

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 513 043**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027	(2006.01) C12N 15/00	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01) C12N 15/62	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01) C12N 15/85	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01)	
C07K 14/73	(2006.01)	
C07K 14/74	(2006.01)	
C07K 14/81	(2006.01)	
C07K 14/815	(2006.01)	
C12N 5/10	(2006.01)	
C12N 9/64	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.1998** **E 05077712 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014** **EP 1676920**

54 Título: **Proteína de fusión anticoagulante anclada a membrana de la célula**

30 Prioridad:

26.03.1997 GB 9706327
23.09.1997 GB 9720248

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2014

73 Titular/es:

IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED (100.0%)
LEVEL 12 ELECTRICAL AND ELECTRONIC
ENGINEERING BUILDING IMPERIAL COLLEGE
LONDON SW7 2AZ, GB

72 Inventor/es:

RIESBECK, KRISTIAN;
DORLING, ANTHONY;
GEORGE, ANDREW JOHN TIMOTHY y
LECHLER, ROBERT IAN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 513 043 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

Proteína de fusión anticoagulante anclada a membrana de la célula.

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a la inhibición de la coagulación sanguínea, especialmente durante el rechazo de órganos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La técnica quirúrgica del trasplante de órganos ha sido ahora practicada con éxito durante varias décadas y, debido a su éxito, el procedimiento se ha extendido y se podría mantener que se ha convertido en rutinario. Sin embargo, el suministro de órganos adecuados para trasplante no es capaz de satisfacer las demandas siempre en aumento.

Debido a la escasez de órganos humanos adecuados (esto es, alogénicos), la posibilidad de utilizar órganos de animales (esto es, xenogénicos) en las operaciones de trasplante en humanos ("xenoinjerto" o "xenotrasplante") ha estado recibiendo cada vez más atención en los años recientes (por ejemplo, *Nature* 1997; 385: 285). Se cree que los órganos donantes de porcino son candidatos adecuados, ya que los cerdos son anatómicamente y fisiológicamente similares a los humanos y hay un suministro abundante.

La realización de xenoinjertos está actualmente impedida, sin embargo, por los graves y bien documentados problemas de rechazo. Este proceso puede ser dividido en etapas distintas, la primera de las cuales tiene lugar a los minutos del trasplante. Ésta es conocida como respuesta hiperaguda y está causada por anticuerpos existentes en el receptor que reconocen y reaccionan con antígenos foráneos que están en las células endoteliales (CEs) del xenoinjerto. Este reconocimiento desencadena la cascada del complemento que a su vez da lugar a la lisis y muerte de las CEs del trasplante.

Este rechazo hiperagudo inicial es posteriormente reforzado por la respuesta vascular retardada (conocida también como rechazo vascular agudo o rechazo retardado del xenoinjerto). La lisis y la muerte de las CEs durante la respuesta hiperaguda está acompañada por edema y por la exposición de las células adventicias que expresan constitutivamente en su superficie el factor tisular (TF). Se cree que el factor tisular es fundamental para el inicio de la cascada de coagulación *in vivo*, y su exposición al plasma desencadena las reacciones de coagulación. La trombina y el TNF- α se localizan alrededor del tejido dañado y esto induce la síntesis y la expresión posterior de TF por las CEs.

El entorno alrededor de las CEs en reposo no favorece la coagulación. Varios inhibidores naturales de la coagulación están asociados con los proteoglicanos extracelulares de las CEs, tales como el inhibidor de la ruta del factor tisular, antitrombina III y trombomodulina. Sin embargo, el reconocimiento del tejido foráneo por anticuerpos naturales xenorreactivos (XNAs), produce la pérdida de estas moléculas. Junto con la exposición y la inducción del factor tisular, el entorno anticoagulante alrededor de las CEs se convierte así en procoagulante.

Las regiones vascularizadas del xenoinjerto se convierten por tanto en lugares de coágulos sanguíneos, una característica del tejido dañado. El flujo sanguíneo disminuye y el órgano trasplantado resulta isquémico. Una descripción más completa del rechazo vascular retardado puede ser encontrada en Bach y col., (1996).

La utilización de órganos xenogénicos en trasplantes está por tanto impedida por un rechazo hiperagudo inicial seguido por un rechazo vascular prolongado, seguido posiblemente por un rechazo mediado por células T. La inhibición de los mecanismos responsables de estos rechazos podría facilitar la utilización de xenoinjertos.

La simple administración de inhibidores adecuados no es, sin embargo, un abordaje particularmente adecuado. La inhibición completa del complemento en un animal receptor es equivalente a inmunosupresión, dejando al sujeto susceptible a infecciones oportunistas. De manera similar, la inhibición de la cascada de la coagulación en un receptor dejará al animal susceptible a un sangrado post-operatorio incontrolado. Por tanto, los inhibidores deberían estar localizados deseablemente en el receptor en el lugar del xenoinjerto.

La prevención del rechazo hiperagudo es el tema de la Patente Europea 0495852 (Imutran). Con el fin de hacer que los tejidos sean más adecuados para un xenoinjerto, esta patente describe que deberían estar asociados con factores homólogos de restricción del complemento, que impiden la activación completa del complemento en el receptor del órgano xenogénico.

Este abordaje ha sido desarrollado y aplicado para producir animales transgénicos con órganos diseñados para sobrevivir al rechazo hiperagudo (Squinto, 1996). Se han producido ratones transgénicos que expresan CD59 humano, un regulador del complemento, en CEs cardíacas (Diamond, 1995). El CD59 humano conservaba la

actividad biológica y el complemento fue inhibido cuando los corazones transgénicos fueron perfundidos con plasma humano.

5 Se han descrito cerdos transgénicos que expresan DAF humano y/o CD59 humano (McCurry, 1996). El rechazo cardíaco tardó el doble de tiempo en ocurrir en los xenoinjertos transgénicos que en los controles.

La inhibición del rechazo vascular retardado no ha recibido la misma atención, aunque inhibidores de la cascada de coagulación son bien conocidos en la técnica y muchos de ellos han sido bien caracterizados.

10 Por ejemplo, se sabe que el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI) inhibe la función del complejo activo que se forma normalmente entre el factor tisular, el Factor VIIa y el Factor Xa. El TFPI es un polipéptido soluble de 276 residuos cuyo extremo C cargado positivamente se une al sulfato de heparina en la capa de proteoglicanos de las CEs. Ha sido dividido teóricamente en tres dominios "Kunitz": el Dominio Kunitz I es responsable de la unión al factor tisular y al Factor VIIa; el Dominio II se une al Factor Xa; pero las funciones del Dominio III están menos claras
15 (Hamamoto, 1993).

El péptido anticoagulante de la garrapata (TAP) es un inhibidor específico y potente del Factor Xa. Este polipéptido de 60 aminoácidos ha sido purificado de la garrapata blanda *Ornithodoros moubata*.

20 Muchos venenos de serpiente contienen también polipéptidos anticoagulantes. Por ejemplo, un activador de la proteína C de 231 aminoácidos ha sido purificado del veneno de la serpiente *Agkistrodon contortrix* (McMullen, 1989; Kisiel, 1987).

25 La hirudina es la proteína anticoagulante utilizada por la sanguijuela *Hirudo medicinalis* cuando extrae la sangre de su víctima. Es muy potente y se une a la trombina en una proporción 1:1, con una constante de disociación en el rango de femtomolar. El sitio activo de la trombina está enmascarado en el complejo estable y por tanto la hirudina impide la degradación del fibrinógeno, inhibiendo de este modo la formación del coágulo.

30 Un abordaje posible para localizar anticoagulantes para el lugar del rechazo es ligar hirudina a anticuerpos contra la E-selectina, que se expresa en la superficie de las CEs durante la activación celular. Este abordaje ha demostrado ser eficaz para inhibir la formación del coágulo *in vitro* (Kiely, 1995). Otras posibles estrategias fueron revisadas recientemente por Bach y col. (1996).

35 La P-selectina (conocida también como CD62) es expresada también en la superficie de las CEs durante la activación celular. Durante la síntesis es dirigida hacia los gránulos de almacenamiento secretorios de las plaquetas y de las células endoteliales por secuencias que residen en su dominio citoplásmico (Disdier, 1992). En respuesta a agonistas celulares, tales como trombina, los gránulos son redistribuidos rápidamente y la P-selectina se expresa en la superficie celular (Green, 1994).

40 Es un objeto de la presente invención proporcionar proteínas anticoagulantes unidas a membranas. Estas proteínas son adecuadas para inhibir la cascada de coagulación en la superficie de las CEs, inhibiendo de este modo los mecanismos *in vivo* responsables del rechazo de órganos.

45 Es un objeto más proporcionar la expresión regulada de tales moléculas en la superficie de las CEs, de tal manera que la inhibición de la coagulación tenga lugar localmente durante las condiciones del rechazo del órgano. El rechazo podría ser xenogénico o alogénico.

50 Es un objeto todavía más de la invención proporcionar tejido biológico adecuado para trasplantes, particularmente para xenotrasplantes.

RESUMEN DE LA INVENCION

55 La invención proporciona un animal no humano que comprende un tejido biológico, en el que el tejido comprende una célula, la célula expresa una o más proteínas que comprenden una región con actividad anticoagulante y una región que puede anclar dicha proteína a una membrana celular, en la que la región de anclaje y la región anticoagulante de la proteína derivan de proteínas diferentes, y en la que la región anticoagulante comprende la secuencia de un polipéptido anticoagulante seleccionado entre los grupos que consisten en:

- 60 i) hirudina, inhibidor de la vía del factor tisular, péptido anticoagulante de la garrapata y un activador de la proteína C;
- ii) derivados y fragmentos funcionales de i) que retienen la actividad anticoagulante;
- 65 iii) heparina y antitrombina;
- iv) derivados y fragmentos funcionales de iii) que retienen la actividad anticoagulante; y

v) derivados anticoagulantes de la trombina.

La invención también proporciona un órgano de un animal transgénico no humano de la invención, en el que dicho órgano comprende una célula, la célula expresa una o más proteínas que comprenden una región con actividad anticoagulante y una región que puede anclar dicha proteína a una membrana celular, en la que la región de anclaje y la región anticoagulante de la proteína derivan de proteínas diferentes, y en la que la región anticoagulante comprende la secuencia de un polipéptido anticoagulante seleccionado entre los grupos que consisten en:

- i) hirudina, inhibidor de la vía del factor tisular, péptido anticoagulante de la garrapata y un activador de la proteína C;
- ii) derivados y fragmentos funcionales de i) que retienen la actividad anticoagulante;
- iii) heparina y antitrombina;
- iv) derivados y fragmentos funcionales de iii) que retienen la actividad anticoagulante; y
- v) derivados anticoagulantes de la trombina.

La invención también proporciona un tejido biológico que comprende una célula, en el que la célula expresa una o más proteínas que comprenden una región con actividad anticoagulante y una región que puede anclar dicha proteína a una membrana celular, en la que la región de anclaje y la región anticoagulante de la proteína derivan de proteínas diferentes, y en la que la región anticoagulante comprende la secuencia de un polipéptido anticoagulante seleccionado entre los grupos que consisten en:

- i) hirudina, inhibidor de la vía del factor tisular, péptido anticoagulante de la garrapata y un activador de la proteína C;
- ii) derivados y fragmentos funcionales de i) que retienen la actividad anticoagulante;
- iii) heparina y antitrombina;
- iv) derivados y fragmentos funcionales de iii) que retienen la actividad anticoagulante; y
- v) derivados anticoagulantes de la trombina.

en el que la célula no se produce utilizando un método que implica la modificación de la identidad genética de la línea germinal del ser humano o que implica el uso de un embrión humano para fines industriales o comerciales.

La invención también proporciona un método para hacer que un tejido u órgano sea adecuado para trasplante, que comprende la expresión de una proteína en la superficie de las células endoteliales de dicho tejido u órgano, en la que el método no implica la modificación de la identidad genética de la línea germinal del ser humano o uso de un embrión humano para fines industriales o comerciales, y en el que dicha proteína comprende una región con actividad anticoagulante y una región que puede anclar dicha proteína a una membrana celular, en la que la región de anclaje y la región anticoagulante de la proteína derivan de proteínas diferentes, y en la que la región anticoagulante comprende la secuencia de un polipéptido anticoagulante seleccionado entre los grupos que consisten en:

- i) hirudina, inhibidor de la vía del factor tisular, péptido anticoagulante de la garrapata y un activador de la proteína C;
- ii) derivados y fragmentos funcionales de i) que retienen la actividad anticoagulante;
- iii) heparina y antitrombina;
- iv) derivados y fragmentos funcionales de iii) que retienen la actividad anticoagulante; y
- v) derivados anticoagulantes de la trombina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se describe una proteína que contiene una región con actividad anticoagulante y una región que puede anclar dicha proteína a una membrana celular.

Preferiblemente, esta es una proteína quimérica, es decir, la región de anclaje y la región anticoagulante derivan de proteínas diferentes.

La región anticoagulante puede contener la secuencia de cualquier péptido anticoagulante. Ejemplos de tales polipéptidos anticoagulantes incluyen heparina, TAPs, antitrombina, hirudinas y TFPIs, junto con sus derivados funcionales tales como fragmentos y derivados que conserven la actividad anticoagulante. Se han descrito también derivados anticoagulantes de la trombina, normalmente un procoagulante (Dang, 1997).

Preferiblemente, la región anticoagulante contiene la secuencia de una hirudina. Las hirudinas incluyen hirudina, derivados de hirudina, análogos ("hirúlogos") y variantes (por ejemplo, hirudisinas). Por ejemplo, se ha descrito que la sulfatación en Tyr-64 aumenta la actividad anticoagulante de la hirudina, y que la hirudisina-2 es un inhibidor de la actividad de la trombina más potente que la propia hirudina (por ejemplo, Knapp, 1992; Skern, 1990).

Como alternativa, la región anticoagulante podría contener la secuencia de un inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI). Los TFPIs incluyen el propio TFPI y derivados o análogos del mismo que conserven la actividad inhibidora. Preferiblemente, la secuencia de TFPI comprende los Dominios Kunitz I y II del propio TFPI.

Como una alternativa adicional, la región anticoagulante podría comprender la secuencia de un péptido anticoagulante de la garrapata (TAP). Los TAPs incluyen el propio TAP y derivados o análogos del mismo que conserven la actividad inhibidora. Por ejemplo, la potencia de la inhibición de FXa por TAP ha sido incrementada mediante mutagénesis dirigida a un sitio (por ejemplo, Mao, 1995).

Regiones anticoagulantes alternativas adicionales podrían comprender, por ejemplo, la secuencia de un activador de la proteína C, tal como los aislados del veneno de serpiente (por ejemplo, McMullen, 1989; Kisiel, 1987), o la secuencia de anticoagulantes aislados de venenos de serpiente que actúen por otra vía distinta de la activación de la proteína C, o sus derivados o análogos que conserven la actividad anticoagulante.

La región de anclaje puede ser cualquier entidad que pueda unir la proteína a una membrana celular. Ejemplos adecuados incluyen secuencias transmembranales de proteínas de membrana y los anclajes del GPI. Preferiblemente, la región de anclaje es una secuencia capaz de unir la proteína a una bicapa lipídica, tal como las regiones transmembranales de las proteínas del HLA de clase I o de las proteínas CD4. Puede ser también deseable que la proteína comprenda el dominio citoplásmico que está asociado normalmente con dichas regiones transmembranales, tal como el dominio citoplásmico de CD4 y/o los dominios extracelulares inmediatamente yuxtapuestos con la membrana celular, tales como los dominios 3 y 4 de CD4. Alternativamente, la región de anclaje podría ser una secuencia que confiriera a la proteína la capacidad para asociarse extracelularmente con una proteína de membrana sin que la propia proteína sea insertada en la membrana celular.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se describe una proteína de acuerdo con el primer aspecto que comprende además una secuencia diana que impide que la proteína se exprese constitutivamente en la superficie celular.

Preferiblemente, la secuencia vectorizante es una secuencia polipeptídica que puede dirigir un polipéptido naciente hacia un gránulo secretor y, más preferiblemente, el gránulo secretor es uno que no se fusiona con la membrana plasmática de la célula hasta que la célula es estimulada adecuadamente. Por ejemplo, los cuerpos de Weibel-Palade no se fusionan con la membrana plasmática hasta que la superficie de la célula endotelial es estimulada por un secretagogo, tal como trombina o fibrina (Wagner, 1993). Preferiblemente, el gránulo secretor se fusiona con la membrana plasmática durante la activación de la CE que tiene lugar durante el rechazo del órgano.

Por tanto, la secuencia vectorizante es preferiblemente una que dirige un polipéptido naciente hacia un cuerpo de Weibel-Palade, tal como la secuencia relevante de la P-selectina. Muy preferiblemente, la proteína de acuerdo con la invención comprende una secuencia anticoagulante y los dominios transmembranal y citoplásmico de la P-selectina. Los dominios de la P-selectina proporcionan de este modo la secuencia de anclaje y la secuencia vectorizante.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se describe un polinucleótido que codifica una proteína descrita en la presente invención. Preferiblemente, el polinucleótido es ADN.

Preferiblemente, el polinucleótido contiene secuencias adecuadas para la regulación de la expresión de la proteína de acuerdo con la invención. Esta expresión puede ser preferiblemente controlada, tal como mediante un control específico de la célula, un control inducible o un control temporal. Por ejemplo, la expresión podría ser específica para CEs o podría ser regulada en respuesta a la activación celular.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se describe un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con el tercer aspecto.

El término "vector" significa una molécula que es capaz de transferir un polinucleótido a una célula huésped. Preferiblemente, el vector es un vector de ADN y, más preferiblemente, es capaz de expresar ARN que co-difica una proteína de acuerdo con la invención. Se conocen en la técnica numerosos vectores adecuados.

5 Preferiblemente, el vector es adecuado para la producción de un animal transgénico. Vectores adecuados para la producción de cerdos transgénicos, por ejemplo, están descritos en Heckl-Östreicher (1995), McCurry (1996), White (1995), Yannoutsos (1995) y Langford (1996). Vectores con minigenes adecuados para la producción de ratones transgénicos están descritos en Diamond (1995).

10 De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se describe un sistema de administración que comprende una molécula del primero, segundo, tercer o cuarto aspecto y significa administrar dicha molécula a una célula diana.

15 Ciertos vectores de acuerdo con el tercer aspecto pueden funcionar también como sistemas de administración adecuados. De igual modo, ciertos sistemas de administración de acuerdo con este cuarto aspecto pueden ser también inherentemente vectores, pero no es éste siempre el caso. Por ejemplo, un vector vírico puede funcionar también como un sistema de administración, mientras que un sistema de administración liposómico no es un vector.

20 El sistema de administración puede ser vírico o no vírico. Los sistemas no víricos, tales como liposomas, evitan algunas de las dificultades asociadas con los sistemas basados en virus, tales como el precio de la producción a gran escala, la poca duración de la expresión y los problemas relativos a la seguridad. Preferiblemente, el sistema de administración es adecuado para ser utilizado en terapia génica. Se conocen en la técnica numerosos sistemas de administración apropiados.

25 Preferiblemente, el sistema de administración será dirigido, de tal manera que las moléculas de acuerdo con la presente invención sean captadas por células adecuadas para el trasplante, o por células que hayan sido trasplantadas. Muy preferiblemente, el sistema de administración será específico para estas células. Por ejemplo, el sistema de administración puede estar dirigido hacia un órgano específico, tal como el corazón o el riñón, o hacia un tipo celular específico, tal como células endoteliales.

30 Para conseguir esto, el sistema de administración puede ser, por ejemplo, un sistema de administración mediado por receptores, estando dirigido a receptores encontrados en las células diana. Por ejemplo, el sistema de administración puede estar dirigido hacia receptores encontrados en las células cardíacas, preferiblemente hacia receptores encontrados exclusivamente en células cardíacas, o puede estar dirigido hacia receptores encontrados en las células endoteliales, preferiblemente hacia receptores encontrados exclusivamente en células endoteliales, o hacia receptores encontrados en células endoteliales activadas, tales como E-selectina o P-selectina.

35 El sistema de administración es preferiblemente adecuado para la producción de animales transgénicos. Por ejemplo, el sistema de administración puede estar dirigido hacia un gameto, un cigoto o una célula madre embrionaria.

40 De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, se describe un método para transfectar una célula con un vector de acuerdo con la descripción. Esto puede implicar la utilización de un sistema de administración de acuerdo con la descripción.

45 El tipo celular no está restringido y puede ser procariótico o eucariótico. La transfección puede tener lugar *in vivo* o *ex vivo*.

50 Cuando la célula va a ser utilizada en trasplante, la célula es preferiblemente eucariótica, más preferiblemente una célula endotelial. La transfección estable de células endoteliales porcinas, por ejemplo, está descrita en Heckl - Östreicher (1995).

55 Preferiblemente, la célula es adecuada para la producción de un animal transgénico. Más preferiblemente, la célula es un gameto, un cigoto o una célula madre embrionaria. La transfección de óvulos murinos mediante microinyección para generar ratones transgénicos, por ejemplo, está descrita en Diamond (1995), y la microinyección de cigotos porcinos, por ejemplo, para generar cerdos transgénicos está descrita en Yannoutsos (1995), Langford (1996) y White (1995).

60 De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención, se describe una célula transfectada de acuerdo con el sexto aspecto.

65 Con el fin de incrementar la eficacia de la inhibición de la cascada de coagulación, la célula es capaz de expresar preferiblemente dos o más proteínas diferentes de acuerdo con la descripción, cada una de las cuales inhibe la cascada de coagulación en una etapa diferente. Por ejemplo, la región anticoagulante de una proteína puede comprender un TFPI, mientras que la otra comprende una hirudina.

