

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 862**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/01 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2007 E 07722853 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 1991255**

54 Título: **Polipéptidos del factor X de coagulación con propiedades de activación modificadas**

30 Prioridad:

21.02.2006 EP 06003475

08.03.2006 US 780066 P

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

29.09.2015

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**SCHULTE, STEFAN;
HAUSER, HANS-PETER;
KALINA, UWE y
WEIMER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 546 862 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

Polipéptidos del factor X de coagulación con propiedades de activación modificadas

Campo de la invención:

5 La presente invención se refiere a secuencias de ADNc modificadas que codifican polipéptidos del factor X humano, en particular el factor X humano y sus derivados que pueden evitar la necesidad del factor VIIIa/FIXa o del factor VIIa/FT para la activación. La invención se refiere además a vectores de expresión recombinantes que contienen tales secuencias de ADNc modificadas, a células hospedadoras transformadas con tales vectores de expresión recombinantes, a polipéptidos recombinantes y a derivados que tienen actividades biológicas de la proteína de tipo silvestre sin modificar pero que tienen propiedades de activación alteradas y a procedimientos para la preparación de
10 tales proteínas recombinantes y sus derivados. La invención también abarca un vector de transferencia para uso en una terapia génica humana, que comprende tales secuencias de ADN modificadas.

Antecedentes de la invención:

15 Las proteínas dependientes de la vitamina K se usan para tratar ciertos tipos de hemofilia. La hemofilia clásica o hemofilia A es un trastorno hemorrágico hereditario. Es el resultado de una deficiencia ligada al cromosoma X del factor VIII de la coagulación sanguínea, y afecta casi exclusivamente a varones con una incidencia de entre uno y dos individuos por cada 10,000. El defecto del cromosoma X es transmitido por las mujeres portadoras siendo ellas mismas no hemofílicas. La manifestación clínica de la hemofilia A es una tendencia a la hemorragia incrementada. Antes de la introducción del tratamiento con concentrados de factor VIII, el promedio de vida de una persona con hemofilia grave era menor a 20 años. El uso de concentrados de factor VIII procedente del plasma y más tarde de
20 formas recombinantes del factor VIII, ha mejorado considerablemente la situación de los pacientes hemofílicos, incrementando mucho el promedio de vida, proporcionando a la mayoría de ellos la posibilidad de tener una vida más o menos normal. La hemofilia B que es 5 veces menos prevalente que la hemofilia A, está causada por un factor IX no funcional o ausente y se trata con concentrados de factor IX procedente del plasma o una forma recombinante del factor IX. Tanto en la hemofilia A como en la hemofilia B el problema médico más grave en el tratamiento de la enfermedad es la generación de aloanticuerpos contra los factores de sustitución. Hasta un 30% de todos los pacientes con hemofilia A desarrollan anticuerpos contra el factor VIII. Los anticuerpos contra FIX se producen en menor medida pero con consecuencias más graves, ya que son menos susceptibles a una terapia de inducción de tolerancia inmune.

30 El modelo actual de coagulación afirma que el desencadenante fisiológico de la coagulación es la formación de un complejo entre el factor tisular (FT) y el factor VIIa (FVIIa) en la superficie de células que expresan FT, que se encuentran normalmente fuera de la vasculatura y solo se vuelven accesibles cuando se produce una lesión. El complejo de factor VIIa/FT activa el factor IX y el factor X, generando en última instancia trombina. En un bucle de retroalimentación positiva, la trombina activa el factor VIII y el factor IX que luego también activan el factor X, el denominado brazo "intrínseco" de la cascada de coagulación sanguínea, amplificando de este modo la generación de factor
35 Xa, que es necesario para la generación de la ráfaga de trombina completa para lograr una hemostasia completa. Se mostró que mediante la administración de concentraciones suprafisiológicas de FVIIa, se consigue una hemostasia evitando la necesidad de factor VIIIa y factor IXa. La clonación del ADNc del factor VII (documento de patente de EE.UU. 4,784,950) hizo posible el desarrollo de un sustituto recombinante de ese factor de coagulación obtenido a partir del plasma. Este factor VIIa se administró con éxito por primera vez en 1988 a un paciente con un título elevado de anticuerpos inhibidores de FVIII. Desde entonces el número de indicaciones de factor VIIa ha crecido de manera constante lo que muestra un potencial para que el factor VIIa se convierta en un agente hemostático universal (Erhardtsen, 2002). Desafortunadamente, el factor VIIa solo tiene una semivida en plasma de poco más de 2 horas y por lo tanto se tiene que volver a administrar con frecuencia, volviendo dicha terapia invasiva y muy costosa.

45 Existe, por ello una necesidad actual de factores de coagulación mejorados, especialmente de aquellos que son agentes hemostáticos de actividad correctora. Los agentes hemostáticos de actividad correctora son sustancias que permiten que se produzca la coagulación cuando se administran a pacientes en los que ciertos factores de coagulación están ausentes, no son funcionales o están bloqueados por anticuerpos inhibidores. La actividad de estos compuestos para corregir bloqueos en la cascada de la coagulación (actividad hemostática correctora) se puede medir mediante ensayos de coagulación conocidos en la técnica. Los agentes de actividad correctora esencialmente
50 hemostáticos tienen la capacidad de activar los sustratos de un factor de coagulación ausente, no funcional o bloqueado, u otros sustratos en la cascada de la coagulación "aguas abajo" del factor de coagulación ausente, no funcional o bloqueado, de una forma directa de tal manera que el factor de coagulación ausente, no funcional o bloqueado ya no es necesario para la generación eficaz de trombina.

También el factor X ha sido objeto de una extensa investigación.

55 El ADNc del factor X se ha caracterizado (Leytus et al. 1984, PNAS, 82: 3699-3702). El factor X de coagulación es una glicoproteína dependiente de la vitamina K con un peso molecular de 58,5 kDa, que es secretada desde las células hepáticas en el plasma, como un zimógeno. Inicialmente, el factor X se produce como un prepro péptido con un péptido señal que consiste en un total de 488 aminoácidos. El péptido señal se separa por escisión con la pepti-

5 dasa señal durante la exportación al retículo endoplasmático, la secuencia del propéptido se separa por escisión después de tener lugar la carboxilación gamma en los primeros 11 residuos del ácido glutámico en el extremo N-terminal de la cadena N-terminal madura. Una etapa de procesamiento adicional se produce mediante la escisión entre Arg182 y Ser183. Esta etapa del procesamiento también conduce de forma concomitante a la delección del tripéptido Arg180-Lys181-Arg182. El zimógeno del factor X secretado resultante consta de una cadena ligera N-terminal de 139 aminoácidos (M_r 16,200) y una cadena pesada C-terminal de 306 aminoácidos (M_r 42,000) que están ligadas covalentemente a través de un puente de disulfuro entre Cys172 y Cys342. Otras etapas de procesamiento posteriores a la traducción incluyen la β -hidroxilación de Asp103, así como la glicosilación de tipo N y O.

10 Tanto el factor VIIIa/factor IXa o el factor VIIa/FT son capaces, en condiciones fisiológicas, de activar el factor X en las superficies de plaquetas activadas mediante la escisión carboxi-terminal a Arg234, liberando de este modo el denominado péptido de activación de 52 aminoácidos desde Ser183 a Arg234.

15 En una escisión autocatalítica, el factor X activado (factor Xa) separa por escisión un pequeño fragmento en el extremo C-terminal de su cadena pesada carboxi-terminal a Arg464, lo que conduce al factor Xa β . Sin embargo, la relevancia fisiológica de esta escisión no está clara ya que ambas formas del factor Xa tienen actividades catalíticas comparables.

Se han realizado diversos intentos de modificar el factor X:

20 Wolf et al. 1991 (JBC, 266, n° 21, págs. 13726-13730) deleccionaron el péptido de activación del factor X, sustituyéndolo con el dipéptido Arg-Lys que lleva a la introducción de 2 nuevos sitios de consenso de escisión de furina dentro de la región del péptido de activación del factor X. Tales variantes del factor X ya están activadas durante el procesamiento intracelular lo que conduce de este modo a la secreción de factor X activado.

Wolf et al. 1995 (Blood. 86. págs. 4153-4157) produjeron variantes inactivas aciladas del factor Xa, que se desacilan lentamente después de la inyección en el plasma sanguíneo generando de ese modo factor X activado con el paso del tiempo.

25 Rudolph et al. 1997 (Prot. Express and Puri. 10: 373-378) modificaron el factor X en la región del sitio de escisión del propéptido y encontraron que la sustitución de Thr39 por Arg mejoraba considerablemente la eficacia del procesamiento del propéptido en un cultivo celular.

30 Camire et al. 2000 (Biochemistry. 39 págs.14322-14329) consiguieron un mayor grado de carboxilación gamma en un cultivo celular mediante la sustitución del prepropéptido del factor X por el de trombina. Sin embargo, aunque la tasa de carboxilación gamma aumentó, un 10-30% del factor X se mantuvo sin carboxilar.

Rudolph et al. 2002 (Thromb Haemost., 88:756-62) crearon variantes del factor X con el péptido de activación deleccionado. Se pudo observar que tales variantes del factor X se activaban automáticamente de una manera independiente del cofactor y el artículo llega a la conclusión de que la función primaria del péptido de activación es evitar una activación falsa de FX.

35 Thiec et al. 2003 (JBC, 12. págs. 10393-10399) sustituyeron el dominio Gla y el primer dominio de EGF del factor X por el dominio correspondiente de FIX para investigar la capacidad de tales quimeras para interactuar de manera productiva con el complejo FT/FVIIa.

