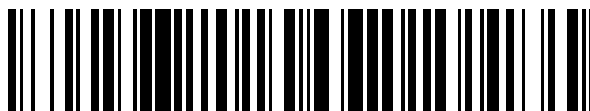


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 929**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/64** (2006.01)

**C12N 15/57** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2006 E 11182949 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2423224**

54 Título: **Composiciones y métodos para modular la hemostasia**

30 Prioridad:

**15.11.2005 US 736680 P**

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

**03.11.2015**

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA  
(100.0%)**

**34th Street & Civic Center Boulevard  
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**CAMIRE, RODNEY M.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 549 929 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

Composiciones y métodos para modular la hemostasia

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los campos de la medicina y la hematología. Más específicamente, la invención proporciona nuevos agentes del Factor X/Xa de coagulación y métodos para utilizarlos para modular la cascada de coagulación en pacientes que lo necesiten.

10

**Antecedentes de la invención**

A lo largo de la memoria descriptiva se citan diversas publicaciones y documentos con el fin de describir el estado de la técnica relacionado con esta invención.

15

Las enzimas de coagulación son enzimas de tipo tripsina que pertenecen a la familia de proteasas S1 peptidasas que contienen un pliegue de tipo quimotripsina. Las proteasas de coagulación contienen dominios catalíticos que son muy homólogos entre sí y con las serina proteasas de digestión ancestrales. La homología/identidad estructural es tan grande (>70 %) que los restos en los dominios catalíticos de las enzimas de coagulación se numeran de acuerdo con los restos correspondientes en el quimotripsinógeno.

20

Las enzimas de coagulación circulan en la sangre como precursores inactivos, zimógenos, que requieren escisión proteolítica para su activación. Los zimógenos poseen actividad proteolítica de ~10.000 veces o menor cuando se compara con las serina proteasas producidas tras la activación. El inicio de la coagulación en el sitio del daño vascular da lugar a una serie de reacciones en las que un zimógeno se convierte en una proteasa a través de escisión proteolítica específica y forma la enzima para la reacción posterior. Esto culmina en la activación de los glóbulos y en la conversión de fibrinógeno soluble en fibrina insoluble y, por tanto, en la formación del coágulo. El exceso de proteasas se elimina por reacción con inhibidores de proteasa circulantes que actúan como sustratos "suicidas" o aquellos que reconocen las enzimas activas. Por tanto, la activación proteolítica de los zimógenos de coagulación es una característica reguladora clave de la cascada de coagulación.

25

30

Camire R., (J. Biol. Chem., vol 277, no. 40, 2002) desvela la sustitución de Tyr<sup>225</sup> en el Factor Xa por Pro para disminuir la sensibilidad a la unión con Na<sup>+</sup>. El Factor Xa resultante mostró que un puente salino parcialmente desestabilizado (Ile<sup>16</sup>-Asp<sup>194</sup>), era más de tipo zimógeno, y poseía una capacidad disminuida para unir el Factor Va.

35

El documento WO2004/005347 desvela mutantes del Factor X escindibles por trombina donde el sitio de escisión alrededor de la posición 16 está mutado por un sitio de escisión de trombina.

40

Aunque algunos de los zimógenos de coagulación se escinden en dos o más sitios en sus respectivas reacciones de activación, la formación de la proteasa requiere la escisión en un solo sitio. La escisión en este sitio y sus consecuencias estructurales se consideran de la forma más simple utilizando el sistema de numeración homólogo basado en el quimotripsinógeno y en el exhaustivo trabajo estructural realizado con el tripsinógeno y la tripsina. La conversión del zimógeno en serina proteasa requiere escisión después de Arg<sup>15</sup> (normalmente, la unión entre Arg<sup>15</sup> e Ile<sup>16</sup>) que generalmente elimina un péptido de activación y expone un nuevo extremo N en el dominio catalítico que comienza con Ile<sup>16</sup>. Un ejemplo es la conversión del factor X al factor Xa (véanse las figuras 1 y 2). En la tripsina y el factor Xa, la nueva secuencia N-terminal empieza con Ile<sup>16</sup>-Val<sup>17</sup>-Gly<sup>18</sup>-Gly<sup>19</sup>. En el caso de otras enzimas coagulantes, la nueva secuencia N-terminal es una variación sobre el mismo tema. Después, la secuencia N-terminal se pliega hacia atrás en el dominio catalítico y se inserta en la hendidura de unión N-terminal de una forma específica de secuencia que denomina "sexualidad molecular". Véase la Figura 2. Por consiguiente, no es probable que variantes con secuencias N-terminal experimenten sexualidad molecular de una forma comparable. La inserción N-terminal da lugar a la formación de un puente salino entre el grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de Ile<sup>16</sup> y Asp<sup>194</sup> en el interior del dominio catalítico. La formación del puente salino está asociada a numerosos cambios en la estructura del dominio catalítico, incluyendo: reordenamientos de los denominados dominios de activación, mostrados en la Figura 3; formación del orificio de oxianión requerido para la catálisis y la formación de un sitio de unión a sustratos. Estos cambios dan lugar a la maduración de la serina proteasa activa. La aportación principal de las interacciones específicas de secuencia del nuevo extremo N durante la sexualidad molecular y la formación del puente salino a la maduración de la proteasa activa son evidentes a partir de los siguientes hechos: las proteasas bacterianas que no requieren la escisión para la activación utilizan otra cadena lateral dentro del dominio catalítico hacia el puente salino con Asp<sup>194</sup>; el tripsinógeno puede activarse en una configuración de tipo proteinasa sin escisión, pero con concentraciones extremadamente elevadas de un dipéptido Ile-Val que se inserta en la hendidura, aunque de forma muy ineficaz; el dipéptido Val-Ile y otras variantes son mucho menos eficaces; asimismo, hay dos ejemplos de proteínas bacterianas que activan zimógenos de coagulación en ausencia de escisión trastocando el mecanismo de activación proporcionando su propio extremo N que se inserta en la hendidura de unión N-terminal.

45

50

55

60

65

Los cambios estructurales descritos anteriormente proporcionan una explicación molecular para la conversión de un zimógeno precursor en una serina proteasa activa. Sin embargo, a diferencia de la tripsina, que es totalmente activa

después de la escisión en Arg<sup>15</sup>, muchas de las enzimas de coagulación actúan muy pobremente sobre sus sustratos de proteína. A pesar de que generalmente poseen sitios activos totalmente funcionales y de que pueden escindir pequeños sustratos de peptidil, la escisión eficaz del sustrato biológico a menudo requiere una proteína cofactor (Figura 2). En estos casos, las proteínas cofactores aumentan la velocidad de escisión de sustratos de proteínas en varios miles de veces. Aunque el mecanismo mediante el cual funcionan las proteínas cofactores sigue sin resolverse, es improbable que funcionen haciendo que la proteasa sea más de tipo enzima y, por lo tanto, más eficaz. Un aspecto fundamental es que, con una excepción, los cofactores unen selectivamente la proteasa y no el zimógeno correspondiente. Por ejemplo, el factor Xa se une con gran afinidad al FVa unido a la membrana, mientras que el zimógeno del factor X no se une al FVa.

Dependiendo del estado del paciente, puede que sea aconsejable desarrollar proteínas de la cascada de coagulación alteradas que posean una función de coagulación mejorada o reducida. Un objetivo de la invención es proporcionar dichas proteínas para su uso como terapia.

### 15 Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos para influir en sitios reguladores en la ruta de transición de zimógeno FX→proteasa impulsando así la producción de una especie FXa más de "tipo zimógeno". Las composiciones y métodos de la invención son eficaces para modular la hemostasia en pacientes que lo necesiten.

En una realización, se proporciona una variante del Factor Xa que modula la hemostasia que comprende al menos una mutación por sustitución en los aminoácidos 41 a 179 y 235 a 488 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 5, en la que la Val en la posición 236 está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, y Leu, con la condición de que el aminoácido en la posición 235 no sea Val o Ala.

La variante del Factor Xa puede comprender asimismo al menos una mutación por sustitución en la Ile en la posición 235 o en el Asp en la posición 418, o en la que dicha al menos una mutación por sustitución consiste en la sustitución de la Val en la posición 236 con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly y Leu, o en la que el Factor Xa consiste en los aminoácidos 41 a 179 y 235 a 488 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 5.

Los ácidos nucleicos que codifican las variantes de zimógeno/proteasas de la invención también se desvelan por ser métodos de uso de los mismos. Dichos nucleótidos pueden codificar opcionalmente un sitio de escisión PACE/furina intracelular.

También se describe una composición farmacéutica que comprende la variante del Factor Xa de la invención en un vehículo biológicamente compatible. Se desvelan además métodos para el tratamiento de un trastorno relacionado con hemostasia en un paciente que lo necesita que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de zimógeno/proteasa de la variante del Factor X/Xa que contiene composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Dichos métodos deberían ser eficaces en el tratamiento de trastornos en los que se necesita un procoagulante y que incluyen, sin limitación, la hemofilia A y B, la hemofilia A y B asociada a anticuerpos inhibidores, deficiencia del factor de coagulación, deficiencia de la vitamina k epóxido reductasa C1, deficiencia de gamma carboxilasa, sangrado asociado a traumatismo, lesión, trombosis, trombocitopenia, ictus, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada (CID); trastornos con tratamiento para el exceso de anticoagulación, síndrome de Bernard Soulier, tromblastemia de Glanzman, y deficiencia de almacenamiento del pool plaquetario.

Algunas variantes de zimógeno/proteasa pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos en los que se desea la anticoagulación. Dichos trastornos incluyen, sin limitación, la trombosis, la trombocitopenia, el ictus y la coagulopatía.

Otro aspecto de la invención incluye células hospedadoras que expresan la variante de zimógeno/proteasas de la invención con el fin de producir grandes cantidades de las mismas. También se describen métodos para aislar y purificar las variantes de zimógenos proteasa.

### 55 Breve descripción de los dibujos

**Figura 1. Procesamiento del Factor X.** El Factor X se sintetiza con una secuencia señal y un propéptido que se eliminan antes de su secreción. El Factor X es un zimógeno y no tiene actividad enzimática. El FX se convierte en factor Xa después de la escisión en la unión Arg<sup>15</sup>-Ile<sup>16</sup> que libera un péptido de activación (PA).

**Figura 2. Conversión de zimógeno a proteasa.** La transición de zimógeno a proteasa para el factor X y el ensamblaje del factor Xa en protrombina (FXa, FVa, fosfolípidos e iones de calcio). Esta enzima convierte la protrombina (II) en trombina (IIa).

**Figura 3. Estructura de rayos X del FXa.** El dominio catalítico del FXa en la orientación convencional. Las regiones estructurales se indican junto con restos importantes. Tomada de Brandstetter et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:29988-29992.

5 **Figura 4. Análisis SDS-PAGE de variantes de FX/Xa.** Se procesaron geles SDS-PAGE al 4-12 % en condiciones no reductoras o reductoras y después se tiñeron con Azul de Coomassie.

10 **Figura 5. Secuencias de aminoácidos (SEC ID NO: 1) y de ácidos nucleicos (SEC ID NO: 2) del Factor Xa.** Los sitios y las posiciones de los aminoácidos para modificaciones deseadas en la SEC ID NO: 1 se muestran en negrita.

15 **Figura 6. Actividad del Factor Xa en plasma de hemofilia B.** Se añadieron FXa o FXa116L (2 nM) de tipo silvestre a plasma de hemofilia B y a intervalos de tiempo seleccionados las muestras se diluyeron (0,1 nM) y se ensayaron en un ensayo de coagulación de aPTT.

20 **Figura 7. Corrección del aPTT.** A través de la vena de la cola de ratones con hemofilia B (C57BL/6) se inyectaron Factor Xa-116L (200 µg/kg; n = 7 ratones) o PBS (n = 4 ratones). 5 y 30 min después de la inyección se extrajo sangre y se realizó un ensayo de aPTT. La línea discontinua roja representa el valor de aPTT de animales C57Bl/6 normales.

25 **Figura 8. Valoración hemostática posterior al ensayo de corte en la punta de la cola en ratones con hemofilia B.** La pérdida de sangre se mide por el contenido de hemoglobina de la solución salina por A525 después de la lesión. El número de ratones (Balb c) son; tipo silvestre (TS) (n = 7); HB-PBS (n = 6); y HB-FXa116L (n = 7).

## 25 Descripción detallada de la invención

La proteólisis es un aspecto esencial de la coagulación sanguínea y es la base de muchos de los mecanismos que regulan la hemostasia normal. Los prococfactores y zimógenos no pueden participar en un grado significativo en sus respectivos complejos enzimáticos macromoleculares. Esto indica que la activación proteolítica debe dar lugar a cambios estructurales adecuados que conducen a la expresión de sitios que imparten capacidades de unión de enzimas, sustratos y cofactores. Si bien la activación prococfactores y zimógenos se ha estudiado en profundidad, la relación entre la proteólisis y la expresión de sitios de unión que imparten funciones no se entiende del todo. La presente invención proporciona composiciones y sistemas modelo que aclaran los mecanismos moleculares subyacentes a la expresión de interacciones de uniones macromoleculares que acompañan a transiciones desde el estado de zimógeno.

El Factor X (FX)<sup>1</sup> es una glucoproteína de dos cadenas dependiente de la vitamina K que desempeña un papel fundamental en la coagulación sanguínea (Figura 1). Este zimógeno de serina proteasa es un sustrato tanto para los complejos de la enzima tenasa extrínsecos (factor del tejido/FVIIa) como para los intrínsecos (FVIIIa/ FIXa) que escinden la unión escindible Arg<sup>15</sup>-Ile<sup>16</sup> en el FX que libera un péptido de activación de 52 aminoácidos que genera el FXa. El Factor Xa es la proteasa responsable de la conversión de protrombina en trombina (Figura 2). Aunque el factor Xa es una proteasa totalmente competente y posee la maquinaria catalítica para la escisión de protrombina, es un catalizador extremadamente pobre para esta reacción. Su firme interacción de unión con el cofactor, el factor Va, sobre una superficie de membrana aumenta profundamente la velocidad de formación de trombina sin afectar sustancialmente a otras reacciones catalizadas por el factor Xa. Se espera que los cambios en la secuencia N-terminal (Ile-Val-Gly) después del sitio de escisión Arg<sup>15</sup> que dan lugar a una sexualidad molecular por debajo del nivel óptimo produzcan un derivado del Xa "de tipo zimógeno" que ha afectado, o incluso eliminado, la actividad proteolítica. No se espera que estos derivados sean susceptibles de inhibición por inhibidores de proteasa de plasma tales como Antitrombina III ni se espera que interfieran en el inicio de la coagulación tras un daño vascular porque no se espera que se una muy bien al TFPI. El factor Xa se une al factor Va firmemente mientras que el factor X del zimógeno no. Por tanto, se espera que las formas de tipo zimógeno del factor Xa se unan al Va más débilmente, pero deben ser rescatadas completamente a concentraciones de cofactores suficientemente elevadas y que catalicen la formación de trombina de forma eficaz. Se espera que formas de tipo zimógeno del factor Xa con estas propiedades actúen como proteasas de larga duración en la circulación que de otro modo mueren pero que conservan la capacidad de catalizar la formación de trombina cuando se unen al factor Va. Tienen el potencial para actuar como procoagulantes terapéuticos que evitan deficiencias en otros factores de coagulación en la cascada, sin los efectos perjudiciales asociados a la infusión del FXa de tipo silvestre totalmente funcional.