De acuerdo con la invención, se proporciona un tejido biológico que comprende una célula, en el que la célula expresa una o más proteínas que comprenden una región con actividad anticoagulante y una región que puede anclar dicha proteína a una membrana celular, en la que la región de anclaje y la región anticoagulante de la proteína derivan de proteínas diferentes, y en la que la región anticoagulante comprende la secuencia de un polipéptido anticoagulante seleccionado entre los grupos que consisten en:

- i) hirudina, inhibidor de la vía del factor tisular, péptido anticoagulante de la garrapata y un activador de la proteína C;
- ii) derivados y fragmentos funcionales de i) que retienen la actividad anticoagulante;
- iii) heparina y antitrombina;
- iv) derivados y fragmentos funcionales de iii) que retienen la actividad anticoagulante; y
- v) derivados anticoagulantes de la trombina.

en el que la célula no se produce utilizando un método que implica la modificación de la identidad genética de la línea germinal del ser humano o que implica el uso de un embrión humano para fines industriales o comerciales. El término "tejido biológico", según se utiliza en la presente, incluye colecciones de células, tejidos y órganos. Por consiguiente, la definición incluye por ejemplo fibroblastos, una córnea, tejido nervioso, un corazón, un hígado o un riñón.

De acuerdo con la invención, se proporciona un animal que comprende un tejido biológico, en el que el tejido comprende una célula, la célula expresa una o más proteínas que comprenden una región con actividad anticoagulante y una región que puede anclar dicha proteína a una membrana celular, en la que la región de anclaje y la región anticoagulante de la proteína derivan de proteínas diferentes, y en la que la región anticoagulante comprende la secuencia de un polipéptido anticoagulante seleccionado entre los grupos que consisten en:

- i) hirudina, inhibidor de la vía del factor tisular, péptido anticoagulante de la garrapata y un activador de la proteína C;
- ii) derivados y fragmentos funcionales de i) que retienen la actividad anticoagulante;
- iii) heparina y antitrombina;
- iv) derivados y fragmentos funcionales de iii) que retienen la actividad anticoagulante; y
- v) derivados anticoagulantes de la trombina.

Preferiblemente, el animal es adecuado para la producción de órganos para ser trasplantados a humanos. Preferiblemente, el animal es un mamífero y, más preferiblemente, es un cerdo transgénico o una oveja transgénica.

El animal puede ser tratado mientras está vivo de tal manera que contenga tejido biológico transgénico (esto es, tratado mediante terapia génica). Preferiblemente, un animal vivo es transfectado con un vector de acuerdo con la descripción con el fin de producir un animal transgénico. Por ejemplo, un vector de acuerdo con la descripción podría ser administrado específicamente a las células endoteliales de un cerdo para producir órganos transgénicos adecuados para xenotrasplante.

Alternativamente, el animal podría haber nacido como animal transgénico. Varios procedimientos adecuados para generar tales animales transgénicos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Bradley y Liu, 1996; Clarke, 1996; Wheeler, 1994). Por ejemplo, la manipulación directa del cigoto o del embrión temprano, mediante por ejemplo microinyección de ADN, es bien conocida, igual que lo es la manipulación *in vitro* de células pluripotenciales tales como las células madre embrionarias. La infección retroviral de embriones tempranos ha demostrado tener éxito en varias especies, y se ha descrito la infección adenoviral de huevos libres de zona. La transgénesis y la clonación de ovejas mediante transferencia nuclear han sido también descritas (por ejemplo, WO97 / 07668).

De acuerdo con la invención, se proporciona un método para convertir un tejido u órgano en adecuado para el trasplante, que comprende la expresión de una proteína de acuerdo con la presente descripción en la superficie de las células endoteliales en dicho tejido u órgano, en el que el método no implica la modificación de la identidad genética de la línea germinal del ser humano o el uso de un embrión humano para fines industriales o comerciales, y en la que dicha proteína comprende una región con actividad anticoagulante y una región que puede anclar dicha proteína a una membrana celular, en la que la región de anclaje y la región anticoagulante de la proteína derivan de proteínas diferentes, y en la que la región anticoagulante comprende la secuencia de un polipéptido anticoagulante seleccionado entre los grupos que consisten en:

- i) hirudina, inhibidor de la vía del factor tisular, péptido anticoagulante de la garrapata y un activador de la proteína C;
- ii) derivados y fragmentos funcionales de i) que retienen la actividad anticoagulante;
- iii) heparina y antitrombina;

- iv) derivados y fragmentos funcionales de iii) que retienen la actividad anticoagulante; y v) derivados anticoagulantes de la trombina. El tejido biológico puede ser así convertido *in vivo* o *ex vivo*. Por ejemplo, un órgano de un animal puede ser transfectado *in vivo* con un vector de acuerdo con la invención, o un órgano podría ser transfectado *ex vivo* antes del trasplante o *in vivo* después del trasplante.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se describe un método de trasplante que comprende el trasplante de un tejido biológico de acuerdo con la invención procedente de un animal donante en un animal receptor. Preferiblemente, el método es para xenotrasplantes y el tejido biológico del donante es xenogénico con respecto al animal receptor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra mapas de proteínas quiméricas hirudina-CD4 y construcciones de acuerdo con la invención. (A) Construcciones HLA-hirudina-CD4 con adaptadores de glicina. (B) Construcción HLA-hirudina-CD4 con el extremo C-terminal de la P-selectina humana, con la secuencia vectorizante específica subrayada. Están indicadas las regiones transmembranal (TM), de parada de la transferencia (ST) y citoplásmica (C) de CD4.

La **Figura 2** muestra los perfiles de FACS para las construcciones HLA-hirudina-CD4 expresadas en fibroblastos DAP.3.

La **Figura 3** muestra los perfiles de FACS para las construcciones de ADNc de HLA-hirudina-CD4-P-selectina expresadas en CHO-K1.

La **Figura 4** muestra que los fibroblastos que expresan hirudina-CD4 se unen a trombina.

La **Figura 5** muestra la especificidad de la unión de trombina a las células que expresan hirudina-CD4.

La **Figura 6** muestra que la trombina se une a células CHO-K1 transfectadas con construcciones HLA-hirudina.

La **Figura 7** muestra que la inactivación de trombina suprime la unión de trombina a hirudina-CD4 en la superficie celular. Células que expresaban hirudina-G2-CD4 fueron incubadas con trombina o con trombina inactivada y teñidas para determinar la unión de trombina con anticuerpos anti-protrombina o anti-trombina-hirudina.

La **Figura 8** muestra mapas de proteínas quiméricas TFPI-CD4 y construcciones de acuerdo con la invención.

La **Figura 9** muestra perfiles de citometría de flujo de células DAP.3 que expresan TFPI unido a la superficie celular.

La **Figura 10** muestra la unión específica de FXa a TFPI₁₋₂₇₆-CD4 y TFPI₁₋₁₈₃-CD4 unidas a la superficie celular.

La **Figura 11** muestra el bloqueo de la unión de FXa por una fracción de inmunoglobulina anti-TFPI polyclonal.

La **Figura 12** muestra el bloqueo de la unión de FXa por anticuerpos monoclonales dirigidos contra los Dominios Kunitz I y II.

La **Figura 13** muestra la inhibición de FXa por células que expresan TFPI₁₋₂₇₆-CD4 y TFPI₁₋₁₈₃-CD4. Se muestra el tiempo medio necesario para que un sustrato cromogénico específico de FXa alcance una DO₄₀₅=0,1 para células DAP.3 transfectadas incubadas con FXa. Los valores obtenidos para las células control fueron restados y las barras de error indican desviaciones estándar.

La **Figura 14** muestra que se requiere un complejo TFPI₁₋₂₁₉/FVIIa activo para obtener una unión máxima a las proteínas quiméricas TFPI-CD4.

La **Figura 15** muestra la especificidad de la unión de trombina a células endoteliales porcinas inmortalizadas (IPEC) que expresan hirudina-CD4, y muestra también el efecto de la expresión de hirudina-CD4 en la superficie celular sobre los tiempos de coagulación.

La **Figura 16** muestra la distribución de ACTH y de hirudina en células D16/16, según se reveló mediante fluorescencia.

La **Figura 17** muestra el cambio de la distribución celular de hirudina-CD4-P-selectina después de la estimulación con PMA.

La **Figura 18** muestra que TFPI-CD4 expresada en IPEC conserva sus propiedades de unión.

La **Figura 19** muestra la unión competitiva de factores tisulares porcinos y humanos.

La **Figura 20** muestra que TFPI-CD4 prolonga los tiempos de coagulación cuando se expresa en la superficie de IPEC.

La **Figura 21** muestra el efecto anticoagulante de la coexpresión de TFPI-CD4 e hirudina-CD4.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

1. Hirudina fusionada con un péptido señal de HLA de clase I y ligada a los Dominios 3 y 4 del CD4 humano está unida a la membrana celular

Con el fin de expresar construcciones de hirudina heterólogas en células de mamífero, el ADNc de la secuencia líder del péptido señal dirigido a la membrana procedente de A2.1 del HLA de clase I humano, aminoácidos -1 a -24 (Holmes, 1987), fue fusionado a la variante 1 de hirudina (Dodt, 1984) utilizando PCR con extensión solapante (Figura 1).

La secuencia líder de A2.1 del HLA fue amplificada utilizando los cebadores:

5'-cagtgtcgacggatccatggcgctcatggcgccccga-3' [hla-1] <SEC ID 1>
(que introduce sitios de restricción de *SalI* y *BamHI*) y:
5'-gtcagtgtaaacaaccgcccaggctctgggtcagg-3' <SEC ID 2>

La secuencia de hirudina fue amplificada utilizando los cebadores:

5'-accagacctggcggtgtttactactgactgcacc-3' y <SEC ID 3>
5'-gacgctgcagaattcttcaggtattctccgggatt-3' [hir-3] <SEC ID 4>

(que introduce sitios distales de *EcoRI* y *PstI*).

Los productos resultantes de la PCR (108 y 228 pb) fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa y utilizados posteriormente en una tercera PCR utilizando los cebadores flanqueantes hla-1 y hir-3. El producto resultante de la PCR (300 pb) fue digerido con *SalI* y *BamHI* y subclonado en pBluescript SK(+) (Stratagene).

Un anclaje que constaba de un ADNc que codificaba los Dominios 3 y 4 de CD4 (Maddon, 1985) junto con la secuencia de parada de translocación (ST), los dominios transmembranal y citoplásmico de CD4 (CD4₁₆₆₋₄₃₅), fue añadido al casete de HLA-hirudina.

Con el fin de asegurar que la hirudina permaneciera móvil y activa cuando estuviera unida por su extremo C-terminal al anclaje de CD4, se produjeron, sin embargo, 3 longitudes de adaptadores de glicina diferentes (denominadas G1 a G3 - Fig. 1A):

- para el adaptador de glicina 1 (G1; GGSGG), el par de oligonucleótidos constaba de 5'-aattaggaggttctggaggctgca-3' <SEC ID 5> (que contenía una secuencia de reconocimiento de *EcoRI* mutada y un sitio de *PstI*) y 5'-gcctccagaacctct-3' <SEC ID 6>;

- los adaptadores de glicina 2 (G2) y 3 (G3) constaban de la secuencia central (GGSGG) repetida dos o tres veces, respectivamente.

Estos adaptadores fueron introducidos en el extremo 3' del fragmento de HLA-hirudina.

Los oligonucleótidos adaptadores de glicina fueron hibridados y ligados cada uno de ellos en el sitio de *EcoRI/PstI* de plásmidos que contenían el casete de HLA-hirudina, antes de la inserción del anclaje de CD4.

CD4₁₆₆₋₄₃₅ fue amplificado utilizando los cebadores:

5'-tgtctgcaggaaccagaagaaggtggaattca-3' <SEC ID 7>
(que introduce sitios de *PstI* y *EcoRI*) y:
5'-gtgggatccgctggcctcgtgcctcaa-3' <SEC ID 8>
(que contiene un sitio de *BamHI* distal).

El producto resultante de la PCR fue clonado en pBluescript y secuenciado. En CD4₁₆₆₋₄₃₅, se encontró que V³²⁸ había mutado a A³²⁸. El fragmento de CD4 *PstI/BamHI* fue subclonado en los plásmidos HLA-hirudina-G1, -G2 y -G3, y estas construcciones fueron verificadas mediante análisis de la secuencia de ADN.

Cada una de las tres construcciones de ADNc fue subclonada en el sitio de *BamHI* del vector de expresión de mamífero pH β Actpr-1gpt (Gunning, 1987), que contenía el intensificador y la región promotora de la β -actina humana junto con un elemento intensificador de SV40 que dirigía el gen de resistencia a gpt, permitiendo la selección de los clones en presencia de ácido micofenólico (Figuras 1C y 1D). La orientación de las construcciones finales fue verificada mediante la creación de mapas con endonucleasas de restricción.

Los vectores que contenían las construcciones HLA-hirudina-G1/2/3-CD4 individuales fueron transfectadas en la línea celular de fibroblastos de ratón DAP.3 (Marguelies, 1983) con fosfato de calcio de acuerdo con protocolos estándar. Después de 18 horas de crecimiento en medio DMEM (Gibco) suplementado con un 5% de suero de ternera fetal, ampicilina, estreptomycin y glutamina, las células fueron tratadas con glicerol durante 30 segundos. Las células fueron posteriormente lavadas dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se añadió medio nuevo que incluía xantina, hipoxantina y ácido micofenólico a una concentración final de 12 μ g/ml.

Como control negativo, se utilizaron células DAP.3 transfectadas con una construcción de clase II humana que expresaba HLA-DR (línea celular 531) (Lechler, 1988) cultivadas en el mismo medio de cultivo que contenía ácido micofenólico.

Los clones supervivientes fueron analizados para determinar la expresión de hirudina y CD4 mediante FACS utilizando los anticuerpos monoclonales murinos 4158-81-7 (Schlaeppli, 1991) y OKT-4 (Reinherz, 1979), respectivamente. Se tiñeron 10⁵ células con los anticuerpos murinos durante 30 minutos sobre hielo y se añadió un anticuerpo policlonal anti-ratón producido en oveja conjugado a FITC como capa secundaria.

Según se muestra en la Figura 2, estas construcciones hirudina-CD4 se expresaban bien en la superficie celular de DAP.3. No se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre hirudina-CD4 con las tres longitudes diferentes de los adaptadores de glicina.

Por tanto, los polipéptidos anticoagulantes pueden ser expresados de manera estable en la superficie celular.

2. La hirudina-CD4 con una secuencia vectorizante procedente del extremo C de P-selectina se expresa en la superficie celular de CHO-K1

Además de las construcciones HLA-hirudina-G1/2/3-CD4, se sintetizaron dos construcciones más con secuencias vectorizantes derivadas de la P-selectina humana (Figura 1B). Se utilizó para estas construcciones la región transmembranal de CD4, mientras que la secuencia de parada de translocación y el extremo C fueron sustituidos por las secuencias correspondientes de P-selectina (Johnston, 1989).

Para fusionar los Dominios 3 y 4 de CD4 más la región transmembranal (CD4₁₆₆₋₃₉₅) con la secuencia de parada de translocación y las regiones citoplásmicas 1 y 2 de la P-selectina humana (P-sel₇₅₄₋₇₈₉) (McEver, 1989), se realizó una PCR con extensión solapante. Para la amplificación de la parte CD4 de la molécula, se utilizaron los cebadores:

5'-tgtctgcaggaaccagaagaaggtggaattca-3' [CD4-5] <SEC ID 7>

(que introduce sitios de restricción de *PstI* y *EcoRI*) y:

5'-gtctgaaacgcttctgaagaagatgcctagcccaatgaaagcaggaggccg-3' <SEC ID 9>

En paralelo, para amplificar la región C-terminal de P-selectina, se utilizaron los cebadores:

5'-tgggctagggcatcttctcagaaagcgtttcagacaaaaaga-3' y <SEC ID 10>

5'-gaccaggatccggacaggtctctta-3' [P-selN3] <SEC ID 11>

(que introduce un sitio de *BamHI* distal).

Después de la purificación de los productos resultantes de la PCR a partir de geles de agarosa, se llevó a cabo una tercera PCR utilizando los cebadores flanqueantes CD4-5 y P-selN3. El producto resultante de la PCR (832 pb) fue digerido con *PstI* y *BamHI*, subclonado en pBluescript y secuenciado. Posteriormente, el fragmento CD4-P-sel (CD4₁₆₆₋₃₉₅-P-sel₇₅₄₋₇₈₉) fue escindido con *PstI/BamHI* y subclonado en plásmidos que contenían HLA-hirudina-G1 o -G2.

Las construcciones HLA-hirudina-G1/G2-CD4-P-selectina finales fueron subclonadas en el sitio de *BamHI* de pH β Actpr-1gtp y transfectadas en células CHO-K1 (ATCC CCL61), que fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con un 5% de suero de ternera fetal, ampicilina, estreptomycin y glutamina.

La transfección se realizó mediante electroporación de acuerdo con protocolos estándar. Brevemente, 5×10^6 células fueron resuspendidas en 350 μ l de medio sin suero y transferidas a una cubeta de electroporación de 1 ml con un espacio de 0,4 cm entre los electrodos (Bio-Rad). Después de la adición de 10 μ g de ADN plasmídico en 150 μ l, las muestras fueron agitadas suavemente y mantenidas sobre hielo. Las células fueron sometidas a electroporación a resistencia infinita, 960 μ F y 350 V en un aparato Gene Pulser (Bio-Rad). El día después de la electroporación, las células fueron lavadas dos veces con PBS y se añadió medio nuevo que incluía ácido micofenólico, xantina e hipoxantina.

Se ha demostrado recientemente que cuando las células CHO-K1 eran transfectadas con ADNc de P-selectina, la proteína P-selectina no se acumulaba intracelularmente, sino que era expresada en la superficie celular (Disdier, 1992). En los transfectantes CHO-K1 producidos anteriormente, hirudina-G1-CD4-P-selectina e hirudina-G2-CD4-P-selectina se expresaban ambas en la superficie según se estimó mediante tinción con los monoclonales OKT-4 y 4158-81-7 (Figura 3). El control negativo utilizado fue una línea celular CHO-K1 que expresaba TFPI fusionado a los Dominios 3 y 4 de CD4 (TFPI-CD4₁₆₆₋₄₃₅), cultivada en el mismo medio que contenía ácido micofenólico.

Como control positivo, células CHO-K1 fueron transfectadas con P-selectina humana de longitud completa (Johnston, 1989), que fue subclonada como un fragmento de *SalI* de 3142 pb en pH β Actpr-1neo que contenía un gen de resistencia a neomicina (G418) dirigido por SV40. Estas células fueron tratadas con 400 μ g/ml de G418 y después de 2 semanas los clones individuales fueron recogidos con bastoncillos de algodón y transferidos a placas de 12 pocillos. Los clones supervivientes fueron analizados para determinar la expresión de hirudina y CD4 utilizando 4158-81-7 a 10 μ g/ml y un sobrenadante sin diluir de hibridomas OKT-4.

La P-selectina humana fue detectada por el mAb anti-CD62 (Becton Dickinson), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se observó un perfil de FACS similar al obtenido con hirudina-CD4-P-selectina para estas células marcadas con CD62 (Figura 3E), confirmando que las células CHO-K1 expresan P-selectina en la membrana plasmática.

Por tanto, las proteínas quiméricas que contienen la secuencia vectorizante de P-selectina permanecen funcionales cuando se expresan en la superficie celular.

3. La hirudina anclada a la superficie celular se une a trombina según se detectó con anticuerpos específicos

Con el fin de analizar si la hirudina unida de esta forma a la superficie celular conservaba su actividad de unión a trombina, se utilizó el siguiente ensayo de unión.

Células transfectadas de manera estable fueron cultivadas en frascos de cultivo T75 durante 36 horas antes de cada experimento. Las células DAP.3 fueron despegadas utilizando una rasqueta de células, mientras que las células CHO-K1 fueron despegadas del plástico mediante tratamiento con PBS, EDTA 5 mM durante 10 minutos a 37°C. Después de 4 lavados con PBS que contenía un 0,1% de BSA (p/v), $2,5 \times 10^5$ células en 150 μ l fueron incubadas durante 1 hora a 37°C con concentraciones crecientes de trombina. Las células fueron lavadas cuatro veces con PBS que contenía un 0,1% de BSA e incubadas posteriormente durante 30 minutos sobre hielo con inmunoglobulinas anti-protrombina humana de conejo (10 μ g/ml en 100 μ l) (Dakopatts). Después de dos lavados más, las células fueron incubadas durante 30 minutos con inmunoglobulinas anti-conejo producidas en cerdo conjugadas a FITC (Dakopatts). Finalmente, los transfectantes fueron lavados tres veces y analizados mediante citometría de flujo.

Según se muestra en la Figura 4, la hirudina expresada en la superficie celular conserva la capacidad para unirse a trombina y la longitud del adaptador de glicina no influía sobre la unión a trombina.

Con el fin de determinar la cantidad de trombina necesaria para saturar las células que expresan hirudina-CD4, dos clones fueron incubados con trombina hasta 82 U/ml. Cuando se analizó el porcentaje de células positivas, los transfectantes se saturaban a 41 U/ml de trombina (Figura 4C). Sin embargo, según las intensidades de fluorescencia medias (mfi), las células no estaban saturadas ni siquiera a 82 U/ml (Figura 4D). A estas elevadas concentraciones experimentales de trombina, la unión de fondo a las células control que expresaban HLA-DR aumentaba significativamente.

Con el fin de elucidar la especificidad de la unión de trombina a hirudina-CD4, se llevaron a cabo posteriormente experimentos de bloqueo. Los transfectantes DAP.3 HLA-hirudina-G3-CD4 fueron preincubados sobre hielo durante 30 minutos con 10 μ g/ml de mAb anti-hirudina o de controles apropiados (IgG1 e IgG2a de ratón, Dakopatts) durante 30 minutos sobre hielo, y lavados dos veces en PBS que contenía un 0,1% de BSA antes de incubar con trombina durante 1 hora a 37°C igual que anteriormente. La unión de trombina fue analizada igual que anteriormente.

