. VIII para las variantes a altos niveles de expresión (de aproximadamente 20 µg/ml). Había una buena correlación entre los niveles de antígeno de F. IX y la actividad de puenteo de F. VIII para todas las variantes del F. IX con ITAWV que mostraban la mayor actividad de puenteo del F. IX T y la menor del F. VIII (Figura 5). Estos resultados

confirman la funcionalidad de las variantes también en el sistema murino. Entonces expusimos diferentes grupos de ratones al ensayo de pinzamiento de la cola. Después las colas se cortaron a un diámetro de bien 1,5 mm (Figura 6 A) o de 3 mm (Figura 6 B) y se recogió sangre. Después de diez minutos se detuvo la hemorragia y se cuantificó la sangre perdida. Había una significativa reducción en la pérdida de sangre para todos los grupos de ratones tratados con la variante del F. IX en comparación con los ratones que expresaban el F. IX natural o no tratados con el vector en ambos modelos de hemorragia. Esta mejora era una corrección parcial, según se observa en el modelo más provocador de 3 mm en comparación con ratones C57BL/6 no hemofílicos. Esta era la primera prueba de que las variantes del F. IX podían servir de hecho como compuestos terapéuticos hemostáticamente activos *in vivo*.

Ejemplo 8

10 **Las variantes del F. IX detienen la hemorragia en presencia de anticuerpos inhibidores**

A continuación se confirmó la funcionalidad de las variantes del F. IX en presencia de altos títulos de anticuerpos inhibidores contra el F. VIII. Por lo tanto, fueron inducidos anticuerpos anti-F. VIII en ratones con el gen del F. VIII inactivado usando el modelo de inducción de inhibidor introducido por C. Miao y colaboradores (Ye y col., 2004). Se obtuvo la expresión inicial del F. VIII usando una transferencia génica hepática no vírica del F. VIII usando un vector plasmídico. Seis semanas después confirmamos la presencia de elevados títulos (entre 20.000 y 100.000 ng/ml) de anticuerpos anti-F. VIII y la ausencia de antígeno y actividad residual del F. VIII mediante ensayos en una etapa y ELISA. Entonces los ratones se trataron mediante transferencia génica minicircular para la expresión del F. IX natural o de la variante, y se expusieron a un ensayo de pinzamiento de la cola al tercer día (Figura 7). La sangre perdida en los grupos de control (ratones sin vector y tratados con F. IX natural) era significativamente mayor en comparación con la hemorragia en los grupos tratados con las tres variantes [K265T (T), V181I / K265T / I383V (ITV) o V181I / K265T / R338A / S377W / I383V (ITAWV)]. Por lo tanto, se confirmó la funcionalidad de las variantes del F. IX tanto en ausencia como en presencia de anticuerpos inhibidores del F. VIII.

Ejemplo 9

En un experimento adicional, los inventores ensayaron diferentes aminoácidos en la posición 265, en los que el constructo usado contenía adicionalmente mutaciones en las posiciones 181 y 383 (a saber, V181I y I383V). El constructo de vector usado era pAAV-CMV-hF. IX. Las variantes fueron expresadas en células HEK 293, los niveles del antígeno de F. IX se determinaron mediante ELISA, y la actividad de F. IX en plasma deficiente en F. IX y en F. VIII se determinó mediante un ensayo en una etapa, como se ha descrito anteriormente. La reversión del residuo 265 desde Treonina a la natural Lisina (V181I / 265K / I383V, IKV) dio como resultado una pérdida prácticamente completa de la actividad independiente del F. VIII. Sorprendentemente, otras sustituciones de aminoácidos, especialmente en las variantes K265A / V181I / I383V, K265G / V181I / I383V, K265V / V181I / I383V, K265N / V181I / I383V, o K265D / V181I / I383V, dieron como resultado una actividad de puenteo del F. VIII similar que las K265T / V181I / I383V, siendo las mayores para K265A / V181I / I383V. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 8. Como puede observarse, las mutantes con los residuos de aminoácidos pequeños en la posición 265 muestran una mayor actividad coagulante, en las que las mutaciones K265T y K265A muestran el mayor aumento en la actividad coagulante. Este resultado era inesperado, dado que la actividad independiente del F. VIII para una variante del factor IX portadora de una única sustitución K265A que había sido descrita previamente estaba en un intervalo bastante menor (Kolkman y Mertens, *Biochemistry* 2000, 39, 7398 - 7405).

Material y procedimientos

40 **Constructos plasmídicos y vectores no víricos**

En los experimentos se emplearon dos vectores de expresión diferentes para las variantes del F. IX. Los vectores para cultivo tisular (Figura 3A) consistían en el F. IX con un intrón 1 truncado de 1,4 kb dirigido por un promotor de CMV según se describió previamente (Schuettrumpf y col., 2005). Los cambios en los nucleótidos que codifican para las variantes deseadas se introdujeron en este plásmido mediante mutagénesis dirigida estándar.

El vector de expresión para la transferencia génica dirigida al hígado (Figura 3B) consistía en la región 1 de control del locus hepático, el promotor de la alfa-1 anti-tripsina humana, el mini-gen del F. IX que contenía el intrón 1 truncado de 1,4 kb y una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (HCR/haAT - F. IX) según se describe (Miao y col., 2000) con modificaciones menores. El casete de expresión se introdujo en un plásmido productor de minicírculo amablemente proporcionado por Mark Kay (Chen y col., 2005). Este sistema permite la eliminación de la secuencia del esqueleto del plásmido bacteriano para vectores circulares de ADN. Brevemente, se hace crecer un plásmido completo que contiene el casete de expresión del F. IX flanqueado por las secuencias de reconocimiento de la integrasa en bacterias de *E. coli*. Una integrasa inducible del fago Φ C31 y la endonucleasa inducible I-SceI junto con su sitio de reconocimiento están ubicados en la otra parte (parental) del plásmido. Después de una noche de crecimiento, la integrasa es activada mediante la adición de arabinosa. La activación de la integrasa da lugar a la formación de dos círculos, uno que contiene únicamente el casete de expresión y otro que contiene el resto del plásmido. Entonces se ajustan las condiciones (pH, temperatura y contenido en sodio) para la endonucleasa, que fue inducida de una forma similar por la arabinosa. Esta enzima corta el esqueleto del plásmido bacteriano, pero no el casete de expresión contenido en el minicírculo, de forma que el minicírculo permanece en las