### 60 I. Definiciones:

Anteriormente en el presente documento se han utilizado diversos términos relacionados con las moléculas biológicas de la presente invención y también en toda la memoria descriptiva y en las reivindicaciones.

65 La expresión "variante de zimógeno/proteasa" se refiere a un zimógeno del FX o a una proteasa del FXa modificado que ha sido genéticamente alterado de manera que al convertirse en FXa su actividad proteasa se reduce o es "similar a la de un zimógeno" en ausencia de cofactores específicos (por ejemplo, la afinidad de unión para el sitio

activo es inferior a la observada en la molécula de tipo silvestre). En particular, esta afinidad/actividad se restablece en presencia de cofactores adecuados que incluyen, sin limitación, el factor Va. Los sitios preferidos para las alteraciones de aminoácidos en la molécula FX parental incluyen la sustitución de la isoleucina en la posición 16, la sustitución de la valina en la posición 17 y la sustitución del ácido aspártico en la posición 194, con la condición de que el aminoácido en la posición 16 no sea valina ni alanina.

La expresión "trastorno relacionado con hemostasia" se refiere a trastornos de sangrado tales como la hemofilia A y B, pacientes con hemofilia A y B con anticuerpos inhibidores, deficiencias en los Factores, VII, IX y X, XI, V, XII, II de coagulación, factor de von Willebrand, deficiencia combinada de FV/FVIII, deficiencia de la vitamina K epóxido reductasa C1, deficiencia de gamma carboxilasa, sangrado asociado a traumatismo, lesión, trombosis, trombocitopenia, ictus, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada (CID); exceso de anticoagulación asociado a la heparina, heparina de bajo peso molecular, pentasacárido, warfarina, antitrombóticos de pequeña molécula (es decir, inhibidores del FXa); y trastornos plaquetarios tales como síndrome de Bernard Soulier, tromblastemia de Glanzman, y deficiencia de almacenamiento del pool plaquetario.

Un trastorno relacionado con hemostasia también puede incluir sangrado relacionado con trastornos trombóticos tales como trombosis venosa profunda, trombosis asociada a patologías cardiovasculares o a tumores malignos, trombosis resultantes de catéteres permanentes u otros procedimientos quirúrgicos invasivos y trombosis asociada a enfermedades autoinmunitarias tales como lupus. Las variantes de zimógeno/proteasa también podrían proporcionar la hemostasia necesaria a pacientes con coagulación intravascular diseminada o coagulopatías de consumo derivadas de una serie de patologías.

Con referencia a los ácidos nucleicos de la invención, a veces se utiliza la expresión "ácido nucleico aislado". Esta expresión, cuando se aplica al ADN, se refiere a una molécula de ADN que está separada de secuencias con las que está inmediatamente contigua (en las direcciones 5' y 3') en el genoma de origen natural del organismo del que se origina. Por ejemplo, el "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN o de ADNc insertada en un vector, tal como un vector plasmídico o viral, o integrada en el ADN de un procarionte o eucariota.

Con respecto a las moléculas de ARN de la invención, la expresión "ácido nucleico aislado" se refiere principalmente a una molécula de ARN codificada por una molécula de ADN aislada según la definición anterior. Como alternativa, la expresión puede referirse a una molécula de ARN que se ha separado suficientemente de moléculas de ARN con las que estaría asociada en su estado natural (es decir, en células o tejidos), de manera que existe en forma "sustancialmente pura" (la expresión "sustancialmente pura" se define más adelante).

Con respecto a la proteína, algunas veces, en el presente documento, se utiliza la expresión "proteína aislada" o "proteína aislada y purificada". Esta expresión se refiere principalmente a una proteína producida por expresión de una molécula de ácido nucleico aislada de la invención. Como alternativa, esta expresión puede referirse a una proteína que se ha separado suficientemente de otras proteínas con las que estaría asociada naturalmente, para existir en forma "sustancialmente pura".

La expresión "región promotora" se refiere a las regiones reguladoras transcripcionales de un gen, que pueden encontrarse en el lado 5' o 3' de la región codificante, o dentro de la región codificante, o dentro de intrones.

El término "vector" se refiere a una pequeña molécula de ADN transportadora en la que puede insertarse una secuencia de ADN para su introducción en una célula hospedadora, donde se replicará. Un "vector de expresión" es un vector especializado que contiene un gen o secuencia de ácido nucleico con las regiones reguladoras necesarias que se necesitan para la expresión en una célula hospedadora.

La expresión "unido(a) operativamente" significa que las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de una secuencia codificante se sitúan en la molécula de ADN en las posiciones adecuadas con respecto a la secuencia codificante para efectuar la expresión de la secuencia codificante. Esta misma definición se aplica a veces a la disposición de secuencias codificantes y elementos de control de la transcripción (por ejemplo, promotores, potenciadores y elementos de terminación) en un vector de expresión. Esta definición también se aplica a veces a la disposición de secuencias de ácido nucleico de una primera y una segunda molécula de ácido nucleico en las que se genera una molécula de ácido nucleico híbrida.

La expresión "sustancialmente puro(a)" se refiere a una preparación que comprende al menos el 50-60 % en peso del compuesto de interés (por ejemplo, ácido nucleico, oligonucleótido, proteína, etc.). Más preferentemente, la preparación comprende al menos el 75 % en peso, y más preferentemente el 90-99 % en peso, del compuesto de interés. La pureza se mide mediante métodos adecuados para el compuesto de interés (por ejemplo, métodos cromatográficos, electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, análisis HPLC, etc.).

La expresión "que consiste esencialmente en", cuando se refiere a una secuencia de nucleótidos o a una secuencia de aminoácidos en particular, significa una secuencia que tiene las propiedades de una SEC ID NO: determinada. Por ejemplo, cuando se utiliza en referencia a una secuencia de aminoácidos, la expresión incluye de por sí la secuencia y modificaciones moleculares que no afectarían a las características básicas y nuevas de la secuencia. El término "oligonucleótido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cebadores y sondas de la

presente invención, y se define como una molécula de ácido nucleico comprendida por dos o más ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, preferentemente más de tres. El tamaño exacto del oligonucleótido dependerá de varios factores y de la aplicación particular para la que se utilice el oligonucleótido.

5 El término "sonda", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido, polinucleótido o ácido nucleico, bien sea ARN o ADN, ya sea de origen natural como en una digestión enzimática de restricción purificada, o se produzca de forma sintética, que sea capaz de hibridarse con, o hibridarse específicamente con un ácido nucleico con secuencias complementarias a la sonda. Una sonda puede ser monocatenaria o bicatenaria. La longitud exacta de la sonda dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura, la fuente de la sonda y el método de uso. Por ejemplo, para aplicaciones diagnósticas, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, la sonda oligonucleotídica normalmente contiene de 15 a 25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

15 En el presente documento las sondas se seleccionan para que sean "sustancialmente" complementarias con diferentes cadenas de una secuencia de ácido nucleico diana en particular. Esto significa que las sondas deben ser suficientemente complementarias para ser capaces de "hibridarse específicamente" o aparearse con sus respectivas cadenas diana en una serie de condiciones predeterminadas. Por tanto, la secuencia de sonda no tiene que reflejar la secuencia complementaria exacta de la diana. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario puede fijarse al extremo 5' o 3' de la sonda, con el resto de la secuencia de sonda quedando complementario a la cadena diana. Como alternativa, pueden entremezclarse bases no complementarias o secuencias más largas en la sonda, siempre que la secuencia de sonda tenga suficiente complementariedad con la secuencia del ácido nucleico diana para hibridarse específicamente con la misma.

25 La expresión "hibridarse específicamente" se refiere a la asociación entre dos moléculas de ácido nucleico monocatenarias de secuencia suficientemente complementaria para permitir dicha hibridación en condiciones predeterminadas generalmente utilizadas en la técnica (a veces denominadas "sustancialmente complementarias"). En particular, la expresión se refiere a la hibridación de un oligonucleótido con una secuencia sustancialmente complementaria contenida dentro de una molécula de ADN o ARN monocatenaria de la invención, con la exclusión sustancial de la hibridación del oligonucleótido con ácidos nucleicos monocatenarios de secuencia no complementaria.

35 El término "cebador", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido, ya sea ARN o ADN, monocatenario o bicatenario, tanto derivado de un sistema biológico, generado por digestión enzimática de restricción, o producido de forma sintética, que, al situarse en el entorno adecuado, es capaz de actuar funcionalmente como un iniciador de la síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Cuando se presenta con un molde de ácido nucleico adecuado, precursores nucleósidos trifosfatos de ácidos nucleicos adecuados, una enzima polimerasa, cofactores y condiciones adecuados, tales como una temperatura y un pH apropiados, el cebador puede extenderse en su extremo 3' por la adición de nucleótidos mediante la acción de una polimerasa o una actividad similar para producir un producto de extensión del cebador.

40 La longitud del cebador puede variar dependiendo de las condiciones y los requisitos particulares de la aplicación. Por ejemplo, en aplicaciones diagnósticas, el cebador oligonucleotídico tiene normalmente una longitud de entre 15 y 25 o más nucleótidos. El cebador debe tener suficiente complementariedad con el molde deseado para cebar la síntesis del producto de extensión deseado, es decir, para ser capaz de aparearse con la cadena molde deseada de forma suficiente como para proporcionar el resto hidroxilo en posición 3' del cebador en correcta yuxtaposición para su uso en el inicio de la síntesis por una polimerasa o enzima similar. No es necesario que la secuencia cebadora represente un complemento exacto del molde deseado. Por ejemplo, puede fijarse una secuencia de nucleótidos no complementaria al extremo 5' de un cebador complementario de otro modo. Como alternativa, pueden entremezclarse bases no complementarias dentro de la secuencia del cebador oligonucleotídico, siempre que la secuencia cebadora tenga suficiente complementariedad con la secuencia de la cadena molde deseada para proporcionar funcionalmente un complejo cebador-molde para la síntesis del producto de extensión.

55 La expresión "porcentaje idéntico" se utiliza en el presente documento en referencia a comparaciones entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos suelen compararse utilizando programas informáticos que alinean secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, definiendo así las diferencias entre los dos. A efectos de esta invención, se realizan comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos utilizando la versión 9.1 del Paquete GCG Wisconsin, disponible en el Grupo Genetics Computer en Madison, Wisconsin. A efectos de comodidad, se pretende que los parámetros predeterminados (penalización por creación de espacios = 12, penalización por extensión de espacios = 4) especificados por este programa se utilicen en el presente documento para comparar la identidad de las secuencias. Como alternativa, también puede utilizarse el programa Blastn 2.0 que proporciona el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) (que se encuentra en Internet en el sitio [ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/); Altschul et al., 1990, *J Mol Biol* 215:403-410) que utiliza una alineación espaciada con parámetros predeterminados, para determinar el nivel de identidad y similitud entre secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos.

65 II. Preparación de Variante de Zimógeno-Proteasa que Codifica Moléculas de Ácido Nucleico y Polipéptidos

## A. Moléculas de Ácido Nucleico

5 Las moléculas de ácido nucleico que codifican la variante de zimógeno/proteasa de la invención pueden prepararse utilizando métodos de tecnología de ADN recombinante. La disponibilidad de información de la secuencia de nucleótidos permite la preparación de moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención por diversos medios. Por ejemplo, utilizando protocolos convencionales muy conocidos en la técnica pueden aislarse secuencias de ácido nucleico que codifiquen un polipéptido de zimógeno/proteasa de fuentes biológicas adecuadas.

10 Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden mantenerse como ADN en cualquier vector de clonación conveniente. En una realización preferida, los clones se mantienen en un vector de clonación/expresión plasmídico, tal como pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), que se propaga en una célula hospedadora de *E. coli* apropiada. Como alternativa, los ácidos nucleicos pueden mantenerse en un vector adecuado para su expresión en células de mamíferos. En los casos en los que la modificación post-traducciona afecta a la función del zimógeno/proteasa (por ejemplo, el Factor Xa), es preferible expresar la molécula en células de mamíferos.

15 En una realización, los ácidos nucleicos que codifican las variantes de zimógeno del factor X pueden modificarse aún más mediante la inserción de un sitio de escisión proteolítica intracelular. Con el fin de expresar variantes de FXa de tipo zimógeno "activadas" en células de mamíferos, puede insertarse un sitio de escisión proteolítica intracelular entre las posiciones Arg15 y 16 en la variante de zimógeno del FX. Dichos sitios de escisión incluyen: Arg-Lys-Arg o Arg-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg. Las proteasas reconocen eficazmente estos sitios de escisión (enzimas de tipo PACE/furina) dentro de la célula y los eliminan. Esto da lugar a una variante procesada del FX(a) en la que la cadena pesada en la molécula ahora empieza en la posición 16. La introducción de este sitio de escisión en dicha posición permitirá la conversión intracelular de FX en FXa.

20 En otra realización, todo el péptido de activación de 52 aminoácidos puede eliminarse y en su lugar puede introducirse el sitio de escisión de proteasas intracelular, lo que dará lugar a la variante del FXa.

25 En última instancia, estos tipos de modificaciones permitirán la secreción de la forma "activa" procesada de la variante del FX de una célula que expresa la variante modificada del FX. La secreción del factor escindido evita una necesidad de escisión proteolítica durante la coagulación sanguínea o después del aislamiento de la proteína.

30 Las moléculas de ácido nucleico que codifican la variante de zimógeno/proteasa de la invención incluyen ADNc, ADN genómico, ARN, y fragmentos de los mismos que pueden ser mono- o bicatenarios. De este modo, la presente invención proporciona oligonucleótidos (cadenas de ADN o ARN en sentido o antisentido) que tienen secuencias capaces de hibridarse con al menos una secuencia de una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Dichos oligonucleótidos son útiles como sondas para detectar la expresión de zimógeno/proteasa.

## B. Proteínas

35 De acuerdo con métodos conocidos puede prepararse un polipéptido de longitud completa o de una variante de zimógeno/proteasa de la presente invención de varias formas. La proteína puede purificarse de fuentes adecuadas, por ejemplo, células o tejidos cultivados de bacterias o animales transformados que expresan zimógeno/proteasa, mediante purificación por inmunoadfinidad. Sin embargo, este no es un método preferido debido a la baja cantidad de proteína que es probable que esté presente en un tipo de célula determinado en cualquier momento.

40 La disponibilidad de las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de una variante de zimógeno/proteasa permite la producción de zimógeno/proteasa utilizando métodos de expresión *in vitro* conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ADNc o gen puede clonarse en un vector de transcripción *in vitro* adecuado, tal como pSP64 o pSP65 para la transcripción *in vitro*, seguido de una traducción celular en un sistema de traducción celular adecuado, tal como germen de trigo o lisados de reticulocitos de conejo. Los sistemas de transcripción y de traducción *in vitro* están disponibles en el comercio, por ejemplo, en Promega Biotech, Madison, Wisconsin o BRL, Rockville, Maryland.