40 El documento WO 98/38317 (Prioridad: 27 de Febrero 1997) reivindica análogos del factor X con una modificación en el sitio natural de escisión para la activación entre Gly228 e Ile235 de modo que proteasas que no activan de forma natural el factor X, pueden escindir y activar tales análogos del factor X.

El documento WO 98/38318 (Prioridad: 27 de Febrero 1997) describe análogos del factor X en los que se eliminan los aminoácidos Arg180 a Arg234 y los aminoácidos de Gly173 a Arg179 se modifican de tal manera que proteasas, que no activan naturalmente FX, pueden escindir la secuencia modificada activando de este modo los análogos del factor X descritos anteriormente.

45 El documento WO 01/10896 (Prioridad: 10 de Agosto 1999) describe análogos del factor X, que tienen sustituciones de al menos uno de los aminoácidos entre Glu226 e Ile235. En el ejemplo se muestra la introducción de un sitio de escisión para la activación obtenido a partir de FIX que hace que la variante del factor X se pueda escindir con FXI.

50 El documento WO 03/035861 (Prioridad: 19 de Octubre 2001) reivindica variantes del factor X en las que el péptido de activación se ha eliminado y se ha reemplazado por los aminoácidos P₁₀ a P₁ de fibrinopéptido A, creando un sitio de escisión quimérico para trombina, haciendo que esta variante del factor X se pueda activar con trombina.

El documento WO 2004/005347 (Prioridad: 3 de Julio 2002) describe variantes del factor X que se pueden activar con trombina modificando los residuos P₃-P₂-P₁-P₁'-P₂'-P₃' que son en el factor X de tipo silvestre Leu-

Thr-Arg-Ile-Val-Gly a X-Pro-Arg-Ala-Y-Z.

Volkel et al. (2005). Mol. Biotechnol. 29(1):19-30 describen la introducción de un nuevo sitio de escisión para proteasa en el péptido de activación de FX, de tal manera que el antígeno específico de la próstata activa específicamente dicha variante de FX.

5 Aunque algunos autores han sugerido que el factor X activado (FXa) se podría utilizar como un agente hemostático de actividad correctora (Ni et al., 1992 (Thromb. Haemost. 67:264-271); Himmelspach et al., 2002 (Thromb. Haemost. 88:1003-1011)), sigue habiendo alguna preocupación porque tales preparaciones farmacéuticas pueden ser trombogénicas y podrían conducir a una coagulación intravascular diseminada (CID).

10 El uso terapéutico del zimógeno del factor X no activado parece ser un enfoque mucho más seguro. El documento de patente de EE.UU. 4,501,731 (prioridad de 27 de junio 1983) sugiere el uso del factor X solo como un agente hemostático de actividad correctora. En el documento WO 03/006054 (prioridad: 10 de julio 2001) se ha mostrado además que el factor X es capaz en composiciones farmacéuticas, en combinación con FVIIa, de mejorar sinérgicamente la eficacia hemostática de FVIIa.

15 Sin embargo, como la eficacia de la activación del factor X a través de la vía intrínseca de la coagulación se ve gravemente comprometida en pacientes con inhibidores, mientras que la vía extrínseca de la coagulación (debido a la disponibilidad limitada de factor tisular) parece estar limitada a la fase de iniciación de la coagulación, es ventajoso modificar el factor X de tal manera que se facilite su activación en situaciones en las que se necesite una coagulación y evitar la necesidad de cofactores con disponibilidad y/o actividad limitadas. El zimógeno de la variante del factor X debe ser estable para que pueda ser producido y administrado sin activación, pero que en caso de que sea necesaria una actividad coagulante (por ejemplo, generación de trombina), la activación se produzca a velocidades más elevadas sin necesidad de los activadores naturales de la vía intrínseca y la extrínseca de la coagulación.

20 Se ha descrito que varios autores intentaron generar análogos del factor X que se pueden activar con proteasas que no escinden de forma natural ni activan FX. Los análogos del factor X presentaron delecciones del péptido de activación o una modificación de la secuencia del péptido de activación anterior al sitio de escisión en Arg234. Estos análogos del factor X, sin embargo, exhiben una actividad hemostática correctora insuficiente.

25 Uno de los problemas abordados en la presente invención es identificar agentes hemostáticos de actividad correctora. En particular, existe una necesidad de agentes hemostáticos de actividad correctora, que se puedan utilizar para tratar pacientes que tienen un título elevado de inhibidores del factor VIII.

30 En la presente invención se ha descubierto sorprendentemente que las variantes del factor X humano biológicamente activas que tienen una actividad hemostática correctora mejorada (figura 1) se puede obtener (i) modificando el péptido de activación del factor X, representando dicha modificación un sitio de escisión de una proteasa que no está presente en el péptido de activación del factor X de tipo silvestre, y (ii) donde el número de aminoácidos entre los residuos correspondientes a Arg179 e Ile235 se reduce 10-48 aminoácidos respecto al factor X de tipo silvestre tal como se ilustra en la Figura 2 y donde la variante del factor X tiene una actividad hemostática correctora mejorada.

35 La secuencia de ADNc que codifica el factor X de tipo silvestre y la secuencia de aminoácidos del factor X de tipo silvestre se muestran en la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2, respectivamente. La numeración de los aminoácidos dentro de la secuencia del factor X según se utiliza en esta solicitud se refiere a la numeración de aminoácidos de la secuencia de tipo silvestre que se muestra en la SEQ ID NO:2.

40 La variante del factor X de acuerdo con la presente invención se activa al escindir el sitio de procesamiento de una proteasa recién introducido por acción de una proteasa capaz de escindir dicho sitio de procesamiento de una proteasa. Normalmente, la variante del factor X de la presente invención no puede ser activada por proteasas intracelulares tales como la furina. Por consiguiente, la variante del factor X de la presente invención normalmente no es procesada en forma del factor Xa durante su expresión en células hospedadoras, al contrario que la variante descrita por Wolf et al. 1991 (JBC, 266, n.o 21, págs. 13726-13730). Normalmente, la variante del factor X de la presente invención se ha de administrar a un paciente en una forma no activada y la activación en forma del factor Xa solamente ocurre después de su administración dentro del cuerpo del paciente.

45 El número de aminoácidos definido anteriormente, respecto al factor X de tipo silvestre, se reduce 10-48 aminoácidos, más preferentemente 20-47 aminoácidos, aún más preferentemente 30-47 aminoácidos, con mayor preferencia 38-47 aminoácidos (p. ej., 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 o 46 aminoácidos).

50 La reducción en el número de aminoácidos se puede deber a la delección de uno o más aminoácidos entre los residuos correspondientes a Arg179 e Ile235. Puede haber mutaciones adicionales que incluyen, pero no se limitan a, sustituciones e inserciones respecto a la secuencia de aminoácidos del factor X de tipo silvestre.

55 La expresión "sitio de procesamiento de una proteasa", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una secuencia de aminoácidos que es reconocida y escindida por una proteasa. El enlace químico que es escindido eventualmente por la proteasa puede encontrarse en una posición interna dentro del sitio de procesamiento o en C-terminal respec-

to al sitio de procesamiento. A modo de ejemplo, si el sitio de procesamiento es TQSFNDFTR (SEQ ID NO:3), la escisión real puede ocurrir en C-terminal a la arginina en esa secuencia. Preferentemente, el nuevo sitio de procesamiento se sitúa en la región C-terminal del péptido de activación modificado, p. ej., en la región en la que se encuentra el sitio de procesamiento de activación del factor X de tipo silvestre.

5 La escisión por dicha proteasa del sitio de procesamiento de una proteasa conduce a la activación de la variante del factor X.

En otro aspecto de la presente invención, el péptido de activación del factor X natural en las variantes del factor X se modifica de forma tal que las proteasas, que activan de forma natural el factor X, ya no son capaces de escindir ni activar dicha variante del factor X. Esto se puede conseguir introduciendo mutaciones en la secuencia del péptido de activación del factor X. Las mutaciones incluyen inserciones, deleciones y sustituciones. Se prefieren las deleciones y/o sustituciones en la secuencia del péptido de activación de manera que las proteasas, que activan de forma natural el factor X, ya no son capaces de escindir ni activar dicha variante del factor X, de modo que la activación solo ocurre a través del nuevo sitio de procesamiento de una proteasa. Más preferentemente que el sitio de procesamiento de una proteasa presente en el péptido de activación del factor X de tipo silvestre se reemplace con un sitio de procesamiento de una proteasa para una proteasa que no escinde ni activa de forma natural el factor X de tipo silvestre.

De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, el nuevo sitio de procesamiento de una proteasa en el péptido de activación de la variante del factor X modificada puede ser escindido por una serina-proteasa. Más preferentemente, la serina-proteasa se selecciona del grupo constituido por el factor IIa, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, proteína C activada, elastasa o calicreína.

Las proteínas que son escindidas por una proteasa adecuada y comprenden un sitio de procesamiento de una proteasa adecuado incluyen factores de coagulación y serpinas como el factor VII, factor IX, antitrombina III, factor II, factor VIII, factor XI, factor XII, precalicreína y los expertos en la técnica conocen sus secuencias de aminoácidos (véase infra). En la invención también se contemplan variaciones de estos sitios de procesamiento siempre que sigan siendo escindibles por la proteasa escisora. Las variantes incluyen sustituciones, deleciones e inserciones de aminoácidos, y combinaciones de estas.