La preincubación con 4158-81-7 inhibía la unión específica de trombina a hirudina-CD4 (Figura 5A). La unión de trombina a hirudina-CD4 fue demostrada mediante incubación con trombina y comparación del marcaje con el mAb 4107-76-1 (Schlaeppi, 1991) y con inmunoglobulinas anti-protrombina. El 4107-76-1 está dirigido contra el complejo hirudina-trombina y no detecta hirudina sin trombina ni trombina unida a los receptores de trombina endógenos. Según se muestra en la Figura 5B, la unión de trombina detectada con 4107-76-1 era similar a la unión observada con la fracción de inmunoglobulina anti-protrombina.

Por tanto, la hirudina expresada en la superficie de células DAP.3 conserva la capacidad de unión específica a trombina.

Células epiteliales porcinas immortalizadas (IPEC) fueron transfectadas con hirudina-CD4 de la misma manera. Según se muestra en la Figura 15A, solamente las células transfectadas se unían a trombina, y esta unión era bloqueada por 4158-81-7 de manera dependiente de la dosis (Figura 15B). Se utilizó un sistema de ensayo de recalcificación de plasma humano para una investigación adicional del efecto funcional de la expresión de hirudina unida a la superficie en IPEC. Según se muestra en la Figura 15C, IPEC no transfectadas acortaban el tiempo de coagulación del plasma recalcificado hasta 170 segundos aproximadamente, en comparación con un tiempo de coagulación control de 370 segundos en ausencia de células. La preincubación con IL-1, que induce la expresión de TF, reducía además el tiempo de coagulación hasta menos de 100 segundos. En contraste, los tiempos de coagulación para las IPEC transfectadas eran prolongados incluso después de preincubación con IL-1 que inducía la expresión de TF. La incubación con 4158-81-7 reducía el efecto anticoagulante de manera dependiente de la dosis, indicando que el efecto era debido a la presencia de hirudina en la superficie celular (Figura 15D).

La hirudina expresada en la superficie de IPEC se une por tanto a la trombina e inhibe también la coagulación del plasma humano.

4. La hirudina-CD4-P-selectina expresada por células CHO-K1 se une a trombina

Para investigar si la hirudina-CD4-P-selectina se une también a trombina cuando es expresada en la superficie de células CHO-K1, estas células fueron incubadas con trombina durante 1 hora a 37°C. Después de teñir con inmunoglobulinas anti-protrombina y de añadir una segunda capa de anticuerpos marcados con FITC, las células fueron analizadas mediante citometría de flujo.

Se detectó un perfil de unión distinto, según se muestra en la Figura 6A. Con las inmunoglobulinas anti-protrombina, la unión de fondo de la trombina a células CHO-K1 que expresaban una proteína irrelevante unida a CD4, fue detectable después de la incubación con concentraciones de trombina bastante bajas. Sin embargo, la unión específica de trombina a hirudina fue verificada mediante la tinción con el mAb 4107-76-1 específico anti-hirudina/trombina (Figura 6B). Con este anticuerpo, la unión de fondo a las células CHO-K1 control era indetectable. Es también evidente a partir de la Figura 6 que los clones que expresaban hirudina parecían unirse a la trombina de manera no específica en un grado diferente, implicando que tenían niveles de expresión diferentes de receptores de trombina endógenos. Esta variación de la unión no específica fue confirmada con otros varios clones.

Para comparación, los resultados procedentes de dos transfectantes CHO-K1 que expresaban hirudina-G1-CD4 e hirudina-G2-CD4 (esto es, sin la secuencia de P-selectina) están mostrados en las Figuras 6C y 6D. Excepto por una unión de trombina ligeramente incrementada debida a proteínas quiméricas mejor expresadas (mfs mayores), no se detectaron diferencias importantes en los perfiles de unión en comparación con los transfectantes que expresaban hirudina unida al anclaje CD4-P-selectina.

5. La hirudina-CD4-P-selectina es almacenada en gránulos secretores y puede liberada tras activación

Para examinar la acumulación intracelular de hirudina y su ruta desde los gránulos secretores hasta la superficie celular, una línea celular de pituitaria murina secretora (D16/16) fue transfectada de manera transitoria con ADNc que codificaba hirudina-CD4-P-selectina o hirudina-CD4. Esta línea celular fue elegida por dos razones. En primer lugar, se sabe que estas células expresan ACTH en gránulos de almacenamiento específicos que se descargan en la superficie celular tras la activación con ésteres de forbol. En segundo lugar, las células endoteliales (que parecerían ser el tipo celular ideal para investigar la vectorización intracelular de la construcción de P-selectina) pierden rápidamente sus gránulos de almacenamiento de Weibel-Palade durante el cultivo *in vitro*.

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células D16/16 fueron teñidas con anticuerpos contra hirudina y ACTH. En las células transfectadas con hirudina-CD4-P-selectina, la hirudina fue detectada en gránulos distribuidos uniformemente en el citoplasma (Figura 16A). Se observó el mismo patrón de distribución de los gránulos con una tinción específica de ACTH, implicando la colocalización con hirudina (Figura 16B). Esto fue verificado cuando ambos anticuerpos fueron utilizados para la tinción (Figura 16C).

En contraste, las células D16/16 transfectadas con hirudina-CD4 no acumulaban hirudina en gránulos intracelulares, sino que expresaban niveles elevados de hirudina en la superficie celular (Figura 16D). La doble tinción (Figura 16F) reveló únicamente una ligera colocalización de hirudina y ACTH.

Las células que expresaban hirudina-CD4-P-selectina fueron activadas con el éster de forbol PMA y fueron analizadas mediante citometría de flujo. El 4158-81-7 no detectó hirudina en la superficie celular de las células no estimuladas (Figura 17A). Sin embargo, después de 30 minutos de estimulación con PMA, se detectó hirudina en la superficie celular (Figura 17B). Además, las células D16/16 activadas se unían específicamente a trombina, a diferencia de las células no activadas (Figura 17C - teñidas con 4107-76-1).

Por tanto, mediante la utilización de la línea celular de pituitaria D16/16 que contiene gránulos, se demostró claramente que la hirudina-CD4-P-selectina puede ser vectorizada hacia gránulos de almacenamiento intracelulares específicos, y que moléculas quiméricas funcionales pueden ser liberadas y expuestas en la superficie celular después de la activación.

6. La interacción entre trombina e hirudina-CD4 es suprimida cuando el sitio catalítico de la trombina es inactivado

La unión específica de trombina a hirudina-CD4 con y sin la secuencia vectorizante de P-selectina estaba clara (Figuras 4 y 6). Para potenciar adicionalmente la especificidad de la interacción trombina-hirudina, se preincubó trombina (210 nmoles en 50 µl de solución salina tamponada con Tris (TBS), BSA 0,1%, pH 7,4) durante 1 hora a 37°C con:

- hirudina nativa de longitud completa (Biopharm) en un exceso molar de 10 veces;
- diclorhidrato de D-Pre-Pro-Arg clorometil cetona ("PPACK-HCl") (Calbiochem) en un exceso molar de 100 veces o con
- un análogo sintético del dodecapéptido C-terminal de hirudina que comprende los residuos de hirudina 53-64, con sulfato-Tyr64 (American Diagnostica) en un exceso molar de 100 veces.

La actividad catalítica dependiente de trombina fue analizada con un sustrato que era un oligopéptido cromogénico pequeño (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA·2HCl ("S-2238") (Quadratech).

Con el fin de determinar si la trombina era inactivada por PPACK-HCl e hirudina, 5 µl de cada mezcla de reacción fueron diluidos con 95 ml de TBS, BSA 0,1%, e incubados con 50 µl de S-2238 4 mM durante 10 minutos a 37°C.

Según se esperaba, no se observó conversión cromogénica con la trombina incubada con PPACK-HCl o con hirudina en comparación con la trombina incubada sin inhibidor, mientras que el dodecapéptido no influía sobre la actividad catalítica dependiente de trombina según se midió por el corte de S-2238.

Las tres preparaciones diferentes fueron añadidas a transfectantes que expresaban hirudina unida a la superficie celular. Utilizando el procedimiento anteriormente descrito, se investigó la unión de trombina con los anticuerpos anti-protrombina o anti-hirudina-trombina. Como puede observarse en la Figura 7A, la trombina inactivada con hirudina o con PPACK-HCl no se unía con la hirudina expresada en la superficie celular de DAP.3. Además, se observó únicamente una unión parcial del complejo trombina-dodecapéptido. En contraste con los transfectantes DAP.3, las células CHO-K1 presentaban una unión trombina-PPACK-HCl relativamente elevada (Figura 7B). Se encontró que esta interacción era inespecífica según fue ilustrado con el mAb anti-hirudina-trombina 4107-76-1. No se detectó unión específica trombina-PPACK-HCl-hirudina.

Esto confirma que la hirudina unida a la superficie celular se une específicamente y potentemente a la trombina en su sitio catalítico.

7. El TFPI de longitud completa y truncado unido a dominios de CD4 es expresado en la superficie celular

Con el fin de unir el TFPI a la membrana celular, se sintetizó una proteína de fusión que constaba de CD4₁₆₆₋₄₃₅ humano unido a TFPI de longitud completa que incluía los tres Dominios Kunitz (TFPI₁₋₂₇₆) o bien a una forma truncada de TFPI que carecía del Dominio Kunitz III y del extremo C (TFPI₁₋₁₈₃) (Wun, 1988) (Figura 8). Éstas fueron sintetizadas de manera similar a la descrita anteriormente para hirudina, fusionándose las secuencias de TFPI y CD4 mediante la utilización de una estrategia de clonaje con casetes, pero a diferencia de la hirudina, TFPI es una proteína de mamífero y por tanto contiene un péptido señal endógeno.

El ADN que codifica la porción N-terminal de TFPI que incluye los Dominios Kunitz I y II (675 pb) fue amplificado utilizando los cebadores:

5'-catgctgcagcgatcctagatgattacacaatgaagaaagtacatgcactttgggc-3' <SEC ID 12>
(que introduce sitios de restricción de *SalI* y *BamHI*); y

5'-ggacctgcagaattcaaaaaggctgg-3' <SEC ID 13>
(que contiene sitios de *EcoRI* y *PstI*).

El ADN que codifica el tercer Dominio Kunitz junto con el extremo C-terminal de TFPI (315 pb) fue amplificado utilizando los cebadores:

5'-agccttttgaattccacgggtccctcat-3' <SEC ID 14>

(con un sitio de *EcoRI*); y

5'-cattgctataacaactgcagatattttaac-3' <SEC ID 15>

(que contiene un sitio de *PstI*).

El CD4₁₆₆₋₄₃₅ fue amplificado según se describió anteriormente.

Mediante la introducción de sitios de restricción en el extremo 3' del ADNc de TFPI₁₋₁₈₃ y en el extremo 5' del ADNc de TFPI₁₈₄₋₂₇₆, H¹⁸⁴ y G¹⁸⁵ mutaron a C¹⁸⁴ y R¹⁸⁵ en las proteínas de fusión recombinantes (Figura 8). Además, P¹⁸⁶ mutó a S¹⁸⁶. El codón de parada de TFPI fue eliminado mediante la introducción de un sitio de *PstI*, mutando de este modo M²⁷⁶ a I²⁷⁶, y la adición del aminoácido C²⁷⁷. En el transcurso de la introducción de un sitio de *PstI* en el extremo N-terminal del Dominio 3 de CD4, L¹⁶⁴ y Q¹⁶⁵ fueron mutados a C¹⁶⁴ y R¹⁶⁵, respectivamente. En el ADNc de TFPI₁₈₄₋₂₇₆, se encontró que K²⁶⁵ había mutado a E²⁶⁵ y en CD4₁₆₆₋₄₃₅ V³²⁸ había mutado a A³²⁸ (según se describió anteriormente).

Todos los productos de la PCR fueron clonados en pBluescript SK(+).

Los ADNcs de TFPI-CD4 completos fueron ligados en el sitio de *BamHI* del vector de expresión pHβActpr-1gpt.

Igual que anteriormente, células DAP.3, mantenidas en DMEM suplementado, fueron transfectadas con fosfato de calcio igual que anteriormente. Los clones fueron analizados para determinar la expresión de TFPI y CD4 mediante FACS utilizando los mAbs murinos anti-TFPI humano 4903 ó 4904 (American Diagnostica), ambos a 10 µg/ml, y un sobrenadante sin diluir del hibridoma OKT-4 (Reinherz, 1979). El 4903 está dirigido contra el Dominio Kunitz I, mientras que el 4904 está dirigido contra el Dominio Kunitz II. Se analizaron 10⁵ células para cada muestra y, igual que anteriormente, se utilizó como control la línea celular 531.

Según se muestra en la Figura 9, TFPI₁₋₂₇₆-CD4 y TFPI₁₋₁₈₃-CD4 pueden ser expresadas ambas en la superficie celular.

8. TFPI₁₋₁₈₃-CD4 y TFPI₁₋₂₇₆-CD4 unidas a la superficie celular confieren la unión a FXa

Para analizar si TFPI unido de esta forma a la superficie celular conserva su actividad de unión a FXa, se utilizó el ensayo de unión siguiente.

Células DAP.3 transfectadas de manera estable fueron despegadas mediante tratamiento con PBS, EDTA 5 mM durante 10 minutos a 37°C. Después de 4 lavados con un exceso de PBS, BSA 0,1% (p/v), 2,5x10⁵ células en 100 µl fueron incubadas durante 1 hora a 37°C con concentraciones crecientes de FXa.

Las células fueron posteriormente lavadas dos veces e incubadas adicionalmente durante 30 minutos sobre hielo con 10 µg/ml de inmunoglobulinas anti-FXa humano de conejo (RAFX-IG, Enzyme Research Laboratories) en 100 µl. Después de dos lavados adicionales, las células fueron incubadas durante 30 minutos con inmunoglobulinas policlonales anti-conejo producidas en cerdo conjugadas a FITC y analizadas mediante citometría de flujo.

Según se muestra en la Figura 10, las células DAP.3 que expresan TFPI₁₋₂₇₆-CD4 y TFPI₁₋₁₈₃-CD4 en la superficie celular se unen potentemente a FXa de manera dependiente de la dosis (Figura 10), detectándose unión significativa a 0,02 nM. No se detectó diferencia en la unión de FXa entre la TFPI-CD4 de longitud completa y la trunca.

Fue también posible bloquear la unión de FXa con una fracción de inmunoglobulina anti-TFPI policlonal (4901) o con los monoclonales 4903 y 4904.

Las células fueron incubadas sobre hielo durante 30 minutos con 4901, 4903 ó 4904 a concentraciones crecientes, utilizando como control negativo un antisuero anti-hemoglobina (Dakopatts). Las células fueron lavadas posteriormente dos veces en PBS, BSA 0,1%, e incubadas adicionalmente con FXa 5 nM durante una hora a 37°C. Las células fueron luego lavadas e incubadas con RAFX-IG igual que anteriormente y analizadas para determinar la unión de FXa mediante FACS.

La unión de FXa a TFPI₁₋₂₇₆-CD4 disminuyó un 27% y un 55% a 10 y 80 µg/ml del policlonal 4901, respectivamente, en comparación con las células incubadas con el policlonal control anti-hemoglobina irrelevante (Figura 11A). Se encontró también una unión de FXa disminuida en las células TFPI₁₋₁₈₃-CD4 preincubadas con 4901 (Figura 11B).

Cuando se bloqueó TFPI₁₋₂₇₆-CD4 con 4903 o con 4904, se observó un 33% menos de unión de FXa a 40 µg/ml del mAb, en comparación con inmunoglobulinas de ratón del mismo isotipo (Fig. 12). No se detectó diferencia significativa entre la actividad bloqueante de los mAbs 4903 y 4904.

5 Esto demuestra por primera vez que TFPI conserva su actividad de unión a FXa cuando es expresado como una proteína de fusión unida a la membrana.

9. TFPI₁₋₁₈₃-CD4 y TFPI₁₋₂₇₆-CD4 son ambas funcionalmente activas frente a FXa

10 Con el fin de determinar si TFPI unido a la superficie celular conservaba su capacidad para inhibir la función de FXa, la actividad proteolítica de FXa fue analizada utilizando el sustrato cromogénico N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl ("S-2765") (Quadrach).

15 Las células DAP.3 transfectadas fueron despegadas según se describió anteriormente y lavadas 4 veces con un exceso de TBS, pH 7,4, BSA 0,1%. Se incubaron 0,5x10⁵ células (en 100 µl) por pocillo durante 1 hora a 37°C con varias concentraciones de FXa. Se añadieron 50 µl de S-2765 4 mM y las células fueron incubadas adicionalmente durante 2 horas a 37°C. Se midió la DO₄₀₅ cada 30 segundos y se determinó el tiempo requerido para alcanzar una DO₄₀₅=0,1, que mostraba el FXa activo restante.

20 La actividad FXa fue inhibida por la TFPI-CD4 expresada de una manera dependiente de la dosis, observándose la máxima inhibición cuando se añadieron concentraciones bajas de FXa (0,16 nM) (Figura 13). En una serie de experimentos, no se observó diferencia significativa en la inhibición de FXa entre las células que expresaban TFPI₁₋₁₈₃-CD4 o TFPI₁₋₂₇₆-CD4.

25 Por tanto, el Dominio Kunitz II conserva su función cuando está unido a la superficie celular en TFPI₁₋₁₈₃-CD4 y en TFPI₁₋₂₇₆-CD4.

10. El complejo TF₁₋₂₁₉/FVIIa se une independientemente de la presencia del tercer Dominio Kunitz

30 La unión del factor tisular y el factor VIIa puede ser utilizada para confirmar si el Dominio Kunitz I conserva también su función.

35 El TF₁₋₂₉₁ y el FVIIa humanos recombinantes fueron producidos en *E. coli* y CHO-K1, respectivamente (O'Brien, 1994). Éstos fueron mezclados en concentraciones equimolares e incubados a 25°C durante 15 minutos para obtener un complejo TF₁₋₂₁₉/FVIIa.

Se produjeron inmunoglobulinas policlonales de conejo contra el TF humano de acuerdo con métodos estándar.

40 Células DAP.3 que expresaban TFPI₁₋₂₇₆-CD4 o TFPI₁₋₁₈₃-CD4 fueron incubadas con FXa 5 nM durante 1 hora a 37°C. Las células fueron lavadas dos veces y se añadió el complejo TF₁₋₂₁₉/FVIIa a 2,5x10⁵ células en 100 µl. Después de 1 hora a 37°C, los transfectantes fueron lavados dos veces e incubados con 50 µl de inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-TF (2,5 µg/ml) durante 30 minutos sobre hielo seguido por 2 lavados, y una incubación posterior con inmunoglobulinas anti-conejo producidas en cerdo conjugadas a FITC. Las células positivas fueron analizadas mediante citometría de flujo.

El TF₁₋₂₁₉/FVIIa se unía con la misma eficacia a TFPI₁₋₂₇₆-CD4 (Fig. 14A) y a TFPI₁₋₁₈₃-CD4 (Fig. 14B), mientras que no se detectó en absoluto unión a la línea celular control 531.

50 Con el fin de confirmar la unión específica al Dominio Kunitz I del complejo TF₁₋₂₁₉/FVIIa, el FVIIa fue inactivado mediante preincubación con diclorhidrato de 1,5-dansil-Glu-Gly-Arg-clorometil cetona ("1,5-DNS-GGACK·HCl"). Éste se une al sitio activo de FVIIa e inhibe la unión a TFPI, mientras que no afecta a la formación del complejo TF₁₋₂₁₉/FVIIa (Bajaj, 1992).

55 El FVIIa fue incubado primeramente con un exceso de 100 veces molar de 1,5-DNS-GGACK·HCl durante 18 horas a 20°C y repurificado mediante cromatografía de intercambio iónico. El FVIIa con el sitio activo inhibido (FVIIai) fue incubado con una concentración equimolar de TF₁₋₂₁₉ a 25°C durante 15 minutos y añadido posteriormente a 2,5x10⁵ células en 100 µl. Las etapas siguientes fueron como las descritas anteriormente.

60 Como puede observarse en la Figura 14, significativamente menos complejo TF₁₋₂₁₉/FVIIai se unía a las células que expresaban TFPI-CD4, en comparación con el TF₁₋₂₁₉/FVIIa "activo" unido. No se observó diferencia entre las células DAP.3 transfectadas con TFPI₁₋₂₇₆-CD4 o con TFPI₁₋₁₈₃-CD4.

65 Por tanto, el Dominio Kunitz I conserva también su función cuando está unido a la superficie celular en TFPI₁₋₁₈₃-CD4 y en TFPI₁₋₂₇₆-CD4. Es por tanto obvio que el TFPI unido a la superficie celular es funcionalmente activo en su totalidad.

11. TFPI-CD4 expresada en IPEC se une a factores de coagulación humanos relevantes y al TF porcino

Según se muestra en la Figura 18, la proteína de fusión TFPI-CD4 puede ser expresada en IPEC y conserva la capacidad para unirse a FXa y FVIIa. Con el fin de demostrar que el TFPI puede interaccionar físicamente con el TF porcino, se siguió un procedimiento de inhibición competitiva utilizando TF humano soluble. Según se muestra en la Figura 19A, en presencia de concentraciones saturantes de FXa y FVIIa, la unión del TF humano soluble a IPEC transfectadas con TFPI (pretratadas con IL-1 α) estaba reducida significativamente en comparación con la unión a los transfectantes control negativos para TF (no activados con IL-1 α). Esto sugiere que el TF porcino estaba compitiendo con el TF humano soluble por el VIIa, y por tanto por la unión a TFPI. La Figura 19B apoya esto, mostrando que la unión del TF humano soluble a IPEC transfectadas con TFPI-CD4 (preactivadas con IL-1 α) se incrementaba si los transfectantes eran incubados con concentraciones crecientes de anticuerpo contra el TF porcino. El efecto de este anticuerpo podría reflejar la inhibición de la interacción entre el TF porcino y el FVIIa, o entre los complejos TF porcino-VIIa y TFPI-CD4. De cualquier forma, los resultados sugieren que la proteína de fusión TFPI-CD4 expresada en la superficie de IPEC interacciona físicamente con el complejo TF porcino-FVIIa.