45 Como alternativa, de acuerdo con una realización preferida, pueden producirse cantidades mayores de zimógeno/proteasa mediante la expresión en un sistema de expresión procariota o eucariota. Por ejemplo, puede insertarse la totalidad o parte de una molécula de ADN que codifica una variante del Factor Xa, por ejemplo, en un vector plasmídico adaptado para la expresión en una célula bacteriana, tal como *E. coli* o una célula de mamífero tal como las células CHO o HeLa. Como alternativa, en una realización preferida, pueden generarse proteínas de fusión marcadas que comprenden zimógeno/proteasa. Dichas proteínas de fusión marcadas de zimógeno/proteasa están codificadas por la totalidad o parte de una molécula de ADN, ligada en la fase de lectura del codón correcto con una secuencia de nucleótidos que codifica la totalidad o parte de un marcador polipeptídico deseado que se inserta en un vector plasmídico adaptado para la expresión en una célula bacteriana, tal como *E. coli* o una célula eucariota, tal como, sin limitación, células de levadura y de mamífero. Vectores tales como los descritos anteriormente comprenden los elementos reguladores necesarios para la expresión del ADN en la célula hospedadora posicionada de manera que permita la expresión del ADN en la célula hospedadora. Dichos elementos reguladores requeridos

para la expresión incluyen, sin limitación, secuencias promotoras, secuencias de inicio de la transcripción, y secuencias potenciadoras.

5 Las proteínas de variante de zimógeno/proteasa, producidas por expresión génica en un sistema procariota o eucariota recombinante, pueden purificarse de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. En una realización preferida, puede utilizarse un sistema de expresión/secreción disponible en el mercado, por el cual la proteína recombinante se expresa y después se segrega de la célula hospedadora, para purificarse fácilmente desde el medio circundante. Si no se utilizan vectores de expresión/secreción, un enfoque alternativo implica la purificación de la proteína recombinante mediante separación por afinidad, tal como mediante la interacción inmunológica con anticuerpos que se unen específicamente a la proteína recombinante o a columnas de níquel para el aislamiento de las proteínas recombinantes marcadas con 6-8 restos de histidina en su extremo N o extremo C. Marcadores alternativos pueden comprender el epítipo FLAG, GST o el epítipo de la hemaglutinina. Facultativos expertos utilizan habitualmente dichos métodos.

15 Las proteínas de zimógeno/proteasa, preparadas mediante los métodos mencionados, pueden analizarse de acuerdo con procedimientos convencionales. Por ejemplo, dichas proteínas pueden estar sujetas al análisis de secuencias de aminoácidos, de acuerdo con los métodos conocidos.

20 Tal como se ha comentado anteriormente, una forma práctica de producir un polipéptido de acuerdo con la presente invención es expresar el ácido nucleico que lo codifica, mediante el uso del ácido nucleico en un sistema de expresión. Los expertos en la materia conocen en profundidad varios sistemas de expresión de utilidad para los métodos de la presente invención.

25 Por consiguiente, también se describe un método para hacer un polipéptido (tal como se desvela), el método que incluye la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido (generalmente, ácido nucleico). Esto puede conseguirse de forma de manera práctica mediante el cultivo de una célula hospedadora, que contenga dicho vector, en condiciones adecuadas que causen o permitan la producción del polipéptido. También pueden producirse polipéptidos en sistemas in vitro, tales como lisados de reticulocitos.

### 30 III. Usos de Proteínas de Zimógeno/Proteasa y Ácidos Nucleicos que Codifican Zimógeno/Proteasa

Pueden utilizarse ácidos nucleicos de variantes de zimógeno/proteasa que codifican polipéptidos que tienen actividades de proteasa alteradas, por ejemplo, como agentes terapéuticos y/o profilácticos (proteína o ácido nucleico) que modulan la cascada de coagulación sanguínea. Los inventores actuales han descubierto que las moléculas de zimógeno/proteasa del factor X/Xa pueden aumentar la coagulación y proporcionar una hemostasia eficaz.

#### A. Polipéptidos de la Variante de Zimógeno/Proteasa

40 Pueden administrarse polipéptidos de la variante de zimógeno/proteasa a un paciente por infusión en un vehículo biológicamente compatible, preferentemente por inyección intravenosa. La variante de zimógeno/proteasas de la invención puede encapsularse opcionalmente en liposomas o mezclarse con otros fosfolípidos o micelas para aumentar la estabilidad de la molécula. Puede administrarse zimógeno/proteasa solo o en combinación con otros agentes conocidos para modular la hemostasia (por ejemplo, el Factor V, el Factor Va o derivados de los mismos).  
45 Un facultativo médico puede determinar una composición adecuada en la que los polipéptidos de zimógeno/proteasa se proporcionen teniendo en cuenta una serie de variables fisiológicas, incluyendo, sin limitación, la afección del paciente y el estado hemodinámico. En la técnica se conocen varias composiciones que se adaptan bien a las diferentes aplicaciones y vías de administración, y se describen a continuación.

50 La preparación que contiene un análogo del factor X/Xa purificado contiene una matriz fisiológicamente aceptable y está formulada preferentemente como una preparación farmacéutica. La preparación puede formularse utilizando métodos sustancialmente conocidos de la técnica anterior, puede mezclarse con una solución tamponada que contenga sales, tales como NaCl, CaCl<sub>2</sub>, y aminoácidos, tales como glicina y/o lisina, y en una variación de pH de entre 6 y 8. Hasta que se necesita, la preparación purificada que contiene el análogo del factor X/Xa puede almacenarse en forma de solución terminada o en forma liofilizada o ultracongelada. Preferentemente, la preparación se almacena en forma liofilizada y se disuelve en una solución visualmente transparente utilizando una solución de reconstitución adecuada.

60 Como alternativa, la preparación de acuerdo con la presente invención también puede encontrarse como preparación líquida o como líquido ultracongelado.

La preparación de acuerdo con la presente invención es especialmente estable, es decir, puede permanecer en forma disuelta durante un período prolongado antes de su aplicación.

65



La preparación que contiene un análogo del factor X en combinación con el factor XIa o un derivado del mismo que es capaz de activar el análogo del factor X en el factor Xa o el análogo del factor Xa puede obtenerse en forma de una preparación de combinación que comprende un envase que tiene el factor XIa que está inmovilizado en una matriz, posiblemente en forma de una columna en miniatura o una jeringa complementada con una proteasa, y un envase que contiene la preparación farmacéutica con el análogo del factor X. Para activar el análogo del factor X, la solución que contiene el análogo del factor X, por ejemplo, puede presionarse sobre la proteasa inmovilizada. Durante el almacenamiento de la preparación, la solución que contiene el análogo del factor X se separa espacialmente de la proteasa preferentemente. La preparación puede almacenarse en el mismo envase que la proteasa, pero los componentes se separan espacialmente mediante una partición impermeable que puede eliminarse fácilmente antes de la administración de la preparación. Las soluciones pueden almacenarse en envases distintos y entrar en contacto solamente un poco antes de la administración.

El análogo del factor X puede activarse en el Xa un poco antes de su uso inmediato, es decir, antes de su administración al paciente. La activación puede llevarse a cabo poniendo en contacto un análogo del factor X con una proteasa inmovilizada o mezclando soluciones que contienen una proteasa, por una parte, y el análogo del factor X, por otra. Así, es posible mantener por separado los dos componentes en la solución y mezclarlos mediante un dispositivo de infusión adecuado en el que los componentes entran en contacto a medida que atraviesan el dispositivo y, de este modo, provocar una activación en el factor Xa o en el análogo del factor Xa. Así, el paciente recibe una mezcla del factor Xa y, además, una serina proteasa que es la responsable de la activación. En este contexto, es especialmente importante prestar mucha atención a la dosis, puesto que la administración adicional de una serina proteasa también activa el factor X endógeno, que puede reducir el tiempo de coagulación.

La preparación puede obtenerse como preparación farmacéutica con actividad del factor Xa en forma de preparación de un componente o en combinación con otros factores en forma de preparación de múltiples componentes.

Antes de procesar la proteína purificada en una preparación farmacéutica, la proteína purificada se somete a los controles de calidad convencionales y se produce en una forma de presentación terapéutica. En particular, durante la fabricación recombinante, se analiza la preparación purificada para comprobar la ausencia de ácidos nucleicos celulares así como ácidos nucleicos que surgen del vector de expresión, preferentemente utilizando un método tal como el descrito en el documento EP 0 714 987.

En el presente documento también se describe una preparación que contiene un análogo del factor Xa con una gran estabilidad e integridad estructural y que, en particular, carece de intermediarios inactivos del análogo del factor X/Xa y de productos de degradación autoproteolíticos y que puede producirse activando un análogo del factor X del tipo descrito anteriormente y formulándolo en una preparación adecuada.

La preparación farmacéutica puede contener dosis de entre 10-1000 µg/kg, más preferentemente entre 10-250 µg/kg, aproximadamente, y más preferentemente, entre 10 y 75 µg/kg, siendo particularmente preferido un polipéptido de la variante del factor X de 40 µg/kg. Los pacientes pueden recibir tratamiento inmediatamente después de presentarse en la clínica con un sangrado. Como alternativa, los pacientes pueden recibir una infusión embolada cada hora o cada tres horas o, si se observa suficiente mejoría, una infusión al día de la variante del factor Xa descrita en el presente documento.

#### B. Ácidos Nucleicos que Codifican Zimógeno/Proteasa

Pueden utilizarse ácidos nucleicos que codifican zimógeno/proteasa para varios propósitos. Por ejemplo, se proporciona un vehículo de administración de ácido nucleico (es decir, un vector de expresión) para modular la coagulación sanguínea en el que el vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de variante de zimógeno/proteasa, o un fragmento funcional del mismo tal como se describe en el presente documento. La administración de vectores de expresión que codifican zimógeno/proteasa a un paciente da lugar a la expresión de un polipéptido de zimógeno/proteasa que sirve para alterar la cascada de coagulación. De acuerdo con la presente invención, un zimógeno/proteasa que codifica una secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de zimógeno/proteasa según se describe en el presente documento cuya expresión aumenta la hemostasia. En una realización preferida, una secuencia de ácido nucleico de zimógeno/proteasa codifica una variante de polipéptido del Factor Xa humano.

Los vectores de expresión que comprenden secuencias de ácido nucleico de zimógeno/proteasa de variantes X/Xa pueden administrarse solos, o en combinación con otras moléculas útiles para modular la hemostasia. De acuerdo con la presente invención, los vectores de expresión o la combinación de agentes terapéuticos pueden administrarse al paciente en solitario o en composiciones farmacéuticamente aceptables o biológicamente compatibles.

En una realización preferida de la invención, el vector de expresión que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican las variantes de zimógeno/proteasa es un vector viral.

Los vectores virales que pueden utilizarse en la presente invención incluyen, sin limitación, vectores adenovirales (con o sin promotores/potenciadores específicos de tejidos), vectores de virus adenoasociados (AAV) de múltiples

serotipos (por ejemplo, AAV-2, AAV-5, AAV-7, y AAV-8) y vectores AAV híbridos, vectores de lentivirus y vectores de lentivirus pseudotipificados [por ejemplo, el virus del Ébola, el virus de la estomatitis vesicular (VSV), y el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV)], vectores del virus del herpes simple, vectores del virus de la vacuna, y vectores retrovirales.

5 En el presente documento se describen métodos para la administración de un vector viral que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una variante de zimógeno/proteasa, o un fragmento funcional de las mismas. Los vectores adenovirales de utilidad en los métodos incluyen preferentemente al menos las partes esenciales de ADN del vector adenoviral. Tal como se describe en el presente documento, la expresión de un polipéptido de variante de zimógeno/proteasa después de la administración de dicho vector adenoviral sirve para modular la hemostasia. En el contexto de la variante del Factor Xa descrita en el presente documento, dicha administración aumenta la actividad de procoagulación de la proteasa.

15 Se ha descubierto una amplia utilidad de los vectores adenovirales recombinantes para varias aplicaciones en terapias genéticas. Su utilidad para dichas aplicaciones se debe en gran medida a la gran eficiencia de la transmisión genética *in vivo* conseguida en varios contextos orgánicos.

20 Pueden utilizarse partículas adenovirales para sacar ventaja como vehículos para una adecuada entrega de genes. Dichos viriones poseen un número de características aconsejables para dichas aplicaciones, incluyendo: características estructurales relacionadas con ser un virus no envuelto de ADN bicatenario y características biológicas tales como un tropismo para el sistema respiratorio humano y el tracto gastrointestinal. Asimismo, se sabe que los adenovirus infectan a una amplia variedad de tipos de células *in vivo* e *in vitro* mediante endocitosis mediada por receptores. Certificando la seguridad general de los vectores adenovirales, la infección con adenovirus ocasiona una pequeña patología en los seres humanos que comprende síntomas leves parecidos a la gripe.

25 Debido a su gran tamaño (~36 kilobases), los genomas adenovirales son muy apropiados para su uso como vehículos de terapia genética porque pueden admitir la inserción de ADN exógeno después de la eliminación de genes adenovirales esenciales para las regiones de replicación y no esenciales. Dichas sustituciones dejan el vector viral deteriorado en relación con las funciones replicativas y la infectividad. Es importante mencionar que se han utilizado adenovirus como vectores para la terapia genética y para la expresión de genes heterólogos.

30 Para un análisis más detallado del uso de los vectores adenovirales utilizados para la terapia genética, véanse Berkner, 1988, *Biotechniques* 6:616-fi29 y Trapnell, 1993, *Advanced Drug Delivery Reviews* 12:185-199.

35 Es aconsejable introducir un vector que pueda proporcionar, por ejemplo, múltiples copias de un gen deseado y, por lo tanto, mayores cantidades del producto de dicho gen. Se han descrito en detalle vectores adenovirales y métodos para producir estos vectores con mejoras en varias referencias, patentes, y solicitudes de patentes, incluyendo: Mitani y Kubo (2002, *Curr Gene Ther.* 2(2):135-44); Olmsted-Davis et al. (2002, *Hum Gene Ther.* 13(11):1337-47); Reynolds et al. (2001, *Nat Biotechnol.* 19(9):838-42); las patentes de Estados Unidos Nos: 5.998.205 (en la que se proporcionan vectores replicantes específicos de tumores que comprenden múltiples copias de ADN); 6.228.646 (en la que se describen vectores adenovirales totalmente defectuosos, sin auxiliares); 6.093.699 (en la que se proporcionan vectores y métodos para la terapia genética); 6.100.242 (en la que se utilizó de manera eficaz un vector adenoviral con replicación defectuosa con inserto de transgenes en terapia génica *in vivo* de enfermedades vasculares periféricas y cardiopatías); y las solicitudes de patente internacional Nos WO 94/17810 y WO 94/23744.

45 En algunas aplicaciones, una construcción de expresión también puede comprender elementos reguladores que sirven para dirigir la expresión en un tipo de célula o tejido en particular. Los expertos en la materia conocen dichos elementos reguladores, que se analizan en profundidad en Sambrook et al. (1989) y en Ausubel et al. (1992). La incorporación de elementos reguladores específicos de tejidos en las construcciones de expresión de la presente invención proporciona al menos un tropismo de tejido parcial para la expresión de la variante de zimógeno/proteasas o sus fragmentos funcionales. Por ejemplo, como ventaja, en los métodos descritos en el presente documento puede utilizarse un vector adenoviral de tipo 5 con E1 suprimido que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican la variante de zimógeno/proteasa bajo el control de un promotor de citomegalovirus (CMV).