bacterias, mientras que el resto del plásmido es degradado. Entonces los minicírculos se purificaron en una columna de afinidad regular de una etapa y los contaminantes residuales del ADN bacteriano de las preparaciones se eliminaron mediante la linealización del esqueleto bacteriano con una digestión con la enzima de restricción *NruI* seguido de una degradación exonucleolítica con DNasa dependiente de ATP Plasmid-Safe (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). Finalmente, aislamos el ADN episomal a partir de los digeridos mediante una extracción con fenol-cloroformo, dando como resultado la recuperación del minicírculo altamente puro (MC-HCR/hAAT - F. IX).

Se construyó el vector de expresión del F. VIII para la inducción del inhibidor tras una transferencia génica dirigida al hígado en ratones, similar al constructo HCR/hAAT - F. IX, con la diferencia de que el F. IX se intercambiaba por el gen del F. VIII con el dominio B deletado. Además, se empleó un vector plasmídico que contenía el esqueleto de pSL1 180 en lugar de un vector un minicírculo.

Expresión del F. IX in vitro para el ensayo de la variante

Se transfectaron HEK-293 con el plásmido CMV - F. IX mediante un método de transfección estándar con fosfato cálcico, y se mantuvieron en medio exento de suero con la adición de 10 µg/ml de vitamina K. 48 horas después de la transfección se extrajo el sobrenadante de las células y se recogieron las células. Se tomó una alícuota del sobrenadante y se ensayó para comprobar los niveles y la actividad del antígeno de F. IX. Para las mutantes con una actividad sospechosa de F. VIII, se concentró el resto del sobrenadante usando el método de concentración Vivaspin 20® (Viva Science AG, Hannover, Alemania). Con este método se obtienen fácilmente unas concentraciones de 25.000 ng/ml (un 500% de la actividad plasmática normal). Esto permitió ensayar de forma precisa la actividad de proteasa en plasma deficiente en F. VIII. Cada vez que se realiza el experimento, se usan F. IX natural, F. IX S365R (sin actividad) y células no transfectadas como controles. Todos los experimentos se repitieron al menos una vez y se realizaron por triplicado.

Ensayos del inhibidor de F. VIII, F. IX y F. VIII

Las concentraciones de F. IX se determinaron usando un ensayo de adsorción (ELISA) en el que se usó un anticuerpo monoclonal contra el F. IX humano, clon HIX-1 (Sigma, St Louis, MO), como anticuerpo de captura a una dilución de 1:800; y como anticuerpo de detección, se usó policlonal de cabra anti-F. IX humano conjugado con peroxidasa (Affinity Biologicals, Hamilton, ON) a una dilución de 1:1.000. La actividad funcional del F. IX se determinó mediante un ensayo modificado del factor en una etapa incubando 25 µl de plasma humano deficiente en F. IX o en F. VIII con 25 µl de reactivo automatizado de tromboplastina parcial activada (aPTT) (Dade Behring, Marburg, Alemania), y un total de 25 µl de una muestra de prueba que estaba sin diluir (o cuando se requería, las muestras se diluyeron en tampón de imidazol durante 3 minutos a 37°C). Después se añadieron 25 µl de CaCl₂ 25 mM y se midió el tiempo hasta la formación del coágulo mediante el uso de un fibrómetro. Los anticuerpos contra el F. VIII se midieron mediante un ELISA específico contra las subclases (IgG1 y IgG2) de inmunoglobulina G (IgG) murina, según se describe (Schuettrumpf y col., 2005) con modificaciones menores, mediante el recubrimiento de placas con 1 µg/ml de F. VIII recombinante purificado (Cogenate, Bayer HealthCare, Leverkusen, Alemania). La actividad del F. VIII en plasma del inhibidor del F. VIII se determinó mediante el uso del ensayo Chromogenic FVIII:C (Haemochrom Diagnostica, Essen, Alemania). La determinación de los niveles de antígeno del F. VIII se realizó usando un kit ELISA de American Diagnostica (Pfungstadt, Alemania).

Modelos de ratón

Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por las autoridades locales de cuidado, protección y uso animal. Se obtuvieron ratones deficientes en F. VIII en The Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, EE.UU.). Los ratones C57B1/6 se adquirieron en Harlan (Indianapolis, Indiana). Para el gen no vírico, el vector de transferencia se administró mediante una técnica de inyección hidrodinámica según se describió previamente (Schuettrumpf y col., 2008). En resumen, se inyectaron vectores no víricos a unas dosis de entre 10 y 50 µg por ratón en un volumen de 2 ml de disolución salina fisiológica en la vena de la cola de los ratones en entre 5 y 8 segundos. Durante los siguientes experimentos se recogió entonces sangre de los ratones bien mediante un sangrado retro-orbital o bien un desangrado posterior al corte de la cola.

Ensayos de pérdida de sangre

Se provocaron hemorragias en la cola sin conocer el vector inyectado. Los ratones fueron anestesiados, se cortó la cola distal (de 1,5 o de 3 mm de diámetro) e inmediatamente se sumergió en disolución salina 37°C. La pérdida de sangre se determinó midiendo la absorbancia de la hemoglobina (A492 nm) en la disolución salina la que se había colocado la cola, según se refiere. Schuettrumpf y col., 2005.

Tabla 1 Actividades coagulantes de las variantes del factor IX en ausencia y en presencia del F. VIII. Los valores se muestran en porcentaje, siendo el 100% la actividad del factor IX natural en plasma humano normal agrupado con unos niveles normales de ambos F. IX y F. VIII humanos. Error estándar de la media (E.E.M.)