Las secuencias de aminoácidos adecuadas que comprenden secuencias de aminoácidos que pueden ser reconocidas y escindidas por serina-proteasas se indican en los siguientes apartados (i)-(iv):

(i) una secuencia de aminoácidos que se deriva de FVII y puede ser escindida por, p. ej., el factor Xa, es la secuencia de aminoácidos de LEKRNASKPQGR (SEQ ID NO:5). Otros ejemplos de secuencias de aminoácidos que se derivan de FVII y pueden ser escindidas por, p. ej., el factor Xa, son las secuencias de aminoácidos constituidas por los aminoácidos 2-12 de la SEQ ID NO:5;

los aminoácidos 3-12 de la SEQ ID NO:5;
 los aminoácidos 4-12 de la SEQ ID NO:5;
 los aminoácidos 5-12 de la SEQ ID NO:5;
 los aminoácidos 6-12 de la SEQ ID NO:5;
 los aminoácidos 7-12 de la SEQ ID NO:5; o
 los aminoácidos 8-12 de la SEQ ID NO:5.

(ii) Una secuencia de aminoácidos que se deriva de FIX y puede ser escindida por, p. ej., FXIa, es la secuencia de aminoácidos AETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTR (SEQ ID NO:6). Otros ejemplos de secuencias de aminoácidos que se derivan de FVII y que pueden ser escindidas por, p. ej., FXIa, son las secuencias de aminoácidos constituidas por los aminoácidos

2-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 3-35 de la SEQ ID NO:6;

los aminoácidos 4-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 5-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 6-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 7-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 8-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 9-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 10-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 11-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 12-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 13-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 14-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 15-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 16-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 17-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 18-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 19-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 20-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 21-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 22-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 23-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 24-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 25-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 26-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 27-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 28-35 de la SEQ ID NO:6; los aminoácidos 29-35 de la SEQ ID NO:6;
 los aminoácidos 30-35 de la SEQ ID NO:6; or los aminoácidos 31-35 de la SEQ ID NO:6.

(iii) una secuencia de aminoácidos que se deriva de la antitrombina III y que puede ser escindida por, p. ej., el factor IIa, es la secuencia de aminoácidos GSEAAASTAVVIAGRS (SEQ ID NO:7). Otros ejemplos de secuencias de aminoácidos que se derivan de la antitrombina III y que pueden ser escindidas por, p. ej., el factor IIa, son fragmentos de SEQ ID NO:7 que son escindibles por una proteasa que es capaz de escindir la antitrombina III.

- 5 (iv) Otros ejemplos no limitantes de sitios de escisión de una proteasa son secuencias de aminoácidos que pueden ser escindidas por el factor IIa, factor IXa, factor Xa, factor XIIa, proteína C activada, elastasa o calicreína. Las secuencias de aminoácidos que son reconocidas y escindidas por estas proteasas de serina son conocidas por un experto normal en la técnica (por ejemplo, tal y como se describe en "Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice", cuarta edición, Colman et al. 2001 factor IIa: p34-35, p176, factor IXa: p40-41, factor Xa: p34-35, factor XIa p128-129, factor XIIa: p194, aPC: p34-35, p159, calicreína: p103-104 o elastasa (O'Reilly et al., 1999; "Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin": Science, 285,1926-1928).

Los fragmentos de sitios de escisión de una proteasa también están contemplados por la invención, siempre que la variante de FX que comprende dicho sitio de escisión fragmentado de una proteasa siga siendo susceptible a la escisión y dicha variante de FX siga teniendo actividad biológica.

- 15 En un aspecto preferido, la variante del factor X de la invención comprende una secuencia de aminoácidos en la que los aminoácidos de la Ser183 a la Arg234 de la SEQ ID NO:2 han sido reemplazados con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:5 a la 7 o con un fragmento de estas tal como se ha descrito anteriormente en la presente en cualquiera de los apartados (i), (ii) y (iii). Más preferentemente una variante del factor X que comprende una secuencia de aminoácidos del factor X en la que los aminoácidos de la Ser183 a la Arg234 de la SEQ ID NO:2 han sido reemplazados con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:3. Las secuencias de aminoácidos completas de las variantes del factor X más preferidas se muestran en la SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:9.

- También se contemplan en la presente invención realizaciones en las que se ha introducido un nuevo sitio de procesamiento tal como se ha definido anteriormente en la cadena pesada de la molécula del factor X. El sitio de procesamiento de una proteasa introducido en la cadena pesada puede ser un sitio de procesamiento adicional además del sitio de procesamiento de una proteasa presente en el péptido de activación modificado o puede estar presente en vez del sitio de procesamiento de una proteasa en el péptido de activación modificado. Se realizan inserciones en la cadena pesada preferentemente en C-terminal a Ile235 o un residuo correspondientes (p. ej., Val). Las inserciones en la cadena pesada del factor X se describen detalladamente en la solicitud de patente europea n.o 05011773,8 presentada el 1 de junio de 2005.

- Las variantes del factor X de la invención tienen actividad biológica. La expresión "actividad biológica", tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a actividad de factor X. Una proteína que tiene actividad de factor X significa que la proteína en su forma de zimógeno se puede activar mediante escisión con una proteasa y tiene en su forma activada, actividad de factor Xa. La actividad de factor X se puede determinar en un ensayo de coagulación *in vitro*. Por ejemplo, la actividad de factor X se puede determinar en un ensayo de tiempo de protrombina (PT) midiendo la actividad de la vía de coagulación extrínseca, tal como se describe en el Ejemplo 4. La actividad de factor X, expresada como actividad de coagulación en una muestra, se proporciona como mU/ml o U/ml.

- La actividad de factor X así determinada se puede referir a la cantidad de antígeno del factor X presente en la muestra, obteniendo de este modo la "actividad específica" de la variante, expresada de modo ejemplar en U/mg o mU/μg de proteína. La actividad específica de las variantes de la invención es preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 75% de la actividad de factor X de una molécula de factor X recombinante que tiene la secuencia de tipo silvestre tal y como se muestra en SEQ ID NO: 2.

- Las variantes del factor X de la invención tienen además una actividad hemostática correctora. Esta actividad se puede determinar tal y como se describe en el Ejemplo 4, midiendo la actividad coagulante (aPTT) usando plasma con FVIII o FIX disminuidos. La actividad coagulante en estos ensayos aumenta preferentemente más de 70 veces, más preferentemente más de 100 veces, aún más preferentemente más de 500 veces frente a la del factor X recombinante que contiene la secuencia de tipo silvestre. La actividad coagulante utilizando plasma con FVIII disminuido aumenta preferentemente más de 200 veces, más preferentemente más de 300 veces, más preferentemente más de 500 veces, aún más preferentemente más de 1000 veces o incluso más de 1500 veces frente a la del factor X recombinante que contiene la secuencia de tipo silvestre. La actividad coagulante utilizando plasma con FIX disminuido aumenta preferentemente más de 100 veces, más preferentemente más de 200 veces, aún más preferentemente más de 500 veces o más de 1000 frente a la del factor X recombinante que contiene la secuencia de tipo silvestre.

- La variante del factor X tiene una actividad correctora mejorada en presencia de inhibidores del factor VIII. Esta actividad se puede determinar tal como se describe en el ejemplo 4 infra. El tiempo de coagulación en plasma que contiene inhibidores de FVIII (p. ej., tal como se describe de acuerdo con el ejemplo 4) de la variante del factor X de esta invención se reduce al menos un 25%, preferentemente al menos un 50%, más preferentemente al menos un 75% respecto al tiempo de coagulación del factor X recombinante que contiene la secuencia de tipo silvestre, cuando se ajusta a la misma actividad del factor X.

Las variantes del factor X preferidas de acuerdo con la invención son variantes del factor X que tienen una actividad hemostática correctora mejorada en comparación con las variantes del factor X descritas en la técnica anterior. Por ejemplo, las variantes del factor X de acuerdo con la invención normalmente tienen una actividad hemostática correctora significativamente mejorada en comparación con una variante del factor X que contiene la secuencia Glu226-Gln227-Ser228-Phe229-Asn230-Asp231-Phe232-Thr233-Arg234 (EQSFNDFTR=SEQ ID NO:10), respecto a la numeración de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 (la longitud del péptido de activación de dicha variante comparativa es de 52 aminoácidos, es decir, no hay delección parcial en la longitud del péptido de activación). La actividad hemostática correctora en el plasma con FVIII o FIX disminuidos aumenta en un factor de al menos 1,5, preferentemente de al menos 2, más preferentemente de al menos 5, aún más preferentemente de al menos 10, en comparación con dicha variante comparativa. El tiempo de coagulación en plasma que contiene inhibidores de FVIII (p. ej., según se determina de acuerdo con el ejemplo 4) de la variante del factor X de esta invención se reduce al menos un 25%, preferentemente al menos un 50% respecto al tiempo de coagulación de dicha variante comparativa, cuando se ajusta a la misma actividad del factor X.

En otra realización, las variantes del factor X de acuerdo con la invención tienen una actividad hemostática correctora significativamente mejorada en comparación con una variante del factor X que comprende una secuencia de aminoácidos del factor X en la que los aminoácidos 226-234 de la SEQ ID NO:2 han sido reemplazados con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:3, donde la longitud del péptido de activación en dicha variante del factor X comparativa es de 52 aminoácidos. Esta variante comparativa corresponde al constructo "535" descrito en los Ejemplos. La actividad hemostática correctora en el plasma con FVIII o FIX disminuidos aumenta en un factor de al menos 1,5, preferentemente de al menos 2, más preferentemente de al menos 5, aún más preferentemente de al menos 10, en comparación con dicha variante comparativa. El tiempo de coagulación en plasma que contiene inhibidores de FVIII (p. ej., según se determina de acuerdo con el ejemplo 4) de la variante del factor X de esta invención se reduce al menos un 25%, preferentemente al menos un 50% respecto al tiempo de coagulación de dicha variante comparativa, cuando se ajusta a la misma actividad del factor X.