#### 55 Métodos ilustrativos para Producir Vectores Adenovirales

En la línea celular renal embrionaria humana 293 se han producido vectores adenovirales para la expresión génica recombinante (Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.* 36:59-72). Esta línea celular permite el crecimiento de mutantes del adenovirus 2 (Ad2) y del adenovirus 5 defectuosos en cuanto a funciones E1 porque comprende el extremo izquierdo del genoma del adenovirus 5 y, por lo tanto, expresa proteínas E1. Los genes de E1 integrados en el genoma celular de células 293 se expresan a niveles que facilitan el uso de dichas células como un sistema de expresión en el que amplificar vectores virales desde los cuales estos genes se han suprimido. Se han utilizado células 293 exhaustivamente para el aislamiento y la propagación de mutantes de E1, para la clonación independiente de auxiliares, y para la expresión de vectores adenovirales. Por consiguiente, los sistemas de expresión, tales como la línea celular 293, proporcionan funciones virales esenciales en *trans* y, por lo tanto, permiten la propagación de vectores virales en los que se han sustituido secuencias de ácido nucleico exógenas por

genes de E1. Véase Young et al. en *The Adenovirus*, Ginsberg, ed., Plenum Press, Nueva York y Londres (1984), págs. 125-172.

5 Los expertos en la materia conocen otros sistemas de expresión que son muy adecuados para la propagación de vectores adenovirales (por ejemplo, células HeLa) y que se han revisado en otra parte.

10 En el presente documento también se describe un método para modular la hemostasia que comprende proporcionar células de un individuo con un vehículo de administración de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la variante de zimógeno/proteasa y que permite a las células crecer en condiciones en las que se expresa el polipéptido de zimógeno/proteasa.

15 A partir del análisis anterior, puede observarse que los polipéptidos de zimógeno/proteasa y los vectores de ácido nucleico que expresan el polipéptido de zimógeno/proteasa, pueden utilizarse en el tratamiento de trastornos asociados a la coagulación sanguínea anómala.

### 15 C. Composiciones Farmacéuticas

20 Los vectores de expresión de la presente invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas que pueden administrarse a un sujeto, para permitir la producción de una proteína biológicamente activa (por ejemplo, una variante del polipéptido de zimógeno/proteasa o un fragmento funcional o derivado de la misma). En una realización particular de la presente invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden suficiente material genético para permitir a un receptor producir una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante del polipéptido de zimógeno/proteasa, pueden influir en la hemostasia en el sujeto. Como alternativa, tal como se ha analizado anteriormente, puede infundirse una cantidad eficaz de la variante del polipéptido del Factor X a un paciente que lo necesite. Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier vehículo farmacéutico biocompatible estéril, incluyendo, sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones que influyen en la hemostasia pueden administrarse a un paciente en solitario, o en combinación con otros agentes (por ejemplo, cofactores).

30 Las composiciones farmacéuticas también pueden contener un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico que por sí mismo no induzca una respuesta inmunitaria perjudicial para el individuo que recibe la composición, y que puede administrarse sin la indebida toxicidad. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, líquidos tales como agua, solución salina, glicerol, azúcares y etanol. En ellos también pueden incluirse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similar; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similar. Además, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH, y similar, pueden estar presentes en dichos vehículos. En *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., 18ª Edición, Easton, Pa. [1990]) puede encontrarse un análisis exhaustivo de excipientes farmacéuticamente aceptables.

45 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o solución salina fisiológicamente tamponada. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Además, según sea apropiado pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleaginosas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como etil oleato o triglicéridos, o liposomas. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

50 La composición farmacéutica puede proporcionarse como una sal y puede formarse con bastantes ácidos, incluyendo, sin limitación, ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos o en otros disolventes protónicos que las formas de base libre correspondientes. En otros casos, la preparación preferida puede ser un polvo liofilizado que puede contener bastante o todo de: histidina 1-50 mM, sacarosa 0,1 %-2 %, y manitol 2-7 %, a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, es decir, combinado con tampón antes de su uso.

60 Una vez preparadas, las composiciones farmacéuticas pueden introducirse en un envase adecuado y etiquetarse para el tratamiento. Para la administración de vectores o polipéptidos que contienen zimógeno/proteasa, dicho etiquetado incluiría la cantidad, la frecuencia y el modo de administración.

65 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen composiciones en las que los ingredientes activos se incluyan en una cantidad eficaz para conseguir el fin terapéutico deseado. La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de un médico experto que utilice las técnicas y pautas proporcionadas en el presente documento. Las dosis terapéuticas

5 dependerán, entre otros factores, de la edad y del estado general del sujeto, de la gravedad del fenotipo de coagulación sanguínea anómalo, y de la fuerza de las secuencias de control que regulan los niveles de expresión del polipéptido de la variante de zimógeno/proteasa. Por tanto, basándose en la respuesta de un paciente individual ante el tratamiento de zimógeno/proteasa basado en vectores, una cantidad terapéuticamente eficaz en seres humanos disminuirá en un intervalo relativamente amplio.

#### D. Administración

10 Tal como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos de la variante del Factor X, solos o en combinación con otros agentes, pueden infundirse directamente en un paciente en un vehículo biológico apropiado. Mediante diversos medios, a un paciente se le puede administrar vectores de expresión de la presente invención que comprendan secuencias de ácido nucleico que codifiquen la variante de zimógeno/proteasa, o sus fragmentos funcionales (véase más adelante) para conseguir y mantener un nivel profiláctico y/o terapéuticamente eficaz del polipéptido de zimógeno/proteasa. Un experto en la materia podría determinar inmediatamente protocolos específicos para utilizar los vectores de expresión que codifican el zimógeno/proteasa de la presente invención para el tratamiento terapéutico de un paciente en particular. En las Patentes de Estados Unidos Nos 5.998.205; 6.228.646; 6.093.699; 6.100.242; y en las Solicitudes de Patente Internacional Nos WO 94/17810 y WO 94/23744 se han descrito protocolos para la generación de vectores adenovirales y la administración a pacientes.

20 Mediante cualquier método conocido a un paciente se le puede administrar vectores adenovirales que codifiquen una variante de zimógeno/proteasa. Generalmente, la administración directa de las composiciones farmacéuticas *in vivo* puede realizarse por inyección utilizando una jeringa convencional, aunque se contemplan otros métodos de administración, tales como la administración mejorada por convección (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.720.720). En este sentido, las composiciones pueden administrarse por vía subcutánea, epidérmica, intradérmica, intratecal, intraorbital, intramucosa, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, oral, intrahepática o intramuscular. Otros modos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas. Un médico especialista en el tratamiento de pacientes con trastornos de la coagulación sanguínea puede determinar la vía de administración óptima de los vectores adenovirales que comprenden secuencias de ácido nucleico de zimógeno/proteasa basándose en una serie de criterios, incluidos, sin limitación: la afección del paciente y el propósito del tratamiento (por ejemplo, mejorar o reducir la coagulación sanguínea).

En el presente documento también se describen vectores AAV que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de polipéptido de zimógeno/proteasa.

35 También se describen lentivirus o vectores de lentivirus pseudotipificados que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de polipéptido de zimógeno/proteasa

También se describen vectores de expresión o plasmídicos desnudos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de polipéptido de zimógeno/proteasa.

#### 40 EJEMPLO 1

##### VARIANTE DE ZIMÓGENO/PROTEASA DEL FACTOR XA

45 El procesamiento proteolítico de proteínas plasmáticas precursoras para influir en la activación es una característica de la coagulación sanguínea. El paradigma de este tipo de mecanismo de activación es la transición de zimógeno a proteasa en la familia de serina proteasas de tipo quimotripsina. La escisión del enlace en un sitio altamente conservado (Arg15-Ile16; sistema de numeración de quimotripsina) desvela un nuevo extremo N que actúa como un ligando intramolecular para Asp194 (Figura 2). Este nuevo puente salino da como resultado, o está asociado a, un cambio y ordenación conformacional del denominado "dominio de activación", bucles superficiales que consisten en el bolsillo de especificidad S1, orificio de oxanión, bucle de autólisis, y sitio de unión de sodio (Figura 3). En el sistema de tripsinas está bien documentado que la formación del puente salino interno de Ile16-Asp194 está alostéricamente vinculado al sitio de especificidad S1; es decir, que los cambios en un sitio influyen en el otro sitio y viceversa.

55 Los principios básicos de la transición de zimógeno a enzima activa para las serina proteasas al nivel estructural están bien documentados, en particular para la quimotripsina y la tripsina, y estos ejemplos actúan de paradigma para la familia de las serina proteasas. Los aspectos generales pueden resumirse de la siguiente manera (véase la Figura 2): 1) la estructura (~80-85 %) del zimógeno es relativamente similar a la proteasa; 2) la transición se inicia después de la liberación de un extremo N altamente conservado (por ejemplo, Ile16-Val-Gly-Gly19); 3) el nuevo grupo  $\alpha$ -amino libre (Ile16) queda oculto en un entorno hidrófobo y su nitrógeno  $\alpha$ -amino forma un puente salino interno con Asp194; 4) la posición de Asp194 cambia notablemente con la rotación de activación del zimógeno ~170°; y 5) este puente interno da como resultado, o está asociado a, un cambio conformacional en el denominado "dominio de activación", bucles expuestos a la superficie que consisten en restos 16-19, 142-153, 184-194, y 216-223; y que comprenden parcialmente el sitio de especificidad S1 (nomenclatura de Schechter y Berger (1967)

Bochem. Biophys. Res. Comm. 43:694-702) y el orificio de oxani6n. Diversos estudios indican que el zim6geno y la enzima madura existen en equilibrio, con un valor  $K_{eq} = \sim 10^8$  a favor del zim6geno. Bode y colaboradores han demostrado magnificamente que el tripsin6geno puede adoptar una estructura de tipo tripsina activa en la fuerte uni6n del ligando al bolsillo de especificidad S1 o ligandos adecuados con alta afinidad por la hendidura Ile16. Ejemplos adicionales de esta inducci6n sin escisi6n de la uni6n Arg/Lys15-Ile16 incluyen la uni6n de estreptoquinasa a plasmin6geno, estafilococagulasa a protrombina, y un autoanticuerpo recientemente descrito a protrombina (Madoiwa et al. (2001) Blood 97:3783-3789). En conjunto, estos estudios indican que las serina proteasas, incluso en sus formas de zim6geno, pueden adoptar funciones de tipo proteasa dependiendo de diversas condiciones ambientales, es decir, fuerte uni6n del ligando al zim6geno.

Es bien conocido que la activaci6n del FX da lugar a importantes cambios conformacionales en el dominio de las serina proteasas que van acompa6ados de la capacidad de la proteasa a unirse con mucha m1s afinidad a sondas dirigidas por S1 y al FVa unido a la membrana (1-6). Generalmente se supone que el mecanismo (o mecanismos) molecular global que gobierna la transici6n de las serina proteasas sigue el sistema de tripsinas. Sin embargo, puede que este no sea el caso de manera uniforme. La tPA monocatenaria emplea una estrategia molecular diferente para mantener su estado de tipo zim6geno (8-11). El an1lisis de los pares de zim6geno/proteasa involucrados en la coagulaci6n sanguinea, en particular FVII/FVIIa, indica que existen varias diferencias en esta transici6n en comparaci6n con el sistema de tripsinas (12). Aunque diversos determinantes estructurales en el FXa forman parte del denominado dominio de activaci6n, actualmente no est1 claro si la formaci6n de estos sitios est1 directamente vinculada a la transici6n de zim6geno a proteasa. Sin embargo, un modelo descrito recientemente del zim6geno FX sugiere que algunos de estos elementos pueden estar desordenados en el zim6geno (13). La comparaci6n del modelo de zim6geno con la enzima activa revela que los restos que componen el  $Ca^{2+}$  (Asp70-Glu80),  $Na^+$  (Ala183-Asp194; Gly219-Gly226) y los bucles de aut6lisis (Thr144-Arg150) experimentan importantes cambios en sus posiciones principales en la transici6n de zim6geno a proteasa. Dado que ya est1 bien documentado, al menos para el tripsin6geno/tripsina, que el sitio de especificidad S1 y la formaci6n de Ile16-Asp194 est1n alost6ricamente vinculados, es razonable suponer que otros elementos del dominio de activaci6n tambi6n est1n vinculados a la transici6n de zim6geno a proteasa. En el ejemplo actual, se han dise6ado experimentos para ensayar la hip6tesis de que la desestabilizaci6n del puente salino interno Ile16-Asp194 haciendo cambios en las posiciones 16, 17, o 194 altera la hendidura del sitio activo haciendo la variante resultante " de tipo zim6geno". Tambi6n se ha supuesto que estos cambios modular1an alost6ricamente la uni6n de FVa.

#### Materiales y M6todos

##### Expresi6n del Factor Xa

Aunque existen diversos informes en la bibliograf1a sobre la expresi6n del rFX, la mayor1a est1n basados en versiones truncadas o no han proporcionado una adecuada caracterizaci6n (15-20). Los intentos iniciales de expresar rFX en c6lulas HEK 293 dieron lugar a niveles de expresi6n en el intervalo de 1-2 mg rFX/L de medios condicionados; sin embargo, solamente el 10-40 % del material producido result6 estar completamente  $\gamma$ -carboxilado (21). El material restante no mostr6  $\gamma$ -carboxilaci6n. Se aprovecharon las distintas afinidades de uni6n de los prop6ptidos dependientes de la vitamina K para la carboxilasa y se supuso que, dado que el prop6ptido protrombina muestra la menor afinidad por la carboxilasa, el intercambio del prop6ptido del FX (mayor afinidad) con el de la protrombina pod1a mejorar la  $\gamma$ -carboxilaci6n permitiendo una mayor renovaci6n del sustrato (22, 23). Utilizando este nuevo vector, se seleccionaron transfectantes estables de c6lulas HEK 293, se expandieron, y el rFX se purific6 mediante cromatograf1a de inmunoafinidad. Se utiliz6 eluci6n con fosfato de hidroxapatita para separar el material carboxilado del material no carboxilado. Los resultados, actualmente obtenidos a partir de m1s de 30 l1neas celulares estables indican que, de media, el  $\sim 80$ -90 % del rFX est1 completamente  $\gamma$ -carboxilado en comparaci6n con el 10-40 % utilizando el prop6ptido del FX nativo. Estos resultados se han publicado recientemente y al menos un laboratorio distinto ha empleado posteriormente esta estrategia (24,25). De este modo, utilizando este nuevo sistema de expresi6n se est1n produciendo actualmente cantidades en miligramos (15-25 mg de rFX completamente  $\gamma$ -carboxilado a partir de  $\sim 10$  l de medio acondicionado) de prote1na para estudios de estructura/funci6n detallados.

##### Ensayos Enzim1ticos

Las concentraciones enzim1ticas se determinar1n por titulaci6n del sitio activo con p-nitrofenil p- guanidinobenzoato (IIa) o mono-p-guanidinobenzoato de fluoresce1na (FXa) (26, 27). La actividad del sustrato cromog6nico FXa, en presencia o ausencia de diversos inhibidores, se medir1 a partir de velocidades iniciales de hidr6lisis de Espectrozima FXa, S-2222, o S-2765, seg1n la descripci6n anterior (14). Los par1metros cin6ticos se determinar1n por ajuste de m1nimos cuadrados de los datos de velocidad inicial a las ecuaciones apropiadas.

##### Generaci6n de variantes de FXa

Se generaron mutantes de FX utilizando el kit de mutag6nesis dirigida Quick Change (Stratagene) y se secuenci6 todo el ADNc del FX para verificar la identidad del producto. Los diversos pl1smidos se transfectaron de forma transitoria en c6lulas HEK 293 utilizando Lipofectamine-2000. 48 horas despu6s de la transfecci6n, se recogieron los

medios y se determinaron los niveles de antígeno del FX utilizando un ELISA específico de FX y se evaluó la actividad del FXa mediante un ensayo cromogénico antes de la activación por RVV-X o por el FVIIa del factor tisular.

