

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 801**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/48** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

**A61P 7/00** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2010 PCT/US2010/042015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11008885**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2010 E 10737699 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2453910**

54 Título: **Formulación de dosis unitaria de antídoto para inhibidores del factor Xa para su uso en la prevención de la hemorragia**

30 Prioridad:

**15.07.2009 US 225887 P**

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

**16.03.2017**

73 Titular/es:

**PORTOLA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
270 East Grand Avenue, Suite 22  
South San Francisco, California 94080, US**

72 Inventor/es:

**SINHA, UMA;  
LU, GENMIN;  
HUTCHALEELAHA, ATHIWAT y  
HOLLENBACH, STANLEY J.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 605 801 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

Formulación de dosis unitaria de antídoto para inhibidores del factor Xa para su uso en la prevención de la hemorragia

5 **Campo**

La presente invención se refiere a formulaciones de dosis unitaria de un antídoto que invierte y/o neutraliza el inhibidor del factor Xa. En concreto, el antídoto puede ser derivados de factor Xa (fXa) que tienen una actividad procoagulante intrínseca reducida o nula, pero que también son capaces de unirse y/o neutralizar los inhibidores de fXa, actuando así como antídotos para los anticoagulantes dirigidos al fXa. La presente divulgación también se refiere a métodos de uso de la dosis concreta de antídoto.

15 **Antecedentes**

Los anticoagulantes cubren una necesidad en el mercado para el tratamiento o la prevención de la trombosis no deseada en pacientes con una tendencia a formar coágulos sanguíneos, tales como, por ejemplo, aquellos pacientes que tienen trastornos de la coagulación, confinados a períodos de inmovilidad o sometidos a cirugías médicas. Sin embargo, una de las principales limitaciones de la terapia anticoagulante es el riesgo de hemorragia asociado con los tratamientos, y las limitaciones en la capacidad de invertir rápidamente la actividad anticoagulante en caso de sobredosis o de requerirse un procedimiento quirúrgico urgente. Por lo tanto, los antídotos específicos y eficaces para todas las formas de terapia con anticoagulantes son muy deseados. Por motivos de seguridad, también es ventajoso contar con un par de anticoagulante-antídoto en el desarrollo de nuevos fármacos anticoagulantes.

Los pares de anticoagulante-antídoto actualmente disponibles para el exceso de anticoagulación son heparina-protamina y warfarina-vitamina K. También se han usado el plasma y el factor recombinante VIIa (rfVIIa) recién congelados como antídotos inespecíficos en pacientes sometidos a tratamiento con heparina de bajo peso molecular, que sufren un gran traumatismo o una hemorragia grave. (Lauritzen, B. *et al.*, *Blood*, 2005, 607A-608A). También se ha informado de fragmentos de protamina (patente de EE.UU. n.º 6.624.141) y pequeños péptidos sintéticos (patente de EE.UU. n.º 6.200.955) como antídotos de heparina o de heparina de bajo peso molecular; y muteínas de la trombina (patente de EE.UU. n.º 6.060.300) como antídotos para el inhibidor de la trombina. Se ha informado de productos intermedios de protrombina y derivados como antídotos para la hirudina y los inhibidores de trombina sintéticos (patentes de EE.UU. n.º 5.817.309 y 6.086.871).

Una forma prometedor de terapia anticoagulante se dirige al factor Xa (fXa), y de hecho, varios inhibidores directos de fXa se encuentran actualmente en diferentes etapas de desarrollo clínico para su uso en terapia anticoagulante. Un inhibidor directo de fXa Xarelto™ (rivaroxabán) ha sido aprobado para uso clínico en la Unión Europea y Canadá para la prevención del tromboembolismo venoso en pacientes de cirugía ortopédica. Muchos de estos son moléculas pequeñas. Si bien estos nuevos inhibidores de fXa son prometedores para el tratamiento, aún se necesitan antídotos específicos y eficaces. En caso de exceso de anticoagulación o necesidad de cirugía en pacientes tratados con estos inhibidores de fXa, se puede requerir un agente para neutralizar esencialmente el inhibidor o inhibidores de fXa administrados y restablecer la hemostasia normal.

Los agentes disponibles en la actualidad, tales como el factor VIIa recombinante (rfVIIa), tienen limitaciones mecánicas y no son específicos de la inversión de los inhibidores de fXa y, por lo tanto, se desean mejores opciones para el clínico. En estudios realizados en seres humanos, se ha usado el rfVIIa para neutralizar el efecto de los inhibidores indirectos del fXa dependientes la antitrombina III tales como fondaparinux e idraparinux (Bijsterveld, N. R. *et al.*, *Circulation*, 2002, 106:2550-2554; Bijsterveld, N. R. *et al.*, *British J. of Haematology*, 2004(124): 653-658). El mecanismo de acción del factor VIIa (fVIIa) es el de actuar con el factor tisular para convertir el factor X (fX) presente en la circulación sanguínea en el fXa con el fin de restablecer la hemostasis normal en los pacientes. Este modo de acción dicta necesariamente que la concentración potencial más elevada de fXa que se podría alcanzar para neutralizar el sitio activo dirigido a los inhibidores de fXa está limitada por la concentración en plasma en circulación de fX. Así pues, el potencial del uso de rfVIIa para invertir el efecto de los inhibidores directos de fXa tiene limitaciones mecánicas. Dado que la concentración en plasma en circulación de fX es de 150 nanomolar ("nM"), la cantidad máxima de fXa producida de este modo sería de 150 nM. Las concentraciones terapéuticas que se han dado a conocer de los inhibidores de fXa de bajo peso molecular, tales como rivaroxabán, han sido superiores (de aproximadamente 600 nM, Kubitz D., *et al.*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2005, 61:873-880) a la posible cantidad de fXa generada por rfVIIa. El uso de rfVIIa para la inversión de los niveles terapéuticos o supratrapéuticos de anticoagulación por el inhibidor de fXa proporcionaría, por lo tanto, niveles inadecuados de eficacia. Como se muestra en la Figura 4, el uso de rfVIIa tiene un efecto limitado en la neutralización de la actividad anticoagulante del inhibidor del factor Xa betrixabán (descrito más adelante). El fVIIa recombinante mostró una actividad de antídoto sensible a la dosis de 50 nM a 100 nM, pero el efecto se estabilizó entre 100 nM a 200 nM, lo que indica que su efecto de antídoto está limitado por factores distintos a su concentración. En todas las concentraciones de rfVIIa ensayadas, el betrixabán seguía mostrando una inhibición de fXa sensible a la dosis, hasta aproximadamente el 75 % de inhibición a una concentración de 250 nM. Dicha observación coincide con el

mecanismo de acción de fVIIa propuesto. Esto también se ve apoyado por estudios que muestran que el rfVIIa no invirtió por completo el efecto inhibitor de fondaparinux en los parámetros de generación de la trombina y de activación de la protrombina. (Gerotifas, G. T., *et al.*, *Thrombosis & Haemostasis*, 2204(91):531-537).

5 El fXa activo exógeno no se puede administrar directamente a un sujeto de una manera similar al rfVIIa. A diferencia del rfVIIa, que tiene muy baja actividad procoagulante en ausencia de su cofactor tisular, el fXa natural es una potente enzima y tiene un riesgo potencial de causar trombosis. Por lo tanto, el uso de bien rfVIIa o fXa activo como antídoto para una terapia anticoagulante con fXa tiene desventajas.

10 Los antídotos empleados en las formulaciones y en los métodos de la invención se describen en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2009-0098119.

A pesar de la divulgación de los antídotos en la solicitud mencionada anteriormente, la dosificación del antídoto es un componente crítico para garantizar la seguridad del paciente.

15

### Sumario

Se ha descubierto ahora que los derivados modificados de las proteínas fXa administrados son útiles como antídotos para los anticoagulantes dirigidos al fXa cuando se proporcionan en una determinada dosis. Los derivados modificados de las proteínas fXa no compiten con fXa en el ensamblaje en el complejo de protrombinasa, sino que, en cambio, se unen y/o neutralizan esencialmente los anticoagulantes tales como los inhibidores de fXa. Los derivados útiles como antídotos se modifican para reducir o eliminar las actividades procoagulante y anticoagulante intrínsecas, al tiempo que conservan la capacidad de unirse a los inhibidores. Se contempla que los derivados de la invención pueden incluir la modificación del sitio activo, o el cambio o la eliminación de todo el dominio Gla de fXa, o diversas combinaciones de los mismos. Se contempla además que la modificación del dominio Gla reduce o elimina el efecto anticoagulante del derivado de fXa en la hemostasia normal, porque se sabe que un fXa de longitud completa con el sitio activo modificado es un anticoagulante.