12. La TFPI-CD4 expresada en IPEC inhibe la producción de fibrina dependiente de TF

La Figura 20A muestra los resultados de un único experimento representativo para ilustrar el fenotipo procoagulante de IPEC transfectadas con TFPI-CD4. La presencia de la proteína de fusión en las células transfectadas prolongaba consistentemente los tiempos de coagulación en comparación con IPEC control. Sin embargo, este efecto fue observado únicamente después de activación con IL-1 α - la expresión de TFPI-CD4 no tenía influencia sobre los tiempos de coagulación cuando se utilizaron IPEC negativas para TF. Por tanto, la proteína de fusión TFPI-CD4, según se esperaba, inhibía la producción de fibrina dependiente de TF, pero no la producción de fibrina independiente de TF. Un anticuerpo anti-TFPI, utilizado en concentraciones crecientes durante una etapa de preincubación, era capaz de normalizar los tiempos de coagulación volviendo a los valores anteriores observados con IPEC control no transfectadas activadas con IL-1 α (Figura 20B), indicando que la prolongación de los tiempos de coagulación en presencia de las células transfectadas era debida en su totalidad a la acción inhibitoria específica del TFPI.

13. Expresión de un activador de la proteína C en la membrana celular

Para expresar las construcciones heterólogas que contenían el activador de la proteína C aislado del veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix* (McMullen, 1989; Kisiel, 1987), se sintetizó un ADNc que codificaba la proteína. La secuencia de la proteína es la <SEC ID 16>:

```
VIGGDECNINEHRFLALVYANGSLCG
GTLINQEWVLTARHCDRGNMRIYLG
HNLKVLNKDALRRFPKEKYFCLNTRN
DTIWDKDIMLIRLNRPVRNSAHIAPI
SLPSNPPSVGSGVCRIMGWGTITSPNA
TLPDVPHCANINILDYAVCQAAYKGL
AATTLCAGILEGGKDTCKGDSGGPLI
CNGQFQGILSVGGNPCAQPRKPGIYT
KVFDYTDWIQSIISGNTDATCPP
```

De acuerdo con la predisposición para la utilización de codones porcinos (que es aplicable a la mayoría, si no a todas, las células de mamífero), se sintetizó el ADN de hebra sencilla siguiente <SEC ID 17>:

```
GTG ATC GGC GGC GAC GAG TGC AAC ATC AAC GAG CAC CGC
TTC CTG GCC CTG GTG TAC GCC AAC GGC AGC CTG TGC GGC
GGC ACC CTG ATC AAC CAG GAG TGG GTG CTG ACC GCC CGC
CAC TGC GAC CGC GGC AAC ATG CGC ATC TAC CTG GGC ATG
CAC AAC CTG AAG GTG CTG AAC AAG GAC GCC CTG CGC CGC
TTC CCC AAG GAG AAG TAC TTC TGC CTG AAC ACC CGC AAC
GAC ACC ATC TGG GAC AAG GAC ATC ATG CTG ATC CGC CTG
AAC CGC CCC GTG CGC AAC AGC GCC CAC ATC GCC CCC CTG
AGC CTG CCC AGC AAC CCC CCC AGC GTG GGC AGC GTG TGC
CGC ATC ATG GGC TGG GGC ACC ATC ACC AGC CCC AAC GCC
ACC CTG CCC GAC GTG CCC CAC TGC GCC AAC ATC AAC ATC
CTG GAC TAC GCC GTG TGC CAG GCC GCC TAC AAG GGC CTG
GCC GCC ACC ACC CTG TGC GCC GGC ATC CTG GAG GGC GGC
AAG GAC ACC TGC AAG GGC GAC AGC GGC GGC CCC CTG ATC
TGC AAC GGC CAG TTC CAG GGC ATC CTG AGC GTG GGC GGC
AAC CCC TGC GCC CAG CCC CGC AAG CCC GGC ATC TAC ACC
AAG GTG TTC GAC TAC ACC GAC TGG ATC CAG AGC ATC ATC
AGC GGC AAC ACC GAC GCC ACC TGC CCC CCC
```


Este ADN de hebra sencilla fue hibridado a oligonucleótidos complementarios para dar lugar a una molécula de doble hebra. Están incluidos sitios de restricción en cada extremo del ADN de doble hebra, a los cuales se liga un anclaje de CD4 y una secuencia señal de P-selectina de manera similar a la descrita anteriormente. La molécula resultante fue ligada, igual que anteriormente, en el vector pH β Actpr-1gpt.

Como fuente de ADN alternativa, podría someterse a selección una biblioteca de ADNc de serpiente sobre la base de la secuencia de proteínas conocida.

14. La coexpresión de TFPI-CD4 e hirudina-CD5 produce la inhibición de la coagulación dependiente de TF e independiente de TF

Se generaron transfectantes estables que expresaban TFPI-CD4 e hirudina-CD4. Según se muestra en la Figura 21A, los transfectantes primarios expresaban niveles variables de hirudina y niveles bajos de TFPI. Sin embargo, a pesar de esta modesta expresión por la mayoría de los transfectantes, el fenotipo procoagulante de estas células estaba significativamente reducido en comparación con los controles (Figura 21B). La presencia en la superficie celular de ambas moléculas anticoagulantes en IPEC activadas con IL-1 α prolongaba notablemente el tiempo necesario para coagular el plasma hasta 300 segundos aproximadamente, que se aproxima al tiempo que tarda el plasma humano recalcificado en coagular espontáneamente. Estudios de bloqueo con anticuerpos anti-hirudina y anti-TFPI confirmaron que el fenotipo alterado de estos transfectantes dobles era debido a la inhibición específica de la coagulación por la hirudina y el TFPI expresados.

Se entenderá que la presente invención se describe únicamente a modo de ejemplo y que pueden realizarse modificaciones siempre y cuando permanezcan dentro del alcance de la invención según se define en las reivindicaciones.

REFERENCIAS

- Bach, F.H., Winkler, H., Ferran, C., Hancock, W.W., Robson, S.C. Delayed xenograft rejection. *Immunology Today* 1996; 17(8): 379-384.
- Bajaj, S.P., Sabharwal, A.K., Gorka, J., Birktoft, J.J. Antibody-probed conformational transitions in the protease domain of human factor IX upon calcium binding and zymogen activation: putative high-affinity Ca²⁺-binding site in the protease domain. *PNAS USA* 1992; 89: 152-156.
- Bradley, A., Liu, P. Target practice in transgenics. *Nature Genet.* 1996; 14: 121-123.
- Clarke, A.R. The adenovirus and the egg: a new approach to transgenesis. *Nature Biotech.* 1996; 14: 942.
- Dang, Q.D., Guinto, E.R., Di Cera, E. Rational engineering of activity and specificity in a serine protease. *Nature Biotech.* 1997; 15: 146-149.
- Diamond, L.E., McCurry, K.R., Oldham, E.R., Tone, M., Waldmann, H., Platt, J.L., Logan, J.S. Human CD59 expressed in transgenic mouse hearts inhibits the activation of complement. *Transplant Immunol.* 1995; 3: 305-312.
- Disdier, M., Morrissey, J.H., Fugate, R.D., Bainton, D.F., McEver, R.P. Cytoplasmic domain of P-selectin (CD62) contains the signal for sorting into the regulated secretory pathway. *Molec. Biol. Cell.* 1992; 3: 309-321.
- Dodt, J., Kohler, S., Baici, A. Interaction of site specific hirudin variants with alpha-thrombin. *FEBS Lett.* 1988; 229: 87-90.
- Green, S.A., Setiadi, H., McEver, R.P., Kelly, R.B. The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. *J. Cell. Biol.* 1994; 124: 435-448.
- Gunning, P., Leavitt, J., Muscat, G., Ng, S.Y., Kedes, L. A human beta-actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. *PNAS USA* 1987; 84: 4831-5.
- Hamamoto, T., Yamamoto, M., Nordfang, O., Petersen, J.G.L., Foster, D.C., Kisiel, W. Inhibitory properties of full-length and truncated recombinant TFPI variants expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 13344-13351.
- Heckl-Östreicher, B., Binder, R., Kirschfink, M. Functional activity of the membrane-associated complement inhibitor CD59 in a pig-to-human *in vitro* model for hyperacute xenograft rejection. *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 102: 589-595.
- Holmes, N., Ennis, P., Wan, A.M., Denney, D.W., Parham, P. Multiple genetic mechanisms have contributed to the generation of the HLA-A2/A28 family of class I MHC molecules. *J. Immunol.* 1987; 139: 936-41.
- Johnston, G.I., Cook, R.G., McEver, R.P. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell.* 1989; 56: 1033-44.
- Kiely, J.-M., Cybulsky, M.I., Luscinskas, F.W., Gimborne, M.A. Immunoselective targeting of an anti-thrombin agent to the surface of cytokine-activated vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15: 1211-1218.
- Kisiel, E., Kondo, S., Smith, K.J., McMullen, B.A., Smith, L.F. Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix venom*. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 12607-13.
- Knapp, A., Degenhardt, T., Dodt, J. Hirudinsins. *J. Biol. Chem.* 1992; 34: 24230-24234.
- Langford, G.A., Cozzi, E., Yannoutsos, N., Lancaster, R., Elsome, K., Chen, P., White, D.G.J. Production of pigs transgenic for human regulators of complement activation using YAC technology. *Transplant Proc.* 1996; 28: 862-863.
- Lechler, R.I., Bal, V., Rothbard, J.B., Germain, R.N., Sekaly, R., Long, E.O., Lamb, J. Structural and functional studies of HLA-DR restricted antigen recognition by human helper T lymphocyte clones by using transfected murine cell lines. *J. Immunol.* 1988; 141: 3003-3009.

- McCurry, K.R., Diamond, L.E., Kooyman, D.L., Byrne, G.W., Martin, M.J., Logan, J.S., Platt, J.L. Human complement regulatory proteins expressed in transgenic swine protect swine xenografts from humoral injury. *Transplant Proc.* 1996; 28: 758.
- 5 McMullen, B.A., Fujikawa, K., Kisiel, W. Primary structure of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix* venom. *Biochemistry* 1989; 28: 674-679.
- Maddon, P.J., Littman, D.R., Godfrey, M., Maddon, D.E., Chess, L., Axel, R. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell.* 1985; 42: 93-104.
- 10 Mao, S.S., Huang, J., Welebob, C., Neeper, M.P., Garsky, V.M., Shafer, J.A. Identification and characterization of variants of tick anticoagulant peptide with increased inhibitory potency toward human factor Xa. *Biochemistry* 1995; 34: 5098-5103.
- Merkenschlager, M., Altmann, D.M., Ikeda, H. T cell alloresponses against HLA-DQ and -DR products involve multiple epitopes on the CD4 molecule. Distinct mechanisms contribute to the inhibition of HLA class II-dependent and -independent T cell responses by antibodies to CD4. *J. Immunol.* 1990; 145: 3181-7.
- 15 O'Brien, D.P., Kemball-Cook, G., Hutchinson, A.M., Martin, D.M., Johnson, D.J., Byfield, P.G., Takamiya, O., Tuddenham, E.G., McVey, J.H. Surface plasmon resonance studies of the interaction between factor VII and tissue factor. *Biochemistry* 1994; 33: 14162-9.
- Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Schlossman, S.F. Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *PNAS USA* 1979; 76: 4061-4065.
- 20 Schlaeppli, J.M. Preparation of monoclonal antibodies to the thrombin/hirudin complex. *Thromb. Res.* 1991; 62: 459-470.
- Skern, T., Bischoff, R., Jallat, S., Dott, K., Ali-Hadji, D., Clesse, D., Kieny, M.P., Courtney, M. Sulphation of hirudin in BHK cells. *FEBS* 1990; 1: 36-38.
- Squinto, S.P. Xenogeneic organ transplantation. *Curr. Opin. Biotech.* 1996; 7: 641-645.
- 25 Wagner, D.D. The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thrombosis & Haemostasis* 1993; 70: 105-110.
- Wheeler, M.B. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod. Fertil. Dec.* 1994; 6: 563-568.
- White, D., Cozzi, E., Langford, G., Oglesby, T., Wang, M., Wright, L., Wallwork, J. The control of hyperacute rejection by genetic engineering of the donor species. *Eye* 1995; 9: 185-189.
- 30 Wun, T.C., Kretzmer, K.K., Girard, T.J., Miletich, J.P., Broze, G.J. Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 6001-4.
- Yannoutsos, N., Langford, G.A., Cozzi, E., Lancaster, R., Elsome, K., Chen, P., White, D.J.G. Production of pigs transgenic for human regulators of complement activation. *Transplant Proc.* 1995; 27: 324-325.
- 35

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 (1) INFORMACIÓN GENERAL:
- (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: RPMS Technology Limited
- (B) CALLE: Commonwealth Building
- (C) CIUDAD: Du Cane Road
- (D) STATE: London
- 45 (E) PAÍS: Reino Unido
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): W12 0NN
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Inhibición de la coagulación
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 17
- (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 50 (A) TIPO DE MEDIO: Disco magnético flexible 720K
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA: PatentIn Ver 2.0/Microsoft Word 97
- (v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 55 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/GB98/00850
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°:1
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 38 nucleótidos
- 60 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID N°:1
- 65 CAGTGTCTGAC GGATCCATGG CCGTCATGGC GCCCCGA

	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:2	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 34 nucleótidos	
5	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE HEBRA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:2	
10	GTCAGTGTAACAACCGCCCAGGTCTGGGT CAGG	34
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:3	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 36 nucleótidos	
15	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE HEBRA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:3	
20	ACCCAGACCTGGGCGGTTGT TTAACTGAC TGCACC	36
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:4	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 37 nucleótidos	
25	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE HEBRA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:4	
30	GACGCTGCAG AATTCTTGCA GGTATTCTC CGGGATT	37
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:5	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 24 nucleótidos	
35	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE HEBRA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:5	
40	AATTAGGAGG TTCTGGAGGC TGCA	24
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:6	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 16 nucleótidos	
45	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE HEBRA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:6	
50	GCCTCCAGAA CCTCCT	16
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:7	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 32 nucleótidos	
55	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE HEBRA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:7	
60	TGTCTGCAGG AACCAGAAGAAGGTGGAATT CA	32
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:8	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 28 nucleótidos	
65	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE HEBRA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	

	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:8 GTGGGATCCG CCTGGCCTCG TGCCTCAA	28
5	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:9 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 53 nucleótidos (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
10	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:9 GTCTGAAACG CTTTCTGAAG AAGATGCCTA GCCCAATGAA AAGCAGGAGG CCG	53
15	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 42 nucleótidos (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
20	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:10 TGGGCTAGGC ATCTTCTTCA GAAAGCGTTT CAGACAAAA GA	42
25	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:11 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 25 nucleótidos (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
30	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:11 GACCAGGATC CGGACAGGTC TCTTA	25
35	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:12 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 57 nucleótidos (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
40	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:12 CATCGTCGAC GGATCCTAGA TGATTACAC AATGAAGAAA GTACATGCAC TTTGGGC	57
45	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:13 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 26 nucleótidos (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
50	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:13 GGACCTGCAG AATTCAAAAA GGCTGG	26
55	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:14 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 28 nucleótidos (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
60	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº:14 AGCCTTTTGG AATTCCACGG TCCCTCAT	28
65	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	

- (A) LONGITUD: 31 nucleótidos
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID N°:15
 CATTGCTATA ACAACTGCAG ATATTTTAA C 31
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 16
- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 231 aminoácidos
 (B) TIPO: proteína
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: *Agkistrodon contortrix contortrix*
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID N°:16
 Val Ile Gly Gly Asp Glu Cys Asn Ile Asn Glu His Arg Phe Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Val Tyr Ala Asn Gly Ser Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Gln
 20 25 30
 Glu Trp Val Leu Thr Ala Arg His Cys Asp Arg Gly Asn Met Arg Ile
 35 40 45
 25 Tyr Leu Gly Met His Asn Leu Lys Val Leu Asn Lys Asp Ala Leu Arg
 50 55 60
 Arg Phe Pro Lys Glu Lys Tyr Phe Cys Leu Asn Thr Arg Asn Asp Thr
 65 70 75 80
 Ile Trp Asp Lys Asp Ile Met Leu Ile Arg Leu Asn Arg Pro Val Arg
 85 90 95
 30 Asn Ser Ala His Ile Ala Pro Leu Ser Leu Pro Ser Asn Pro Pro Ser
 100 105 110
 Val Gly Ser Val Cys Arg Ile Met Gly Trp Gly Thr Ile Thr Ser Pro
 115 120 125
 35 Asn Ala Thr Leu Pro Asp Val Pro His Cys Ala Asn Ile Asn Ile Leu
 130 135 140
 Asp Tyr Ala Val Cys Gln Ala Ala Tyr Lys Gly Leu Ala Ala Thr Thr
 145 150 155 160
 Leu Cys Ala Gly Ile Leu Glu Gly Gly Lys Asp Thr Cys Lys Gly Asp
 165 170 175
 40 Ser Gly Gly Pro Leu Ile Cys Asn Gly Gln Phe Gln Gly Ile Leu Ser
 180 185 190
 Val Gly Gly Asn Pro Cys Ala Gln Pro Arg Lys Pro Gly Ile Tyr Thr
 195 200 205
 45 Lys Val Phe Asp Tyr Thr Asp Trp Ile Gln Ser Ile Ile Ser Gly Asn
 210 215 220
 Thr Asp Ala Thr Cys Pro Pro
 225 230
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 17
- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 693 nucleótidos
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA PARA LA SEC ID N°:17
 GTGATCGGCG GCGACGAGTG CAACATCAAC GAGCACCGCT TCCTGGCCCT GGTGTACGCC 60
 AACGGCAGCC TGTGCGGCGG CACCCTGATC AACCAGGAGT GGGTGCTGAC CGCCCGCCAC 120
 60 TGC GACCGCG GCAACATGCG CATCTACCTG GGCATGCACA ACCTGAAGGT GCTGAACAAG 180
 GACGCCCTGC GCCGCTTCCC CAAGGAGAAG TACTTCTGCC TGAACACCCG CAACGACACC 240
 ATCTGGGACA AGGACATCAT GCTGATCCGC CTGAACCGCC CCGTGCGCAA CAGCGCCAC 300
 ATCGCCCCC TGAGCCTGCC CAGCAACCCC CCCAGCGTGG GCAGCGTGTG CCGCATCATG 360
 GGCTGGGGCA CCATCACCAG CCCCAACGCC ACCCTGCCCG ACGTGCCCCA CTGCGCCAAC 420
 65 ATCAACATCC TGGACTACGC CGTGTGCCAG GCCGCCTACA AGGGCCTGGC CGCCACCACC 480
 CTGTGCGCCG GCATCCTGGA GGGCGGCAAG GACACCTGCA AGGGCGACAG CGGCGGCCCC 540