## RESULTADOS

La generación de la especie FXa distribuida a lo largo de la ruta de transición de zimógeno-proteasa se describe en la Tabla 1. Los resultados de transfección transitoria indican que se ha generado una serie de variantes de FXa con cantidades de actividad variables, que varían de ~25 % a <1 %. Se supone que estas diferencias en la actividad probablemente reflejan variantes de FX que cambian en diversos grados a lo largo de la transición zimógeno a proteasa. Dicho de otro modo, el puente salino interno Ile16-Asp194 se estabiliza a diversos grados dependiendo del aminoácido en las posiciones 16, 17 o 194. Se seleccionaron tres de estas variantes (rFXa16L, FXa16G y FXaV17A) para la caracterización adicional.

**Tabla 1: Activación de Diversas Variantes de rFX con RVV-X y TF-FVIIa**

Construcciones	<sup>a</sup> [FX] (nM)	% en peso Antígeno	Activación de FX con RW-X:		Activación de FX con TF-FVIIa:	
			Actividad de <sup>b</sup> FXa (nM)	<sup>c</sup> % en peso	Actividad de <sup>b</sup> FXa (nM)	<sup>c</sup> % en peso
rts-FX	54,07	100,00	10,95	100,00	18,905	100,00
Ile16→Leu	24,88	46,03	0,25	5,00	0,572	6,57
Ile16→Phe	49,48	91,51	0,01	0,08	0,004	0,02
Ile16→Asp	12,04	22,27	0,01	0,22	0,000	0,00
Ile16→Gly	27,88	51,56	0,00	0,05	0,037	0,38
Val17→Leu	28,18	52,12	1,22	21,33	3,003	30,48
Val17→Ala	55,88	103,36	0,34	3,02	1,029	5,27
Val17→Gly	47,76	88,34	0,02	0,21	0,036	0,22
Asp <sup>194</sup> →Asn	17,32	32,04	0,03	0,79	0,000	0,00
Asp <sup>194</sup> →Glu	30,97	57,29	0,02	0,27	0,000	0,00

<sup>a</sup> Los niveles de antígenos se calculan utilizando un ELISA específico de FX y se expresan como nM FX

<sup>b</sup> Los niveles de actividad FXa están basados en la velocidad de hidrólisis del sustrato de peptidil después de la activación por RVV-X o TF-FVIIa de una variante de FX determinada y las velocidades de hidrólisis iniciales se comparan con la curva estándar de FXa.

Los valores de <sup>c</sup> % en peso están basados en la comparación con niveles de actividad peso-FXa. Los valores se han ajustado para los niveles de antígenos.

Se establecieron líneas celulares estables en células HEK293 y se purificó cada uno de los zimógenos a partir de 10 l de medios acondicionados (14, 24). Las variantes se activaron con RVV-X y se purificaron después mediante cromatografía de filtración en gel (14,24). El SDS-PAGE de las variantes antes y después de la activación (reductora y no reductora) se muestra en la Figura 4.

En primer lugar el objetivo fue evaluar los cambios en el entorno del sitio activo de cada una de las variantes utilizando sondas específicas que se dirigen a esta región de FXa. Estudios cinéticos que utilizan sustratos de peptidil y sondas dirigidas de sitios activos revelaron que FXa16L y FXaV17A tienen una capacidad deteriorada para unir estas sondas (aumento de 15 a 25 veces en los valores Km o Ki), mientras que la velocidad de catálisis (kcat) se redujo en 3 veces en comparación con el FXa de tipo silvestre (derivado de plasma y recombinante) (Tablas 2 y 3). El Factor Xa I16G no se inhibió por ninguna de las sondas examinadas y su actividad cromogénica se deterioró seriamente (entre 500 y 1000 veces) impidiendo el cálculo de parámetros cinéticos. Estos datos son coherentes con la idea de que la desestabilización de la formación del puente salino interno (Ile16-Asp194) influye en la unión en el sitio de especificidad S1. A diferencia de estos resultados, el ensamblaje de FXa16L y FXaV17A en protrombinasa casi restableció por completo el valor de Km para los sustratos de peptidil mientras que el valor de kcat seguía reducido 3 veces, indicando que la unión de FVa puede redimir la unión en el sitio activo (Tablas 2 y 3). Sorprendentemente, incluso el valor Km para I16G se restableció casi completamente (aumento de 3 veces en comparación con el Fxa de tipo silvestre) cuando se ensambló en protrombinasa; sin embargo, se encontró una reducción de 60 veces en el valor kcat.

**Tabla 2: Constantes cinéticas para la escisión del sustrato cromogénico**

Especie de enzima	$K_m (\mu M) \pm DT$	$k_{cat} (s^{-1}) \pm DT$
<b>Factor Xa</b>		
rtsFXa	88,8 ± 11,4	215 ± 13,5
rFXa <sup>V17A</sup>	1377 ± 332	71,6 ± 13,5
rFXa <sup>I16L</sup>	<b>15X</b> 1149 ± 244	<b>3X</b> 57,3 ± 3,1
rFXa <sup>I16G</sup>	1608 ± 423	0,28 ± 0,05

<b>Protrombinasa</b>				
rtsFXa			130 ± 11	141 ± 3,7
rFXa <sup>V17A</sup>			362 ± 42	3X 68,2 ± 9,7
rFXa <sup>I16L</sup>	3X		296 ± 54	32,5 ± 3,1
rFXa <sup>I16G</sup>			433 ± 31	60X 1,92 ± 0,05

Para experimentos en los que se utilizó el factor Xa libre, se incubó factor Xa de tipo silvestre (ts) 2,0 nM o mutante 6,0 nM con concentraciones crecientes de Espectrozima FXa y para experimentos en los que se utilizó protrombinasa se incubó factor Xa de tipo silvestre o mutante 5,0 nM con factor Va 30 nM, PCPS 50 µM y concentraciones crecientes de sustrato (10 a 500 µM). La actividad cromogénica se evaluó monitorizando el aumento en absorbancia a 405 nm a lo largo del tiempo. Los errores en las constantes ajustadas representan el 95 % de los límites de confianza.

De acuerdo con estos datos, los estudios cinéticos que utilizaban protrombina revelaron que los valores de Km obtenidos para cada una de estas variantes ensambladas en protrombinasa fueron esencialmente equivalentes a los de la enzima de tipo silvestre, mientras que los valores de kcat se redujeron en una medida similar a los correspondientes a los sustratos cromogénicos (Tabla 4). Tomados en conjunto, los resultados indican que la transición de zimógeno a proteasa para FX no solamente influye en la formación del sitio S1, sino que también contribuye en forma sustancial a la formación de un sitio de unión a FVa. Dado que la unión directa de estas variantes de FXa a FVa redime la unión en el sitio S1, la unión alostérica se da entre estos sitios. En conjunto, estos estudios han ilustrado un modo único de modificar la vía de transición de zimógeno a proteasa y han revelado un posible modo de desarrollar formas de tipo zimógeno de enzimas que están "activadas" después de la fuerte unión de ligandos tales como proteínas cofactores.

**Tabla 3: Constantes cinéticas para la inhibición de Fxa y protrombinasa**

<b>Especie de enzima</b>		<b>Ki (µM) ± DT</b>		<b>kz (M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) ± DT x 10<sup>3</sup></b>	
<b>Factor Xa</b>	<b>Pefabloc tPa/Xa</b>	<b>Para-amino benzamidina</b>		<b>Antitrombina III</b>	
rtsFXa		0,070 ± 0,002	78,1 ± 1,5		1,37 ± 0,02
rFXa <sup>V17A</sup>	25X	1,695 ± 0,072	11X 996 ± 37	19X	0,09 ± 0,003
rFXa <sup>I16L</sup>		1,701 ± 0,065	726 ± 40		0,06 ± 0,001
<b>Protrombinasa</b>					
rtsFXa		0,050 ± 0,002	48,6 ± 0,6		0,28 ± 0,01
rFXa <sup>V17A</sup>	5X	0,295 ± 0,013	3X 191 ± 6,4	4X	0,05 ± 0,001
rFXa <sup>I16L</sup>		0,209 ± 0,005	143 ± 9,0		0,09 ± 0,003

**Tabla 4: Constantes cinéticas para la escisión de protrombina**

<b>Especie de enzima</b>	<b>Km ± DT(µM)</b>	<b>V<sub>máx</sub>/E<sub>t</sub> ± DT (nM Ila/min/nM E)</b>	<b>V<sub>máx</sub>/E<sub>t</sub> • Km (µM<sup>-1</sup> • s<sup>-1</sup>)</b>
<b>pdFXa</b>	0,42 ± 0,02	2424 ± 54	96
<b>rFXa</b>	0,35 ± 0,01	1937 ± 26	92
<b>rFXa<sup>V17A</sup></b>	0,47 ± 0,03	887 ± 26	31
<b>rFXa<sup>I16L</sup></b>	0,31 ± 0,02	619 ± 14	33

Los resultados obtenidos con el sustrato cromogénico y con los inhibidores dirigidos activos indican que las variantes de FXa de tipo zimógeno se unen a sondas de sitios activos con afinidad reducida. Sin embargo, el ensamblaje de estas variantes en protrombinasa mejora significativamente la afinidad por las sondas de sitios activos, lo que sugiere que la unión de FVa puede redimir la unión en el sitio activo. Después se investigó si lo contrario también era cierto, es decir, si la ocupación del sitio activo de tipo zimógeno influye en la unión a FVa. Con el fin de evaluar esta hipótesis se midieron las constantes de unión entre FVa y FXaI16L y FXaV17A. Para realizarlo, el FVa se incubó con un derivado fluorescente del tsFXa inactivo en presencia de vesículas fosfolípídicas sintéticas e iones de Ca<sup>2+</sup>. La formación del complejo da como resultado el aumento de la señal fluorescente relativa al FXa fluorescente solo. Después se añadieron concentraciones crecientes de un FXa no fluorescente que, si puede unirse a FVa, desplazará al FXa fluorescente, dando como resultado una disminución de la señal fluorescente. Como control se añadió FXa S195A como competidor. Este mutante es inactivo porque le falta la Ser de la tríada catalítica, pero tiene una gran afinidad por FVa (Tabla 5). En cambio, al añadir FXaI16L o FXaV17A, la afinidad de estas variantes de tipo zimógeno para el FXa disminuyó significativamente en comparación con FXaS195A (Tabla 5). Después se examinó si la ocupación covalente del sitio activo del FXaI16L podría restablecer la unión al FVa. Para hacerlo, se modificó el sitio activo del FXa de tipo silvestre y el FXaI16L con un inhibidor irreversible (EGR-clorometil cetona) y después se repitió el experimento. Los datos muestran que el sitio activo bloqueó membranas de FVa unidas a FXaI16L con la misma afinidad que el sitio activo de tipo silvestre bloqueó el FXa. Esto indica que la ocupación del sitio activo del FXa de tipo zimógeno tiene influencia directa en la unión al FVa.

**Tabla 5: Constantes de unión en equilibrio para el ensamblaje en protrombinasa**

<i>Especie de enzima</i>	<i>K<sub>d</sub> ± DT (nM)</i>
rFXa <sup>S195A</sup>	1,34 ± 0,17
rFXa <sup>V17A</sup>	7,25 ± 0,65
rFXa <sup>I16L</sup>	13,81 ± 1,07
EGR-FXA	1,80 ± 0,42
EFR-FXA <sup>I16L</sup>	1,92 ± 0,20

Después, basándose en la observación de que los derivados de FXa de tipo zimógeno tienen poca reactividad con sondas e inhibidores dirigidos activos en ausencia de FVa, pero aparentemente una actividad casi normal cuando las variantes se ensamblan en protrombinasa, se evaluó la actividad de FXaI16L en un entorno plasmático. Se añadió plasma hemofílico A (no se muestran los datos) o B a FXa de tipo silvestre para corregir el tiempo de coagulación (aPTT) de estos plasmas; el tsFXa 0,1 nM dio un tiempo de coagulación de ~32 seg. La adición de la misma concentración de FXaI16L dio un tiempo de coagulación de ~42 seg., que es ~ 50-70 % de la actividad relativa al tsFXa, lo que sugiere que esta variante de tipo zimógeno tiene una actividad de coagulación casi normal en plasma. Después, se monitorizó la semivida del FXa de tipo silvestre y del FXaI16L en el plasma de hemofilia B. Se añadieron las proteínas al plasma HB y en diferentes momentos, se extrajo una alícuota de la mezcla y se sometió a ensayo en un ensayo basado en aPTT. Los resultados con plasma HB muestran que la actividad residual relativa del FXa de tipo silvestre se inhibió muy rápidamente (<2-min) (Figura 6). En cambio, la actividad de FXaI16L persistió durante mucho más tiempo con una semivida estimada de >2 horas. Se obtuvieron resultados similares con plasma de hemofilia A. Estos resultados sugieren que es posible modular las características de una enzima para que tenga una larga semivida en plasma y pueda corregir el tiempo de coagulación de un plasma hemofílico.

A continuación se evaluó la capacidad del FXaI16L de tipo zimógeno para modular la hemostasia en un modelo murino de hemofilia (Schlachterman, et. al., 2005, J. Thromb. Haemost., 3, 2730-2737). El valor aPTT en ratones con hemofilia B (C57BL/6) es de aproximadamente 50-55 seg. A través de la vena de la cola de ratones con hemofilia B se inyectó Factor XaI16L (200 µg/kg; n = 7) o PBS (n = 4). En momentos seleccionados (5 y 30 min) se extrajo sangre y se realizó un aPTT en todas las muestras. Tal como muestra la Figura 7, la infusión de FXaI16L dio lugar a la corrección completa del aPTT a niveles observados en animales normales. Este efecto se mantuvo durante el menos 30 min, indicando que la molécula tiene una semivida relativamente larga *in vivo*. La infusión de PBS sólo tuvo un efecto marginal. Estos datos son coherentes con los experimentos anteriores de plasma *in vitro* e indican que, ciertamente, FXaI16L y, posiblemente, otras variantes de FXa de tipo zimógeno pueden modular eficazmente la hemostasia *in vivo*.

Para ensayar aún más la eficacia de FXaI16L *in vivo*, se examinó si esta molécula podría corregir el tiempo de sangrado de ratones con hemofilia B después de una lesión en la cola (Schlachterman, et. al., 2005, J. Thromb. Haemost., 3, 2730-2737). La pérdida de sangre se midió durante un período de 10 min minutos después de seccionar la parte distal de la cola. En este tipo de ensayo, la pérdida de sangre es mínima en ratones Balb-c de tipo silvestre normales (n = 7) y bastante cuantiosa en ratones (Balb c) con hemofilia B a los que inyecta PBS (n = 6) después de la lesión en la cola (Figura 8). En cambio, la inyección de 450 µg/kg de FXaI16L redujo significativamente la cantidad total de pérdida de sangre después de la lesión en la cola (n = 7). Tomados en conjunto, estos datos aportan pruebas de que el FXaI16L tiene la capacidad de mejorar la hemostasia en pacientes con hemofilia A o B.