Variantes	Actividad (%) sin F. VIII	E.E.M.	Actividad (%) con F. VIII	E.E.M.
R338A + S377W	0,0	0,1	1086,6	125,5
Tipo natural	0,0	0,1	100,0	3,7
Y259F	0,0	0,1	96,9	11,1
Y345T	0,0	0,0	50,9	8,1
S365R	0,0	0,0	0,0	0,3
E245K + K265T	0,2	0,1	21,6	7,1
G4Y + Y259F + K265T + Y345T	1,2	0,3	110,5	12,0
N34D + Y259F + K265T + Y345T	1,8	0,1	36,7	0,8
Y259F + K265T + Y345T + R358A	2,0	0,2	54,6	6,2
Y259F + K265T + Y345T	2,0	0,1	73,2	6,3
Y259F + K265T + Y345T + E388G	2,1	0,8	24,4	2,1
Y259F + K265T + Y345T + F353Y	2,1	0,4	57,1	6,8
F25Y + Y259F + K265T + Y345T	2,3	0,1	45,6	1,3
Y259F + K265T + Y345T + S377W	2,6	0,2	94,9	10,4
Y259F + K265T + I290L + Y345T	2,8	0,7	60,1	8,4
Y259F + K265T + Y345T + S360A	2,8	0,2	64,4	3,6
Y259F + K265T + Y345T + I383V + E388G	3,1	1,3	39,7	3,5
V217L + Y259F + K265T + Y345T	3,2	0,5	62,3	8,3
Y259F + K265T + Y345T + I383V	3,5	0,3	67,1	5,3
Y259F + K265T + R338A + T340S + Y345T	3,9	0,3	214,6	21,9
V181I + Y259F + K265T + Y345T	4,0	0,6	50,9	2,0
D85A + K265T	5,2	1,3	188,1	37,5
K265T + S360A + I383V	5,3	1,3	104,2	23,1
V253I + K265T	5,5	0,8	187,2	29,3
Y259F + K265T	5,9	0,9	141,0	20,5
K265T + S360A	5,9	0,5	187,0	19,8
V217L + K265T	6,0	0,9	259,9	39,2
K265T	6,6	0,7	191,1	14,0
R338A + K265T	7,1	0,6	658,2	86,4
K265T + R338A + I383V	8,1	1,4	480,2	80,9
K265T + I383V	8,7	1,1	138,7	15,8
V181I + K265T	9,0	0,8	219,2	22,4
V181I + K265T + I383V	16,4	2,1	204,9	28,9
V181I + K265T + R338A + S377W + I383V	21,9	3,9	1637,9	335,9

5 **Tabla 2** Variantes del factor IX para el tratamiento de la hemofilia B. Las proteínas muestran una actividad específica alterada del factor IX (en porcentaje comparado con el F. IX natural). La actividad del F. IX en ausencia del F. VIII está por debajo de los límites de detección mediante el procedimiento de ensayo en una etapa. Error estándar de la media (E.E.M.)

Variantes	Actividad del F. IX (%)	E.E.M.
G4Y + V10K	41	3
G4Y + R37T	54	4
S340T + R338A + Y345T	87	13
WT	100	5
G4Y	101	8
G4Y + Y1A	102	12
S377W	218	27

Variantes	(continuación)	
	Actividad del F. IX (%)	E.E.M.
R338A	552	68
R338A + S377W	841	138
S360A + R338A + S377W	938	94
V86A + R338A + S377W	1076	77
G4Y + R338A + S377W	1284	335

Tabla 3 Efecto de las mutaciones adicionales a K265T sobre la actividad coagulante del F. IX en ausencia o en presencia del F. VIII.

5 U: actividad coagulante hacia arriba; D: actividad coagulante hacia abajo;

N: sin cambios en la actividad coagulante, en la que N (U): tendencia hacia arriba o N (D): tendencia hacia abajo.

Mutación	Actividad sin F. VIII	Actividad con F. VIII
R338A	U	U
V181I	U	N (U)
I383V	U	D
V86A	N (U)	U
S377W	N (U)	U
V217L	N (U)	N (U)
I290L	N (U)	N (D)
F25Y	N (U)	D
F353Y	N (U)	D
D85A	N (D)	N (D)
V253I	N (D)	N (D)
Y259F	N (D)	N (D)
E388G	N (D)	D
N34D	N (D)	D
R358A	N (D)	D
S360A	N	N (D)
T340S	N	N
Y345T	D	D
G4Y	D	U
E245K	D	D

Tabla 4 Actividades coagulantes de las variantes del factor IX en ausencia y en presencia del F. VIII. Los valores se muestran en porcentaje, siendo el 100% la actividad del factor IX natural en plasma humano normal agrupado con unos niveles normales de ambos F. IX y F. VIII humanos. Error estándar de la media (E.E.M.)

10

aPTT		
Mutación	Actividad del F, IX [%] ± EEM	Actividad de puenteo del F, VII [%] ± EEM
WT	100 ± 3	0,52 ± 0,7
ITV	230 ± 14	10,4 ± 1,85
IAV	204 ± 7	12,51 ± 0,61
IKV	52 ± 3	1,49 ± 0,07
ICV	33 ± 6	1,97 ± 0,14
IDV	213 ± 27	7,63 ± 1,52
IEV	181 ± 19	5,8 ± 0,72
IFV	155 ± 18	6,42 ± 0,44
IGV	201 ± 12	7,96 ± 0,47
IHV	152 ± 8	7,66 ± 0,95
IIV	172 ± 10	5,51 ± 0,53
ILV	94 ± 11	2,41 ± 0,29

(continuación)

aPTT		
Mutación	Actividad del F, IX [%] ± EEM	Actividad de puenteo del F, VII [%] ± EEM
IMV	89 ± 20	2,78 ± 0,4
INV	184 ± 17	9,21 ± 0,62
IPV	29 ± 3	2,7 ± 0,5
IQV	105 ± 8	2,71 ± 0,25
IRV	46 ± 11	0,73 ± 0,2
ISV	112 ± 7	5,97 ± 0,77
IVV	134 ± 15	8,49 ± 1,23
IWV	16 ± 2	2,44 ± 0,37
IYV	83 ± 9	2,56 ± 0,29

Tipo natural (WT) se refiere a V181 / K265 / I383, ITV se refiere a V1811 / K265T / I383V, IAV se refiere a V1811 / K265A / I383V y así sucesivamente.
 Actividad del F. IX se refiere a la actividad con F. VIII;
 Actividad de puenteo del F. VIII se refiere a la actividad sin F. VIII

5 Las características desveladas en la descripción anterior, en las reivindicaciones y/o en los dibujos anexos pueden, tanto por separado como en cualquier combinación de las mismas, ser el material para la realización de la de invención en diversas formas de la misma.