ES 2 513 043 T3

```
CTGATCTGCA ACGGCCAGTT CCAGGGCATC CTGAGCGTGG GCGGCAACCC CTGCGCCCAG 600
CCCCGCAAGC CCGGCATCTA CACCAAGGTG TTCGACTACA CCGACTGGAT CCAGAGCATC 660
ATCAGCGGCA ACACCGACGC CACCTGCCCC CCC 693
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un animal no humano que comprende un tejido biológico, en el que el tejido comprende una célula, la célula expresa una o más proteínas que comprenden una región con actividad anticoagulante y una región que puede anclar dicha proteína a una membrana celular, en la que la región de anclaje y la región anticoagulante de la proteína derivan de proteínas diferentes, y en la que la región anticoagulante comprende la secuencia de un polipéptido anticoagulante seleccionado entre los grupos que consisten en:
- 10 i) hirudina, inhibidor de la vía del factor tisular, péptido anticoagulante de la garrapata y un activador de la proteína C;
ii) derivados y fragmentos funcionales de i) que retienen la actividad anticoagulante;
15 iii) heparina y antitrombina;
iv) derivados y fragmentos funcionales de iii) que retienen la actividad anticoagulante; y
v) derivados anticoagulantes de la trombina.
- 20 2. El animal no humano de la reivindicación 1, en el que la región anticoagulante comprende la secuencia de una hirudina, un inhibidor de la vía del factor tisular, un péptido anticoagulante de la garrapata, o un activador de la proteína C.
3. El animal no humano de la reivindicación 2, en el que la región anticoagulante comprende la secuencia de un inhibidor de la vía del factor tisular.
- 25 4. El animal no humano de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la región de anclaje comprende la secuencia transmembranal de una proteína de membrana.
5. El animal no humano de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tejido es una colección de células.
- 30 6. El animal no humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tejido es fibroblastos, una córnea, tejido nervioso, un corazón, un hígado o un riñón.
- 35 7. El animal no humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tejido es un órgano.