Otro aspecto de la invención es un método para producir un agente hemostático corrector, que comprende modificar el péptido de activación de una secuencia del factor X de manera que el péptido de activación modificado comprenda un sitio de procesamiento de una proteasa que no está presente en la secuencia de aminoácidos de Arg179 a Arg234 del factor X de tipo silvestre, y reducir el número de aminoácidos entre los residuos correspondientes a Arg179 e Ile235 de 10 a 48 aminoácidos respecto al factor X de tipo silvestre.

Preferentemente, el nuevo sitio de escisión se encuentra en la región C-terminal del péptido de activación modificado. Las realizaciones preferidas del método de la invención corresponden a realizaciones preferidas de la variante del factor X descritas en la presente.

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica un factor X humano modificado, tal y como se describe en esta solicitud. El término "polinucleótido(s)" se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. El polinucleótido puede ser ADN monocatenario o bicatenario, ARN monocatenario o bicatenario. Tal y como se emplea en esta memoria, el término "polinucleótido(s)" incluye también ADNs o ARNs que comprenden una o varias bases modificadas y/o bases inusuales, tales como inosina. Se apreciará que se puede realizar una variedad de modificaciones en el ADN y el ARN que cumplen muchas funciones útiles, conocidas por los expertos en la técnica. El término "polinucleótido(s)", tal y como se emplea en este documento, abarca tales formas de polinucleótidos modificados de forma química, enzimática o metabólica, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo, por ejemplo, células simples y complejas.

El experto en la materia comprenderá que debido a la degeneración del código genético, un polipéptido dado puede estar codificado por diferentes polinucleótidos. Estas "variantes" están incluidas en esta invención.

Preferiblemente, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido aislado. El término polinucleótido "aislado" se refiere a un polinucleótido que está sustancialmente exento de otras secuencias de ácidos nucleicos, tales como y sin estar limitadas a las mismas, otros ADNs y ARNs cromosómicos y extracromosómicos. Los polinucleótidos aislados se pueden purificar a partir de una célula hospedadora. Los métodos de purificación convencionales de ácido nucleico conocidos por los expertos en la técnica se pueden utilizar para obtener polinucleótidos aislados. El término también incluye polinucleótidos recombinantes y polinucleótidos sintetizados químicamente.

Aún otro aspecto de la invención es un plásmido o un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el plásmido o el vector es un vector de expresión. En una realización particular, el vector es un vector de transferencia para uso en terapia génica humana.

Todavía otro aspecto de la invención es una célula hospedadora que comprende un polinucleótido de la invención o un plásmido o un vector de la invención.

Las células hospedadoras de la invención se pueden emplear en un método para producir una variante del factor X humano, que es parte de esta invención. El método comprende:

- a) cultivar células hospedadoras de la invención en condiciones tales que la variante del factor X se expresa;

y

b) recuperar opcionalmente la variante del factor X humano a partir de las células hospedadoras o del medio de cultivo.

5 El grado y la ubicación de la glicosilación o de otras modificaciones posteriores a la traducción pueden variar dependiendo de las células hospedadoras escogidas y de la naturaleza del entorno celular del hospedador. Cuando se hace referencia a secuencias específicas de aminoácidos, las modificaciones posteriores a la traducción de tales secuencias están incluidas en esta solicitud.

10 El "factor X", tal y como se usa en esta solicitud significa un producto que consiste en la forma no activada (factor X). El "factor X" de la definición anterior incluye proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos del factor X humano natural. También incluye proteínas con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal modificado que incluye deleciones o adiciones de aminoácidos N-terminales, siempre que esas proteínas conserven sustancialmente la actividad de factor Xa. El "factor X" de la definición anterior también incluye variaciones alélicas naturales que pueden existir y presentarse de un individuo a otro. El "factor X" de la definición anterior incluye además variantes del factor X. Tales variantes difieren en uno o varios residuos de aminoácidos de la secuencia de tipo silvestre. Ejemplos de tales diferencias pueden incluir el truncamiento del extremo N-terminal y/o C-terminal a través de uno o varios residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1 a 10 residuos de aminoácidos), o la adición de uno o varios residuos extra en el extremo N-terminal y/o C-terminal, por ejemplo, la adición de un residuo de metionina en el extremo N-terminal, así como sustituciones conservadoras de aminoácidos, es decir, sustituciones realizadas dentro de grupos de aminoácidos con características similares, por ejemplo, (1) aminoácidos pequeños, (2) aminoácidos ácidos, (3) aminoácidos polares, (4) aminoácidos básicos, (5) aminoácidos hidrófobos, (6) aminoácidos aromáticos. Ejemplos de tales sustituciones conservadoras se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1:

| | | | | |
|------|-----------------|-----------------|------------|--------|
| (1) | Alanina | Glicina | | |
| (2) | Ácido aspártico | Ácido glutámico | | |
| (3a) | Asparagina | Glutamina | | |
| (3b) | Serina | Treonina | | |
| (4) | Arginina | Histidina | Lisina | |
| (5) | Isoleucina | Leucina | Metionina | Valina |
| (6) | Fenilalanina | Tirosina | Triptófano | |

25 El término "recombinante" significa, por ejemplo, que la variante se ha producido en un organismo hospedador mediante técnicas de ingeniería genética. La variante del factor X de esta invención es normalmente una variante recombinante del factor X.

Expresión de las variantes propuestas:

30 La producción de proteínas recombinantes a niveles elevados en células hospedadoras adecuadas, requiere el ensamblaje de los ADNc modificados mencionados anteriormente en las unidades transcripcionales eficaces, junto con elementos reguladores adecuados, en un vector de expresión recombinante que se pueden propagar en diferentes sistemas de expresión de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los elementos reguladores de la transcripción eficaces se podrían obtener a partir de virus que tienen células animales como hospedadores naturales de los mismos o a partir del ADN cromosómico de células animales. Preferiblemente, se pueden utilizar las combinaciones de promotor-potenciador obtenidas a partir del virus de simio 40, adenovirus, virus de polioma BK, citomegalovirus humano o la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, o combinaciones de promotor-potenciador que incluyen genes transcritos ampliamente de forma constitutiva en células animales, como beta-actina o GRP78. Con el fin de lograr niveles altos estables de ARNm transcrito a partir de los ADNc, la unidad transcripcional debe contener en su parte 3' proximal, una región de ADN que codifica una secuencia de terminación de la transcripción-poliadenilación. Preferiblemente, esta secuencia se obtiene a partir de la región de transcripción temprana del virus de simio 40, del gen de beta-globina de conejo o del gen activador de plasminógeno tisular humano.

40 Los ADNc se integran a continuación en el genoma de una línea celular hospedadora adecuada para la expresión de la variante del factor X. Preferiblemente, esta línea celular debería ser una línea celular animal de origen vertebrado a fin de asegurar un plegamiento correcto, una síntesis del dominio Gla, una formación de enlace disulfuro, una gli-

cosilación ligada a asparagina, una glicosilación ligada a O, y otras modificaciones posteriores a la traducción, así como la secreción en el medio de cultivo. Ejemplos de otras modificaciones posteriores a la traducción son la hidroxilación y el procesamiento proteolítico de la cadena de polipéptido naciente. Ejemplos de líneas celulares que se pueden utilizar son células COS de mono, células L de ratón, células C127 de ratón, células BHK-21 de hámster, células 293 embrionarias humanas de riñón y células CHO de hámster.

El vector de expresión recombinante que codifica los ADNc correspondientes se puede introducir en una línea celular animal de varias formas diferentes. Por ejemplo, los vectores de expresión recombinantes se pueden crear a partir de vectores basados en diferentes virus animales. Ejemplos de éstos son vectores basados en baculovirus, virus vaccinia, adenovirus y preferentemente virus del papiloma bovino.

Las unidades de transcripción que codifican los ADNc correspondientes también se pueden introducir en células animales junto con otro gen recombinante que puede actuar como un marcador seleccionable dominante en estas células, con el fin de facilitar el aislamiento de clones de células específicas que han integrado el ADN recombinante en su genoma. Ejemplos de este tipo de genes marcadores seleccionables dominantes son la fosfotransferasa de amino-glicósido Tn5, que confiere resistencia a la geneticina (G418), la fosfotransferasa de higromicina, que confiere resistencia a la higromicina, y la acetil transferasa de puromicina, que confiere resistencia a la puromicina. El vector de expresión recombinante que codifica un marcador seleccionable de este tipo puede residir ya sea en el mismo vector que el que codifica el ADNc de la proteína deseada, o puede estar codificado en un vector distinto que se introduce simultáneamente y se integra en el genoma de la célula hospedadora, dando como resultado frecuentemente una ligación física fuerte entre las diferentes unidades de transcripción.

Otros tipos de genes marcadores seleccionables, que se pueden utilizar junto con el ADNc de la proteína deseada, se basan en diversas unidades de transcripción que codifican la reductasa de dihidrofolato (dhfr). Después de la introducción de este tipo de gen en células que carecen de actividad dhfr endógena, preferentemente células CHO (DUKX-B11, DG-44), será posible que crezcan en medios que carecen de nucleósidos. Un ejemplo de un medio de este tipo es F12 de Ham sin hipoxantina, timidina y glicina. Estos genes dhfr se pueden introducir junto con unidades de transcripción de ADNc del factor de coagulación en células CHO del tipo anterior, ligados en el mismo vector o en diferentes vectores, creando de este modo líneas celulares positivas para dhfr que producen proteína recombinante.

Si las líneas celulares anteriores se cultivan en presencia de metotrexato citotóxico inhibidor de dhfr, se pondrán de manifiesto nuevas líneas celulares resistentes al metotrexato. Estas líneas celulares pueden producir proteína recombinante con una tasa incrementada debido al número amplificado de dhfr ligada y las unidades de transcripción de la proteína deseada. Cuando estas líneas celulares se propagan en concentraciones crecientes de metotrexato (1-10000 nM), se pueden obtener nuevas líneas celulares que producen la proteína deseada con una tasa muy elevada.