Referencias

- Arruda y col. Blood 2004, 104: 85.
- Chang y col. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 277, Nº 28, publicación del 12 de julio, págs. 25393 - 25399, 2002.
- 10 Chang y col. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 273, Nº 20, publicación del 15 de mayo, págs. 12089 - 12094, 1998.
- Chen ZY, He CY, Kay MA. Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. Hum Gene Ther. 2005; 16 (1): 126 - 31.
- Davie, E. W., Fujikawa, K. y Kisiel, W. (1991) Biochemistry 30, 10363 - 10370.
- 15 DiScipio, R. G., Hermodson, M. A., Yates, S. G. y Davie, E. W. (1977) Biochemistry 16, 698 - 706.
- Di Scipio RG, Kurachi K y Davie EW (1978) Activation of human factor IX (Christmas factor). J Clin Invest, 61, 1528 - 1538.
- Duffy EJ y Lollar P (1992) Intrinsic pathway activation of factor X and its activation peptide-deficient derivative, factor Xdes - 143 - 191. J Biol Chem, 267, 7821 - 7827.
- 20 Fujikawa, K., Legaz, M. E., Kato, H., and Davie, E. W. (1974) Biochemistry 13, 4508 - 4516.
- Furie B y Furie BC (1988) The molecular basis of blood coagulation. Cell, 53, 505 - 518.
- Giannelli, F., Green, P. M., Sommer, S. S., Poon, M., Ludwig, M., Schwaab, R., Reitsma, P. H., Goossens, M., Yoshioka, A., Figueiredo, M. S. y Brownlee, G. G. (1998) Nucleic Acids Res. 26, 265 - 268.
- Hartmann R, Dockal M, Kam mlander W, Panholzer E, Scheiflinger F (2007) Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) vol. 110 nº 11: página 791A, Resumen 2694.
- 25 Hockin MF, Jones KC, Everse SJ, Mann KG. (2002) J Biol Chem. 277, 18322 - 33.
- Hopfner KP, Brandstetter H, Karcher A, Kopetzki E, Huber R, Engh RA, Bode W. (1997) EMBO J. 16 (22): 6626 - 35.
- Kolkman y Mertens, Biochemistry 2000, 39, 7398 - 7405 (K265A Mutante)
- Kurachi y Davie (1982) PNAS 79: 6461 - 6464.
- 30 Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM (1953). "Effect of antihemophilic factor on one - stage clotting tests; a presumptive test for hemofilia and a simple one - stage antihemophilic factor assay procedure". J. Lab. Clin. Med. 41 (4): 637 - 47.

Li S - R, y col. (2002). "Identification of Functionally Important Residues in the Protease Domain of Factor IX That Are Critical for Binding Factor XIa, TFPI, and Antibodies", *Blood*, American Society of Hematology, EE.UU., vol. 100, nº 11, 16 de noviembre de 2002, Resumen nº 1006.

Lindquist, P. A., Fujikawa, K. y Davie, E. W. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1902 - 1909.

5 Mann y col. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 17 - 25.

McRae BJ, Kurachi K, Heimark RL, Fujikawa K, Davie EW and Powers JC (1981) Mapping the active sites of bovine thrombin, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, plasma kallikrein, and trypsin with amino acid and peptide toesters: development of new sensitive substrates. *Biochemistry*, 20, 7196 - 7206.

10 Miao CH, Ohashi K, Patijn GA, Meuse L, Ye X, Thompson AR, Kay MA. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro. *Mol Ther.* 2000; 1 (6): 522 - 32.

Schuettrumpf J, Herzog RW, Schlachterman A, Kaufhold A, Stafford DW, Arruda VR. (2005) *Blood.* 105 (6): 2316 - 23.

15 Schuettrumpf J, Milanov P, Roth S, Seifried E, Tonn T. Non - viral gene transfer results in therapeutic factor IX levels in haemophilia B mice, *Haemost.* 2008; 1: S92 - 95.

Sichler K, Kopetzki E, Huber R, Bode W, Hopfner KP, Brandstetter H. Physiological fIXa activation involves a cooperative conformational rearrangement of the 99 - loop. (2003) *J Biol Chem.* 278 (6): 4121 - 6.

Ye y col. *MOLECULAR THERAPY* Vol. 10, Nº 1, julio de 2004, pág. 117.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen gGmbH

5 <120> Variantes del Factor IX con actividad coagulante en ausencia de su cofactor y su uso para el tratamiento de alteraciones hemorrágicas

<130> FB24137/A

10 <150> EP 08013561.9
<151> 28-07-2008

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1386

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 441 167 T3

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta 60
 ggatattctac tcagtgctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt 120
 ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttggtca agggaacctt 180
 gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac 240
 actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat 300
 ccatgtttaa atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc 360
 tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420
 tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaaggtgg tttgctctg tactgagga 480
 tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540
 gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgtttttcc tgatgtggac 600
 tatgtaaatt ctactgaagc tgaaccatt ttggataaca tcaactcaag cacccaatca 660
 tttaatgact tcacgcgtgt tgttggtgga gaagatgcca aaccaggtca attcccttgg 720
 caggttgttt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa 780
 tggattgtaa ctgctgocca ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt tgtcgccggc 840
 gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt 900
 cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa 960
 ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa 1020
 tacacgaaca tcttctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc 1080
 cacaaagga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc 1140
 acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat 1200
 gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa 1260
 gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa 1320
 tatggaatat ataccaaggt atcccggat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc 1380
 acttaa 1386