8. El animal no humano de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el animal no humano es un animal transgénico.
- 40 9. El animal no humano según la reivindicación 8, en el que dicho animal es un cerdo transgénico o una oveja transgénica.
- 45 10. Un órgano del animal transgénico no humano de las reivindicaciones 8 o 9, en el que dicho órgano comprende una célula, la célula expresa una o más proteínas que comprenden una región con actividad anticoagulante y una región que puede anclar dicha proteína a una membrana celular, en la que la región de anclaje y la región anticoagulante de la proteína derivan de proteínas diferentes, y en la que la región anticoagulante comprende la secuencia de un polipéptido anticoagulante seleccionado entre los grupos que consisten en:
- 50 i) hirudina, inhibidor de la vía del factor tisular, péptido anticoagulante de la garrapata y un activador de la proteína C;
ii) derivados y fragmentos funcionales de i) que retienen la actividad anticoagulante;
iii) heparina y antitrombina;
iv) derivados y fragmentos funcionales de iii) que retienen la actividad anticoagulante; y
55 v) derivados anticoagulantes de la trombina.
11. Un tejido biológico que comprende una célula, en el que la célula expresa una o más proteínas que comprenden una región con actividad anticoagulante y una región que puede anclar dicha proteína a una membrana celular, en la que la región de anclaje y la región anticoagulante de la proteína derivan de proteínas diferentes, y en la que la región anticoagulante comprende la secuencia de un polipéptido anticoagulante seleccionado entre los grupos que consisten en:
- 60 i) hirudina, inhibidor de la vía del factor tisular, péptido anticoagulante de la garrapata y un activador de la proteína C;
ii) derivados y fragmentos funcionales de i) que retienen la actividad anticoagulante;
65 iii) heparina y antitrombina;
iv) derivados y fragmentos funcionales de iii) que retienen la actividad anticoagulante; y

v) derivados anticoagulantes de la trombina.