Las líneas celulares anteriores que producen la proteína deseada se pueden cultivar a gran escala, ya sea en cultivo en suspensión o sobre diversos soportes sólidos. Ejemplos de estos soportes son microsoportes que se basan en matrices de dextrano o de colágeno, o soportes sólidos en forma de fibras huecas o diversos materiales cerámicos. Cuando se cultiva en un cultivo celular en suspensión o en microsoportes, el cultivo de las líneas celulares anteriores se puede realizar ya sea como un cultivo en un baño o como un cultivo por perfusión, con una producción continua de medio condicionado durante periodos de tiempo prolongados. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, las líneas celulares anteriores son muy adecuadas para el desarrollo de un procedimiento industrial para la producción de las proteínas recombinantes deseadas.

La proteína recombinante, que se acumula en el medio de células secretoras de los tipos anteriores, se puede concentrar y purificar mediante una variedad de métodos bioquímicos y cromatográficos, incluyendo métodos que utilizan diferencias en el tamaño, la carga, la hidrofobicidad, la solubilidad, la afinidad específica, etc., entre la proteína deseada y otras sustancias en el medio de cultivo celular.

Un ejemplo de tal purificación es la adsorción de la proteína recombinante a un anticuerpo monoclonal, que está inmovilizado sobre un soporte sólido. Después de la desorción, la proteína se puede purificar adicionalmente por una variedad de técnicas cromatográficas basadas en las propiedades anteriores.

Se prefiere purificar la variante modificada del factor X biológicamente activa de la presente invención hasta tener $\geq 80\%$ de pureza, más preferiblemente $\geq 95\%$ de pureza, y se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente puro, que es superior a 99,9% puro con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y está exento de agentes infecciosos y pirógenos. Preferiblemente, una variante modificada del factor X biológicamente activa, aislada o purificada de la invención está sustancialmente exenta de otros polipéptidos.

Las proteínas recombinantes descritas en esta invención se pueden formular en preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. Las proteínas purificadas se pueden disolver en soluciones tampón acuosas fisiológicamente compatibles convencionales a las que se puede añadir, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas.

Tales vehículos y excipientes farmacéuticos así como formulaciones farmacéuticas adecuadas son bien conocidos

en la técnica (véase, por ejemplo, "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)). En particular, la composición farmacéutica que comprende la variante de polipéptido de la invención se puede formular en forma liofilizada o soluble estable. La variante de polipéptido se puede liofilizar a través de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes del uso mediante la adición de uno o varios diluyentes farmacéuticamente aceptables, tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

Las formulaciones de la composición se suministran al individuo a través de cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen varios sistemas de entrega y se pueden utilizar para administrar la composición por cualquier vía conveniente. Preferentemente las composiciones de la invención se administran sistémicamente. Para uso sistémico, las variantes del factor X de la invención se formulan para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmica) o entérica (por ejemplo, oral, vaginal o rectal) de acuerdo con métodos convencionales. La ruta de administración más preferida es la administración intravenosa. Las formulaciones se pueden administrar continuamente mediante infusión o inyección en bolo. Algunas formulaciones incluyen sistemas de liberación lenta.

Las variantes modificadas del factor X biológicamente activas de la presente invención se administran a pacientes en una dosis terapéuticamente eficaz, lo que significa una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados, prevenir o disminuir la gravedad o la extensión del trastorno o la indicación que se está tratando, sin llegar a alcanzar una dosis que produzca efectos secundarios adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores como, por ejemplo, la indicación, la formulación, el modo de administración y se tiene que determinar en ensayos preclínicos y clínicos para cada indicación respectiva.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar sola o junto con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden incorporar como parte del mismo agente farmacéutico.

Otro aspecto de la invención es el uso de un homólogo modificado del factor X humano, tal y como se describe en el presente documento, de un polinucleótido de la invención, de un plásmido o un vector de la invención o de una célula hospedadora de la invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno de la coagulación sanguínea. Los trastornos de la coagulación sanguínea incluyen pero no se limitan a hemofilia A, hemofilia B, o déficit de FVII/FVIIa. Preferiblemente, estas enfermedades se producen por anticuerpos autoinmunes contra los factores de coagulación respectivos o las formas congénitas se agravan por anticuerpos autoinmunes contra los factores de coagulación respectivos. En una realización específica, los pacientes que se van a tratar tienen anticuerpos inhibidores contra el factor VIII. Preferiblemente, el tratamiento comprende una terapia génica humana.

La invención también se refiere a un método de tratamiento de un individuo que padece un trastorno de la coagulación sanguínea, tal como hemofilia A, hemofilia B o un déficit de FVII/FVIIa, preferiblemente estas enfermedades son causadas por anticuerpos autoinmunes contra los factores de coagulación respectivos o las formas congénitas se agravan por anticuerpos autoinmunes contra los factores de coagulación respectivos. El método comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del homólogo modificado del factor X humano, tal y como se ha descrito en el presente documento. En otra realización, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del polinucleótido de la invención o de un plásmido o vector de la invención. Alternativamente, el método puede comprender administrar al individuo una cantidad eficaz de las células hospedadoras de la invención descritas en el presente documento.

Descripción de las tablas y los dibujos:

Figura 1:

Esquema de FX de tipo silvestre y de variantes de FX con sitios de escisión para proteasa introducidos recientemente. Los números se refieren a la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO 2, en donde el péptido de activación se define como la secuencia de aminoácidos de Ser183 a Arg234. Secuencias de activación ajenas obtenidas a partir del factor IX, se describen en negrita. Los aminoácidos subrayados indican mutaciones puntuales que hacen que la molécula respectiva del factor X no se pueda activar con el complejo tenasa y el factor VIIa/factor tisular, respectivamente. La estructura artificial "pFX-532" se corresponde a la secuencia del factor X de tipo silvestre.

Figura 2:

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del factor X de tipo silvestre

Figura 3:

Vista esquemática de la cascada de coagulación que muestra cómo una variante del factor X que contiene un sitio de procesamiento de una proteasa del factor IX puede ser activada directamente por el factor XI sin necesidad de los factores de coagulación IX y VIII

Ejemplos:**Ejemplo 1: Construcción de plásmidos de expresión**

5 La secuencia que codifica el factor X se amplificó mediante PCR a partir de una genoteca de ADNc de hígado humano (Ambion) usando los cebadores We1292 y We1293 (SEQ ID NO 11 y 12). En una segunda ronda de PCR utilizando los cebadores We1354 y We1355 (SEQ ID NO 13 y 14) se introdujo un sitio de escisión para la endonucleasa de restricción NheI en el extremo 5' y un sitio de escisión para la endonucleasa de restricción NotI se introdujo en el extremo 3' del fragmento. El fragmento de PCR se insertó a continuación en los sitios NheI / NotI de pIRES-puro3 (BD Biosciences). El plásmido resultante se designó pFX-445.

10 Para mejorar el procesamiento del propéptido, el sitio de escisión se mejoró mediante la sustitución del aminoácido treonina en la posición 39 (SEQ ID NO 2) por arginina (Rudolph et al., 1997 (Protein Expression and Purification 10:373-378)). Para ello, pFX-445 fue sometido a mutagénesis dirigida al sitio utilizando los oligonucleótidos We1482 y We1483 (SEQ ID NO 15 y 16) de acuerdo con métodos convencionales (kit para mutagénesis dirigida al sitio de QuickChange XL, Stratagene). El plásmido resultante se denominó pFX-532.

15 Todas las mutaciones descritas a continuación se realizaron con un kit de mutagénesis disponible comercialmente (QuickChange XL "Site Directed Mutagenesis Kit", Stratagene).

Basándose en pFX-532, se generaron estructuras artificiales con sitios de escisión para el factor XIa. La mutagénesis por sustitución utilizando los oligonucleótidos We1444 y We1445 (SEQ ID NO 17 y 18) dio como resultado el plásmido pFX-535 con una sustitución de 8 aminoácidos de la región de activación del factor X (aminoácidos 225-233 de SEQ ID NO 2) por 8 aminoácidos de la región de activación de FIX.

20 La mutagénesis dirigida al sitio que emplea los oligonucleótidos We1567 y We1568 (SEQ ID NO 19 y 20) en pFX-532, se utilizó para generar el plásmido pFX-641. Contenía dos mutaciones en el péptido de activación del factor X, Leu232Asp y Thr233Asp, generando de este modo una molécula de factor X que no se podía activar.

25 La mutagénesis por delección utilizando los oligonucleótidos We1976 y We1977 (SEQ ID NO 21 y 22) generó el plásmido pFX-915 con delección de la secuencia del péptido de activación de FX pero manteniendo la secuencia de activación de FIX insertada (véase la figura 3).

La mutagénesis dirigida al sitio en pFX-915 utilizando los oligonucleótidos We2357 y We2358 (SEQ ID NO 23 y 24) generó el plásmido pFX-1066, donde Ile235 se reemplazó por Val y de este modo el aminoácido aminoterminal de la cadena pesada de FX se modificó en el aminoácido correspondiente de FIX.

Ejemplo 2: Transfección y expresión de moléculas modificadas del factor X

30 Los plásmidos se dejaron crecer en TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) y se purificaron utilizando protocolos convencionales (Qiagen). Las células HEK 293 se transfectaron usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se dejaron crecer en medio exento de suero (Invitrogen 293 Express) en presencia de 50 ng/ml de vitamina K y 4 µg/ml de puromicina. Aproximadamente cuatro semanas después de la transfección se recogió el material sobrenadante para la caracterización bioquímica.