En una realización, la invención se dirige a una formulación de dosis unitaria que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y de 400 miligramos a 900 miligramos de un polipéptido de cadena doble que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13, en el que la secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13 (a) tiene una actividad procoagulante reducida en comparación con el factor Xa de tipo silvestre y (b) no se ensambla en un complejo de protrombinasa, para su uso en la prevención, reducción o cese de la hemorragia en un sujeto humano sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa; comprendiendo la prevención, la reducción o el cese de la hemorragia la administración al sujeto de la formulación de dosis unitaria mediante inyección de bolo intravenoso o una combinación de una inyección de bolo y una infusión, en la que se administran de 400 miligramos a 900 miligramos del polipéptido de cadena doble. En una realización, la invención se dirige al uso de una formulación de dosis unitaria que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y de 400 miligramos a 900 miligramos de un polipéptido de cadena doble que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13, en el que la secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13 (a) tiene una actividad procoagulante reducida en comparación con el factor Xa de tipo silvestre y (b) no se ensambla en un complejo de protrombinasa, en la fabricación de un medicamento para la prevención, reducción o cese de la hemorragia en un sujeto humano sometido a una terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa en un método que comprende administrar la formulación de dosis unitaria al sujeto mediante inyección de bolo intravenoso o una combinación de una inyección de bolo y una infusión, en la que se administran de 400 miligramos a 900 miligramos del polipéptido de cadena doble. La cantidad es de aproximadamente 400 miligramos a aproximadamente 900 miligramos.

En ciertas realizaciones, la cantidad del polipéptido es eficaz en la neutralización de un inhibidor del factor Xa en aproximadamente un 20 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 % o aproximadamente 100 %.

En otra realización, la divulgación se dirige a una formulación de dosis unitaria para la administración a un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa, comprendiendo dicha formulación un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad neutralizante de un polipéptido de cadena doble que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o un polipéptido que tiene al menos un 80 % de homología con SEQ ID NO: 13, de manera que la cantidad neutralizante esté al menos en una relación molar de aproximadamente 1:1 de concentración en circulación de polipéptido con respecto a la concentración en circulación del inhibidor del factor Xa durante un período de al menos aproximadamente 30 minutos. En una realización, dicha relación molar se refiere a la anticoagulación inducida por betrixabán. En otras realizaciones, la relación molar es de aproximadamente 1:1 o aproximadamente 2:1, y en otras realizaciones más de la divulgación, la relación es de aproximadamente 4:1 o superior.

En algunas realizaciones, el vehículo es solución salina. En algunas realizaciones, el vehículo es solución salina estéril. En otras realizaciones, la formulación tiene una concentración de aproximadamente 0,2 a aproximadamente

10 miligramos de polipéptido por mililitro de solución salina. En otras realizaciones, la concentración es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 miligramos de polipéptido por mililitro de solución salina o de aproximadamente 2 miligramos de polipéptido por mililitro de solución salina.

5 En ciertas realizaciones, el polipéptido se liofiliza.

En otra realización, la divulgación se dirige a un método de unión e inhibición selectiva de un inhibidor del factor Xa administrado exógenamente a un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa que comprende la administración al sujeto de una formulación de dosis unitaria de la invención.

10 En otra realización más, la divulgación se dirige a un método de prevención, reducción o cese de la hemorragia en un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa que comprende la administración al sujeto de una formulación de dosis unitaria de la invención.

15 En otra realización más, la divulgación se dirige a un método de corrección de los marcadores farmacodinámicos o sustitutos dependientes del inhibidor del fXa en un paciente sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa que comprende la administración al sujeto de una formulación de dosis unitaria de la invención.

20 En los usos de la invención, la formulación se puede administrar bien a través de la administración intravenosa en bolo o una combinación de bolo e infusión. En la literatura, se ha publicado la administración subcutánea de factores de coagulación humanos. Véase, McCarthy K., *et al.*, *Thromb. Haemost.*, 2002, 87(5): 824-30; Gerrard A. J., *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 1992, 81(4): 610-3; Miekka S. I. *et al.*, *Haemophilia*, 1998, 4(4), 436-42. En ciertas realizaciones, se administra del aproximadamente 10 al aproximadamente 20 % de la formulación en forma de bolo, y se infunde el resto de la formulación durante un período hasta que la hemorragia ha cesado esencialmente. Se contempla que la infusión se puede administrar durante aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 6 a aproximadamente 12 horas, o aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas o 48 horas.

25 En otro aspecto, se administra la proteína factor Xa modificada junto con un agente capaz de prolongar la semivida en plasma (o semivida en circulación) del derivado de factor Xa. En otro aspecto más, el antídoto se conjuga con una fracción para prolongar su semivida en plasma.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un inhibidor de fXa para su uso anticoagulante y un antídoto del inhibidor de fXa (o derivado del factor Xa) para su uso cuando se necesita la neutralización sustancial de la actividad anticoagulante del inhibidor de fXa. Cuando se proporciona el antídoto de forma liofilizada, el kit comprende, opcionalmente, además un vial de solución salina estéril.

35 La divulgación proporciona además un conjugado de péptido que comprende un vehículo unido de forma covalente o de forma no covalente al polipéptido que se acaba de describir. El vehículo puede ser un liposoma, una micela, un polímero farmacéuticamente aceptable o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Se pueden encontrar realizaciones adicionales de la invención a lo largo del resto de memoria descriptiva.

### Breve descripción de las figuras

45 La Figura 1 muestra de forma esquemática la estructura de dominios del factor X humano (SEQ ID NO: 1) que se muestra en la Tabla 13 según lo publicado en Leytus *et al.*, *Biochem.*, 1986, 25, 5098-5102. La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos del fX humano codificado por la secuencia de nucleótidos de fX humano (SEQ ID NO: 2) que se muestra en la Tabla 14 que se conoce de la técnica anterior. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos traducida está publicada en Leytus *et al.*, *Biochem.*, 1986, 25, 5098-5102, y que se puede encontrar en GenBank, "NM\_000504" en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=89142731>. La numeración de los aminoácidos de esta secuencia se basa en la secuencia de fX. El precursor de fX humano (SEQ ID NO: 1) contiene una secuencia prepro-líder (aminoácidos 1 a 40 de SEQ ID NO: 1), seguida de las secuencias correspondientes a la cadena ligera de fX (LC) (aminoácidos 41 a 179 de SEQ ID NO: 1), el triplete RKR (SEQ ID NO: 16) (aminoácidos 180 a 182 de SEQ ID NO: 1) que se elimina durante la secreción de fX, y la cadena pesada de fX (aminoácidos 183 a 488 de la SEQ ID NO: 1) que contiene el péptido de activación (AP) (aminoácidos 183 a 234 de SEQ ID NO: 1) y el dominio catalítico (aminoácidos 235 a 488 de SEQ ID NO: 1).

50 La Figura 2 (SEQ ID NO: 3) muestra la secuencia de aminoácidos del factor de X humano maduro. La numeración de los aminoácidos de dicha figura se basa en la secuencia de fX maduro a partir del extremo N-terminal de la cadena ligera de fX. El factor X circula en el plasma como una molécula de doble cadena unida por un enlace disulfuro. La cadena ligera (LC) tiene 139 restos de aminoácido (aminoácidos 41 a 179 de SEQ ID NO: 1) y contiene el dominio rico en ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla) (aminoácidos 1-45 de SEQ ID NO: 3), incluyendo un apilamiento aromático corto (AS) (aminoácidos 40-45 de SEQ ID NO: 3), seguido de dos dominios de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) (EGF1: aminoácidos 46-84, EGF2: aminoácidos 85-128 de SEQ ID NO: 3). La cadena pesada (HC) tiene 306 aminoácidos y contiene un péptido de activación de 52 aminoácidos (AP: aminoácidos 143-194 de SEQ ID NO: 3), seguido del dominio catalítico (aminoácidos 195-448 de SEQ ID NO: 3).

Los equivalentes de la tríada catalítica a H57-D102-S195 de la numeración de la quimotripsina se encuentran en His236, Asp282 y Ser379 de la secuencia de fX y están subrayados (aminoácidos 236, 282 y 379 de SEQ ID NO: 3).

5 La Figura 3 muestra de forma esquemática la estructura de dominios de factor X humano maduro que se muestra en la Figura 2. La numeración de los aminoácidos en dicha figura se basa en la secuencia de fX maduro. Aparecen destacados los sitios de escisión para la digestión por parte de la quimotripsina para eliminar el fragmento que contiene el dominio Gla (aminoácidos 1-44 de SEQ ID NO: 3) y la activación de fX para eliminar el péptido de activación. La digestión del fXa por parte de la quimotripsina da lugar a fXa sin dominio Gla que  
10 carece de los restos de aminoácidos 1-44 (SEQ ID NO: 4).