<210> 2
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 2

5

ES 2 441 167 T3

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
 1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
 20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
 35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
 50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
 65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
 85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
 100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
 115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
 130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
 145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
 165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
 180 185 190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
 195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe

REIVINDICACIONES

1. Una variante del factor IX (F. IX) o del factor IX activado (F. IXa), que está **caracterizada porque** tiene actividad coagulante en ausencia de su cofactor,
en la que el cofactor es el factor VIII (F. VIII) o el factor VIII activado (F. VIIIa),
- 5 comprendiendo dicha variante del factor IX o del factor IX activado al menos una sustitución de aminoácido en la posición 265 en combinación con la sustitución de aminoácido V 181I.
2. La variante del factor IX de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una sustitución de aminoácido en la posición 383.
3. La variante del factor IX de la reivindicación 1 ó 2, en la que la sustitución de aminoácido en la posición 265 es seleccionada de entre K265T, K265A, K265D, K265E, K265F, K265G, K265H, K265I, K265N, K265S y K265V.
- 10 4. La variante del factor IX de la reivindicación 3, en la que la sustitución de aminoácido en la posición 265 es seleccionada de entre K265T, K265A, K265G, K265V, K265N y K265D.
5. La variante del factor IX de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que la sustitución de aminoácido en la posición 383 es I383V.
- 15 6. La variante del factor IX de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente una sustitución de aminoácido en la posición 338 y/o 377, preferiblemente que comprende adicionalmente una sustitución de aminoácido seleccionada de entre R338A, R338L y S377W.
7. La variante del factor IX de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, seleccionada de entre
20 la variante K265T / V181I,
 la variante K265T / V181I / I383V,
 la variante K265T / V181I / I383V / R3 3 8A / S377W,
 la variante K265A / V181I,
 la variante K265A / V181I / I383V, o
 la variante K265A / V181I / I383V / R338A / S377W.
- 25 8. La variante del factor IX de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 seleccionada de entre una variante con una sustitución de aminoácido en la posición 265, preferiblemente seleccionada de entre K265T, K265A, K265D, K265E, K265F, K265G, K265H, K265I, K265N, K265S y K265V, más preferiblemente seleccionada de entre K265T, K265A, K265G, K265V, K265N y K265D, en combinación con la sustitución de aminoácido V181I, preferiblemente en combinación con una sustitución de aminoácido en la posición 383, preferiblemente I383V, más preferiblemente
30 seleccionada de entre
 la variante K265T / V181I / I383V,
 la variante K265A / V181I / I383V,
 la variante K265G / V181I / I383V,
 la variante K265V / V181I / I383V,
35 la variante K265N / V181I / I383V,
 la variante K265D / V181I / I383V,
 la variante K265E / V181I / I383V,
 la variante K265F / V181I / I383V,
 la variante K265H / V181I / I383V,
40 la variante K265I / V181I / I383V, o
 la variante K265S / V181I / I383V.
9. La variante del factor IX de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende un compuesto o una fracción adicional, preferiblemente unida covalentemente a la variante.
10. La variante del factor IX de la reivindicación 9, en la que el compuesto o la fracción adicional es una proteína, un
45 marcador y/o un polímero.
11. Un ácido nucleico que codifica para la variante del factor IX de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, preferiblemente unido operativamente a una secuencia promotora y/o de terminación,
que es más preferiblemente un plásmido de expresión, un constructo de terapia génica, un vector vírico o no vírico o un molde para la reparación génica.
- 50 12. Una composición farmacéutica que comprende al menos una variante del factor IX (F. IX) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o al menos un ácido nucleico de la reivindicación 11, y opcionalmente portador(es) y/o excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s).

13. Una variante del factor IX (F. IX) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un ácido nucleico de la reivindicación 11 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades.
- 5 14. La variante del factor IX (F. IX), el ácido nucleico o la composición farmacéutica de la reivindicación 13, en los que la enfermedad es una alteración hemorrágica o una hemorragia.
15. La variante del factor IX (F. IX), el ácido nucleico o la composición farmacéutica de la reivindicación 14, en los que la alteración hemorrágica es la hemofilia A, hemofilia causada o complicada por anticuerpos inhibidores contra el factor F. VIII o el F. VIIIa, la hemofilia B,
- 10 y/o en los que la alteración hemorrágica o la hemorragia es una alteración hemorrágica en la que se usan agentes de puenteo, incluyendo, por ejemplo, coagulopatías neonatales; enfermedad hepática grave; procedimientos quirúrgicos de alto riesgo; pérdida de sangre traumática; trasplante de médula ósea; trombocitopenias y alteraciones en la función plaquetar; reversión urgente de una anticoagulación oral; deficiencias congénitas en los factores V, VII, X, y XI; y enfermedad de von Willebrand con inhibidores contra el factor de von Willebrand, pérdida de sangre relacionada con grandes heridas, hemorragias cerebrales, alteraciones en las funciones de los trombocitos
- 15 16. La variante del factor IX (F. IX), el ácido nucleico o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, para la terapia celular, la terapia génica, la terapia de infusión de proteínas.