Ejemplo 3: Caracterización de las variantes recombinantes del factor X

35 La expresión de las variantes del factor X se controló mediante ELISA cuantitativo usando anticuerpos monoclonales contra el factor X. La integridad de las proteínas recombinantes se analizó posteriormente mediante SDS-PAGE y transferencia Western. Las muestras se analizaron en condiciones reducidas y no reducidas. El factor X plasmático sirvió como un testigo natural del peso molecular. El factor Xa se utilizó para detectar y comparar cualquier variante recombinante activada del factor X, en caso de activación automática. Tal y como se visualizaba en transferencias Western, todas las variantes recombinantes del factor X se expresaron con el peso molecular correcto de aproximadamente 58 kDa, y migraron a una posición comparable a la del factor X plasmático. Cuando se reducían, las variantes recombinantes del factor X se disgregaban en una cadena pesada (HC) de aproximadamente 40 kDa y una cadena ligera (LC) de aproximadamente 20 kDa. La banda de 58 kDa representaba un factor X de una sola cadena sin procesar (OC). No se detectó ni factor Xa ni ningún agregado del factor X en las transferencias Western. Las variantes del factor X de la invención se visualizaron en transferencias Western como moléculas monocatenarias no procesadas con pesos moleculares de aproximadamente 49 kDa. Esto se cumple tanto para las formas no reducidas como reducidas.

Ejemplo 4: Investigación de las actividades *in vitro* de las variantes recombinantes del factor X en plasmas que carecen de factor X humano, factor VIII humano y factor IX humano, así como en plasma inhibidor del factor X humano

50 La actividad del factor X se determinó en un ensayo de tiempo de protrombina (PT) midiendo la actividad de la vía de coagulación extrínseca. Se mezclaron 100 µl de plasma carente de factor X con 100 µl de material sobrenadante de un cultivo celular de variante del factor X o de proteína purificada. Después de una incubación durante 60 segun-

dos a 37°C, 200 µl de Thromborel (Dade Behring), que contenían tromboplastina obtenida a partir de plasma humano, CaCl₂ y fosfolípidos, se añadieron a la mezcla y se determinó el tiempo de coagulación en segundos mediante el uso de un temporizador de la coagulación de Schnittger & Gross. Para la determinación de la actividad del factor X, el ensayo se calibró usando un patrón del factor X plasmático. El material sobrenadante del cultivo celular de pFX641 con factor X mutado, puede servir como testigo negativo para este ensayo. Este mutante alberga un sitio de escisión inutilizado dentro del péptido de activación del factor X de tipo silvestre. Como era de esperar, cuando el mutante se sometió a ensayo con niveles de antígeno equivalentes a 216,4 U/ml de factor X, la actividad de coagulación alcanzó solo 0,5 mU/ml.

El factor X recombinante de tipo silvestre obtenido a partir de pFX532, así como las variantes de factor X obtenidas a partir de pFX535, pFX915, y pFX1066 se purificaron. El antígeno determinado por ELISA utilizando anticuerpos específicos para las concentraciones de antígeno del factor X en el intervalo de 1,1 hasta 4,3 U/ml. Para excluir la perturbación de la medición del factor X por el factor Xa, el factor Xa se determinó mediante un ensayo cromogénico. Todas las variantes del factor X purificadas solo contenían niveles de factor Xa de 0,023 hasta 0,103 mU/ml (Tabla 2), sin interferir significativamente con la determinación del factor X.

Con el fin de comparar entre sí las variantes expresadas del factor X, se determinaron las actividades coagulantes del factor X y se ajustaron a aproximadamente 1,5 U/ml. Todas las variantes sometidas a ensayo eran funcionalmente activas, lo que daba como resultado unas actividades coagulantes entre 1,10 y 1,72 U/ml (Tabla 2).

La funcionalidad de las variantes recombinantes del factor X en plasmas carentes de FIX y FVIII se sometió a ensayo en tiempo de protrombina parcial activado (aPTT) midiendo la actividad de la cascada de coagulación intrínseca. Se mezclaron 100 µl de plasma con FVIII o FIX disminuido con 100 µl de material sobrenadante de un cultivo celular con variante del factor X o de proteína purificada. Después de incubar durante 6 minutos a 37°C, se añadieron 100 µl de Pathromptin (Dade Behring) que contenía SiO₂, fosfolípidos y NaCl 40 mM así como 100 µl de CaCl₂ 25 mM para iniciar la reacción de coagulación. El tiempo de coagulación en segundos se determinó mediante el uso de un temporizador de la coagulación de Schnittger & Gross. La actividad se expresó como equivalentes respectivos de la coagulación de FX en comparación con plasma humano convencional.

El factor X de tipo silvestre recombinante alcanzó actividades de coagulación de solamente 6,6 mU/ml en plasma con el factor VIII disminuido y de solamente 5,8 mU/ml en plasma con FIX disminuido, como cabía esperar. En cambio, las variantes del factor X de la invención alcanzaron actividades de coagulación muy altas comprendidas entre 12952,0 y 26428,0 mU/ml en plasma con el factor VIII disminuido y entre 6327,0 mU/ml y 15515,0 mU/ml en plasma con FIX disminuido. (Tabla 2).

La variante del factor X derivada de pFX535 corresponde a variantes del factor X descritas en WO 01/10896 que contienen la nueva secuencia de activación del factor IX insertada en la región del péptido de activación de FX de tipo silvestre N-terminal a Ile235, pero sin delección en la longitud del péptido de activación. Sorprendentemente, las variantes del factor X de la invención en las que el péptido de activación del tipo silvestre del factor X ha sido eliminado y reemplazado con un sitio de escisión de una proteasa novedoso, codificadas por pFX915 y pFX1066, desarrollaron actividades de coagulación muy fuertes de 6327,0 y 15515,0 mU/ml respectivamente en plasma con FIX disminuido o 12952,0 y 26428,0 mU/ml respectivamente en plasma con FVIII disminuido (Tabla 2).

La determinación de la actividad funcional se llevó a cabo adicionalmente usando plasma que contenía inhibidor de FVIII procedente de un paciente con hemofilia A. El plasma del paciente contenía aproximadamente 300 unidades Bethesda de inhibidores de FVIII por ml. La coagulación se determinó en aPTT y las muestras se ajustaron a la coagulación del factor X, tal y como se ha descrito anteriormente.

Mientras que el testigo de tampón de la muestra utilizado para la dilución de los patrones y las muestras de ensayo alcanzaba tiempos de coagulación de 156,5 segundos, el factor X recombinante de tipo silvestre llegó a tiempos de coagulación de 111,4 segundos. Confirmando los resultados sorprendentes en el ensayo de coagulación de FVIII o FIX basado en plasma con FVIII o FIX disminuidos, las variantes del factor X de la invención codificadas por pFX915 y pFX1066 alcanzaron en un ensayo FEIBA basado en un plasma que contenía anticuerpos inhibitorios de FVIII, tiempos de coagulación de 21,4 y 21,1 segundos, respectivamente, siendo significativamente más cortos que los tiempos de coagulación obtenidos cuando se utilizó la variante del factor X codificada por pFX535 (Tabla 2).

Resumiendo, se mostró que las variantes del factor X eran funcionalmente activas como agentes hemostáticos de actividad correctora, y que estas variantes del factor X mostraban actividad coagulante en el plasma de pacientes con hemofilia A que contenía inhibidores del factor VIII. Para nuestra sorpresa, variantes del factor X codificadas por pFX915 y pFX1066 mostraron actividades coagulantes mucho más fuertes en plasma con el factor VIII y el factor IX disminuidos, que cuando se compararon con la variante del factor X codificada por pFX535 cuando se ajustaba a los mismos equivalentes de coagulación del factor X.

Tabla 2: Determinación de las actividades de antígeno y de coagulación de pFX532, pFX535, pFX915 y pFX1066

| | Equivalencia con FX | | | Actividades correctoras | | |
|----------------------------|------------------------|----------------------|---------------------------------------|---|---|---|
| | Antígeno de FX (ELISA) | Actividad de FX (PT) | Actividad de FXa (ensayo cromogénico) | Actividad (aPPT) en plasma con FVIII disminuido | Actividad (aPPT) en plasma con FIX disminuido | Actividad FEIBA (en plasma que contiene inhibidor de FVIII) |
| Proteínas expresadas | IU/ml | IU/ml | mIU/ml | mIU/ml | mIU/ml | Tiempo de coagulación (s) |
| pFX532 (de tipo silvestre) | 4,3 | 1,72 | 0,028 | 6,6 | 5,8 | 111,4 |
| pFX535 (comparación) | 3,5 | 1,62 | 0,023 | 423,7 | 272,3 | 51,1 |
| pFX915 (ejemplo) | 1,1 | 1,28 | 0,103 | 12952,0 | 6327,0 | 21,4 |
| pFX1066 (ejemplo) | 1,4 | 1,10 | 0,028 | 26428,0 | 15515,0 | 21,1 |

Ejemplo 5: Purificación de las variantes recombinantes del factor X mediante cromatografía de afinidad con anticuerpo monoclonal

5 Las variantes recombinantes del factor X se purificaron de acuerdo con el siguiente protocolo. Anticuerpos monoclonales FX-13 (ZLB Behring), específicos del factor X, se acoplaron a Sefarosa activada con CNBr. La resina de afinidad resultante se vertió en una columna cromatográfica de Pharmacia XK 16 para formar una matriz de afinidad de 1,6 cm de diámetro y 1,8 cm de altura, lo que daba como resultado 3,6 ml de gel. La matriz de afinidad se almacenó en NaCl 2,5 M, di-sodio-hidrógeno-fosfato 10 mM. Antes de su uso, el gel se equilibró con 10 volúmenes de gel de citrato tri-sódico 20 mM, NaCl 0,15 M a pH 7,0-HCl.