La Figura 4 muestra el efecto de concentraciones variables de fVIIa en presencia de factor tisular en la actividad anticoagulante del inhibidor de fXa betrixabán (descrito más adelante) en un ensayo de generación de trombina (expresada como unidades de fluorescencia relativa (UFR) (según lo descrito en el Ejemplo 2)) usando muestras preparadas de PPP. Los datos muestran que una combinación de fVIIa y factor tisular no fue capaz de neutralizar completamente la actividad anticoagulante de un inhibidor de fXa, betrixabán, a concentraciones de hasta 250 nM.  
15

La Figura 5 muestra que el fXa anhidro con su dominio Gla intacto revierte la inhibición de fXa efectuada por betrixabán en un sistema purificado que contiene fXa activo y betrixabán (círculo vacío), mientras que el fXa anhidro solo tiene actividad procoagulante irrelevante (triángulo vacío) en comparación con el fXa activo. La actividad de fXa cromógeno se normalizó con respecto al fXa activo en ausencia de cualquier inhibidor (cuadrado vacío). Esto se describe más a fondo en el Ejemplo 4. Los datos muestran que el fXa anhidro que es inactivo hacia el sustrato fXa, sigue conservando la capacidad de unión del inhibidor de fXa.  
20

La Figura 6 muestra que el fXa anhidro con dominio Gla intacto de la Figura 5 es un potente inhibidor en el ensayo de generación de trombina en plasma (expresada como unidades de fluorescencia relativa (UFR)) usando muestras preparadas de PPP (según lo descrito en el Ejemplo 2). Inhibió casi por completo la generación de trombina a aproximadamente 115 nM. Los datos muestran que el fXa anhidro sin modificación del dominio Gla no es adecuado para su uso como un antídoto del inhibidor de fXa.  
25

La Figura 7 muestra la comparación de la actividad de coagulación del fXa activo en un formato de placa de 96 pocillos antes de la digestión con quimotripsina, y después de 15 minutos y 30 minutos de la digestión con quimotripsina. Como se muestra en dicha figura, el tiempo de coagulación (cambio de OD405) se retrasó significativamente una vez digerido el fXa por la quimotripsina durante 15 minutos y no se observó coagulación durante hasta 20 minutos cuando se digirió el fXa durante 30 minutos. Este resultado también se usó para establecer las condiciones para la digestión con quimotripsina del fXa anhidro, porque no tiene ninguna actividad que se pueda controlar durante la digestión. Esto se describe más a fondo en el Ejemplo 1.  
30

La Figura 8 muestra la afinidad de unión de fXa anhidro sin Gla al inhibidor del factor Xa betrixabán según lo descrito en el Ejemplo 4. Los datos muestran que el fXa anhidro sin Gla, preparado mediante la digestión con quimotripsina de fXa anhidro para eliminar el fragmento que contiene el dominio Gla (restos 1-44), es capaz de unirse a betrixabán con una afinidad similar a la del fXa natural (fXa:  $K_i = 0,12$  nM, fXa anhidro sin Gla:  $K_d = 0,32$  nM).  
35

La Figura 9 muestra la inversión de la actividad anticoagulante de concentraciones variables de betrixabán mediante la adición de un concentrado de 680 nM del antídoto (fXa anhidro sin Gla) en un ensayo de generación de trombina del Ejemplo 2 usando muestras preparadas de PPP. A la concentración de 680 nM, fXa anhidro sin Gla fue capaz de producir el restablecimiento esencialmente completo de la actividad de fXa.  
40

La Figura 10 muestra la inversión de la actividad anticoagulante de 250 nM de betrixabán variando las concentraciones del antídoto (fXa anhidro sin Gla) en ensayos de prolongación de la coagulación con muestras preparadas de PPP usando el reactivo aPTT en un formato de placa de 96 pocillos (según lo descrito en el Ejemplo 3). Los datos muestran que el tiempo de coagulación resultó ser comparable al del plasma pobre en plaquetas de control cuando se usaron aproximadamente 608 nM del antídoto para neutralizar 250 nM del inhibidor de fXa betrixabán.  
45

La Figura 11 muestra el efecto sobre la actividad anticoagulante de la enoxaparina (0,3125-1,25 U/ml) por 563 nM del antídoto (fXa anhidro sin Gla) en ensayos de prolongación de la coagulación con muestras preparadas de PPP usando el reactivo aPTT en un formato de placa de 96 pocillos, expresado como las veces de cambio tras la normalización. El protocolo del ensayo se describe en Ejemplo 3. Los datos muestran que la adición de 563 nM del antídoto neutralizó significativamente la actividad de la heparina de bajo peso molecular enoxaparina.  
50

La Figura 12 muestra el efecto del antídoto, fXa anhidro sin Gla, sobre la actividad de la trombina (5 nM) y su inhibición por 50 nM de argatrobano, un inhibidor específico de la trombina, en un ensayo cromogénico. Como  
55

60

65

era de esperar, el antídoto de inhibidor de fXa no afecta de forma detectable a la actividad de la trombina o su inhibición por el inhibidor específico argatrobano a concentraciones de hasta 538 nM. Esto se describe más a fondo en el Ejemplo 14.

5 La Figura 13 muestra el efecto sobre la actividad anticoagulante de betrixabán 400 nM a concentraciones variables del antídoto, fXa anhidro sin Gla, en un ensayo de aPTT usando un contador de tiempo de coagulación convencional. El protocolo de ensayo se describe en el Ejemplo 3. Los datos muestran que el antídoto del inhibidor de fXa invierte esencialmente la inhibición de fXa por 400 nM de betrixabán. La  $CE_{50}$  del antídoto se estima en aproximadamente 656 nM con betrixabán 400 nM.

10 La Figura 14 muestra el mapa de la construcción de ADN para la expresión del mutante triple de fXa (SEQ ID NO: 12) en células CHO. Se linealizó el ADN del plásmido y se transfectó en células CHO dhfr(-). Las células se seleccionaron usando medios deficientes en tetrahidrofolato (HT) más metotrexato (MTX). Se seleccionaron clones estables para la expresión de alto valor proteico mediante ELISA. El mutante triple de fXa se produjo en medio exento de suero, y se purificó por combinación de intercambio de iones y columnas de afinidad. La numeración en el mapa se basó en la secuencia polipeptídica codificante de fX humano de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, una mutación de alanina en el sitio activo S419 (SEQ ID NO: 1) es equivalente a la mutación en S379 (SEQ ID NO: 3) de fX humano maduro descrita a lo largo de la solicitud y, más particularmente, en el Ejemplo 7.

15 La Figura 15 muestra SDS-PAGE y transferencia Western del Antídoto r purificado usando anticuerpos monoclonales que reconocen la cadena pesada y la cadena ligera de fX humano, respectivamente.

20 La Figura 15A muestra una transferencia Western del Antídoto r purificado por intercambio iónico y purificación por afinidad. Tras la reducción del enlace disulfuro que une las cadenas ligera y pesada, la cadena pesada del Antídoto r migra en el peso molecular esperado de manera similar a la del fXa derivado del plasma. La supresión de los aa 6 a 39 del dominio Gla de fXa mutante da lugar a una banda de peso molecular inferior de la cadena ligera del Antídoto r en comparación con el fXa normal.

25 La Figura 15B y 15C muestra una SDS-PAGE y transferencia Western del Antídoto r purificado mediante intercambio iónico y purificación por afinidad seguidas de la cromatografía de exclusión por tamaño.

30 La Figura 16 muestra el nivel en plasma de betrixabán en ratones ( $n = 7-10$  por grupo) después de la administración oral de betrixabán solo (15 mg/kg) o betrixabán (15 mg/kg) seguido de la inyección intravenosa (300  $\mu$ g, IV) de antídoto derivado de plasma (antídoto dp) preparado de acuerdo con el Ejemplo 1. Se administró antídoto dp 5 minutos antes del punto temporal de 1,5 h, y se tomaron muestras de sangre de ratón (0,5 ml) a las 1,5, 2,0 y 4,0 horas después de la administración oral de betrixabán. Se analizaron los niveles de INR de sangre entera, betrixabán y antídoto en plasma. Se representó el nivel de betrixabán (media  $\pm$  ETM) en plasma de ratón en función del tiempo para los ratones tras 15 mg/kg (cuadrado vacío) y 15 mg/kg seguidos de la inyección de antídoto (círculo vacío). La correlación de PK-PD del grupo tratado con antídoto en el punto temporal de 1,5 h (5 min después de la inyección de antídoto) se resume en la Tabla 1. Una sola inyección del antídoto resultó en una reducción de  $> 50\%$  de betrixabán funcional basado en las mediciones de INR. Esto se describe más a fondo en el Ejemplo 8.

35 La Figura 17 muestra los resultados de un experimento en ratones con Antídoto r purificado ( $n = 4-10$  por grupo). Se compararon el nivel de betrixabán en plasma de ratón (Figura 17A) y de INR de sangre entera (Figura 17B) tras la administración oral de betrixabán solo (15 mg/kg) o betrixabán (15 mg/kg) seguido de la inyección intravenosa (300  $\mu$ g) de antídoto r. Se indicaron los valores medios para cada grupo tratado. Como se resume en la Tabla 2, una sola inyección IV del antídoto r resultó en  $> 50\%$  de la corrección de INR de sangre entera *ex vivo*, lo que justifica la neutralización eficaz de los inhibidores de fXa por el antídoto a través de una sola o de múltiples inyecciones u otros regímenes. Estos resultados demuestran que las variantes de fXa de la presente invención tienen el potencial de actuar como antídotos universales para invertir el efecto anticoagulante de los inhibidores de fXa en pacientes con hemorragia u otras urgencias médicas. Esto se describe más a fondo en el Ejemplo 8.

45 La Figura 18 muestra la inversión por parte del antídoto r del efecto inhibidor de la enoxaparina en un ensayo de coagulación de cambio de turbidez de 96 pocillos. Los resultados son esencialmente similares al Antídoto dp (Figura 11), lo que indica que ambos derivados de fXa tienen actividad de antídoto funcional comparable. El antídoto r 508 nM corrigió esencialmente ( $> 75\%$ ) el efecto inhibidor de 1,25 U/ml de enoxaparina. El protocolo de ensayo se presenta en el Ejemplo 11.

50 La Figura 19 muestra la inversión por parte del Antídoto r del efecto inhibidor de la heparina de bajo peso molecular (HBPM) analizada en el ensayo de coagulación de plasma humano. Ambas Figuras 18 y 19 se tratan en el Ejemplo 11.

55 La Figura 20 muestra la inversión por parte del Antídoto r del efecto anticoagulante de rivaroxabán. Esto se trata más a fondo en el Ejemplo 12.