#### REFERENCIAS

1. Furie, B. and Furie, B. C. (1976) Spectral changes in bovine factor X associated with activación by the venom coagulant protein *Vipera russelli*. J. Biol. Chem. 251, 6807-6814.
2. Robison, D., Furie, B., Furie, B. C., and Bing, D. H. (1980) Active site of bovine factor X. Characterization using substituted benzamidines as competitive inhibitors and affinity-labeling reagents. J.Biol.Chem. 255, 2014-2021.
3. Keyt, B., Furie, B. C., and Furie, B. (1982) Structural transitions in bovine factor X associated with metal binding and zymogen activation. Studies using conformational-specific antibodies. J.Biol.Chem. 257, 8687-8695.
4. Persson, E., Valcarce, C., and Stenflo, J. (1991) The  $\gamma$ -carboxyglutamic acid and epidermal growth factor-like domains of factor X. Effect of isolated domains on prothrombin activation and endothelial cell binding of factor X. J Biol Chem 266, 2458.
5. Persson, E., Hogg, P. J., and Stenflo, J. (1993) Effects of Ca<sup>2+</sup> binding on the proteasa module of factor Xa and its interaction with factor Va: evidence for two Gla-independent Ca<sup>2+</sup> binding sites in factor Xa. J Biol Chem 268, 22531-22539.



6. Dahlbäck, B. and Stenflo, J. (1978) Binding of bovine coagulation factor Xa to platelets. *Biochemistry* 17, 4938-4945.
- 5 7. Miletich, J. P., Jackson, C. M., and Majerus, P. W. (1978) Properties of the factor Xa binding site on human platelets. *J.Biol. Chem.* 253, 6908-6916.
8. Madison, E., Kobe, A., Gething, M., Sambrook, J. F., and Goldsmith, E. (1993) Converting tissue plasminogen activator to a zymogen: A regulatory triad of Asp-His-Ser. *Science* 262, 419-421.
- 10 9. Tachias, K. and Madison, E. (1996) Converting tissue-type plasminogen activator into a zymogen. *J.Biol. Chem.* 271, 28749-28752.
10. Tachias, K. and Madison, E. (1997) Converting tissue type plasminogen activator into a zymogen. Important role of Lys156 *J. Biol. Chem.* 272, 28-31.
- 15 11. Renatus, M., Engh, R. A., Stubbs, M. T., Huber, R., Fischer, S., Kohnert, U., and Bode, W. (1997) Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *EMBO J* 16, 4797-4805.
- 20 12. Eigenbrot, C., Kirchhofer, D., Dennis, M. S., Santell, L., Lazarus, R. A., Stamos, J., and Ultsch MH (2001) The factor VII zymogen structure reveals reregistration of beta strands during activation. *Structure* 9, 627-636.
13. Venkateswarlu, D., Perera, L., Darden, T., and Pedersen, L. G. (2002) Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X. *Biophys.J* 82, 1190-1206.
- 25 14. Camire, R. M. Prothrombinase assembly and S1 site occupation restore the catalytic activity of FXa impaired by mutation at the sodium-binding site. (2002) *J.Biol. Chem.* 277, 37863-37870.
15. Rezaie, A. R., Neuenschwander, P. F., Morrissey, J. H., and Esmon, C. T. (1993) Analysis of the functions of the first epidermal growth factor-like domain of factor X. *J Biol Chem* 268, 8176-8180.
- 30 16. Rezaie, A. R. and Esmon, C. T. (1994) Asp-70 to Lys mutant of factor X lacks high affinity Ca<sup>2+</sup> binding site yet retains function. *J.Biol.Chem.* 269, 21495-21499.
17. Rezaie, A. R. and Esmon, C. T. (1995) Contribution of residue 192 in factor Xa to enzima specificity and function. *J. Biol. Chem.* 270, 16176-16181.
- 35 18. Rezaie, A. R. (1996) Role of residue 99 at the S2 subsite of factor Xa and activated protein C in enzyme specificity. *J.Biol.Chem.* 271, 23807-23814.
- 40 19. Rezaie, A. R. (2000) Identification of basic residues in the heparin-binding exosite of factor Xa critical for heparin and factor Va binding. *J.Biol.Chem.* 275, 3320-3327.
20. Rezaie, A. R. and He, X. (2000) Sodium binding site of factor Xa: Role of sodium in the prothrmombinase complex. *Biochemistry* 39, 1817-1825.
- 45 21. Larson, P. J., Camire, R. M., Wong, D., Fasano, N. C., Monroe, D. M., Tracy, P. B., and High, K. A. (1998) Structure/function analyses of recombinant variants of human factor Xa: Factor Xa incorporation into prothrombinase on the activated platelet surface is not mimicked by synthetic phospholipid vesicles. *Biochemistry* 37, 5029-5038.
- 50 22. Stanley, T. B., Jin, D. Y., Lin, P., and Stafford, D. W. (1999) The propeptides of the vitamin K-dependent proteins possess different affinities for the vitamin K-dependent carboxylase. *J.Biol.Chem.* 274, 16940-16944.
23. Stanley, T. B., Humphries, J., High, K. A., and Stafford, D. W. (1999) Amino acids responsible for the reduced affinities of vitamin K-dependent propeptides for the carboxylase. *Biochemistry* 38, 15681-15687.
- 55 24. Camire, R. M., Larson, P. J., Stafford, D. W., and High, K. A. (2000) Enhanced  $\gamma$ -carboxylation of recombinant factor X using a chimeric construct containing the prothrombin propeptide. *Biochemistry* 39, 14322-14329.
- 60 25. Zhong, D., Bajaj, M. S., Schmidt, A. E., and Bajaj, S. P. (2001) The N-terminal EGF-like domain in factor IX and factor X represents an important recognition motif for binding to tissue factor. *J.Biol. Chem.* 277, 3622-3631.
26. Chase, T. and Shaw, E. (1969) Comparison of the esterase activities of trypsin, plasmin, and thrombin on guanidinobenzoate esters. Titration of the enzymes. *Biochemistry.* 8, 2212-2224.
- 65

27. Bock, P. E., Craig, P. A., Olson, S. T., and Singh, P. (1989) Isolation of human blood coagulation  $\alpha$ -factor Xa by soybean-trypsin inhibitor-Sepharose chromatography and its active-site titration with fluorescein mono-r-guanid-inobenzoate. Arch. Bioch. Biophys. 273, 375-388.

- 5 Aunque algunas de las realizaciones preferidas de la presente invención se han descrito e ilustrado específicamente en líneas anteriores, no se pretende que la invención quede limitada a dichas realizaciones.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante del Factor Xa que modula la hemostasia, que comprende al menos una mutación por sustitución en los aminoácidos 41 a 179 y 235 a 488 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 5, en la que la Val en la posición 236 está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly y Leu, con la condición de que el aminoácido en la posición 235 no sea Val o Ala.
2. La variante del Factor Xa de la reivindicación 1, en la que la Val en la posición 236 se sustituye por Ala.
- 10 3. La variante del Factor Xa de la reivindicación 1, en la que la Val en la posición 236 se sustituye por Gly.
4. La variante del Factor Xa de la reivindicación 1, en la que la Val en la posición 236 se sustituye por Leu.
- 15 5. La variante del Factor Xa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende al menos una mutación por sustitución en la Ile en la posición 235 o en el Asp en la posición 418, o en la que dicha al menos una mutación por sustitución consiste en la sustitución de la Val en la posición 236 con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly y Leu, o en la que la variante del Factor Xa tiene una semivida plasmática más larga que la de un Factor Xa que consiste en los aminoácidos 41 a 179 y 235 a 488 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 5.
- 20 6. La variante del Factor Xa de la reivindicación 1, que consiste en los aminoácidos 41 a 179 y 235 a 488 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 5 y que comprende al menos una mutación por sustitución, en la que al menos una mutación por sustitución incluye la sustitución de la Val en la posición 236 con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly y Leu.
- 25 7. La variante del Factor Xa de la reivindicación 1 que consiste en los aminoácidos 41 a 179 y 235 a 488 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 5, en la que la Val en la posición 236 se cambia a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly y Leu.
- 30 8. La variante del Factor Xa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la unión de sustratos mediante el sitio activo de dicha variante del Factor Xa es menor en comparación con el Factor Xa que consiste en los aminoácidos 41 a 179 y 235 a 488 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 5 y aumenta cuando dicha variante del Factor Xa está unida por el Factor Va en el complejo de protrombinasa.
- 35 9. Una composición farmacéutica que comprende la variante del Factor Xa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en un vehículo biológicamente compatible.
- 40 10. La variante del Factor Xa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con hemostasia.
- 45 11. La variante del Factor Xa para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho trastorno se selecciona del grupo que consiste en hemofilia A, hemofilia B, deficiencia del factor de coagulación, sangrado asociado a lesión, traumatismo, trombosis, trombocitopenia, ictus, coagulopatía y coagulación intravascular diseminada (CID).
- 50 12. Un ácido nucleico que codifica la variante del Factor Xa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
13. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Factor X (FX) humano, en la que dicho polipéptido del FX comprende al menos una mutación por sustitución en los aminoácidos 41 a 179 y 235 a 488 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 5, incluyendo dicha al menos una mutación por sustitución la sustitución de Val en la posición 236 con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly y Leu, con la condición de que el aminoácido en la posición 235 no sea Val o Ala.
- 55 14. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13, en la que la Val en la posición 236 se sustituye por Ala.
15. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13, en la que la Val en la posición 236 se sustituye por Gly.
16. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13, en la que la Val en la posición 236 se sustituye por Leu.
- 60 17. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en donde dicho ácido nucleico codifica un sitio de escisión proteolítica intracelular, en donde dicho sitio de escisión proteolítica intracelular está entre las posiciones 234 y 235 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 5, o sustituye al péptido de activación.
- 65 18. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17, en la que dicho sitio de escisión proteolítica intracelular es

un sitio de escisión PACE/furina.

- 5 19. El ácido nucleico de la reivindicación 18, en el que dicho sitio de escisión proteolítica PACE/furina comprende RKR o RKRRKR.
20. El ácido nucleico de la reivindicación 17, en donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia propeptídica de protrombina en lugar de la secuencia propeptídica nativa.
- 10 21. El ácido nucleico de la reivindicación 13, en donde dicho polipéptido FX comprende adicionalmente al menos una mutación por sustitución en la Ile en la posición 235 o en el Asp en la posición 418.
22. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21 unido operativamente a una secuencia reguladora.
- 15 23. Una célula hospedadora que comprende la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21 unida operativamente a una secuencia reguladora.
- 20 24. Un método para producir Factor X activado (FXa) que comprende incubar una célula hospedadora que comprende la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20 unida operativamente a una secuencia reguladora y purificar el FXa producido de este modo.
25. El FXa producido de acuerdo con el método de la reivindicación 24.
- 25 26. Un Factor Xa (FXa) activado obtenido mediante la escisión proteolítica de la variante del Factor X codificado por el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20.