10 El material sobrenadante del cultivo celular que contenía más de 100 mIU/ml de factor X-antígeno se dializó utilizando un tipo de tubo VISKING 32/36, en 2-4 l de tampón de equilibrio a 4-8°C durante una noche.

El gel de afinidad se cargó con 70 ml de material sobrenadante dializado con un caudal de 1 ml/min. El gel se lavó con 10 volúmenes de tampón de equilibrio y se eluyó posteriormente con glicina 0,1 M, pH 2,5-HCl. El material eluido se neutralizó con NaOH y se estabilizó con NaCl 1,0 M y caprilato de sodio 0,1 mg/ml.

15 Las muestras de material sobrenadante del cultivo celular de la variante del factor X, procedentes de la fracción de flujo a través y del material eluido se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior tinción con plata. Una banda proteica de 58 kDa se purificó por el método descrito anteriormente. La banda de 58 kDa se indentificó como la variante del factor X mediante transferencia Western analizada con anticuerpos anti-factor X.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ZLB BEHRING GMBH
- 20 <120> Polipéptidos del factor X de coagulación con propiedades de activación modificadas
- <130> 2006. M002-A113-EP
- <160> 24
- <170> PatentIn versión 3,3
- <210> 1
- 25 <211> 1467
- <212> ADN
- <213> Humano

<400> 1
atggggcgcc cactgcacct cgtcctgctc agtgccctcc tggtggcct cctgctgctc 60
gggaaagtc tgttcatccg cagggagcag gccacaaca tcctggcgag ggtcacgagg 120
gccattcct ttcttgaaga gatgaagaaa ggacacctcg aaagagagtg catggaagag 180
acctgctcat acgaagaggc ccgcgaggtc ttgaggaca gcgacaagac gaatgaattc 240
tggaataaat acaaagatgg cgaccagtgt gagaccagtc cttgccagaa ccagggcaaa 300
tgtaagacg gcctcgggga atacacctgc acctgtttag aaggattcga aggcaaaaac 360
tgtgaattat tcacacggaa gctctgcagc ctggacaacg gggactgtga ccagttctgc 420
cacgaggaa acgaactctgt ggtgtgctcc tgcgcccgcg ggtacacctt ggctgacaac 480
ggcaaggcct gcattcccac agggccctac ccctgtggga aacagacctt ggaacgcagg 540
aagaggtcag tggcccaggc caccagcagc agcggggagg cccctgacag catcacatgg 600
aagccatatg atgcagccga cctggacccc accgagaacc ctttcgacct gcttgacttc 660
aaccagacgc agcctgagag gggcgacaac aacctacca ggatcgtggg aggccaggaa 720
tgcaaggacg gggagtgtcc ctggcaggcc ctgctcatca atgaggaaaa cgagggtttc 780
tgtggtggaa ccattctgag cgagtcttac atcctaacgg cagcccactg tctctaccaa 840
gccaaagat tcaaggtgag ggtaggggac cggaacacgg agcaggagga gggcggtag 900
gcggtgcacg aggtggagggt ggtcatcaag cacaaccggt tcacaaagga gacctatgac 960
ttcgacatcg ccgtgctccg gctcaagacc cccatcacct tccgcatgaa cgtggcgcct 1020
gcctgcctcc ccgagcgtga ctgggccgag tccacgctga tgacgcagaa gacggggatt 1080
gtgagcggct tcgggcgcac ccacgagaag ggcggcagc ccaccaggct caagatgctg 1140
gagggtgccct acgtggaccg caacagctgc aagctgtcca gcagcttcac catcaccag 1200
aacatgttct gtgccggcta cgacaccaag caggaggatg cctgccaggg ggacagcggg 1260
ggcccgcacg tcaccgctt caaggacacc tacttctgta caggcatcgt cagctgggga 1320
gagggtctgt cccgtaaggg gaagtacggg atctacacca aggtcaccgc cttcctcaag 1380
tgatcgaca ggtccatgaa aaccaggggc ttgccaagg ccaagagcca tgccccggag 1440
gtcataacgt cctctccatt aaagtga 1467

5 <210> 2
<211> 488
<212> PRT
<213> Humana
<400> 2

ES 2 546 862 T3

Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn
 20 25 30
 Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met
 35 40 45
 Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr
 50 55 60
 Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe
 65 70 75 80
 Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln
 85 90 95
 Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys
 100 105 110
 Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu
 115 120 125
 Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln
 130 135 140
 Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn
 145 150 155 160
 Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr
 165 170 175
 Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly
 180 185 190

Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu
 195 200 205
 Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln
 210 215 220
 Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu
 225 230 235 240
 Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu
 245 250 255
 Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu
 260 265 270
 Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val
 275 280 285
 Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu
 290 300
 Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp
 305 310 315 320
 Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met
 325 330 335
 Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr
 340 345 350
 Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His
 355 360 365
 Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr
 370 375 380
 Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln
 385 390 395 400
 Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln
 405 410 415
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe
 420 425 430
 Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys
 435 440 445
 Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg
 450 455 460

Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu
465 470 475 480

Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
485

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Humana

5

<400> 3

~~Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg~~
1 5 10 15 20 25 30 35 40

<210> 4
<211> 52
<212> PRT
<213> Humana

10

<400> 4

Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile
1 5 10 15

Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro
20 25 30

Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn
35 40 45

Asn Leu Thr Arg
50

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Humana

15

<400> 5

Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg
1 5 10

<210> 6
<211> 35
<212> PRT
<213> Humana

20

<400> 6

Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala
1 5 10 15

Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp
20 25 30

Phe Thr Arg
35

25

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Humana

<400> 7

Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 8

<211> 445

5 <212> PRT

<213> Humana

<220>

<221> PROPEP

<222> (1)..(40)

10 <220>

<221> MUTAGEN

<222> (39)...(39)

<223> T39R

<400> 8

Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn
 20 25 30

Asn Ile Leu Ala Arg Val Arg Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met
 35 40 45

Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr
 50 55 60

Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe
 65 70 75 80

Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln
 85 90 95

Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys
 100 105 110

Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu
 115 120 125

Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln
 130 135 140

Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn
 145 150 155 160

Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr
 165 170 175

Leu Glu Arg Arg Lys Arg Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Ile
 180 185 190

15

Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu
 195 200 205
 Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser
 210 215 220
 Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg
 225 230 235 240
 Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly
 245 250 255
 Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr
 260 265 270
 Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro
 275 280 285
 Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp
 290 295 300
 Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly
 305 310 315 320
 Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met
 325 330 335
 Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser
 340 345 350
 Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln
 355 360 365
 Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe
 370 375 380
 Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys
 385 390 395 400
 Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu
 405 410 415
 Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys
 420 425 430
 Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
 435 440 445

<210> 9
 <211> 445
 <212> PRT

<213> Humana

<220>

<221> PROPEP

<222> (1)..(40)

5

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (39)...(39)

<223> T39R

<400> 9

Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn
 20 25 30
 Asn Ile Leu Ala Arg Val Arg Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met
 35 40 45
 Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr
 50 55 60
 Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe
 65 70 75 80
 Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln
 85 90 95
 Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys
 100 105 110
 Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu
 115 120 125
 Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln
 130 135 140
 Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn
 145 150 155 160
 Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr
 165 170 175
 Leu Glu Arg Arg Lys Arg Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val
 180 185 190
 Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu
 195 200 205
 Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser
 210 215 220

10

Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg
 225 230 235 240
 Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly
 245 250 255
 Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr
 260 265 270
 Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro
 275 280 285
 Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp
 290 295 300
 Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly
 305 310 315 320
 Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met
 325 330 335
 Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser
 340 345 350
 Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln
 355 360 365
 Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe
 370 375 380
 Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys
 385 390 395 400
 Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu
 405 410 415
 Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys
 420 425 430
 Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
 435 440 445

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Humana
 5
 <400> 10

Glu Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg
 1 5

- 5 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1292
 <400> 11
 caggacaca gtactcggcc 20
- 10 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1293
 <400> 12
 gagtgggatc tcactttaat gg 22
- 15 <210> 13
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1354
 <400> 13
 gcggctagca tggggcgccc actgcacc 28
- 20 <210> 14
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1355
 <400> 14
 gcggcggcgcg ctactttaa tggagaggac gttatg 36
- 25 <210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1482
 <400> 15
 cctggcgagg gtcaggaggg ccaattc 27
- 30 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1483
 <400> 16
 gaattgccc tcctgacct cgccagg 27
- 35 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1483
 <400> 16
 gaattgccc tcctgacct cgccagg 27
- 40 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1483
 <400> 16
 gaattgccc tcctgacct cgccagg 27
- 45 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1483
 <400> 16
 gaattgccc tcctgacct cgccagg 27

<210> 17
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1444

<400> 17
 cagacgcagc ctaccaatc atttaatgac ttactcggg tcgtgggagg 50

10 <210> 18
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1445

15 <400> 18
 cctcccacga tccgagtga gtcattaaat gattgggtag gctgcgtctg 50

<210> 19
 <211> 28
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1567

<400> 19
 ggcgacaaca acgacgacag gatcgtgg 28

25 <210> 20
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 30 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1568

<400> 20
 ccacgatcct gtcgtcgttg ttgtcgcc 28

<210> 21
 <211> 32
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1976

<400> 21
 40 gcaggaagag gaccaatca ttaatgact tc 32

<210> 22
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido de mutagénesis We1977

<400> 22
 gaagtcatca aatgattggg tctcttctct gc 32

50 <210> 23
 <211> 25
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de mutagénesis We2357