La Figura 21 muestra la alineación de la secuencia polinucleotídica y la secuencia polipeptídica traducida del Antídoto r.

5 La Figura 22 muestra los resultados de un experimento en ratones con una sola inyección IV (1 inyección) o dos inyecciones (2 inyecciones) del antídoto r (n = 5 por grupo, 312 ug/200 ul de Antídoto r). Se comparó el nivel de betrixabán en plasma (Figura 22A) tras la administración oral de betrixabán (15 mg/kg) seguida de la inyección intravenosa de vehículo o de Antídoto r (para más información, véase el Ejemplo 8). Como se muestra en la Figura 22A, una sola inyección IV de Antídoto r aumentó el nivel de betrixabán en plasma en más de 8 veces en comparación con el control de vehículo (control\_1), lo que indica la capacidad del antídoto para unirse eficazmente a betrixabán *in vivo*. Una segunda inyección del antídoto aumentó aún más el nivel betrixabán en menos de 2 veces en comparación con una sola inyección, lo que indica la cantidad limitante de betrixabán en sangre de ratón y la inversión de su efecto anticoagulante por el antídoto. La Figura 22B demuestra que el INR medido disminuye a medida que aumenta la proporción de antídoto/betrixabán en plasma de ratón tras las inyecciones individuales y dobles del antídoto.

15 La Figura 23 muestra la inversión de la inhibición de fXa por parte de rivaroxabán (A), betrixabán (B) y apixabán (C) usando el Antídoto r. El ajuste de la curva y el análisis de los datos se llevó a cabo mediante el uso del software Dynafit y GraphPad Prism (Ejemplo 15).

20 La Figura 24 muestra la inversión por parte del Antídoto r de la prolongación de PT por parte de rivaroxabán en el plasma humano (Ejemplo 16).

La Figura 25 muestra la prolongación de PT por parte de apixabán y la inversión de sus efectos anticoagulantes mediante la adición de Antídoto r (Ejemplo 16).

25 La Figura 26 muestra la inversión por parte del Antídoto r del efecto anticoagulante de la enoxaparina (Ejemplo 17).

La Figura 27 muestra una inversión sensible a la dosis de la anticoagulación inducida por rivaroxabán mediante la administración IV de Antídoto r en ratas (Ejemplo 18).

30 La Figura 28 muestra una reducción sensible a la dosis de la fracción libre (no unida) de rivaroxabán tras la dosis de antídoto r en ratas anticoaguladas (Ejemplo 19).

35 Las Figuras 29 A y B muestran la inversión sostenida de la anticoagulación inducida por rivaroxabán mediante la administración IV del Antídoto r en ratas medida por la proporción de INR en sangre entera y PT (Ejemplo 20).

La Figura 30 muestra un estudio de variación de la dosis de enoxaparina en ratas anestesiadas (Ejemplo 21).

40 La Figura 31 muestra la inversión sostenida de la anticoagulación inducida por la enoxaparina mediante la administración IV del antídoto r y el sulfato de protamina en ratas medida en los tiempos de tromboplastina parcial activada (Ejemplo 21).

45 La Figura 32 muestra la inversión sostenida de la anticoagulación inducida por betrixabán mediante la administración de Antídoto r (Ejemplo 22).

La Figura 33 muestra el perfil de concentración en plasma-tiempo de Antídoto r en ratas Sprague-Dawley tras una dosis intravenosa de 1 mg (Ejemplo 23).

50 La Figura 34 muestra el perfil de concentración en plasma-tiempo de Antídoto r en mono Rhesus tras la dosis intravenosa de 10 mg (Ejemplo 24).

55 Las Figuras 35A y 35B muestran el perfil en un curso de tiempo simulado de la neutralización de la actividad de rivaroxabán mediante la administración de Antídoto r. En la Fig. 35A, se revierte una dosis de 20 mg de rivaroxabán mediante una dosis de 400 mg de Antídoto r (dosis en bolo), suponiendo un  $T_{1/2}$  de 3 horas para el Antídoto r. En la Fig. 35B, se revierte una dosis de 20 mg de rivaroxabán usando una dosis de 900 mg de Antídoto r (bolo más infusión de 6 horas), suponiendo un  $T_{1/2}$  de 1 hora para el Antídoto r (Ejemplo 25).

60 Las Figuras 36A y 36B muestran el perfil en un curso de tiempo simulado de la neutralización de la actividad de betrixabán por parte del Antídoto r. En la Fig. 36A, se revierte una dosis de 80 mg de betrixabán mediante una dosis de 400 mg de Antídoto r (dosis en bolo), suponiendo un  $T_{1/2}$  de 3 horas para el Antídoto r. En la Fig. 36B, se revierte una dosis de 80 mg de betrixabán usando una dosis de 900 mg de Antídoto r (bolo más infusión de 6 horas), suponiendo un  $T_{1/2}$  de 1 hora para el Antídoto r (Ejemplo 26).

65 La Figura 37 muestra el efecto del Antídoto r en la inversión de la anticoagulación por parte de rivaroxabán (Ejemplo 27).

La Figura 38 muestra la inversión de la pérdida de sangre debida a la anticoagulación de la enoxaparina mediante la administración del Antídoto r a una rata (Ejemplo 28). Las pérdidas de sangre para los animales individuales de cada grupo tratado se muestran en la Figura 41.

5 La Figura 39 muestra la inversión de la pérdida de sangre debida a la anticoagulación de fondaparinux mediante la administración del Antídoto r en una rata (Ejemplo 28). Las pérdidas de sangre para los animales individuales de cada grupo tratado se muestran en la Figura 43.

10 La Figura 40 muestra la inversión de la anticoagulación debida a la anticoagulación de la enoxaparina mediante la administración del Antídoto r. La anticoagulación se midió en unidades anti-fXa en plasma (Ejemplo 29).

La Figura 41 muestra la mitigación sensible a la dosis de la pérdida de sangre debida a la anticoagulación de la enoxaparina mediante la administración del Antídoto r en una rata (Ejemplo 28).

15 La Figura 42 muestra la correlación de la pérdida de sangre medida en el modelo de transacción de cola de rata (Ejemplo 28) y las concentraciones de enoxaparina medidas en unidades anti-fXa (Ejemplo 29).

La Figura 42a muestra un fuerte aumento de la pérdida de sangre a medida que aumentaron las concentraciones de enoxaparina hasta más de 1,5 U/ml medido mediante el ensayo de unidades anti-fXa.

20 La Figura 42b muestra un análisis de correlación con un valor de  $r^2$  de 0,799 entre la pérdida de sangre y las concentraciones de antídoto r.

25 La Figura 42c muestra un análisis de correlación con un valor de  $r^2$  de 0,689 entre las unidades anti-fXa y las concentraciones de antídoto r.

La Figura 43 muestra la inversión de la pérdida de sangre debida a la anticoagulación de fondaparinux con el antídoto r, pero sin protamina en el modelo de transacción de cola de rata (Ejemplo 28).

30 La Figura 44 muestra la inversión de la anticoagulación debida a fondaparinux medida mediante el ensayo de actividad anti-fXa.

## Descripción detallada

### 35 I. Definiciones

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de cultivo de tejidos, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que son competencia de los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook y Russell eds. (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª Edición; la serie Ausubel *et al.* eds. (2007) "Current Protocols in Molecular Biology; the series Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson *et al.* (1991) "PCR 1: A Practical Approach" (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson *et al.* (1995) "PCR 2: A Practical Approach"; Harlow and Lane eds. (1999) "Antibodies, A Laboratory Manual"; Freshney (2005) "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique", 5ª edición; Gait ed. (1984) "Oligonucleotide síntesis"; patente de EE.UU. n.º 4.683.195; Hames y Higgins eds. (1984) "Nucleic Acid Hybridization"; Anderson (1999) "Nucleic Acid Hybridization"; Hames y Higgins eds. (1984) "Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes" (IRL Press (1986)); Perbal (1984) "A Practical Guide to Molecular Cloning"; Miller y Calos eds. (1987) "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) "Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells"; Mayer y Walker eds. (1987) "Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology" (Academic Press, Londres); Herzenberg *et al.* eds (1996) "Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", 3ª Edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002)).

55 Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluyendo los intervalos, son aproximaciones que se varían en incrementos de (+) o (-) 0,1. Se ha de entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También se ha de entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que los reactivos descritos en el presente documento son meramente ilustrativos y que los equivalentes de los mismos se conocen en la técnica.

60 Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas en singular "un", "una", "el" y "ella" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye una pluralidad de vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo las mezclas de los mismos.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" pretende significar que las composiciones y los métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. "Que consiste esencialmente en" cuando se usa

para definir composiciones y métodos, significará que excluye otros elementos de cualquier relevancia esencial de la combinación para el uso previsto. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos según lo definido en el presente documento no excluiría los contaminantes traza del método de aislamiento y purificación, ni vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. "Que consiste en" significará que excluye más que los elementos traza de otros ingredientes y etapas sustanciales del método para administrar las composiciones de la presente invención. Las realizaciones definidas por cada una de dichas expresiones de transición están dentro del alcance de la presente divulgación.

Un "sujeto" de diagnóstico o tratamiento es una célula o un mamífero, incluyendo un ser humano. Los animales no humanos sometidos a diagnóstico o tratamiento incluyen, por ejemplo, murinos tales como ratas, ratones; caninos tales como perros; lepóridos tales como conejos, animales de granja, animales deportivos y mascotas.