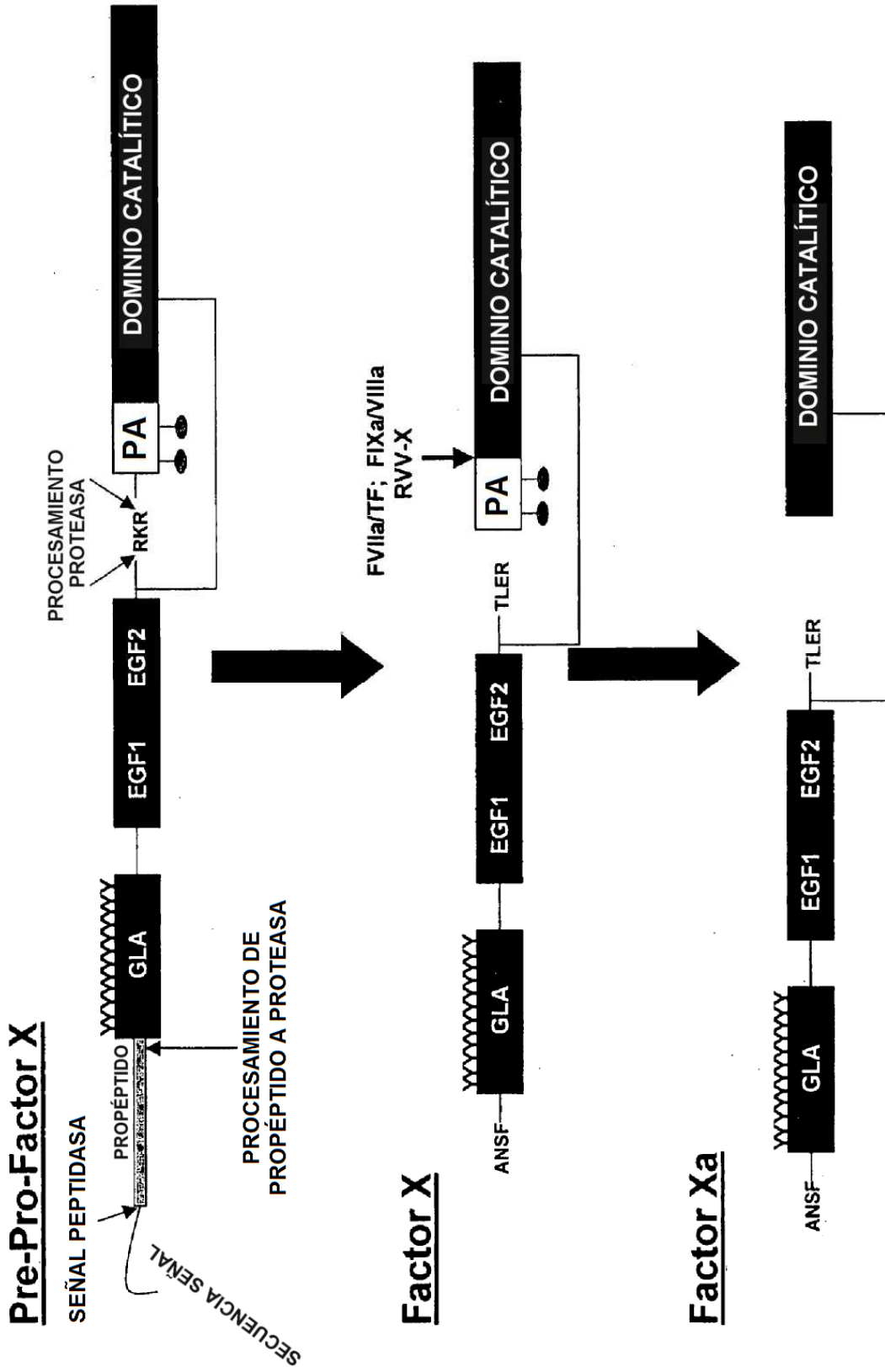


Figura 1

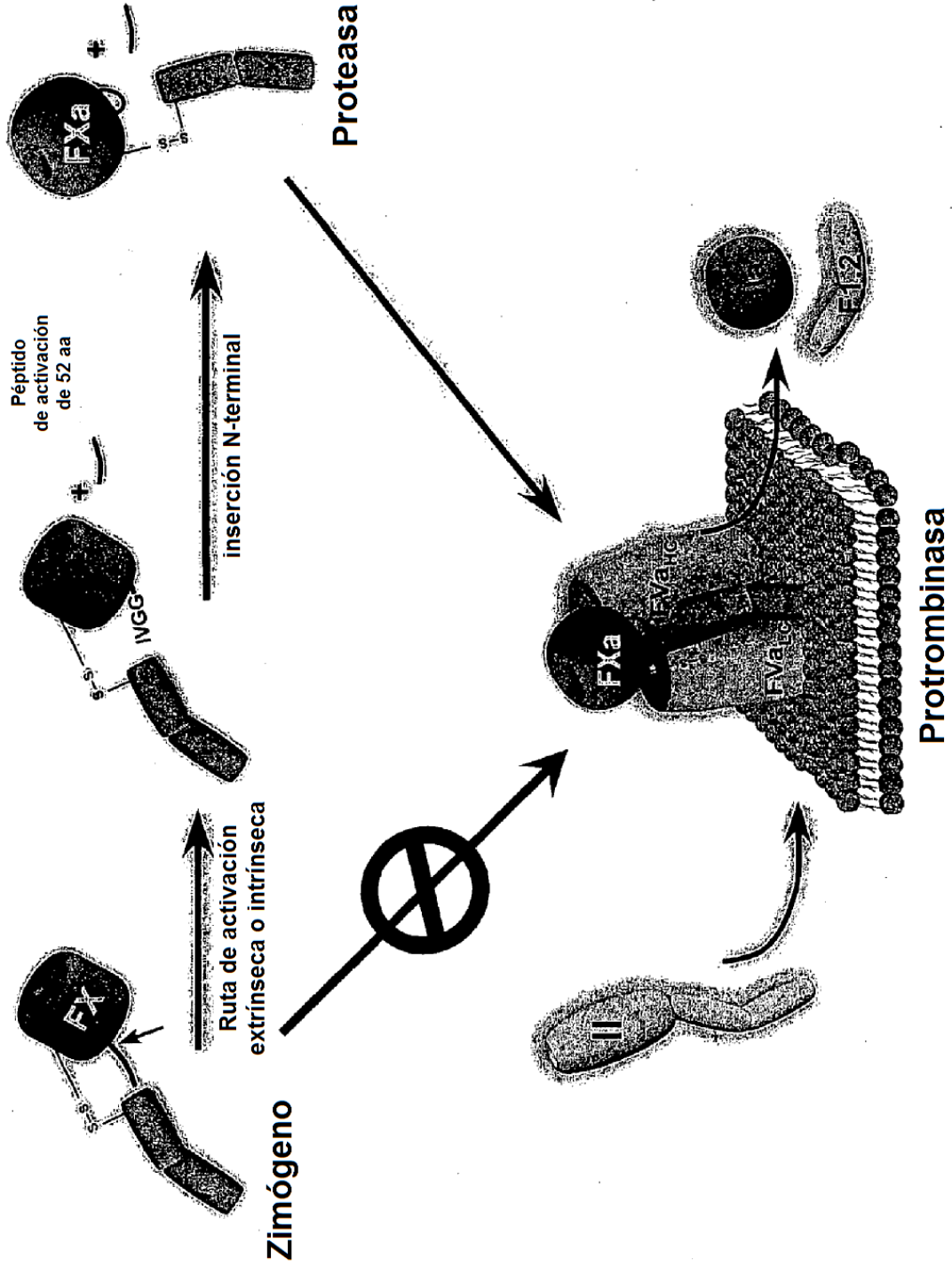


Figura 2.

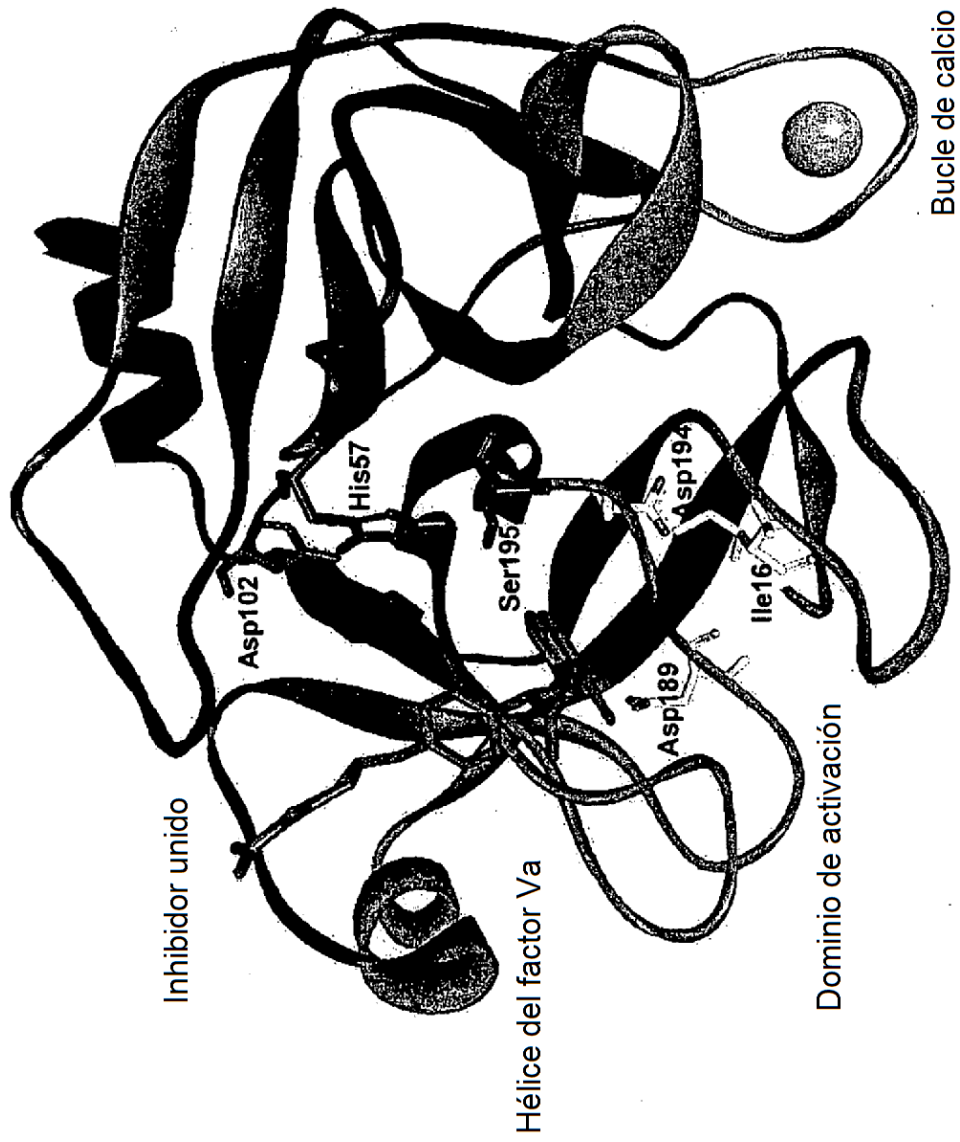


Figura 3.

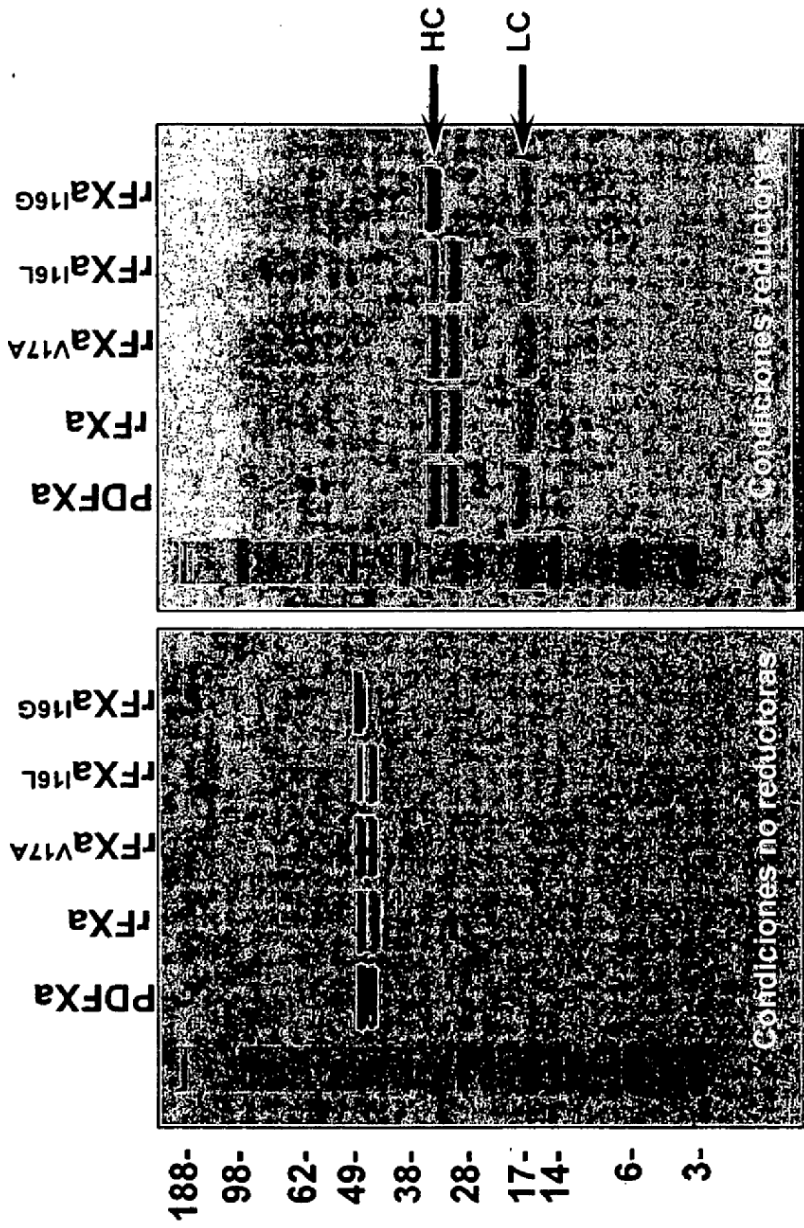


Figura 4.



Figura 5A

```

MetGlyArg ProLeuHisLeu ValleuLeu SerAlaSer LeuAlaGlyLeu LeuLeuLeu GlyGluSer
~~~~~
981 ATGGGGCG CCACTGCACC TCGTCTGTCT CAGTGCCCTCC CTGGCTGGCC TCCTGCTGCT CGGGGAAAGT
TACCCCGG GGTGACGIGG AGCAGGACGA GTCACGGAGG GACCAGACCGG AGGACGACGA GCCCCTTTCA
~~~~~
LeuPheIleArg ArgGluGln AlaAsnAsn IleLeuAlaArg ValArgArg AlaAsnSer PheLeuGluGlu
~~~~~
+I Start
1051 CTGTTTATCC GCAGGGAGCA GGCCAAACAAC ATCTGGCGA GGGTCAGGAG GGCCAAATCC TTTCTTGAAG
GACAAGTAGG CGTCCCCTCGT CCGGTTGTTG TAGGACCCTC CCCAGTCTCC CCGGTTAAGG AAAGAACTTC
~~~~~
MetLysLys GlyHisLeu GluArgGluCys MetGluGlu ThrCysSer TyrGluGluAla ArgGluVal
~~~~~
1121 AGATGAAGAA AGGACACCTC GAAAGAGAGT GCATGGAAGA GACCTGCTCA TACGAAGAGG CCCGCCGAGGT
TCTACTTCTT TCCTGTGGAG CTTTCTCTCA CGTACCTTCT CTGGACGAGT ATGCTTCTCC GGGCGCTCCA
~~~~~
.PheGluAsp SerAspLysThr AsnGluPhe TrpAsnLys TyrLysAspGly AspGlnCys GluThrSer
~~~~~
1191 CTTTGAGGAC AGGACAAGA CGAATGAATT CTGGAATAAA TACAAGATG GCGACCAGTG TGAGACCAGT
GAAACTCCCG TCGCTGTCTT GCTTACTTAA GACCTTATTT ATGTTTCTAC CGCTGGTCC ACCTCTGGTCA
~~~~~
ProCysGlnAsn GlnGlyLys CysLysAsp GlyLeuGlyGlu TyrThrCys ThrCysLeu GluGlyPheGlu
~~~~~
1261 CCTTGCCAGA ACCAGGGCAA ATGTAAGAC GGCCTCGGG AATAACACCTG CACCTGTTTA GAAGGATTGG
GGAACGGTCT TGGTCCCGTT TACATTTCTG CCGGAGCCCC TTATGTGGAC GTGGACAAAT CTTCCCTAAGC
~~~~~
..GlyLysAsn CysGluLeu PheThrArgLys LeuCysSer LeuAspAsn GlyAspCysAsp GlnPheCys
~~~~~
1331 AAGGCAAAA CTGTGAATTA TTCACACGGA AGCTCTGCAG CCTGGACAAC GGGACTGTG ACCAGTCTG
TTCCGTTTTT GACACTTAAT AAGTGTGCTT TCGAGACGTC GGACCTGTTG CCCCTGACAC TGGTCAAGAC
~~~~~
.HisGluGlu GlnAsnSerVal ValCysSer CysAlaArg GlyTyrThrLeu AlaAspAsn GlyLysAla
~~~~~

```

Figura 5B

```

1401 CCACGAGGAA CAGAACTCTG TGGTGTGCTC CTGGCCCGCC GGGTACACCC TGGCTGACAA CGGCAAGGCC
GGTGCTCCTT GTCTTGAGAC ACCACACGAG GACCGGGGG CCCATGTGGG ACCGACTGTT GCCGTTCCGG
CysIleProThr GlyProTyr ProCysGly LysGlnThrLeu GluArgArg LysArgSer ValAlaGlnAla
~~~~~
1471 TGCATTCCCA CAGGGCCCTA CCCCTGTGG AAACAGACCC TGAACGCAG GAAGAGGTCA GTGGCCACAG
ACGTAAGGGT GTCCCGGGAT GGGGACACCC TTTGTCTGG ACCITGCGTC CTTCTCCAGT CACCCGGGTCC

..ThrSerSer SerGlyGlu AlaProAspSer IleThrTrp LysProTyr AspAlaAlaAsp LeuAspPro
~~~~~
1541 CCACCAGCAG CAGCGGGGAG GCCCCTGACA GCATCACATG GAAGCCATAT GATGCAGCCG ACCTGGACCC
GGTGGTCGTC GTCGCCCTC CGGGGACTGT CGTAGTGATC CTTGGGTATA CTACGTCGGC TGGACCTGGG

.ThrGluAsn PropheAspLeu LeuAspPhe AsnGlnThr GlnProGluArg GlyAspAsn AsnLeuThr
~~~~~
1611 CACCGAGAAC CCTTCGACC TGCTTGACTT CAACCAGAGC CAGCCTGAGA GGGCGCACAA CAACCTCACG
GTGGCTCTTG GGGAAAGCTGG ACGAACTGAA GTTGGTCTGC GTCGGACTCT CCCCCTGTT GTTGGAGTGC
15 16 17 18 19
ArgIleValGly GlyGlnGlu CysLysAsp GlyGluCysPro TrpGlnAla LeuLeuIle AsnGluGluAsn
~~~~~
1681 CGTATCGTGG CAGGECAGGA ATGCAAGGAC GGGAGTGT CCTGGCAGGC CCTGCTCATC AATGAGGAAA
GCATAGCACC CTCCGGTCCT TACGTTCCCTG CCCCTCACAG GGACCGTCCG GGACGAGTAG TTACTCCTTT

..GluGlyPhe CysGlyGly ThrIleLeuSer GluPheTyr IleLeuThr AlaAlaHisCys LeuTyrGln
~~~~~
1751 ACGAGGGTTT CTGTGGTGA ACTATTCTGA GCGAGTTCTA CATCCTAACC GCAGCCCACT GTCTCTACCA
TGCTCCCAA GACACCACCT TGATAAGACT CGCTCAAGAI GTAGGATTGC CGTCGGGTGA CAGAGATGGT

.AlalaLysArg PheLysValArg ValGlyAsp ArgAsnThr GluGlnGluGlu GlyGlyGlu AlaValHis
~~~~~
1821 AGCCAAGAGA TTCAAGGTGA GGTAGGTGA CCGGAACACG GAGCAGGAGG AGGGCGGTGA GCGGTGCAC
TCGGTTCCT AAGTTCCTT CCAATCCACT CCCATCCACT GGCCTTGTGC CTCGTCCTCC TCCCGCCACT CCGCCACGTG

GluValGluVal ValIleLys HisAsnArg PheThrLysGlu ThrTyrAsp PheAspIle AlaValLeuArg

```

Figura 5C

```

1891 GAGGTGGAGG TGGTCATCAA GCACAACCCGG TTCACAAAGG AGACCTATGA CTTCGACATC GCCGTGCTCC
CTCCACCTCC ACCAGTAGTT CGTGTGGCC AAGTGTTC TCTGGATACT GAAGCTGTAG CGGCACGAGG
..LeuLysThr ProIleThr PheArgMetAsn ValAlaPro AlaCysLeu ProGluArgAsp TrpAlaGlu.