Figura 1

1 Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu
 1 ATG CAG CGC CTC AAC ATG ATC ATG GCA GAA TCA CCA GGC CTC ATC ACC ATC TGC CTT TTA GGA TAT CTA CTC
 25 Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Ala Asn
 73 AGT GCT GAA TGT ACA GTT TTT CTT GAT CAT GAA AAC GCC AAC AAA ATT CTG AAT CGG CCA AAG AGG GCT AAT
 49 Ser Tyr Lys Leu Glu Glu Phe Lys Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Tyr Glu
 145 TCA TAT AAA TTG GAA GAG TTT AAG CAA GGG AAC CTT GAG AGA GAA TGT ATG GAA GAA AAG TGT AGT TAT GAA
 73 Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Asp Glu Thr Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Pro
 218 GAA GCA CGA GAA GTT TTT GAA GAC GAT GAA ACG ACA ACT GAA TTT TGG AAG CAG TAT GTT GAT GGA GAT CCG
 97 Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro
 291 TGT GAG TCC AAT CCA TGT TTA AAT GGC GGC AGT TGC AAG GAT GAC ATT AAT TCC TAT GAA TGT TGG TGT CCC
 121 Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Ala Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
 364 TTT GGA TTT GAA GGA AAG AAC TGT GAA TTA OCT GCA ACA TGT AAC ATT AAG AAT GGC AGA TGC GAG CAG TTT
 145 Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Ala Leu Ala Ala Gln Lys
 437 TGT AAA AAT AGT GCT GAT AAC AAG GTG GTT TGC TCC TGT ACT GAG GGA TAT GCA CTT GCA GCA GCC CAG AAG
 169 Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
 518 TCC TGT GAA CCA GCA GTG CCA TTT CCA TGT GGA AGA GTT TCT GTT TCA CAA ACT TCT AAG CTC ACC CGT GCT
 193 Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln
 583 GAG ACT GTT TTT CCT GAT GTG GAC TAT GTA AAT TCT ACT GAA GCT GAA ACC ATT TTG GAT AAC ATC ACT CAA
 217 Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Ile Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
 656 ACG ACC CAA TCA TTT AAT GAC TTC ACG CGT ATT GTT GGT GGA GAA GAT GCC AAA CCA GGT CAA TTC CCT TGG
 241 Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Leu Thr
 729 CAG GTT GTT TTG AAT GGT AAA GIT GAT GCA TTC TGT GGA GGC TCT ATC GTT AAT GAA AAA TGG ATT TTA ACT
 265 Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Lys His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
 802 GCT GCC CAC TGT GTT GAA ACT GGT GTT AAA ATT ACA GTT GTC GCC GGC AAR CAT AAT ATT GAG CAG ACA GAA
 289 His Thr Val Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Val Ile Pro His His Asn Phe Asn Ala Ala Ile Asn Thr Tyr
 875 CAT ACA GTG CAA AAG CGA AAT GTG ATT CGA GTT ATT CCT CAC CAC AAC TTC AAT GCA GCT ATT AAT ACG TAC
 313 Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Leu
 948 AAC CAT GAC ATT GCC CTT CTG AAA CTG GAC GCA CCC TTA GTG CTA AAC AGC TAC GTT ACA CCT ATT TGC CTT
 337 Pro Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Ile Phe Glu Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe
 1021 CCT GAC AAG GAA TAC ACG AAC ATC TTC CTC ATA TTT GAA TCT GGC TAT GTA AGT GGC TGG GGA AGA GTC TTC
 361 His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Ala
 1094 CAC AAA GGG AGA TCA GCT TTA GTT CTT CAG TAC CTT AGA GTT CCA CTT GTT GAC CGA GCC ACA TGT CTT GCA
 385 Ser Ser Lys Phe Thr Ile Thr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr His Glu Gly Gly Ala Asp Ala Cys Gln
 1167 TCT TCA AAG TTC ACC ATC ACT AAC AAC ATG TTC TGT GCT GGC TAT CAT GAA GGA GGT GCA GAT GCA TGT CAA
 409 Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Phe Thr Trp Phe Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly
 1240 GGA GAT AGT GGG GGA CCC CAT GTT ACT GAA GTG GAA TTC ACC TGG TTC TTA ACT GGA ATT GTT AGC TGG GGT
 430 Glu Gly Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu
 1313 GAA GGG TGT GCA ATG AAA GGC AAA TAT GGA ATA TAT ACC AAG GTA TCC CGG TAT GTC AAC TGG ATT AAG GAA
 457 Lys Thr Lys Leu Thr ***
 1386 AAA ACA AAG CTC ACT TAA

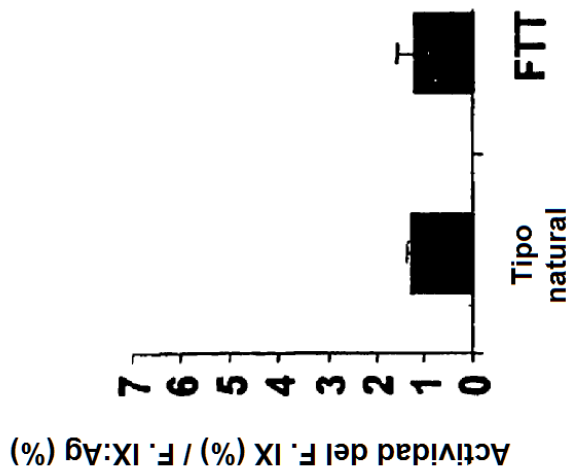
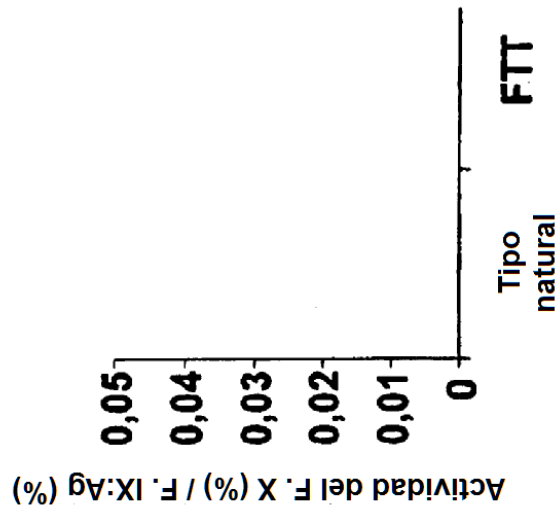
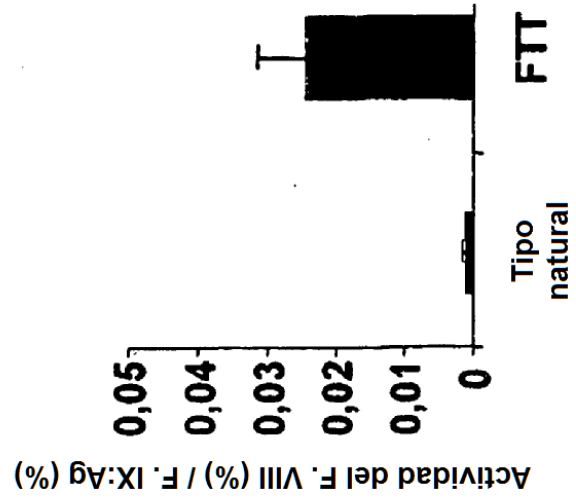