El término "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente y en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácido, análogos de aminoácido o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede estar unida por otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, amino, etc. Una proteína o un péptido deben contener al menos dos aminoácidos y no se aplica ninguna limitación en el número máximo de aminoácidos que puede comprender la secuencia de un péptido o de una proteína. Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere bien a aminoácidos naturales y/o a aminoácidos no naturales o sintéticos, incluyendo la glicina y los isómeros ópticos tanto D como L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. A continuación, se enumeran las abreviaturas de una sola letra y de tres letras de los aminoácidos de origen natural. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina comúnmente oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido comúnmente se denomina polipéptido o proteína.

1 letra	3 letras	Aminoácido
Y	Tyr	L-tirosina
G	Gly	L-glicina
F	Phe	L-fenilalanina
M	Met	L-metionina
A	Ala	L-alanina
S	Ser	L-serina
I	Ile	L-isoleucina
L	Leu	L-leucina
T	Thr	L-treonina
V	Val	L-valina
P	Pro	L-prolina
K	Lys	L-lisina
H	His	L-histidina
Q	Gln	L-glutamina
E	Glu	L-ácido glutámico
W	Trp	L-triptófano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	L-ácido aspártico
N	Asn	L-asparagina
C	Cys	L-cisteína

"Factor Xa" o "fXa" o "proteína fXa" se refiere a una serina proteasa de la vía de coagulación sanguínea que se produce a partir del factor X inactivo (fX). El factor Xa es activado por cualquier factor IXa con su cofactor, el factor VIIIa, en un complejo conocido como Xasa intrínseca, o el factor VIIa con su cofactor, el factor tisular, en un complejo conocido como Xasa extrínseca. fXa forma un complejo de protrombinasa unido a la membrana con el factor Va, y es el componente activo del complejo de protrombinasa que cataliza la conversión de la protrombina en trombina. La

trombina es la enzima que cataliza la conversión del fibrinógeno en la fibrina, que finalmente conduce a la formación de coágulos de sangre. Por lo tanto, la actividad biológica de fXa a veces se denomina "actividad procoagulante" en el presente documento.

5 La secuencia de nucleótidos que codifica el factor X humano ("fX") se puede encontrar en el GenBank, "NM\_000504" en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=89142731>>, y se muestra en la Figura 1b y la SEC ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos y la estructura del dominio correspondiente de fX se describen en Leytus *et al.*, *Biochemistry*, 1986, 25:5098-5102. La estructura del dominio de fX maduro también se describe en Venkateswarlu, D. *et al.*, *Biophysical Journal*, 2002, 82:1190-1206. Tras la escisión catalítica de los 52 primeros restos (aminoácidos 143 a 194 de SEQ ID NO: 3) de la cadena pesada, fX se activa en fXa (SEQ ID NO: 6). fXa contiene una cadena ligera (SEQ ID NO: 8) y una cadena pesada (SEQ ID NO: 9). Los 45 primeros restos de aminoácidos (restos 1-45 de SEQ ID NO: 6) de la cadena ligera se denominan dominio Gla, ya que contiene 11 restos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla) modificados después de la traducción. También contiene una secuencia corta de apilamiento aromático (6 restos de aminoácido) (restos 40-45 de SEQ ID NO: 6). La digestión con quimotripsina elimina selectivamente los restos 1-44, lo que da lugar a fXa sin dominio Gla (SEC ID NO: 4). El dominio catalítico de serina proteasa de fXa se encuentra en la cadena pesada C-terminal. La cadena pesada de fXa es altamente homóloga a otras serina proteasas tales como trombina, tripsina y proteína C activada.

20 La estructura del dominio del factor X maduro se puede encontrar en Venkateswarlu D. *et al.*, *Biophysical J.*, 2002, 82, 1190-1206. La numeración de los aminoácidos en esta figura es la misma que en la Figura 3. El tripéptido de Arg140-Lys141-Arg142 (el triplete RKR (SEQ ID NO: 16) como se muestra en la Figura 1) que conecta la cadena ligera con el péptido de activación no se muestra, porque la forma que carece del tripéptido es predominante en el plasma sanguíneo en circulación. En los recuadros, se muestran los dominios individuales. Esto incluye los aminoácidos 1-45 de la Figura 2 (SEQ ID NO: 3). Los restos catalíticos funcionalmente importantes están rodeados, y " $\gamma$ " representa el resto Gla (ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico).

30 "fXa nativo" o "fXa de tipo silvestre" se refiere al fXa que se encuentra presente de manera natural en el plasma o que está aislado en su forma original, no modificada, que procesa la actividad biológica de la protrombina de activación, potenciando así la formación de coágulos sanguíneos. El término incluye polipéptidos de origen natural aislados a partir de muestras tisulares, así como fXa producido de forma recombinante. "fXa activo" se refiere a fXa que tiene la actividad biológica de la protrombina de activación. "fXa activo" puede ser un fXa nativo o un fXa modificado que conserve la actividad procoagulante.

35 "Derivados de fXa" o "fXa modificado" o "derivados de una proteína de factor Xa" se refiere a proteínas fXa que se han modificado de manera que se unen, bien directa o indirectamente, a un inhibidor del factor Xa y no se ensamblan en el complejo de protrombinasa. Estructuralmente, los derivados se modifican para proporcionar ya sea ninguna actividad procoagulante o actividad procoagulante reducida. La "actividad procoagulante" se denomina en el presente documento la capacidad de un agente para causar la coagulación de la sangre o la formación de coágulos. Actividad procoagulante reducida significa que la actividad procoagulante se ha reducido en al menos aproximadamente el 50 %, o más del aproximadamente 90 %, o más del aproximadamente 95 % en comparación con el fXa de tipo silvestre durante el mismo período de tiempo. Por ejemplo, fX-S395A recombinante no tiene esencialmente actividad procoagulante medida mediante ensayos *in vitro*, tales como ensayos de actividad de fXa.

45 Los derivados de la divulgación bien tienen sitios activos modificados o dominios de Gla modificados, o ambos. También se contemplan modificaciones adicionales. Se contempla que dichas modificaciones se pueden realizar de una o más de las siguientes maneras: deleción de uno o más de los aminoácidos de la secuencia, sustitución de uno o más restos de aminoácidos con uno o más restos de aminoácidos diferentes y/o manipulación de una o más cadenas laterales de aminoácidos o sus extremos "C" o "N".

50 La expresión "sitio activo" se refiere a la parte de una enzima o de un anticuerpo en la que se produce una reacción química. Un "sitio activo modificado" es un sitio activo que se ha modificado estructuralmente para proporcionar el sitio activo con mayor o menor reactividad química o especificidad. Los ejemplos de sitios activos incluyen, pero sin limitación, el dominio catalítico del factor X humano, que comprende los restos de aminoácido 235-488 (Figura 1), y el dominio catalítico del factor Xa humano que comprende los restos de aminoácido 195-448 (Figuras 2 y 3). Los ejemplos de sitio activo modificado incluyen, pero sin limitación, el dominio catalítico del factor Xa humano que comprende los restos de aminoácido 195-448 de SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13 o 15 con al menos una sustitución de aminoácido en la posición Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 o Arg424.

60 Como se ha indicado anteriormente, los derivados de la divulgación pueden tener los dominios Gla modificados o tener todo el dominio Gla eliminado. Los ejemplos de derivados de fXa adecuados como antídotos en los métodos de la presente invención son fXa sin dominio Gla (SEQ ID NO: 4 o 5), fXa con modificaciones en el sitio catalítico (SEQ ID NO: 10 u 11) y fXa con modificaciones en los sitios conocidos por ser importantes para la interacción de fV/fVa o la interacción de fVIII/fVIIIa (SEQ ID NO: 4, 5, 10 u 11 con al menos una sustitución de aminoácido en la posición Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 o Arg424), como se describe en detalle en el presente documento. A continuación, se proporcionan otros ejemplos de los derivados de fXa contemplados por la presente divulgación.

"fXa sin dominio Gla" o "fXa sin Gla " se refiere a fXa que no tiene un dominio Gla y que abarca derivados de fXa que portan otra/s modificación/es además de la eliminación del dominio Gla. Los ejemplos de fXa sin dominio Gla en la presente invención incluyen, pero sin limitación, derivado de fXa carente de los restos de aminoácido 1-39 de SEQ ID NO: 3; derivado de fXa carente de los restos de aminoácido 6-39 de SEQ ID NO: 3, que corresponde a un mutante de fXa expresado en células CHO que se describe en más detalles a continuación (SEQ ID NO: 12, Tabla 24); derivado de fXa carente de los restos de aminoácido 1-44 de SEQ ID NO: 3, que corresponde a fXa sin Gla tras la digestión quimotriptica del fXa humano (SEQ ID NO: 4, Figura 3); y el derivado de fXa carente de todos los restos 1-45 del dominio Gla de SEQ ID NO: 3 como se describe en Padmanabhan *et al*, *Journal Mol. Biol*, 1993, 232: 947-966 (SEQ ID NO: 5). Otros ejemplos incluyen fXa anhidro sin Gla (SEQ ID NO: 10, Tabla 22) y fXa sin Gla-S379A (SEQ ID NO: 11, Tabla 23).