en el que la célula no se produce utilizando un método que implica la modificación de la identidad genética de la línea germinal del ser humano o que implica el uso de un embrión humano para fines industriales o comerciales.

5

12. El tejido de la reivindicación 11, en el que el tejido es una colección de células.

13. El tejido de la reivindicación 11, en el que el tejido es un órgano.

10

14. Un método para hacer que un tejido u órgano sea adecuado para trasplante, que comprende la expresión de una proteína en la superficie de las células endoteliales de dicho tejido u órgano, en el que el método no implica la modificación de la identidad genética de la línea germinal del ser humano o uso de un embrión humano para fines industriales o comerciales, y en el que dicha proteína comprende una región con actividad anticoagulante y una región que puede anclar dicha proteína a una membrana celular, en la que la región de anclaje y la región anticoagulante de la proteína se derivan de proteínas diferentes, y en la que la región anticoagulante comprende la secuencia de un polipéptido anticoagulante seleccionado entre los grupos que consisten en:

15

- i) hirudina, inhibidor de la vía del factor tisular, péptido anticoagulante de la garrapata y un activador de la proteína C;
- ii) derivados y fragmentos funcionales de i) que retienen la actividad anticoagulante;
- iii) heparina y antitrombina;
- iv) derivados y fragmentos funcionales de iii) que retienen la actividad anticoagulante; y
- v) derivados anticoagulantes de la trombina.

20

25

15. Un animal no humano según la reivindicación 3, en el que la secuencia de un inhibidor de la vía del factor tisular comprende dominios Kunitz I y II del inhibidor de la vía del factor tisular.

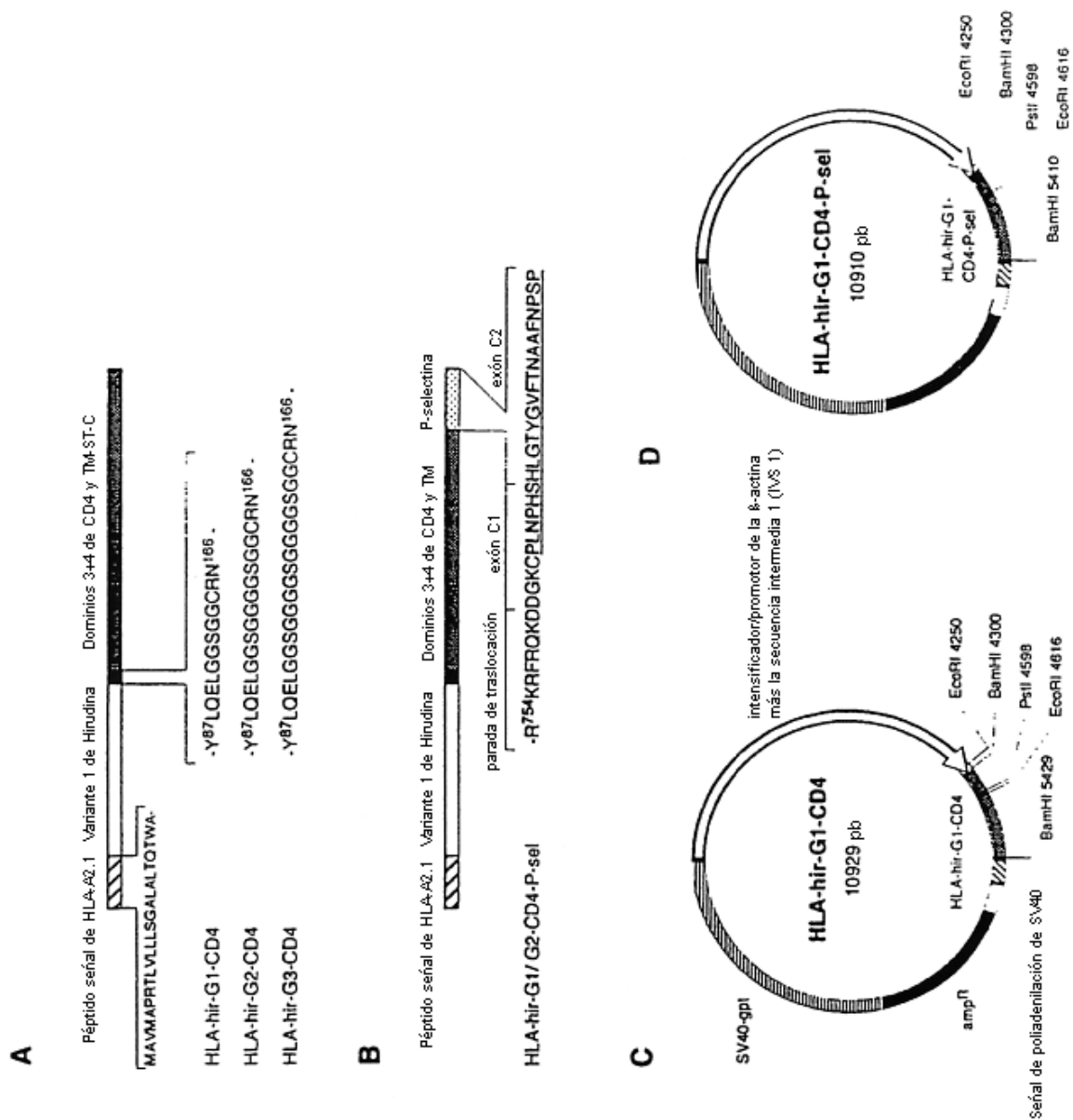


FIG. 1

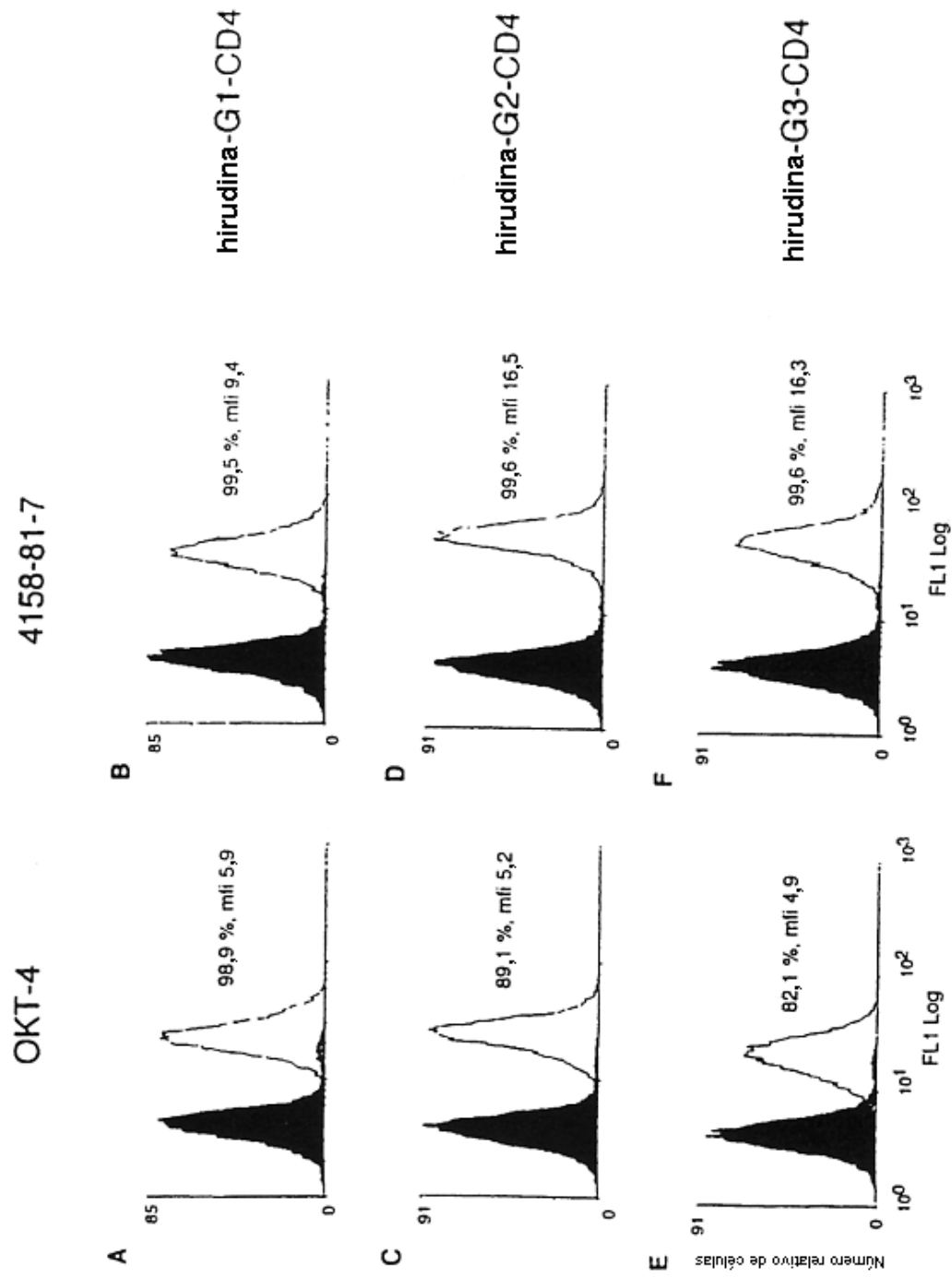
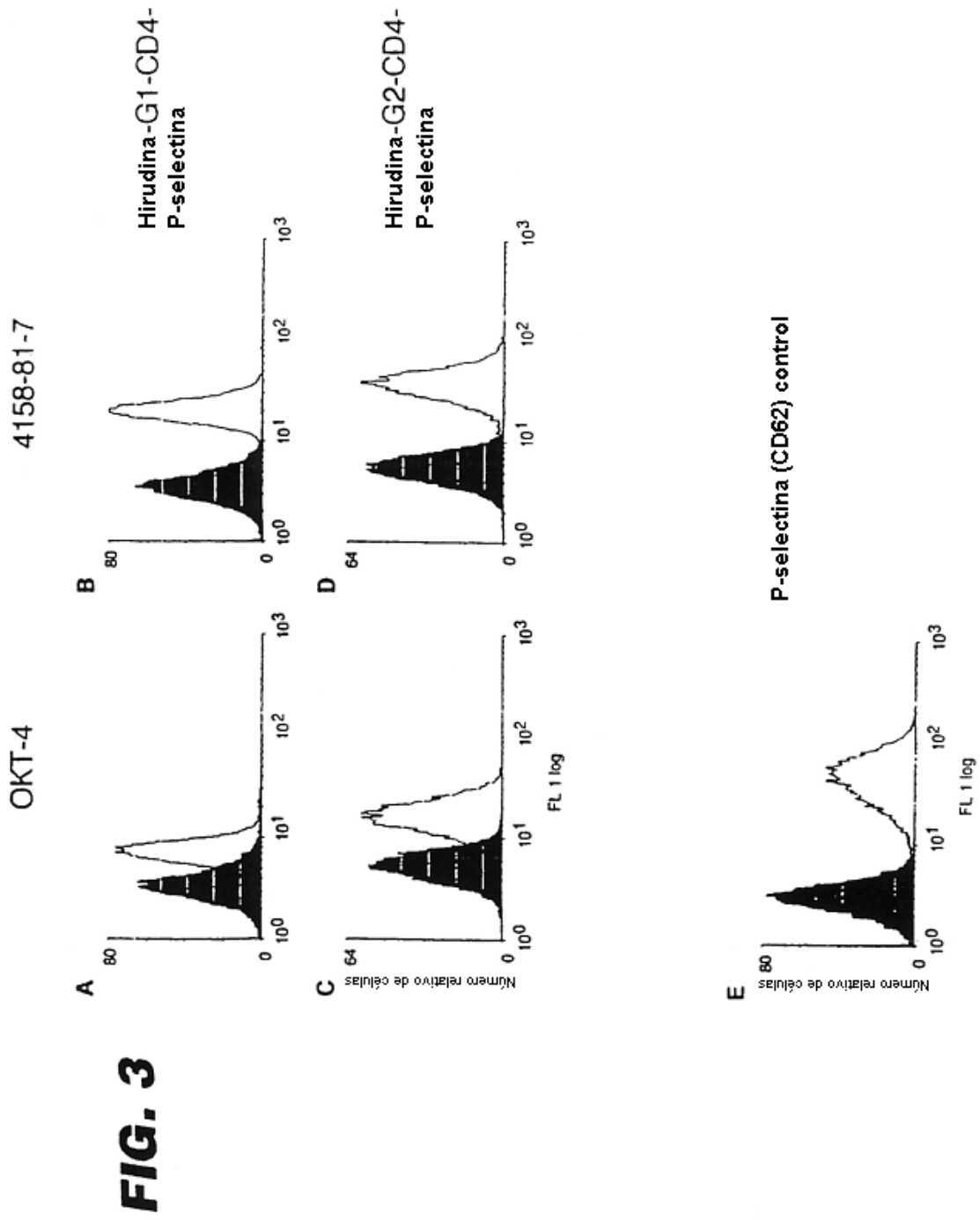


FIG. 2



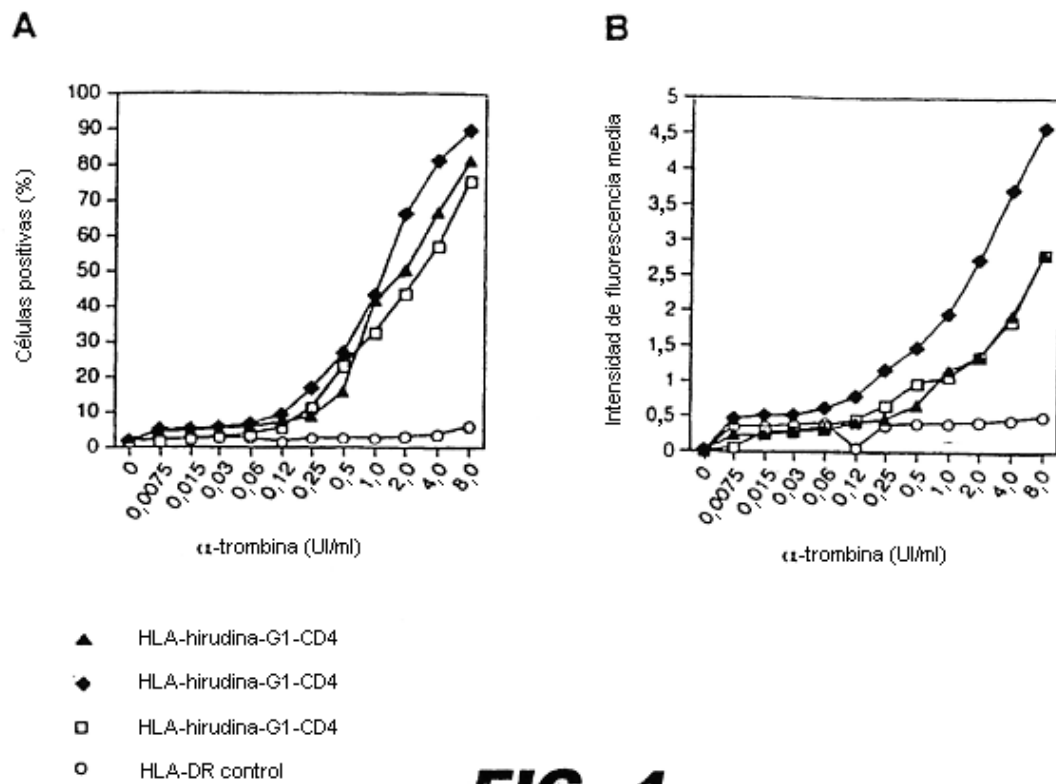


FIG. 4

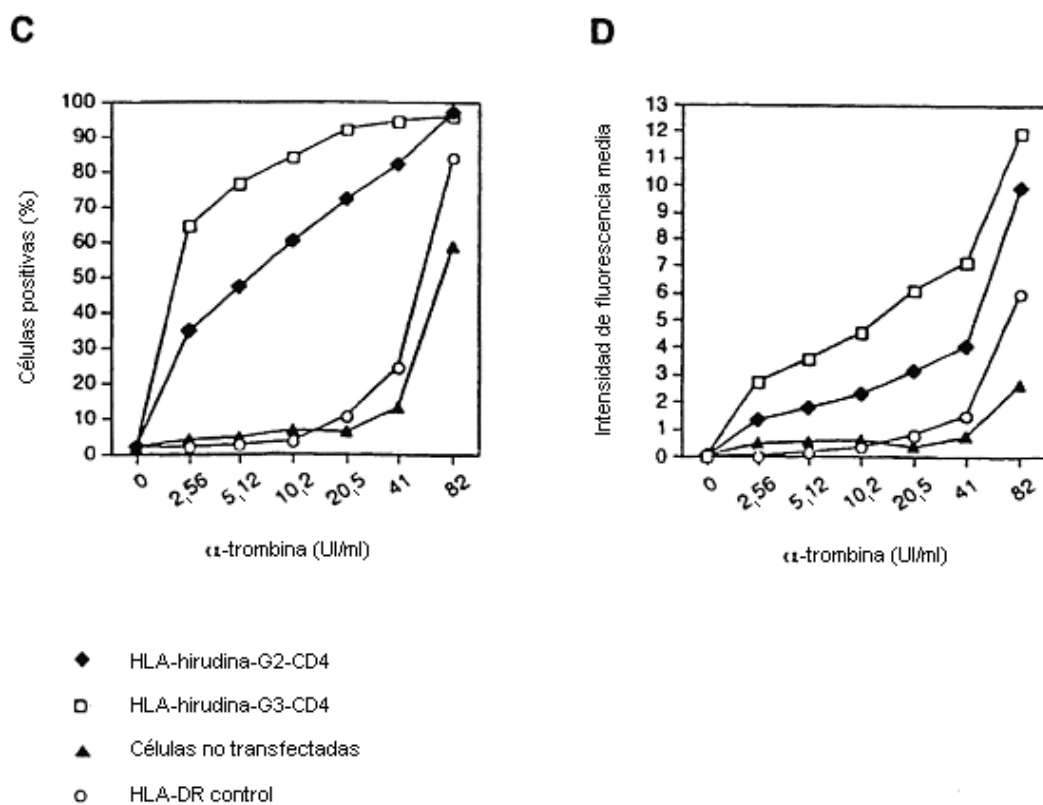


FIG. 5

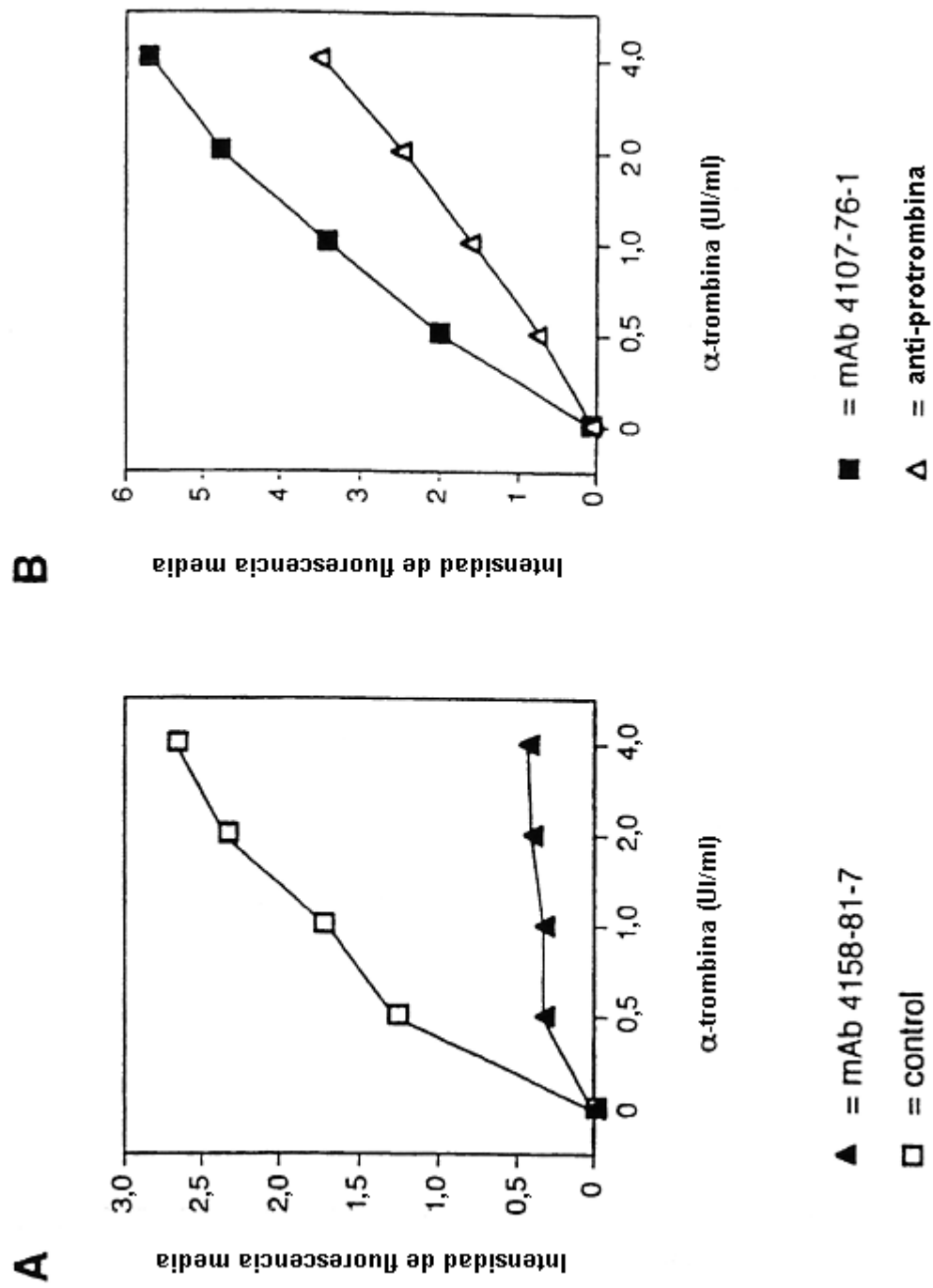