<400> 23

5 cgacttcacc cgcgtcgtgg gaggc 25

<210> 24

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido de mutagénesis We2358

<400> 24

gcctcccacg acgcggtga agtcg 25

REIVINDICACIONES

1. Una variante del factor X humano biológicamente activa que tiene una modificación en el péptido activo, resultando dicha modificación en un sitio de procesamiento de una proteasa que no está presente en la secuencia de aminoácidos de Arg179 a Arg234 del factor X de tipo silvestre, y donde el número de aminoácidos entre los residuos correspondientes a Arg179 e Ile235 se reduce de 10 a 48 aminoácidos respecto al factor X de tipo silvestre tal como se ilustra en la Figura 2 y donde la variante del factor X tiene una actividad hemostática correctora mejorada.
2. Una variante del factor X según la reivindicación 1, donde la escisión de dicho sitio de procesamiento de una proteasa por una proteasa capaz de escindir dicho sitio de procesamiento de una proteasa conduce a la activación de la variante del factor X.
3. Una variante del factor X según la reivindicación 1 o 2, donde dicha proteasa no escinde de forma natural el factor X de tipo silvestre.
4. Una variante del factor X según la reivindicación 2 o 3, donde dicha proteasa no activa de forma natural el factor X de tipo silvestre.
5. Una variante del factor X según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde el sitio de procesamiento de una proteasa permite que dicha variante del factor X sea activada por una serina-proteasa.
6. Una variante del factor X según la reivindicación 5 donde el sitio de procesamiento de una proteasa permite que dicha variante del factor X sea activada por el factor Ha, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, proteína C activada, elastasa o calicreína.
7. Una variante del factor X según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el péptido de activación modificado está constituido por 7-15 aminoácidos.
8. Una variante del factor X según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 donde dicha variante del factor X tiene una actividad hemostática correctora en comparación con una variante del factor X comparativa que comprende una secuencia de aminoácidos del factor X en la que los aminoácidos 226-234 de la SEQ ID NO:2 han sido reemplazados con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:3.
9. Una variante del factor X según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso como una sustancia farmacéutica.
10. Un polinucleótido que codifica una variante del factor X según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un plásmido o un vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 10.
12. Un plásmido o un vector según la reivindicación 11, que es un vector de expresión.
13. Un plásmido o un vector según la reivindicación 12, que es un vector de transferencia para uso en terapia génica humana.
14. Una célula hospedadora que comprende un polinucleótido según la reivindicación 10 o un plásmido o un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.
15. Un método para producir una variante del factor X según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende cultivar células hospedadoras según la reivindicación 14 en condiciones tales que la variante del factor X se expresa, y opcionalmente recuperar la variante del factor X recombinante modificada a partir de las células hospedadoras o del medio de cultivo.
16. Una composición farmacéutica que comprende una variante del factor X según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, un polinucleótido según la reivindicación 10, o un plásmido o un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.
17. El uso de una variante del factor X según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, de un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 10, de un plásmido o de un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, o de una célula hospedadora según la reivindicación 14, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno de la coagulación sanguínea.
18. El uso según la reivindicación 17, en el que el trastorno de la coagulación sanguínea es hemofilia A.
19. El uso según la reivindicación 18, en el que la hemofilia A está causada o agravada por autoanticuerpos contra FVIII.
20. El uso según la reivindicación 17, en el que el trastorno de la coagulación sanguínea es hemofilia B.

21. El uso según la reivindicación 20, en el que la hemofilia B está causada o agravada por autoanticuerpos contra FIX.
22. El uso según la reivindicación 17, en el que el trastorno de la coagulación sanguínea es un déficit de FVII y/o FVIIa.
- 5 23. El uso según la reivindicación 22, en el que el déficit de FVII y/o FVIIa está causado o agravado por autoanticuerpos contra FVII y/o FVIIa.
24. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en el que el tratamiento comprende una terapia génica humana.
- 10 25. El uso de una variante del factor X según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, de un polinucleótido según la reivindicación 10, de un plásmido o un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, o de una célula hospedadora según la reivindicación 14, para la preparación de un medicamento con propiedades procoagulantes.

Figura 1

| | .. Cadena ligera | Péptido de activación | Cadena pesada |
|-------------|-------------------------|---|-------------------------------------|
| <u>532</u> | .PYPCGKQTLERRK | SVAQATSSSSGEAPDSITWKPYDAADLDPTENPFDLLDFNQTPERGDNNLT | IVGGQECKD.. |
| <u>641</u> | .PYPCGKQTLERRK | SVAQATSSSSGEAPDSITWKPYDAADLDPTENPFDLLDFNQTPERGDNNDD | IVGGQECKD.. |
| <u>535</u> | .PYPCGKQTLERRK | SVAQATSSSSGEAPDSITWKPYDAADLDPTENPFDLLDFNQTP | TQSFNDFT IVGGQECKD.. |
| <u>915</u> | .PYPCGKQTLERRK | | TQSFNDFT IVGGQECKD.. |
| <u>1066</u> | .PYPCGKQTLERRK | | TQSFNDFT VVGGQECKD .. |

Figura 2

ADNc del factor X de tipo silvestre y secuencia de aminoácidos

| | |
|---|-----|
| atg ggg cgc cca ctg cac ctc gtc ctg ctc agt gcc tcc ctg gct ggc | 48 |
| Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly | |
| 1 5 10 15 | |
| ctc ctg ctg ctc ggg gaa agt ctg ttc atc cgc agg gag cag gcc aac | 96 |
| Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn | |
| 20 25 30 | |
| aac atc ctg gcg agg gtc acg agg gcc aat tcc ttt ctt gaa gag atg | 144 |
| Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met | |
| 35 40 45 | |
| aag aaa gga cac ctc gaa aga gag tgc atg gaa gag acc tgc tca tac | 192 |
| Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr | |
| 50 55 60 | |
| gaa gag gcc cgc gag gtc ttt gag gac agc gac aag acg aat gaa ttc | 240 |
| Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe | |
| 65 70 75 80 | |
| tgg aat aaa tac aaa gat ggc gac cag tgt gag acc agt cct tgc cag | 288 |
| Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln | |
| 85 90 95 | |
| aac cag ggc aaa tgt aaa gac ggc ctc ggg gaa tac acc tgc acc tgt | 336 |
| Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys | |
| 100 105 110 | |
| tta gaa gga ttc gaa ggc aaa aac tgt gaa tta ttc aca cgg aag ctc | 384 |
| Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu | |
| 115 120 125 | |
| tgc agc ctg gac aac ggg gac tgt gac cag ttc tgc cac gag gaa cag | 432 |
| Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln | |
| 130 135 140 | |
| aac tct gtg gtg tgc tcc tgc gcc cgc ggg tac acc ctg gct gac aac | 480 |
| Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn | |
| 145 150 155 160 | |
| ggc aag gcc tgc att ccc aca ggg ccc tac ccc tgt ggg aaa cag acc | 528 |
| Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr | |
| 165 170 175 | |
| ctg gaa cgc agg aag agg tca gtg gcc cag gcc acc agc agc agc ggg | 576 |
| Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly | |
| 180 185 190 | |
| gag gcc cct gac agc atc aca tgg aag cca tat gat gca gcc gac ctg | 624 |
| Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu | |
| 195 200 205 | |
| gac ccc acc gag aac ccc ttc gac ctg ctt gac ttc aac cag acg cag | 672 |
| Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln | |
| 210 215 220 | |
| cct gag agg ggc gac aac aac ctc acc agg atc gtg gga ggc cag gaa | 720 |
| Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu | |
| 225 230 235 240 | |

ES 2 546 862 T3

| | |
|---|------|
| tgc aag gac ggg gag tgt ccc tgg cag gcc ctg ctc atc aat gag gaa | 768 |
| Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu | |
| 245 250 255 | |
| aac gag ggt ttc tgt ggt gga acc att ctg agc gag ttc tac atc cta | 816 |
| Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu | |
| 260 265 270 | |
| acg gca gcc cac tgt ctc tac caa gcc aag aga ttc aag gtg agg gta | 864 |
| Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val | |
| 275 280 285 | |
| ggg gac cgg aac acg gag cag gag gag gcc ggt gag gcg gtg cac gag | 912 |
| Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu | |
| 290 295 300 | |
| gtg gag gtg gtc atc aag cac aac cgg ttc aca aag gag acc tat gac | 960 |
| Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp | |
| 305 310 315 320 | |
| ttc gac atc gcc gtg ctc cgg ctc aag acc ccc atc acc ttc cgc atg | 1008 |
| Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met | |
| 325 330 335 | |
| aac gtg gcg cct gcc tgc ctc ccc gag cgt gac tgg gcc gag tcc acg | 1056 |
| Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr | |
| 340 345 350 | |
| ctg atg acg cag aag acg ggg att gtg agc gcc ttc ggg cgc acc cac | 1104 |
| Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His | |
| 355 360 365 | |
| gag aag gcc cgg cag tcc acc agg ctc aag atg ctg gag gtg ccc tac | 1152 |
| Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr | |
| 370 375 380 | |
| gtg gac cgc aac agc tgc aag ctg tcc agc agc ttc atc atc acc cag | 1200 |
| Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln | |
| 385 390 395 400 | |
| aac atg ttc tgt gcc ggc tac gac acc aag cag gag gat gcc tgc cag | 1248 |
| Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln | |
| 405 410 415 | |
| ggg gac agc ggg ggc ccg cac gtc acc cgc ttc aag gac acc tac ttc | 1296 |
| Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe | |
| 420 425 430 | |
| gtg aca gcc atc gtc agc tgg gga gag gcc tgt gcc cgt aag ggg aag | 1344 |
| Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys | |
| 435 440 445 | |
| tac ggg atc tac acc aag gtc acc gcc ttc ctc aag tgg atc gac agg | 1392 |
| Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg | |
| 450 455 460 | |
| tcc atg aaa acc agg ggc ttg ccc aag gcc aag agc cat gcc ccg gag | 1440 |
| Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu | |
| 465 470 475 480 | |
| gtc ata acg tcc tct cca tta aag tga | 1467 |
| Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys * | |
| 485 | |

Figura 3