En algunas realizaciones, fXa sin Gla comprende al menos los restos de aminoácido 40 a 448 de SEQ ID NO: 3 o un equivalente de los mismos. En alguna realización, el fXa sin Gla comprende al menos los restos de aminoácido 45 a 488 (SEQ ID NO: 4) o 46 a 488 (SEQ ID NO: 5) de SEQ ID NO: 3 o equivalentes de los mismos.

En algunas realizaciones de la divulgación, el fXa sin Gla comprende al menos los restos de aminoácido 40 a 139 y 195 a 448 de la SEQ ID NO: 3 o equivalentes de los mismos. En algunas realizaciones de la divulgación, el fXa sin Gla comprende al menos los restos de aminoácido 45 a 139 y 195 a 448 de la SEQ ID NO: 3 o equivalentes de los mismos. En otra realización de la divulgación, el fXa sin Gla comprende al menos los restos de aminoácido 46 a 139 y 195 a 448 de SEQ ID NO: 3 o equivalentes de los mismos.

"fXa deficiente en Gla" se refiere a fXa con un reducido número de grupos  $\gamma$ -carboxilo de cadena lateral libres en su dominio Gla. Al igual que fXa sin dominio Gla, fXa deficiente en Gla también puede portar otras modificaciones. fXa deficiente en Gla incluye fXa no carboxilado, infracarboxilado y descarboxilado. "fXa no carboxilado" o "fXa descarboxilado" se refiere a derivados de fXa que no tienen los grupos  $\gamma$ -carboxi de los restos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico del dominio Gla, tales como fXa que tienen todo su ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico del dominio Gla reemplazado por diferentes aminoácidos, o fXa que tiene todo su  $\gamma$ -carboxilo de la cadena lateral eliminado o enmascarado por medios tales como la aminación, esterificación, etc. Para la proteína expresada de forma recombinante, fXa no carboxilado, a veces, también se denomina fXa sin carboxilar. "fXa infracarboxilado" se refiere a derivados de fXa que tienen un número reducido de grupos  $\gamma$ -carboxi en el dominio Gla, en comparación con el fXa de tipo silvestre, tal como fXa que tiene uno o más, pero no todos sus ácidos  $\gamma$ -carboxiglutámicos del dominio Gla reemplazados por uno o más aminoácidos diferentes, o fXa que tiene al menos uno, pero no todos sus  $\gamma$ -carboxilo de la cadena lateral eliminados o enmascarados por medios tales como la aminación y la esterificación, etc.

La estructura del dominio del factor Xa humano sin dominio Gla se puede encontrar en Padmanabhan *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1993, 232, 947-966. La numeración del aminoácido se basa en equivalencias topológicas con la quimotripsina, donde, por ejemplo, Ser195 corresponde a Ser379 en la Figura 2 cuando se usa la numeración de fX humano maduro. Las inserciones se indican con letras, y las deleciones se indican mediante 2 numeraciones sucesivas. El 300 se añade a la numeración de la cadena ligera para diferenciarla de la numeración de la cadena pesada.  $\beta$ 363 es  $\beta$ -hidroxi-aspartato. Las rayas verticales indican escisiones proteolíticas observadas en el material cristalizado. La secuencia de fXa sin dominio Gla que carece de los restos de aminoácido 1 a 45 basada en el fX maduro (SEQ ID NO: 3) aparece en SEQ ID NO: 5.

En una realización de la divulgación, el derivado de fXa puede carecer de una cadena ligera de fXa, pero todavía contiene un dominio catalítico de serina proteasa presente en la cadena pesada. Además, se pueden usar quimeras con otro dominio catalítico de serina proteasa para realizar sustituciones en la cadena pesada.

"Antídoto dp" o "antídoto derivado de plasma" se refiere al derivado de fXa anhidro sin Gla, y tiene los restos de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

"Antídoto r" o "antídoto recombinante" se refiere a un derivado de fXa que carece de los restos de aminoácidos 6 a 39 de SEQ ID NO: 3, que corresponde a un mutante de fXa expresado en células CHO y después de la eliminación del enlazador descrito más detalladamente a continuación (SEQ ID NO: 13, Tabla 25).

"Agentes anticoagulantes" o "anticoagulantes" son agentes que inhiben la formación de coágulos sanguíneos. Los ejemplos de agentes anticoagulantes incluyen, pero sin limitación, inhibidores específicos de la trombina, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa o factor VIIa, heparina y derivados, antagonistas de la vitamina K y anticuerpos anti-factor tisular. Los ejemplos de inhibidores específicos de la trombina incluyen hirudina, bivalirudina (Angiomax®), argatrobano y lepirudina (Refludan®). Los ejemplos de la heparina y derivados incluyen la heparina no fraccionada (HNF), heparina de bajo peso molecular (HBPM), tal como enoxaparina (enoxaparina, Clexane®, Lovenox®, etc.), dalteparina (Fragmin®), nadroparina (Fraxiparin, Fraxiparine, etc.), tinzaparina (Innohep), ardeparina (Normiflo), certoparina (sandoparina, embolex, etc.) y danaparoid (Orgaran®); y pentasacárido sintético tal como fondaparinux (Arixtra®), idraparinux, idradbiotaparinux e idraparinux biotinilado. Los ejemplos de antagonistas de la vitamina K incluyen warfarina (Coumadin®), fenocoumarol, acenocoumarol (Sintrom®), clorindiona, dicoumarol, difenadiona, biscoumacetato de etilo, femprocumon, fenindiona y tiocloamarol. En una realización, el anticoagulante es un inhibidor

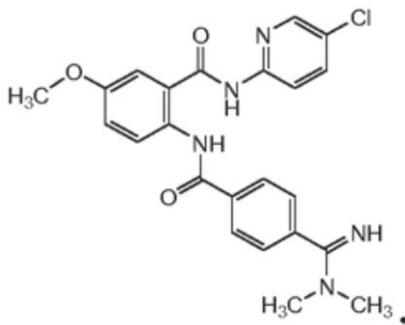
del factor Xa. En una realización, el anticoagulante es betrixabán.

"La terapia anticoagulante" se refiere a un régimen terapéutico que se administra a un paciente para evitar los coágulos sanguíneos no deseados o la trombosis. Una terapia anticoagulante comprende la administración de uno o una combinación de dos o más agentes anticoagulantes u otros agentes a una dosis y un programa adecuado para tratar o prevenir los coágulos sanguíneos no deseados o la trombosis en el paciente.

La expresión "inhibidores del factor Xa" se refiere a compuestos que pueden inhibir, ya sea directa o indirectamente, la actividad del factor de coagulación Xa de catalizar la conversión de la protrombina en trombina *in vitro* y/o *in vivo*. Los ejemplos de inhibidores de fXa conocidos incluyen, sin limitación, edoxabán, fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmin, NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la vía del factor tisular, DX-9065A (como se describe en, por ejemplo, Herbert, J. M., *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 276(3):1030-8), YM-60828 (como se describe en, por ejemplo, Taniuchi, Y., *et al.*, *Thromb Haemost.* 1998 79(3):543-8), YM-150 (como se describe en, por ejemplo, Eriksson, B. I. *et al.*, *Blood* 2005;106(11), Sumario 1865), apixabán, rivaroxabán, PD-348292 (como se describe en, por ejemplo, "Pipeline Insight: Anti-thrombotics - Reaching the Untreated Prophylaxis Market", 2007), otamixabán, razaxabán (DPC906), BAY 59-7939 (como se describe en, por ejemplo, Turpie, A. G., *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 2005, 3(11):2479-86), edoxabán (como se describe en, por ejemplo, Hylek E. M., *Curr Opin Invest Drugs* 2007 8(9):778-783), LY517717 (como se describe en, por ejemplo, Agnelli, G., *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 2007 5(4):746-53), GSK913893, betrixabán (como se describe más adelante) y derivados de los mismos. La heparina de bajo peso molecular ("HBPM") también se considera un inhibidor del factor Xa.

En una realización, el inhibidor del factor Xa se selecciona entre betrixabán, rivaroxabán, apixabán, edoxabán, HBPM, y combinaciones de los mismos.

El término "betrixabán" se refiere al compuesto "[2-({4-[(dimetilamin)iminometil]fenil}carbonilamino)-5-metoxifenil]-N-(5-cloro(2-piridil)carboxamida" o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. "[2-({4-[(Dimetilamino)iminometil]fenil}carbonilamino)-5-metoxifenil]-N-(5-cloro(2-piridil)carboxamida" se refiere al compuesto que tiene la siguiente estructura:



o un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El betrixabán se describe en las patentes de EE.UU. nº 6.376.515; 6.835.739; y 7.598.276. El betrixabán es conocido por ser un inhibidor específico del factor Xa.

Como se usa en el presente documento, el término "antídoto" o la expresión "antídoto contra un inhibidor del factor Xa" se refiere a moléculas, tales como derivados de fXa, que pueden neutralizar o invertir esencialmente la actividad inhibidora de la coagulación de un inhibidor de fXa compitiendo con fXa activo para unirse con inhibidores de fXa disponibles. Los ejemplos de los antídotos de la presente divulgación son derivados de fXa con unión reducida a la membrana fosfolipídica, tales como fXa sin Gla o fXa deficiente en Gla y derivados de fXa con actividad catalítica reducida, tales como derivados de fXa con el sitio activo modificado y derivados con interacción reducida con fV/Va o fVIII/fVIIIa. Los ejemplos de antídotos de la divulgación con unión a la membrana reducida y actividad catalítica reducida incluyen, pero sin limitación, fXa anhidro sin Gla por digestión quimiotróptica de fXa anhidro (como se describe en el Ejemplo 1); fXa sin Gla-S379A (S195A en la numeración de la quimotripsina) por mutagénesis (como se describe en el Ejemplo 6).