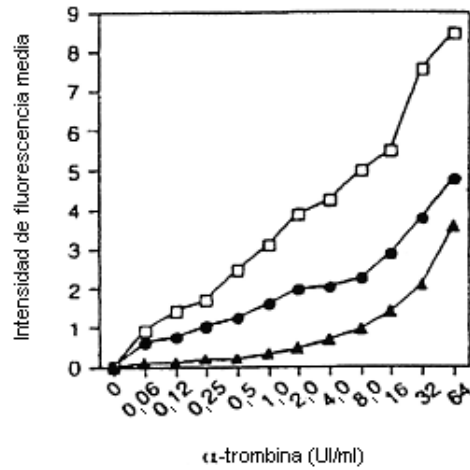
FIG. 6

Anticuerpo de marcaje

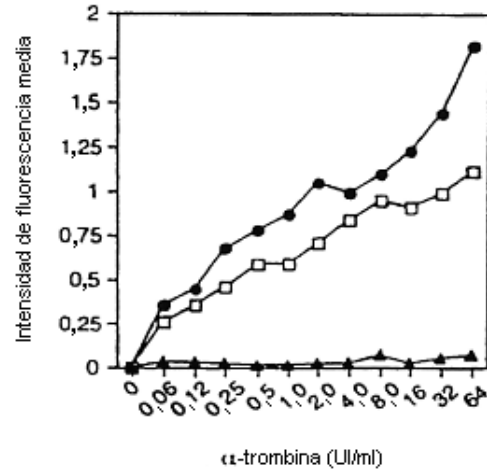
anti-protrombina

anti-complejo hirudina/trombina

A

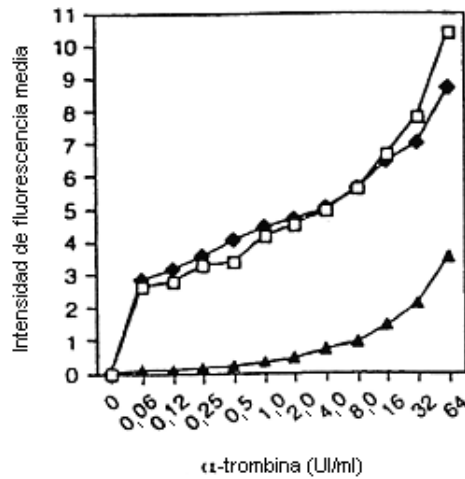


B

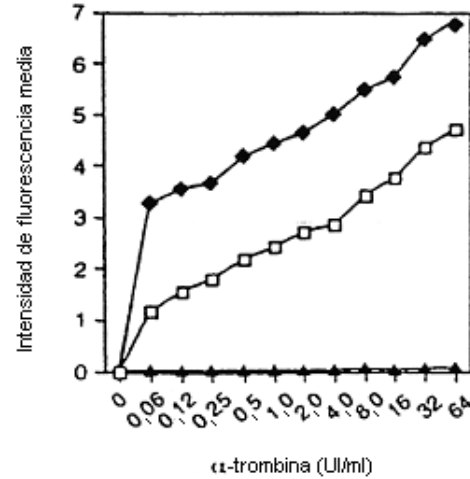


- = HLA-hirudina-G1-CD4-P-selectina
- = HLA-hirudina-G2-CD4-P-selectina
- ▲ = control

C



D



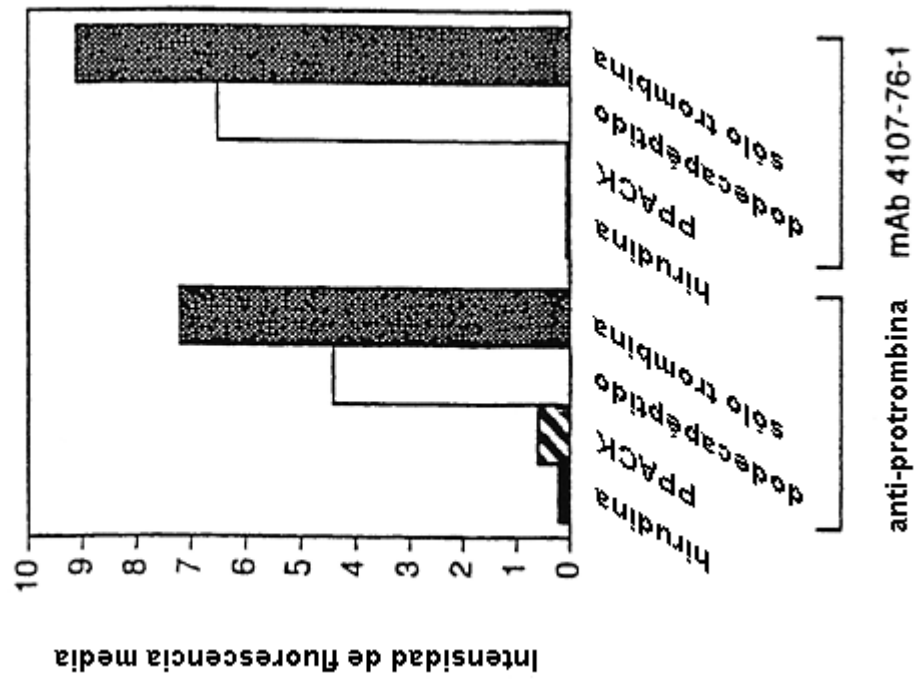
- ◆ = HLA-hirudina-G1-CD4
- = HLA-hirudina-G2-CD4
- ▲ = control

FIG. 7

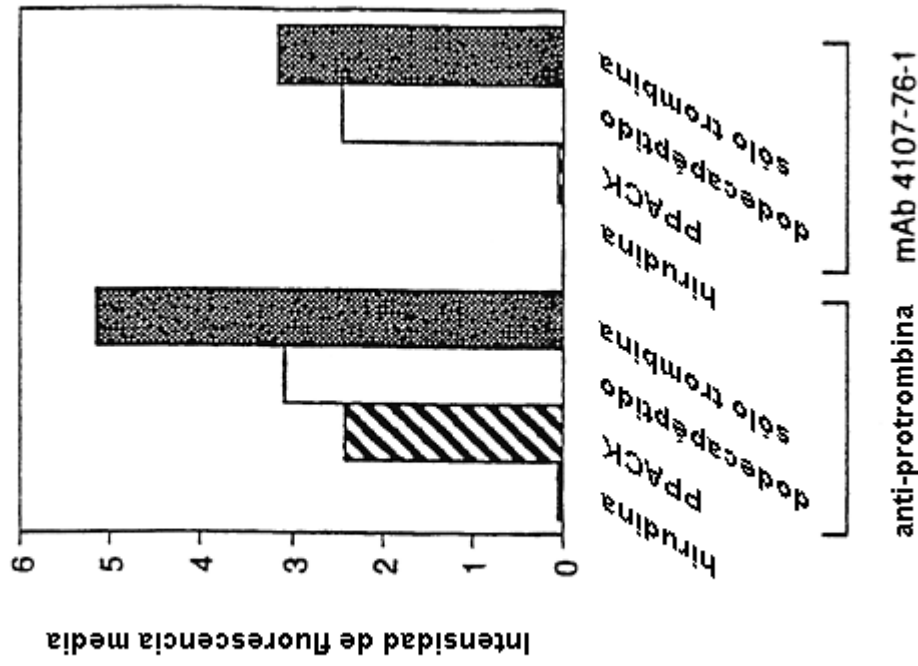
DAP.3

CHO-K1

A



B



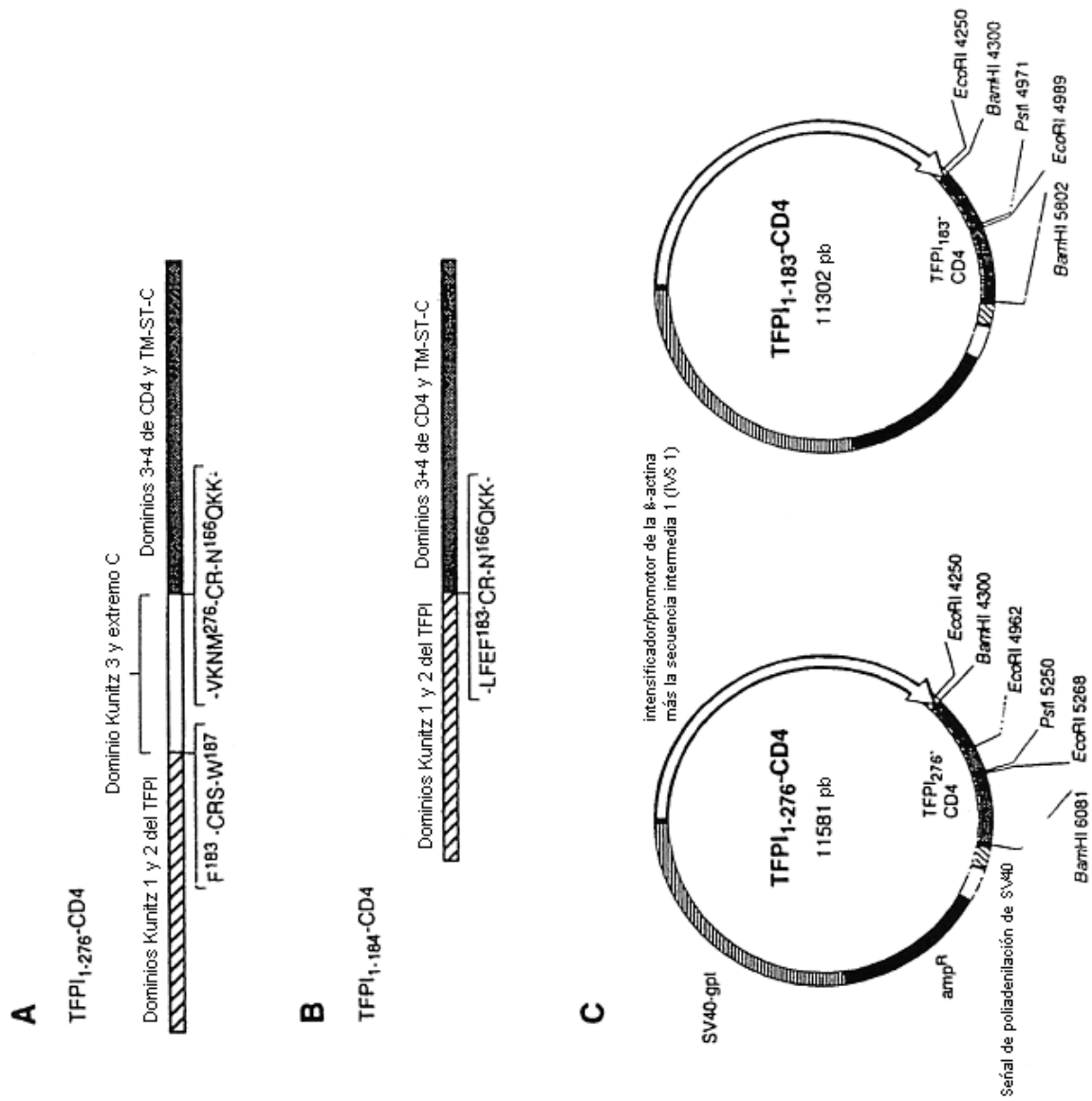


FIG. 8

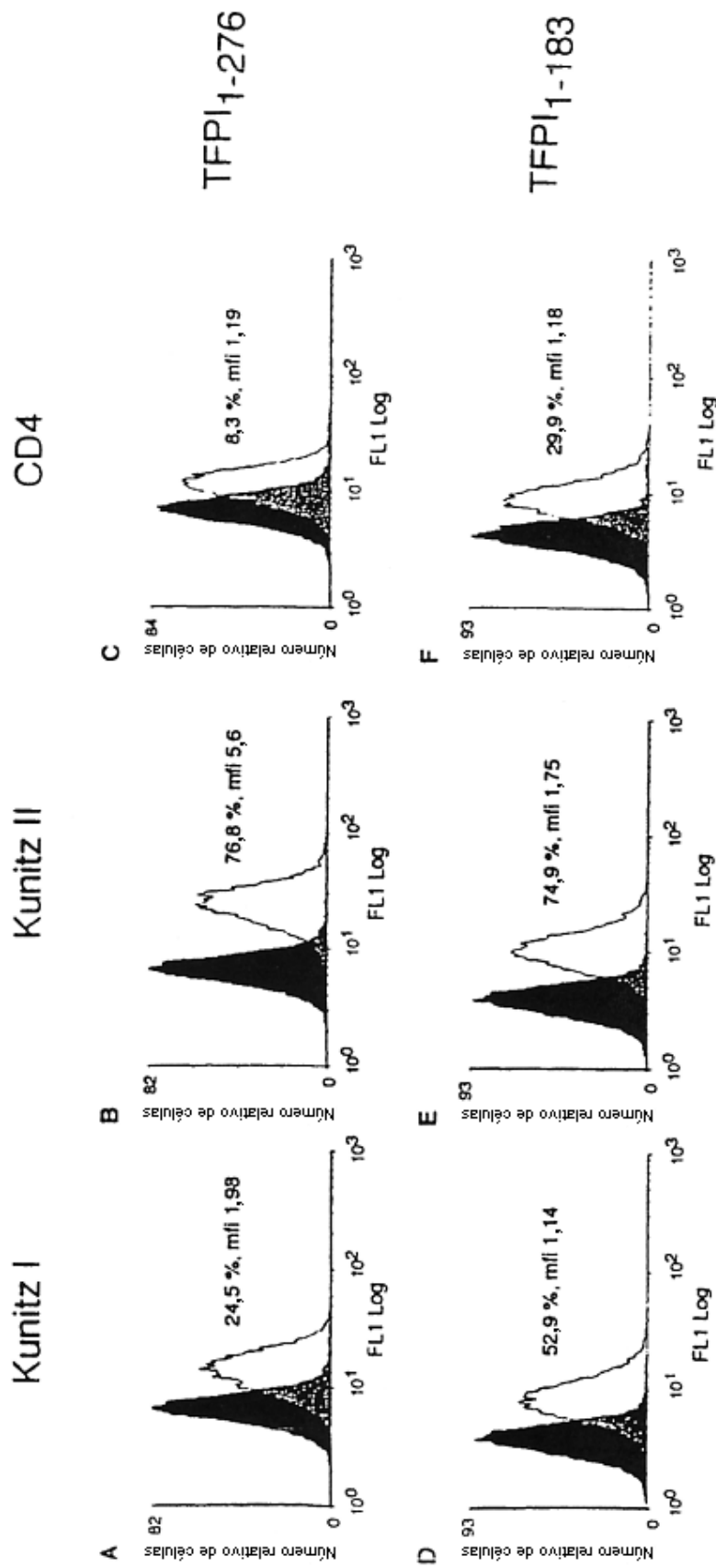
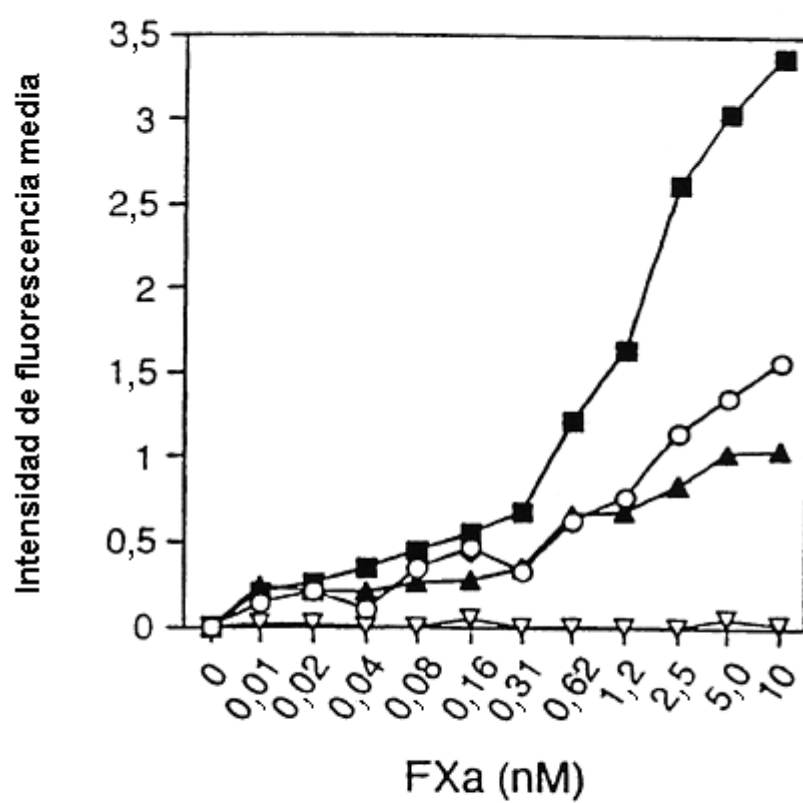


FIG. 9

FIG. 10



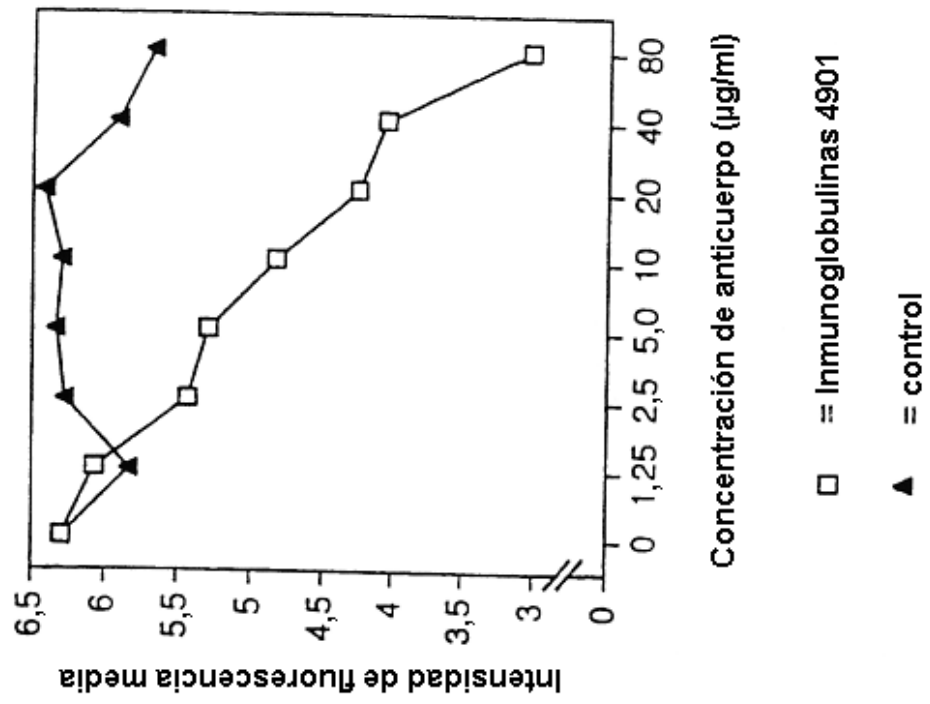
▲ = TFPI₁₋₂₇₆-CD4

○ & ■ = TFPI₁₋₁₈₃-CD4

▽ = control

FIG. 11

B



A

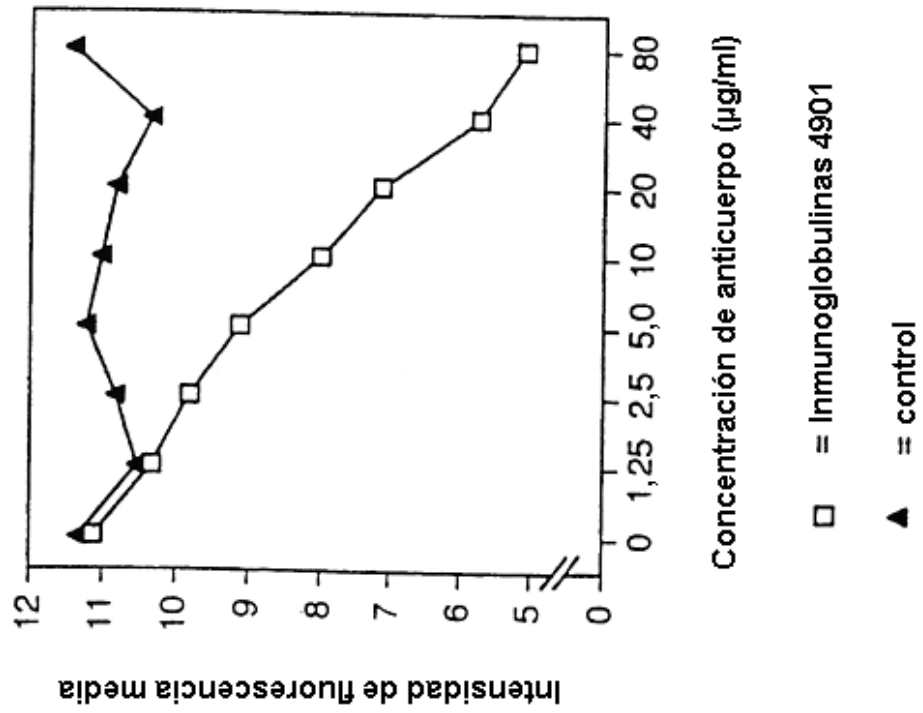
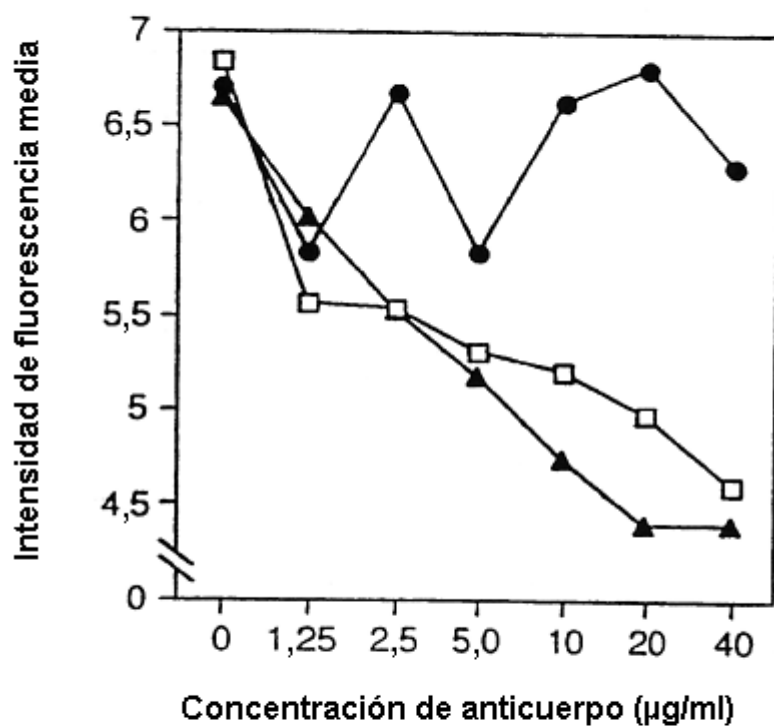
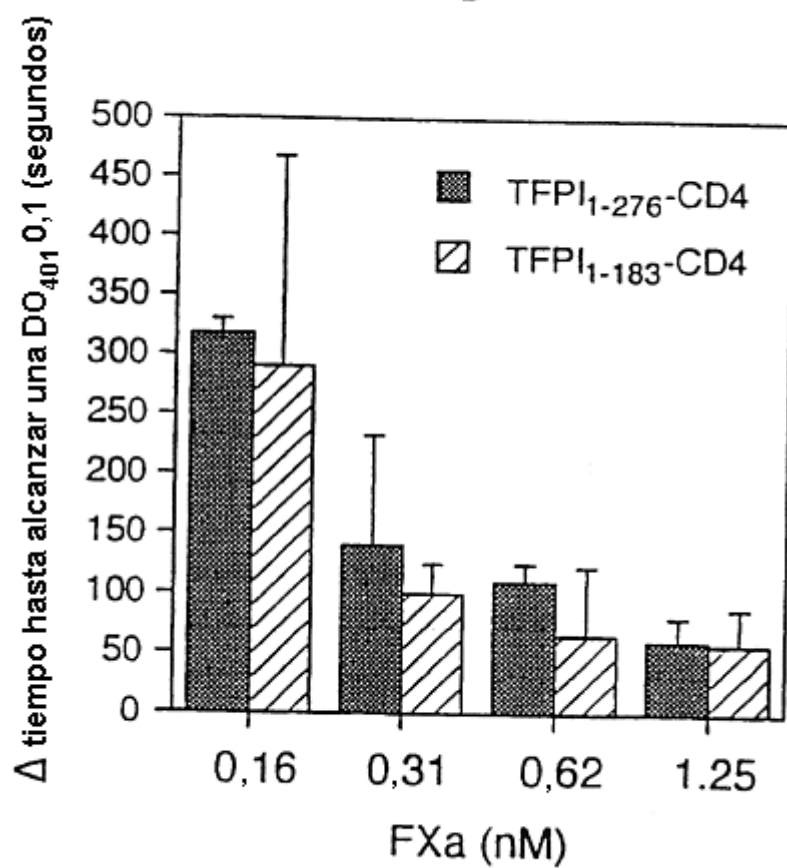


FIG.12

□ = mAb 4903

▲ = mAb 4904

● = control

FIG. 13

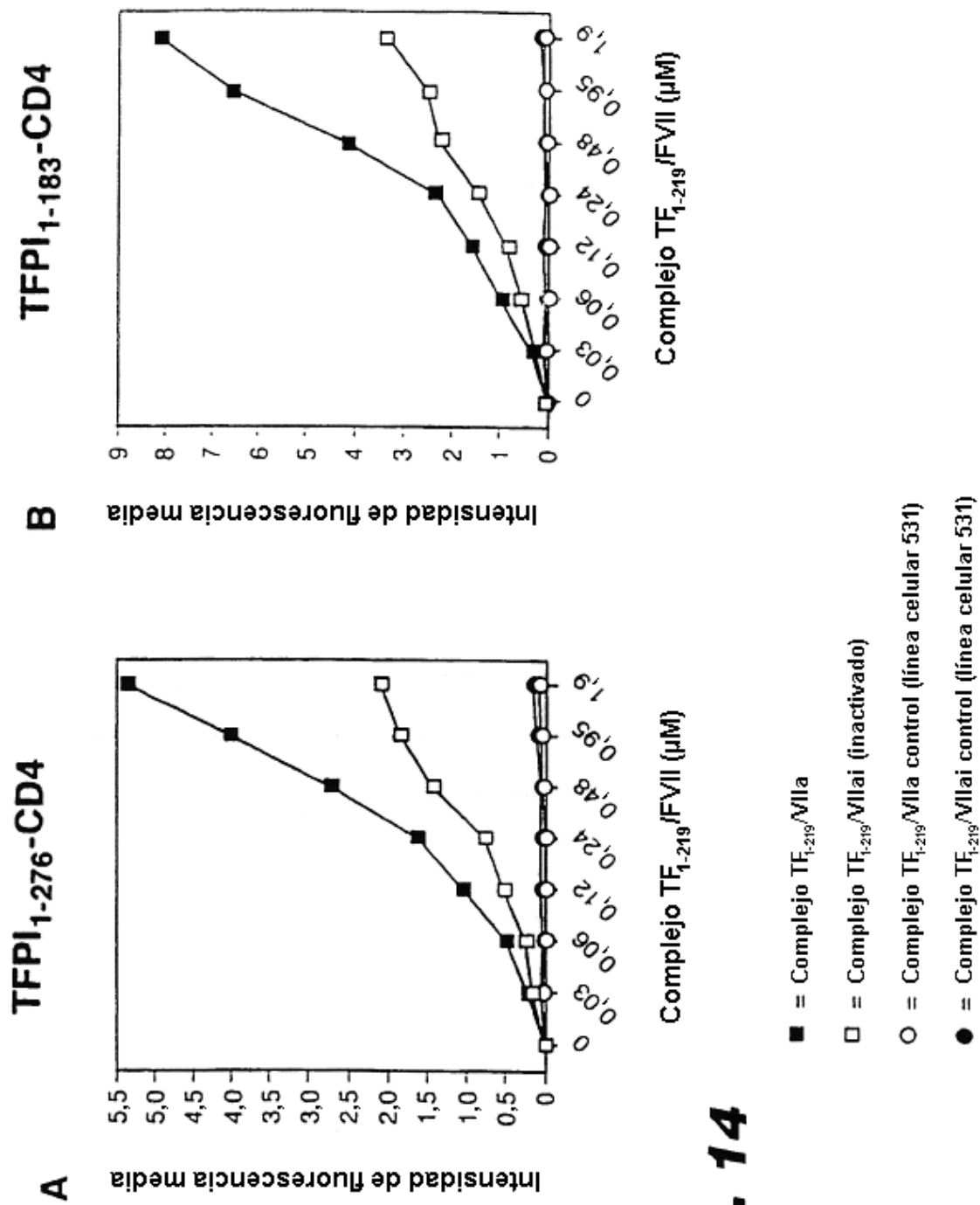


FIG. 14

FIG. 15A

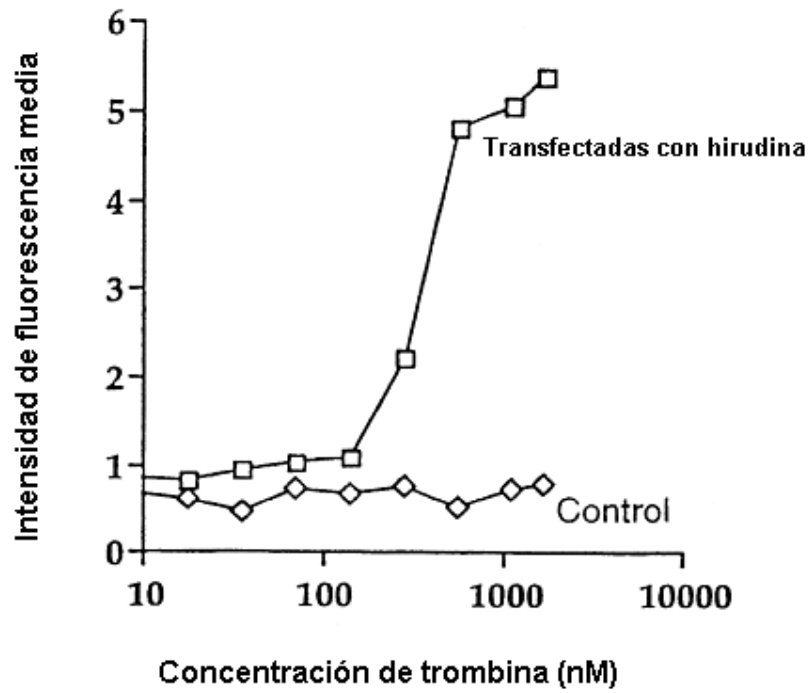


FIG. 15B

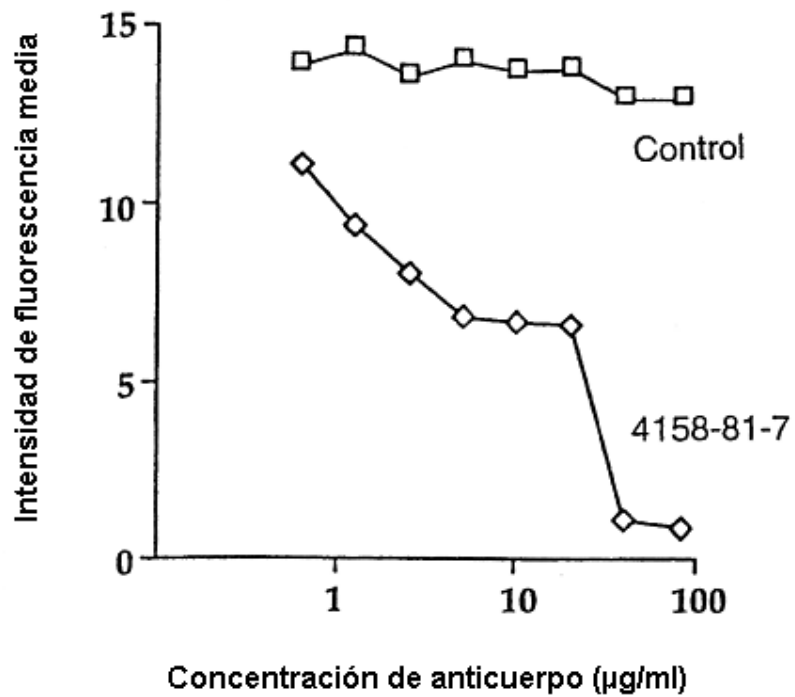


FIG. 15C

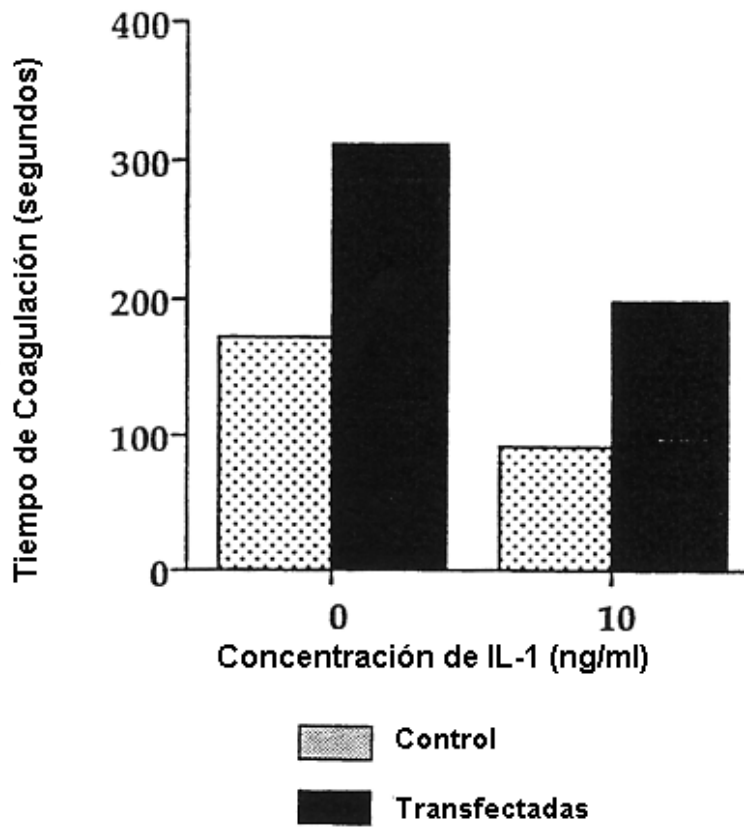


FIG. 15D

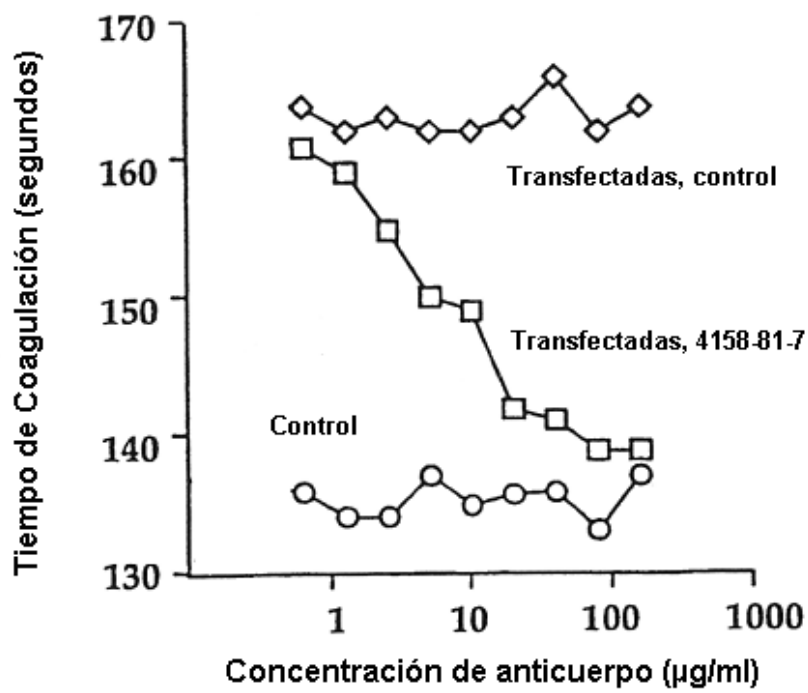


FIG. 16A

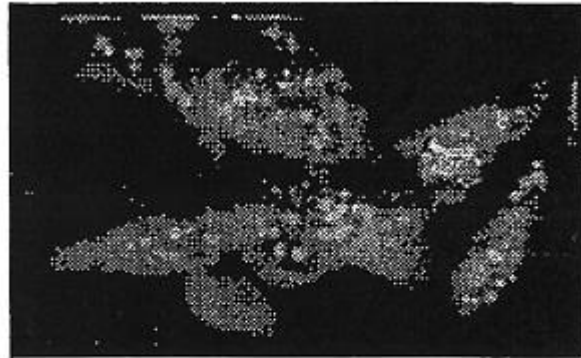


FIG. 16B

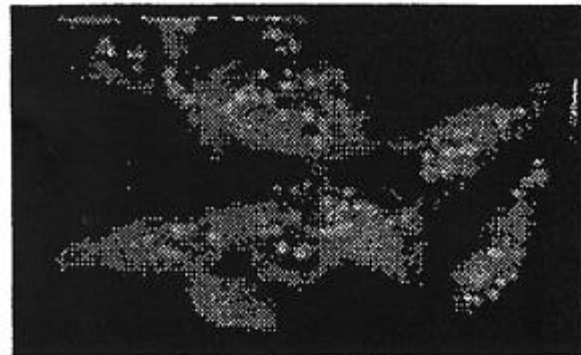


FIG. 16C

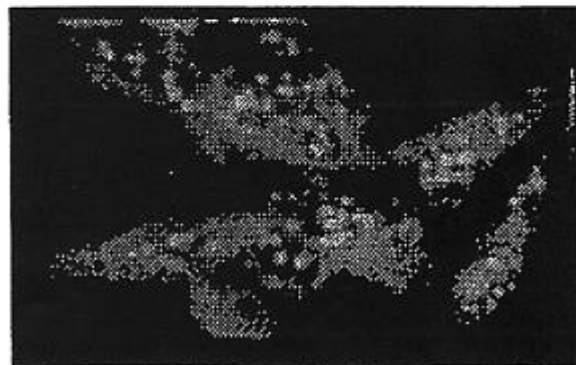


FIG. 16D

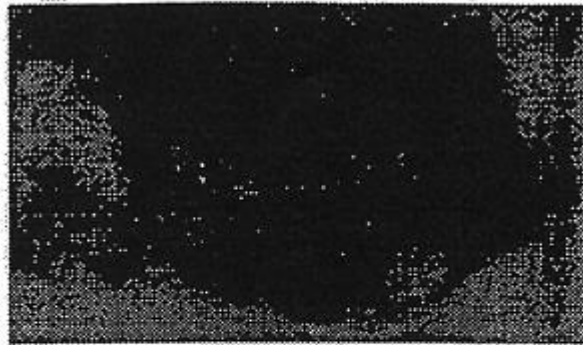


FIG. 16E

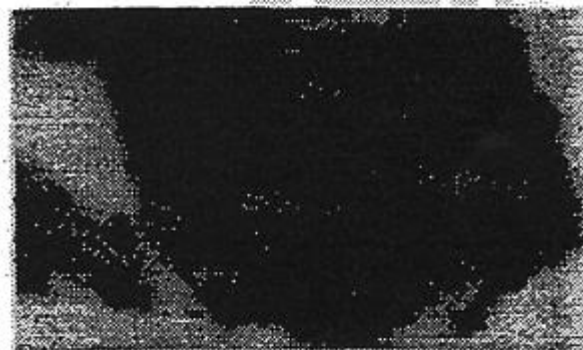


FIG. 16F



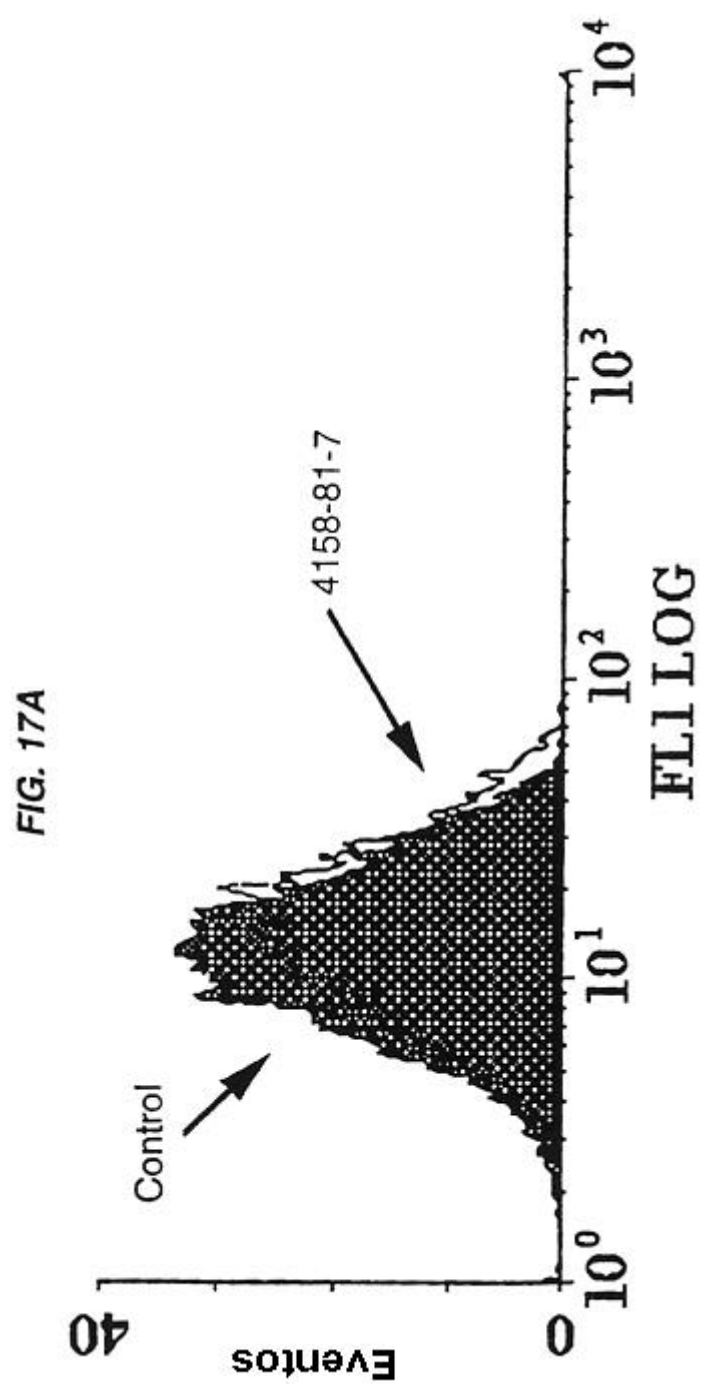


FIG. 17B

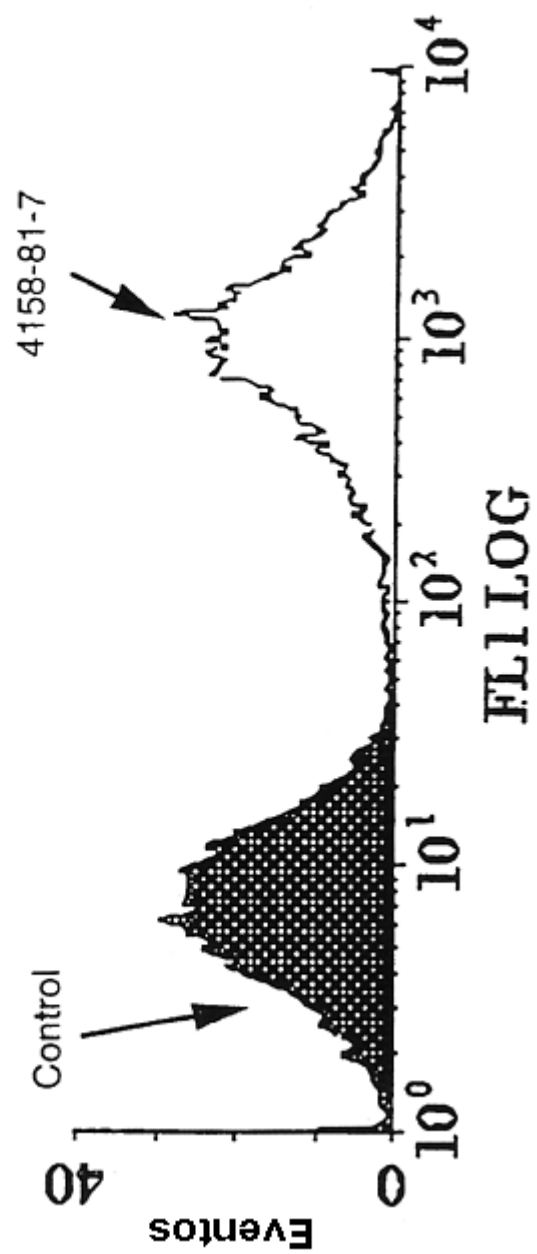


FIG. 17C

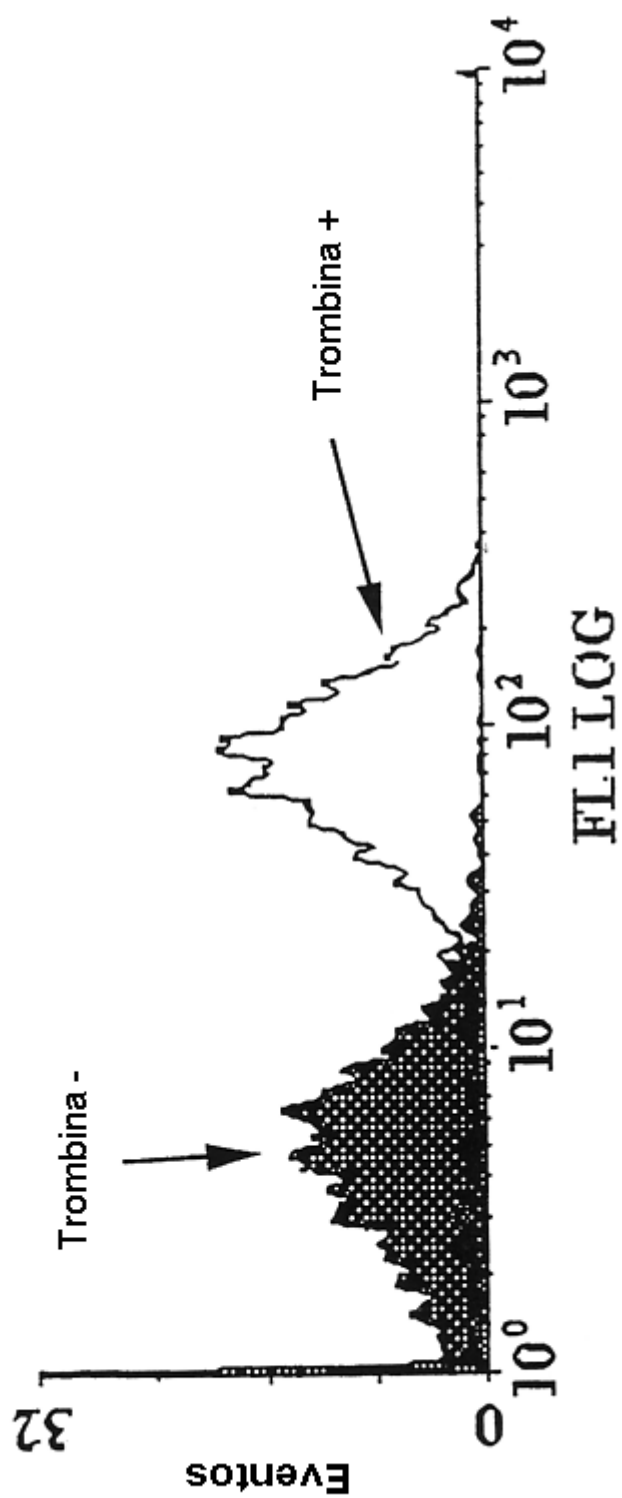


FIG. 18A

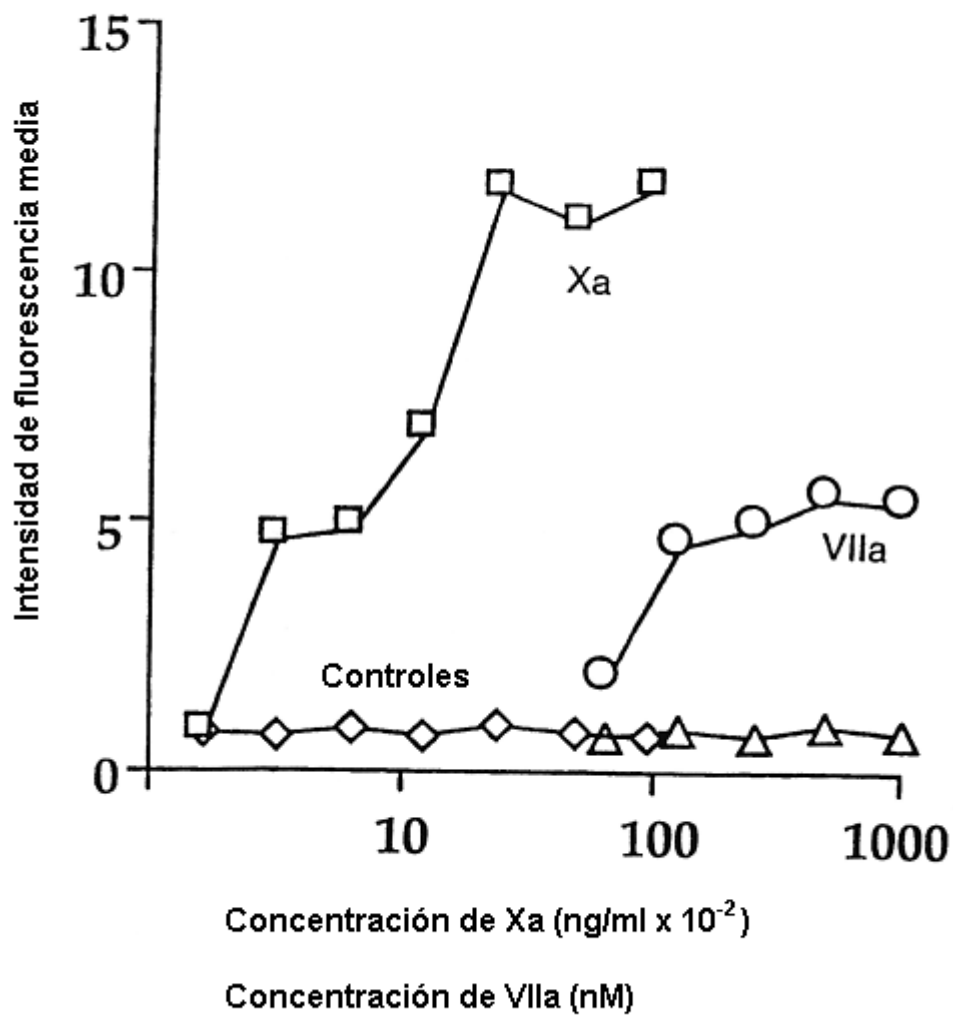


FIG. 18B

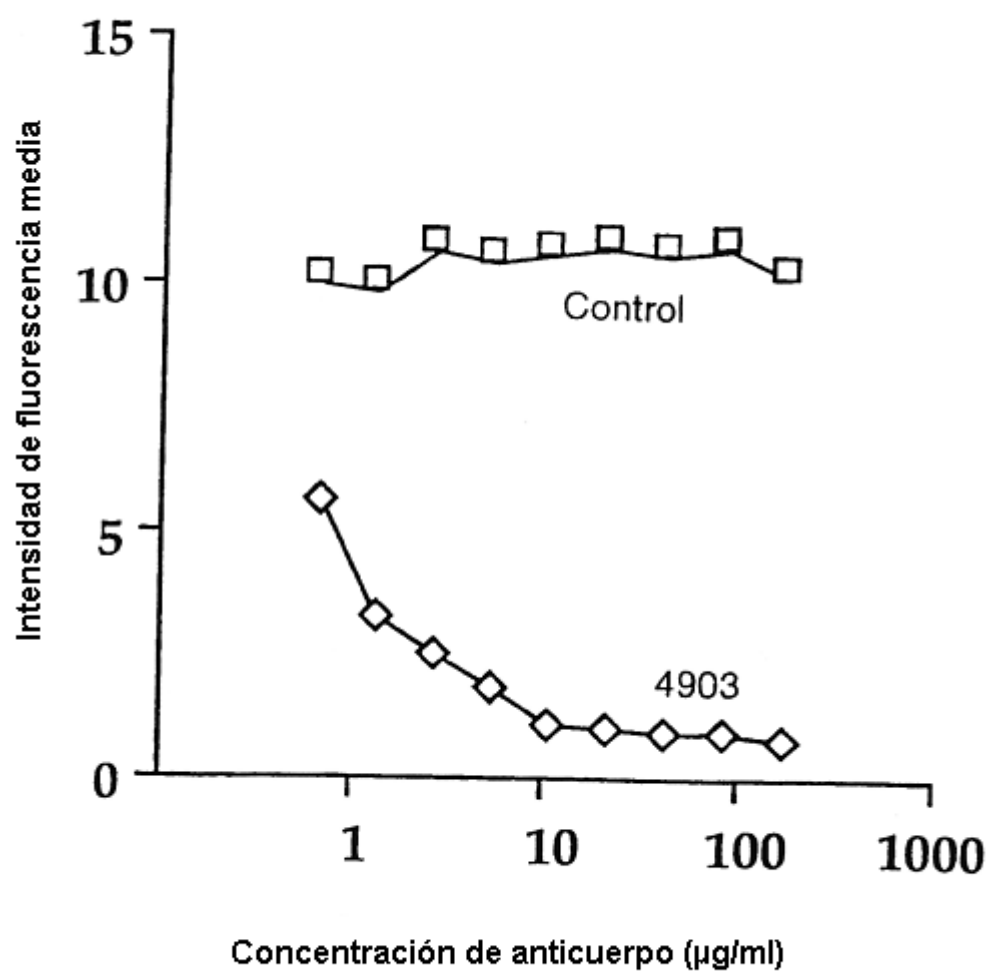


FIG. 19A

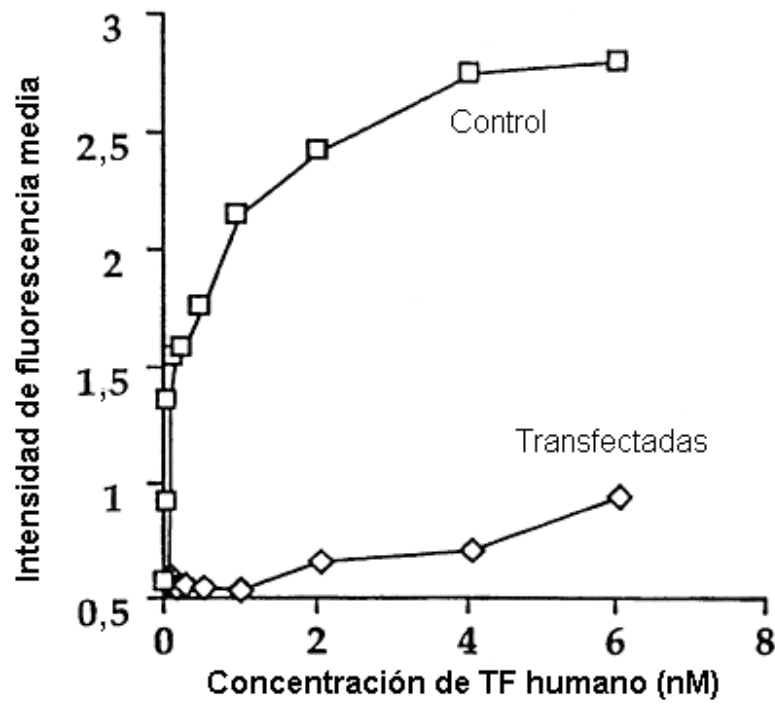
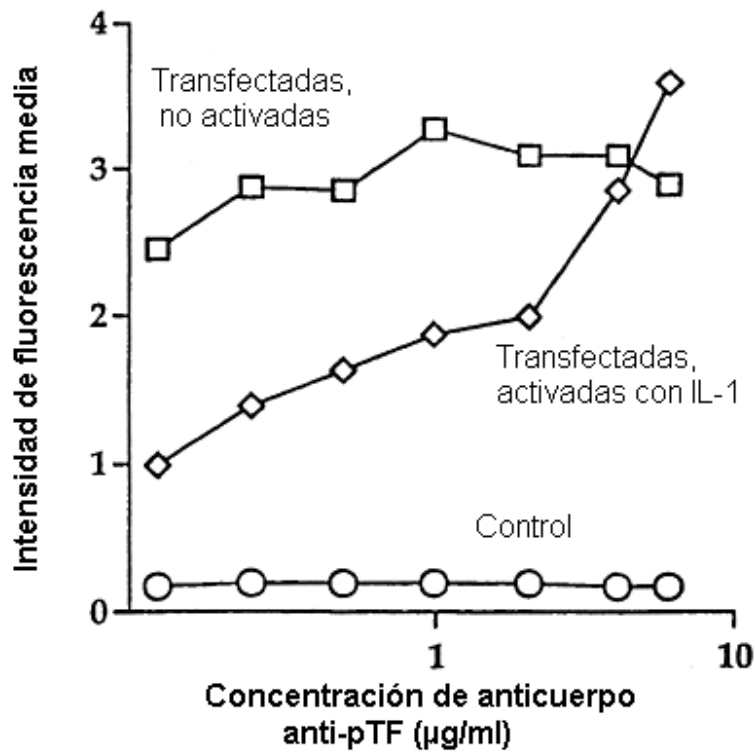


FIG. 19B



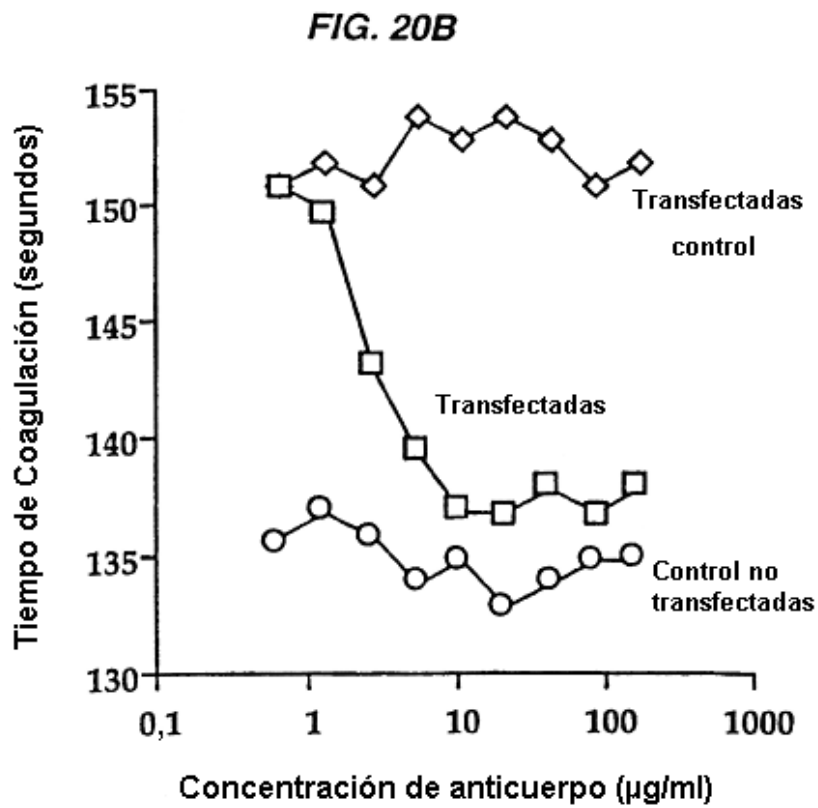
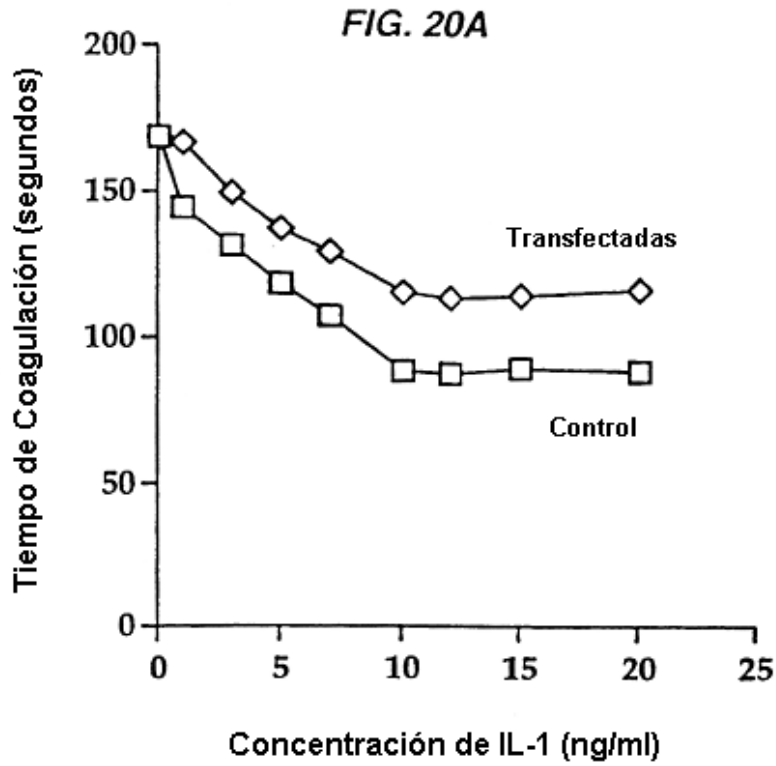


FIG. 21A

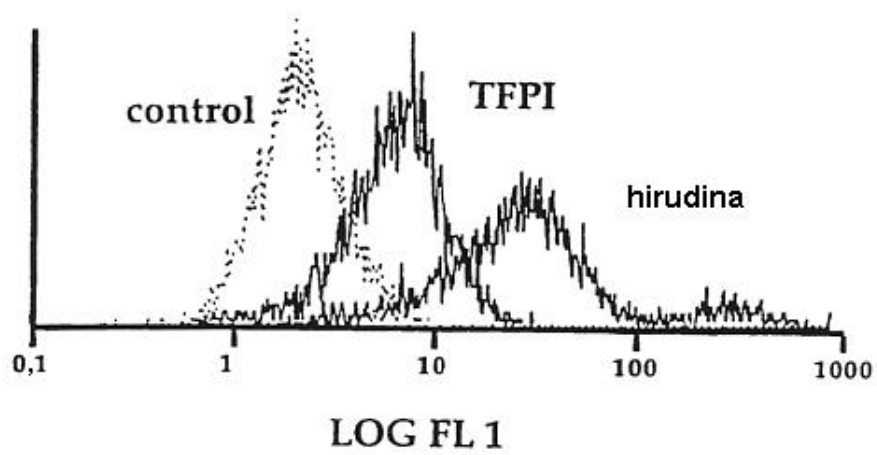


FIG. 21B