1961 GGCTCAAGAC CCCCATCACC TTCCGCATGA ACGTGGCGCC TGCCTGCCTC CCCGAGCGTG ACTGGGCCCGA
CCGAGTTC TG GGGTAGTGG AAGCGTACT TGCACCCGGG ACGGACGGAG GGGCTCGCAC TGACCCGGCT

.SerThrLeu MetThrGlnLys ThrGlyIle ValSerGly PheGlyArgThr HisGluLys GlyArgGln

2031 GTCCACGCTG ATGACGCAGA AGACGGGGAT TGTGAGCGGC TTCGGGGCA CCCACGAGAA GGGCCGGCAG
CAGGTGGCAG TACTGCGTCT TCTGCCCTA ACACTCGCCG AAGCCCGCGT GGGTGTCTTT CCCGGCCGTC

SerThrArgLeu LysMetLeu GluValPro TyrValAspArg AsnSerCys LysLeuSer SerSerPheIle.

2101 TCACACAGG TCAAGATGCT GGAGGTGCC TACGTGGACC GCAACAGCTG CAAGCTGTCC AGCAGCTTCA
AGGTGGTCCG AGTTCTACGA CCTCCACGGG ATGCACCTGG CGTTGTCGAC GTTCGACAGG TCGTCCGAAGT
194

..IleThrGln AsnMetPhe CysAlaGlyTyr AspThrLys GlnGluAsp AlaCysGlnGly AspSerGly.

2171 TCATCACCCA GAACATGTTT TGTGCCGGCT ACGACACCAA GCAGGAGGAT GCCTGCCAGG GGGACAGCGG
AGTAGTGGT CTTGTACAAG ACACGGCCGA TGCTGTGGTT CGTCCCTCCTA CGGACGGTCC CCTGTGCGCC

.GlyProHis ValThrArgPhe LysAspThr TyrPheVal ThrGlyIleVal SerTrpGly GluGlyCys

2241 GGGCCCGCAC GTCACCCCGT TCAAGGACAC CTACTTCGTG ACAGGCATCG TCAGCTGGG AGAGGGCTGT
CCCCGGCGTG CAGTGGGCGA AGTTCCTGTG GATGAAGCAC TGTCCTAGC AGTCGACCCC TCTCCCAGCA

AlaArgLysGly LysTyrGly IleTyrThr LysValThrAla PheLeuLys TrpIleAsp ArgSerMetLys.

2311 GCCCGTAAG GGAAGTACGG GATCTACACC AAGTACCCG CTTCCCTCAA GTGGATCGAC AGGTCCATGA
CGGGCATTC CCTTCATGCC CTAGATGTGG TTCCAGTGGC GGAAGGAGTT CACCTAGCTG TCCAGGTACT

```

## Figura 5D

```

..ThrArgGly LeuProLys AlaLysSerHis AlaProGlu ValIleThr SerSerProLeu Lys
~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~
2381 AAACCAGGG CTTGCCCAAG GCCAAGAGCC ATGCCCCGGA GGCATAACG TCCTCTCCAT TAAAGTGA
TTTGGTCCCC GAACGGGTTT CCGTTCTCGG TACGGGGCCT CCAGTATTGC AGGAGAGGTA ATTTCACT

```

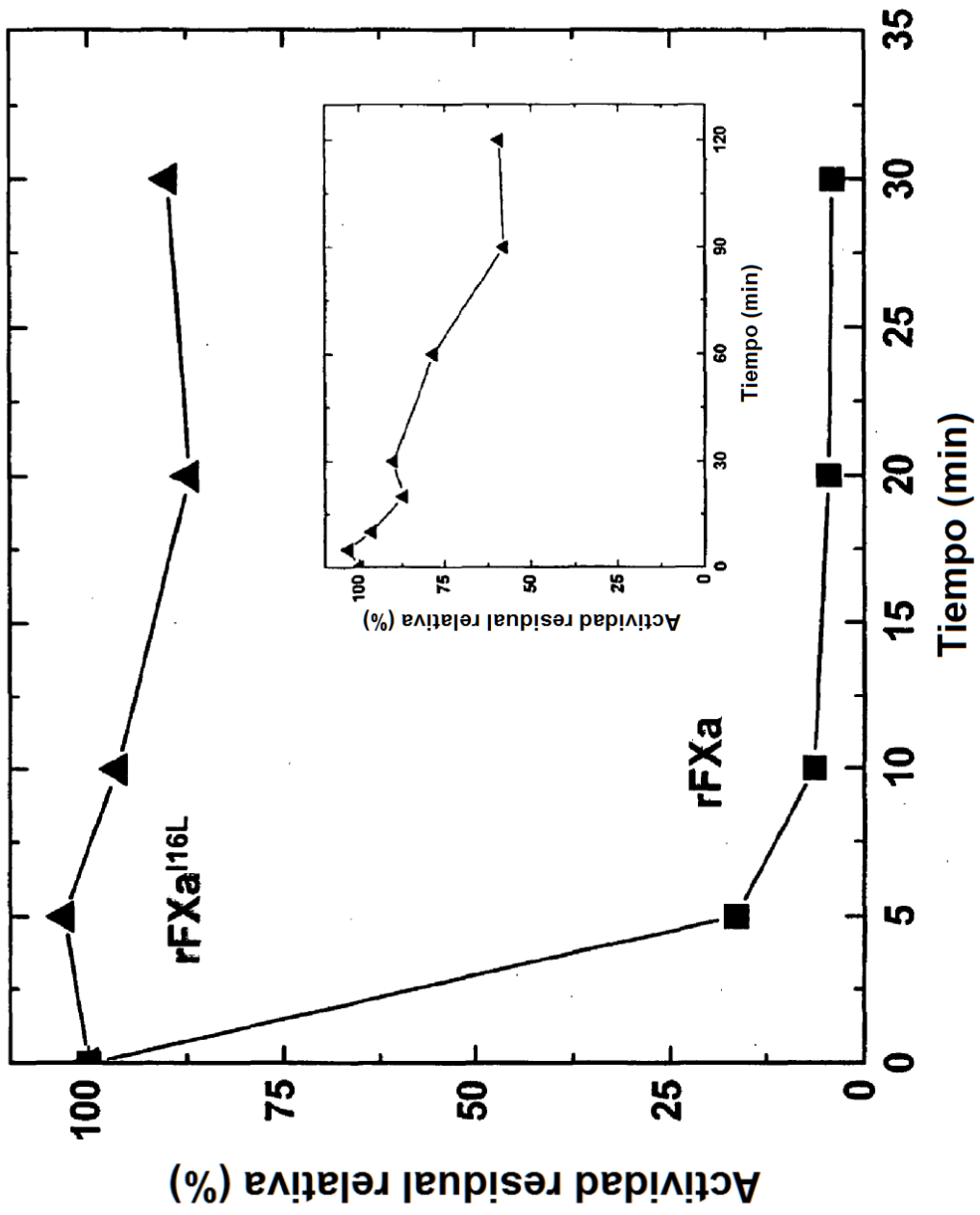


Figura 6.

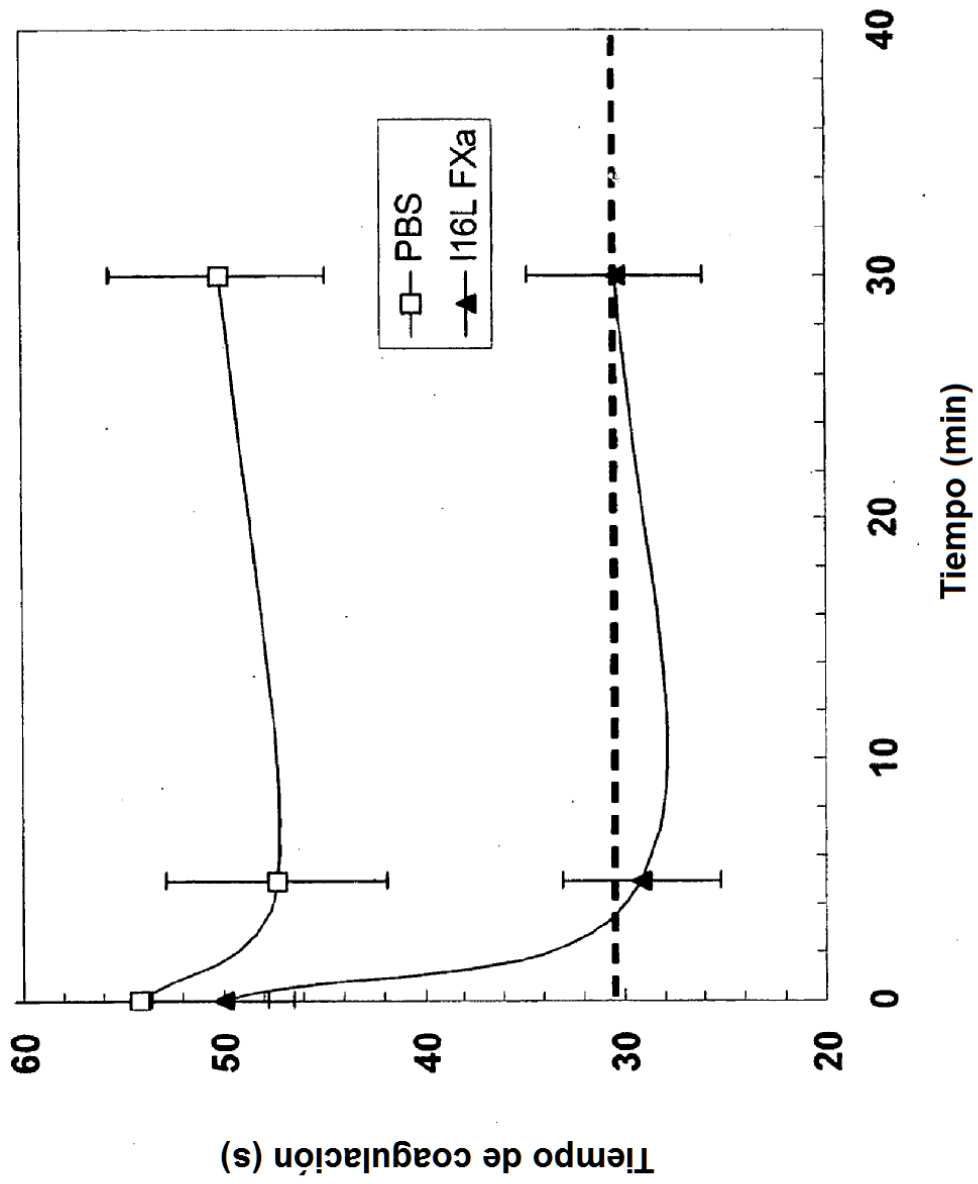


Figura 7.

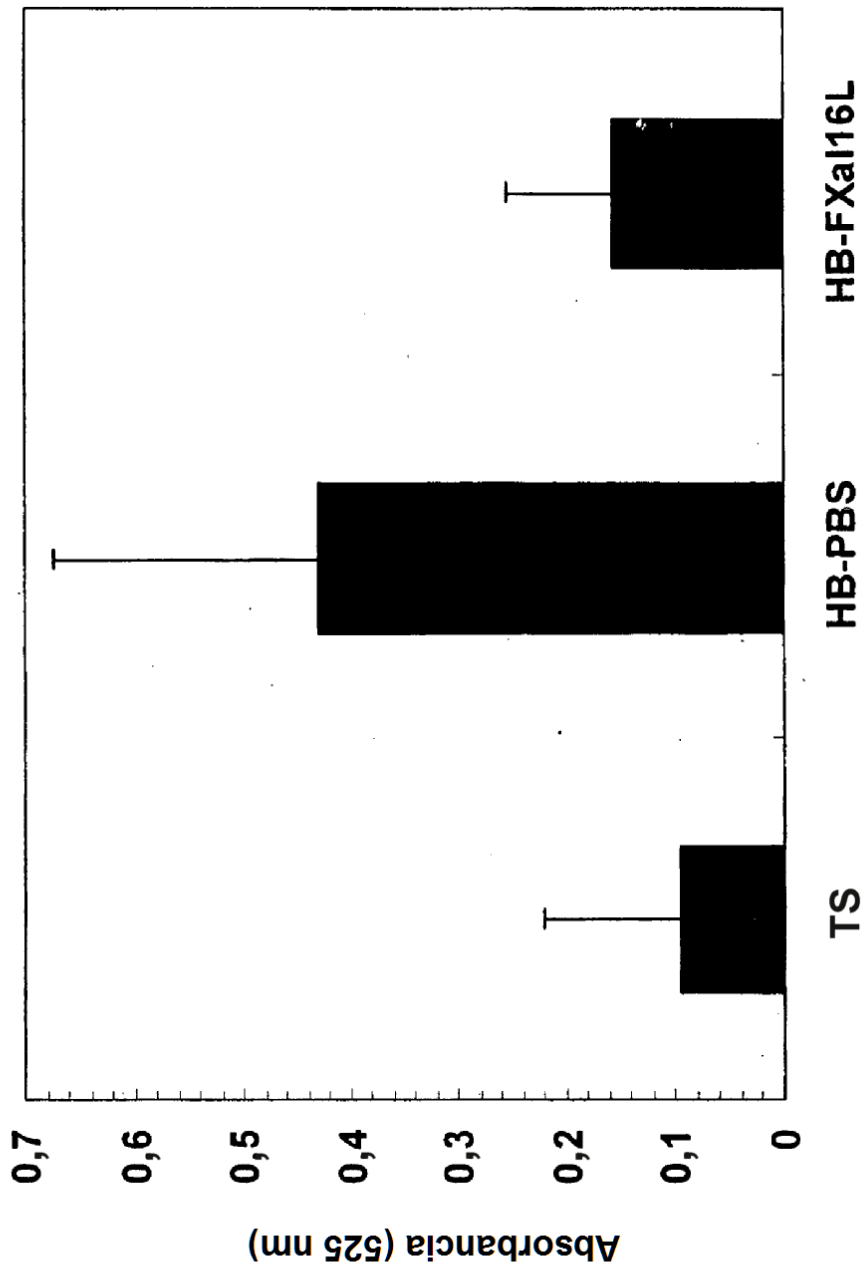


Figura 8.