Otros ejemplos de antídotos de la divulgación incluyen proteínas o polipéptidos que contienen dominios catalíticos de serina proteasa que poseen suficiente similitud estructural con el dominio catalítico de fXa y, por lo tanto, son capaces de unirse a inhibidores de fXa de bajo peso molecular. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, trombina que se une al inhibidor de fXa GSK913893 (Young R., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17(10): 2927-2930); calicreína plasmática que se une al inhibidor de fXa apixabán (Luettgen J., *et al.*, *Blood*, 2006, 108(11) sumario 4130); y tripsina (o su homólogo bacteriano subtilisina) que se une al inhibidor de fXa C921-78 con afinidad subnanomolar (Kd = 500 pM) (Betz A., *et al.*, *Biochem.*, 1999, 38(44):14582-14591).

En una realización, el derivado de la invención se une, ya sea directa o indirectamente, a un inhibidor del factor Xa. Los términos "unión", "unirse", "reconocimiento" o "reconocer", como se usan en el presente documento, pretenden incluir interacciones entre las moléculas que se pueden detectar usando, por ejemplo, un ensayo de hibridación. Los términos también pretenden incluir interacciones de "unión" entre moléculas. Las interacciones pueden ser, por ejemplo, proteína-proteína, proteína-ácido nucleico, proteína-molécula pequeña o molécula pequeña-ácido nucleico en la naturaleza. La unión puede ser "directa" o "indirecta". La unión "directa" comprende el contacto físico directo entre las moléculas. La unión "indirecta" entre las moléculas comprende las moléculas que tienen contacto físico directo con una o más moléculas intermedias de manera simultánea. Por ejemplo, se contempla que los derivados de la invención se unen indirectamente y neutralizan esencialmente la heparina de bajo peso molecular y otros inhibidores indirectos del factor Xa. Esta unión puede dar lugar a la formación de un "complejo" que comprende las moléculas que interactúan. Un "complejo" se refiere a la unión de dos o más moléculas unidas entre sí por enlaces covalentes y/o enlaces no covalentes, interacciones y/o fuerzas.

"Neutralizar", "invertir", "corregir" o "contrarrestar" la actividad de un inhibidor de fXa o las expresiones similares se refieren a inhibir o bloquear la función inhibidora o anticoagulante del factor Xa de un inhibidor de fXa. Dichas expresiones se refieren a la inhibición parcial o al bloqueo de la función, así como a inhibir o bloquear la mayor parte o toda la actividad del inhibidor de fXa, *in vitro* y/o *in vivo*. Estos términos también se refieren a la corrección de al menos aproximadamente el 20 % de los marcadores farmacodinámicos o sustitutos dependientes del inhibidor de fXa. Los ejemplos de marcadores incluyen, pero sin limitación, INR, PT, aPTT, ACT, unidades anti-fXa, la generación de trombina (Tecn trombina TGA, tromboelastografía, CAT (Trombograma automatizado calibrado)) y similares.

En ciertas realizaciones, el inhibidor del factor Xa se neutraliza esencialmente (o "se corrige", como se acaba de describir), lo que significa que su capacidad para inhibir el factor Xa, bien directa o indirectamente, se reduce en al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %.

La expresión "unión a la membrana fosfolipídica" se refiere a la capacidad de un fXa activo para unirse a la membrana fosfolipídica con carga negativa o a otra membrana celular, tal como las plaquetas, en presencia de iones  $Ca^{2+}$ . Esta unión está mediada por los restos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico del dominio Gla de fXa.

La expresión "interacción reducida" se refiere a la reducción de la capacidad del derivado de fXa para unirse o formar un complejo con iones u otros cofactores que normalmente se unen o forman complejos con fXa silvestre. Los ejemplos de dichas interacciones incluyen, pero sin limitación, la unión de fXa con iones  $Ca^{2+}$  y la membrana fosfolipídica, la interacción con fV/fVa o fVIII/fVIIIa, etc. Se prefiere que la interacción de un derivado de fXa con los iones u otros cofactores se reduzca hasta el 50 % con respecto a la de un fXa silvestre. Más preferentemente, la interacción se reduce hasta el 10 %, 1 % y 0,1 % con respecto a la de un fXa de tipo silvestre. Esto se refiere a la capacidad de los derivados para "ensamblarse en el complejo de protrombinasa".

"Actividad de unión al inhibidor de fXa" se refiere a la capacidad de una molécula para unirse a un inhibidor de fXa. Un antídoto de la presente invención posee actividad de unión al inhibidor de fXa, ya sea directa o indirectamente.

La expresión "semivida en circulación" o "semivida en plasma" se refiere al tiempo necesario para que la concentración en plasma de un antídoto que circula en el plasma se reduzca a la mitad de su concentración inicial tras una sola administración o tras el cese de la infusión.

La expresión "fracción conjugada" se refiere a una fracción que se puede añadir a un derivado de fXa mediante la formación de un enlace covalente con un resto del derivado de fXa. La fracción se puede unir directamente a un resto del derivado de fXa o puede formar un enlace covalente con un enlazador que, a su vez, forma un enlace covalente con un resto del derivado de fXa.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión al antígeno o una de sus cadenas individuales. Así pues, el término "anticuerpo" incluye cualquier molécula que contenga proteína o péptido que comprenda al menos una parte de una molécula de inmunoglobulina. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera, o una parte de unión del ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o de cadena ligera, una región constante de cadena pesada o de cadena ligera, una región marco conservada (FR) o cualquier parte de la mismo, o al menos una parte de una proteína de unión.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, y se puede aislar de cualquier fuente biológica adecuada, por ejemplo, murina, de rata, oveja y canina.

Una "composición" pretende significar una combinación de agente activo y otro compuesto u otra composición, inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo, tal como un adyuvante.

Una "composición farmacéutica" pretende incluir la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, que hace que la composición sea adecuada para un uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Una "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de derivado suficiente para inducir un resultado biológico y/o terapéutico deseado. Ese resultado puede ser el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad o de cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente invención, el resultado normalmente implicará uno o más de los siguientes: la neutralización de un inhibidor de fXa que se ha administrado a un paciente, la inversión de la actividad anticoagulante del inhibidor de fXa, la eliminación del inhibidor de fXa del plasma, el restablecimiento de la hemostasia y la reducción o el cese de la hemorragia. La cantidad eficaz variará dependiendo del agente antídoto usado en particular, del inhibidor de fXa específico que haya recibido el sujeto, de la pauta posológica del inhibidor de fXa, del momento de la administración del antídoto, del estado del sujeto y de la enfermedad que se esté tratando, del peso y de la edad del sujeto, de la gravedad de la afección, de la forma de administración y similares, pudiéndose determinar todos ellos fácilmente por el experto habitual en la materia. Un método de determinación de si se logra el resultado biológico o terapéutico consiste en medir los marcadores farmacodinámicos o sustitutos dependientes del inhibidor del fXa en un paciente. El marcador puede ser, pero sin limitación, INR, PT, aPTT, ACT, unidades anti-fXa y la generación de trombina (Tecnotrombina TGA, tromboelastografía, CAT (Trombograma automatizado calibrado)).

La expresión "cantidad neutralizante" se refiere a una cantidad capaz de neutralizar el inhibidor del factor Xa, en la que el término "neutralizante" es como se define en el presente documento.

Como se usan en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y similares se usan en el presente documento para referirse a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente un trastorno, o un signo o un síntoma del mismo, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o total para un trastorno y/o un efecto adverso atribuible al trastorno.

"Tratar" también cubre cualquier tratamiento de un trastorno en un mamífero, e incluye: (a) evitar que se produzca un trastorno en un sujeto que pueda estar predispuesto a un trastorno, pero que puede que todavía no haya sido diagnosticado del mismo, por ejemplo, prevenir la hemorragia en un paciente con sobredosis de anticoagulante; (b) inhibir un trastorno, es decir, detener su desarrollo, por ejemplo, inhibir la hemorragia; o (c) aliviar o mejorar el trastorno, por ejemplo, reducir la hemorragia.

Como se usa en el presente documento, "tratar" incluye además la mejora sistémica de los síntomas asociados con la patología y/o un retraso en el inicio de los síntomas. La evidencia clínica y subclínica del "tratamiento" variará en función de la patología, del individuo y del tratamiento.

La "administración" puede efectuarse en una dosis, de manera continua o intermitente, en el curso del tratamiento. Los métodos de determinación de los medios y de las dosis de administración más eficaces son conocidos por los expertos en la materia, y variarán con la composición usada para la terapia, el fin de la terapia, la célula diana que se esté tratando y el sujeto que se esté tratando. Se pueden llevar a cabo administraciones únicas o múltiples con el nivel de dosis y el patrón seleccionados por el médico tratante. Las formulaciones de dosificación y los métodos de administración adecuados de los agentes son conocidos en la técnica.

Los agentes y las composiciones de la presente divulgación se pueden usar en la fabricación de medicamentos y para el tratamiento de seres humanos y otros animales mediante la administración de acuerdo con procedimientos convencionales, tales como un principio activo en composiciones farmacéuticas.

Un agente de la presente invención se administra mediante administración intravenosa. También se apreciará que la vía preferida variará con el estado y la edad del receptor, y con la enfermedad que se esté tratando.