Figura 2

Figura 3

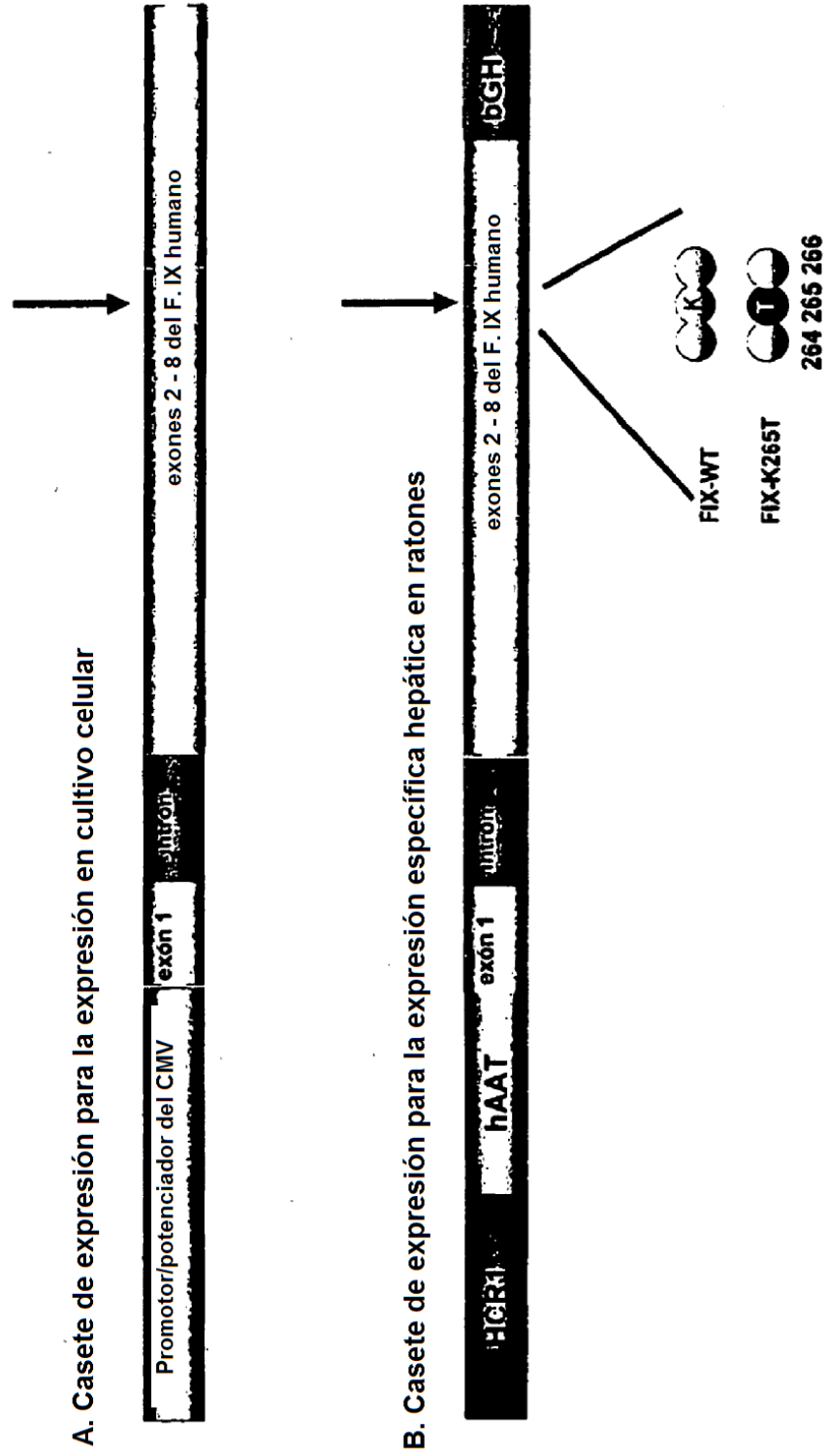


Figura 4

Paciente 2
39 unidades Bethesda

Paciente 1
92 unidades Bethesda

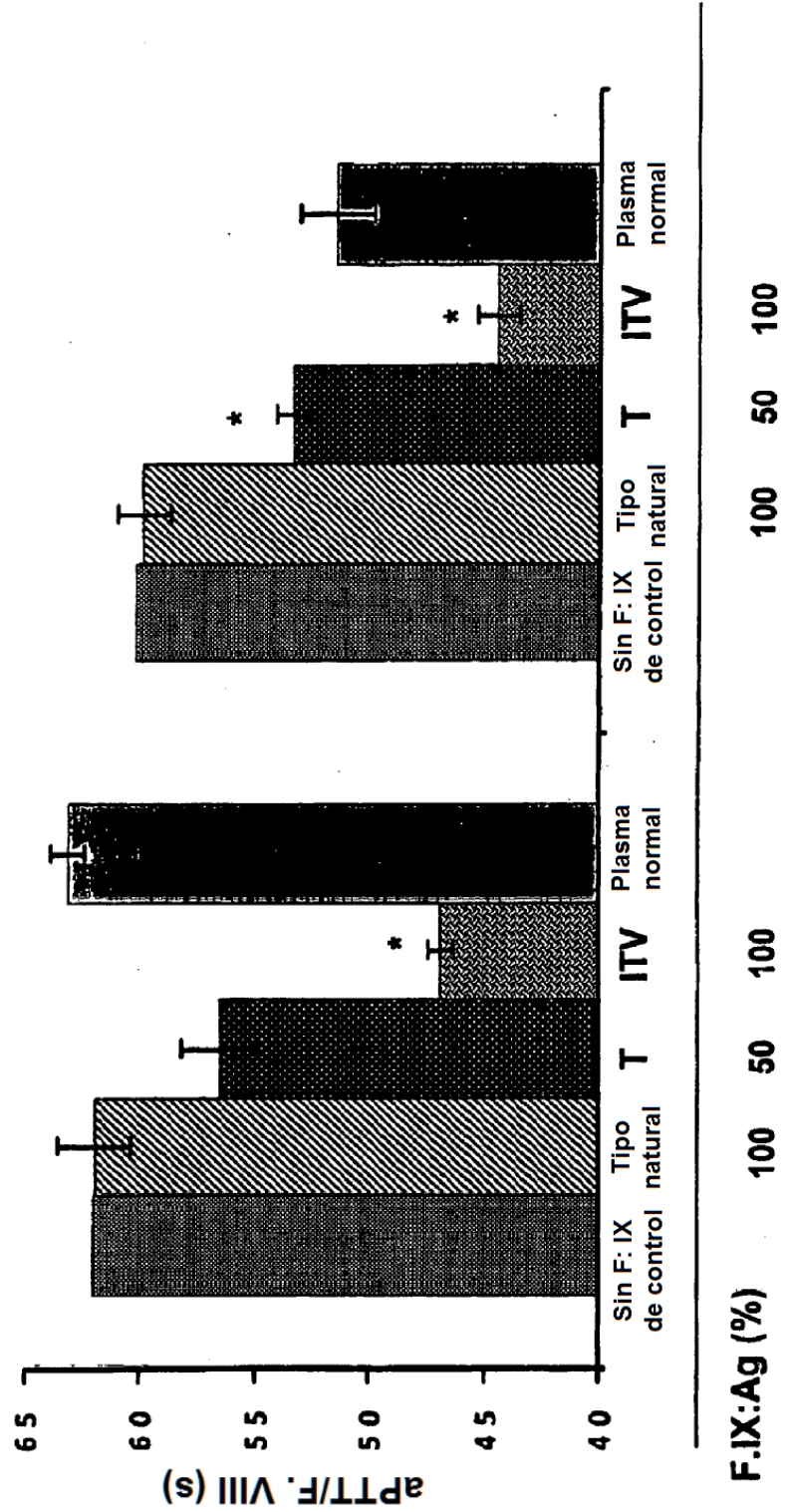


Figura 5

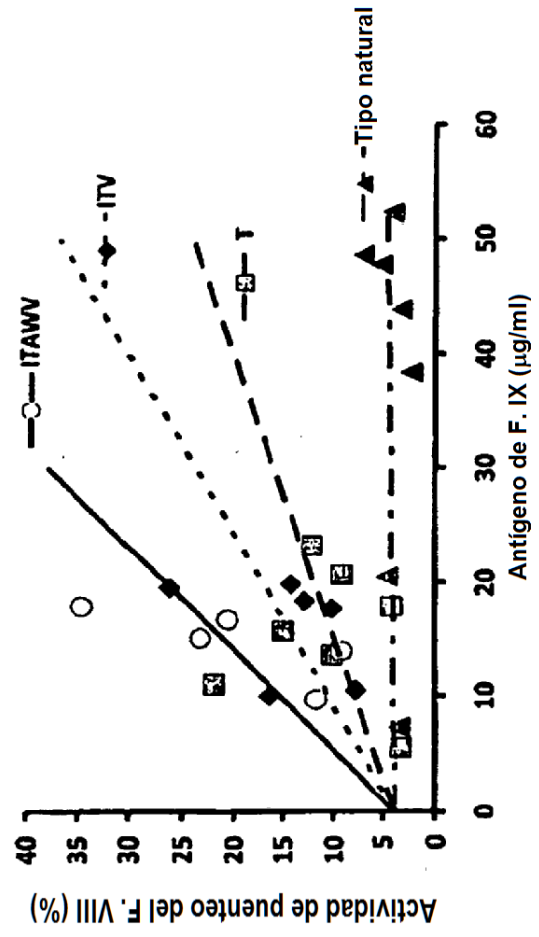


Figura 7

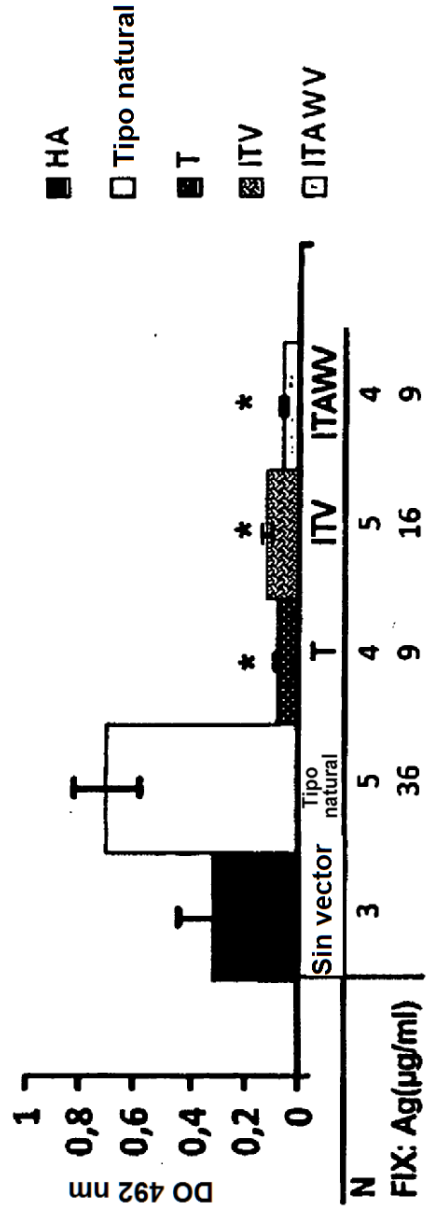


Figura 8