Se puede determinar si el método, es decir, la inhibición o la inversión de un inhibidor del factor Xa, se consigue mediante una serie de ensayos *in vitro*, tales como ensayo de generación de trombina y unidades anti-fXa, y jensayos clínicos de coagulación tales como aPTT, PT y ACT.

El término "aislado", como se usa en el presente documento con respecto a los ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas separadas de otros ADN o ARN, respectivamente que están presentes en la fuente natural de la macromolécula. La expresión "ácido nucleico aislado" se entiende que incluye fragmentos de ácido nucleico que no son fragmentos en la naturaleza y que no se encontrarían en el estado natural. El término "aislado" también se usa en el presente documento para referirse a polipéptidos y proteínas que están aislados de otras proteínas celulares, y pretende abarcar tanto polipéptidos purificados como recombinantes. En otras realizaciones, el término "aislado" significa separado de los componentes, celulares y de otro tipo, en los que la célula, el tejido, el polinucleótido, el péptido, el polipéptido, la proteína, el anticuerpo o el/los fragmento/s de los mismos, están asociados normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, una célula aislada es una célula que está separada del tejido o de células de fenotipo o genotipo diferente. Como es evidente para los expertos en la materia, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento/s de los mismos de origen no natural, no requiere el

"aislamiento" para distinguirlo de su homólogo natural.

Como se usa en el presente documento, la expresión "equivalente del mismo" cuando se refiere a una proteína, un polipéptido o un ácido nucleico de referencia, se refiere a aquellos que tienen una homología mínima, manteniendo a la vez la funcionalidad deseada. Se contempla que cualquier proteína modificada que se mencione en el presente documento también incluye equivalentes de la misma. Por ejemplo, la homología puede ser, del al menos 95 %, o como alternativa, del al menos 98 %, y presentar una actividad biológica esencialmente equivalente al polipéptido o a la proteína de referencia. Que un polinucleótido o una región de polinucleótido (o un polipéptido o una región de polipéptido) tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son idénticas al comparar las dos secuencias. Cabe señalar que cuando se usa solo la cadena pesada de fXa (o una serina proteasa relacionada), la homología global podría ser inferior al 75 %, tal como, por ejemplo, del 65 % o 50 %, manteniéndose, sin embargo, la funcionalidad deseada. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se puede determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, para la alineación, se usan los parámetros por defecto. Un programa de alineación preferido es BLAST, usando los parámetros por defecto. En particular, los programas preferidos son BLASTN y BLASTP usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = convencional; filtro = ninguno; cadena = ambas; punto de corte = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente, y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, EST o marcador SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosomal, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones en la estructura de nucleótidos se pueden impartir antes o después del ensamblaje del polinucleótido. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje. El término también se refiere a moléculas tanto monocatenarias como bicatenarias. A menos que se especifique o se requiera de otra manera, cualquier realización de la presente divulgación que es un polinucleótido engloba tanto la forma bicatenaria como cada una de dos formas monocatenarias complementarias conocidas o predichas que componen la forma bicatenaria.

Un polinucleótido está compuesto de una secuencia específica de cuatro bases de nucleótidos: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) para la timina cuando el polinucleótido es ARN. Por lo tanto, la expresión "secuencia de polinucleótido" es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Dicha representación alfabética se puede introducir en bases de datos de un ordenador que tenga una unidad de procesamiento central y usarse para aplicaciones bioinformáticas tales como la genómica funcional y la búsqueda de homología.

"Homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología puede determinarse comparando una posición de cada secuencia que se pueda alinear con fines de comparación. Cuando una posición de la secuencia comparada está ocupada por la misma base o el mismo aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte una identidad inferior al 40 %, o, como alternativa, inferior al 25 %, con una de las secuencias de la presente invención.

Que un polinucleótido o una región de polinucleótido (o un polipéptido o una región de polipéptido) tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son idénticas al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se puede determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Ausubel *et al.* eds. (2007) "Current Protocols in Molecular Biology". Preferentemente, para la alineación, se usan los parámetros por defecto. Un programa de alineación es BLAST, usando los parámetros por defecto. En particular, los programas son BLASTN y BLASTP usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = convencional; filtro = ninguno; cadena = ambas; punto de corte = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, con último acceso el 26

de noviembre de 2007. Los polinucleótidos biológicamente equivalentes son los que tienen el porcentaje de homología especificado y que codifican un polipéptido que tiene la misma o similar actividad biológica.

La expresión "un homólogo de un ácido nucleico" se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene un cierto grado de homología con la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico o complemento del mismo. Un homólogo de un ácido nucleico bicatenario pretende incluir ácidos nucleicos que tienen una secuencia de nucleótidos que tiene un cierto grado de homología con su complemento. En un aspecto de la divulgación, los homólogos de los ácidos nucleicos son capaces de hibridarse con el ácido nucleico o complemento del mismo.

Un "gen" se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto (ORF) que es capaz de codificar un determinado polipéptido o proteína tras su transcripción y traducción. Se puede usar cualquiera de las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos descritas en el presente documento para identificar fragmentos mayores o secuencias codificantes de longitud completa del gen con el que están asociados. Los métodos de aislamiento de secuencias de fragmentos mayores son conocidos por los expertos en la materia.

El término "expresar" se refiere a la producción de un producto génico.

Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso por el cual los polinucleótidos se transcriben en ARNm y/o el proceso por el cual el ARNm transcrito es posteriormente traducido en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir el corte y empalme del ARNm en una célula eucariota.

El término "codificar", cuando se aplica a los polinucleótidos, se refiere a un polinucleótido que se dice que "codifica" un polipéptido si, en su estado nativo o cuando se manipula mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia, se puede transcribir y/o traducir para producir el ARNm para el polipéptido y/o un fragmento del mismo. La cadena antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico, y la secuencia de codificación se puede deducir de la misma.

A "conjugado peptídico" se refiere a la asociación mediante unión covalente o no covalente de uno o más polipéptidos y otro compuesto químico o biológico. En un ejemplo no limitante, la "conjugación" de un polipéptido con un compuesto químico da lugar a la mejora de la estabilidad o de la eficacia del polipéptido para su fin previsto. En una realización, un péptido se conjuga a un vehículo, en la que el vehículo es un liposoma, una micela o un polímero farmacéuticamente aceptable.

Los "liposomas" son vesículas microscópicas que consisten en bicapas lipídicas concéntricas. Estructuralmente, los liposomas varían en tamaño y forma de tubos largos a esferas, con dimensiones de unos cuantos cientos de Angstroms a fracciones de un milímetro. Los lípidos formadores de vesículas se seleccionan para lograr un grado especificado de fluidez o rigidez del complejo final, proporcionando la composición lipídica de la capa exterior. Estos son neutros (colesterol) o bipolares, e incluyen fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y esfingomielina (SM) y otros tipos de lípidos bipolares, incluyendo, pero sin limitación, dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), con una longitud de cadena de hidrocarburo en el intervalo de 14 a 22, y saturada o con uno o más enlaces dobles C=C. Los ejemplos de lípidos capaces de producir un liposoma estable, solos, o en combinación con otros componentes lipídicos son fosfolípidos tales como fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, cefalina, cardiolipina, ácido fosfatídico, cerebrósidos, diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPe), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE) y 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE-mal). Los lípidos que no contienen fósforo adicionales que pueden incorporarse en los liposomas incluyen estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, miristato de isopropilo, laurilsulfato de trietanolamina, sulfato de alquilarilo, palmitato de acetilo, ricinoleato de glicerol, estearato de hexadecilo, polímeros acrílicos anfóteros, amidas de ácidos grasos polietiloxilados y los lípidos catiónicos mencionados anteriormente (DDAB, DODAC, DMRIE, DMTAP, DOGS, DOTAP (DOTMA), DOSPA, DPTAP, DSTAP, DC-Col). Los lípidos cargados negativamente incluyen ácido fosfatídico (PA), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidilglicerol y (DOPG), dicetilfosfato, que son capaces de formar vesículas. Por lo general, los liposomas se pueden dividir en tres categorías basándose en su tamaño total y en la naturaleza de la estructura laminar. Las tres clasificaciones, desarrolladas por the New York Academy Sciences Meeting, "Liposomes and Their Use in Biology and Medicine", diciembre de 1977, son vesículas multilamelares (MLV), vesículas pequeñas unilamelares (SUV) y vesículas grandes unilamelares (LUV).

Una "micela" es un agregado de moléculas de tensioactivo dispersadas en un coloide líquido. Una micela típica en solución acuosa forma un agregado con las regiones de "cabeza" hidrófilas en contacto con el disolvente circundante, secuestrando las regiones de cola hidrófobas en el centro de la micela. Este tipo de micela se conoce como una micela en fase normal (micela de aceite en agua). Las micelas inversas tienen los grupos de cabeza en el centro con las colas extendiéndose hacia fuera (micela de agua en aceite). Las micelas se pueden usar para unir un polinucleótido, un polipéptido, un anticuerpo o una composición que se describe en el presente documento para

facilitar la administración eficaz de la célula o del tejido diana.

5 La expresión "polímero farmacéuticamente aceptable" se refiere al grupo de compuestos que se pueden conjugar con uno o más polipéptidos descritos en el presente documento. Se contempla que la conjugación de un polímero con el polipéptido es capaz de prolongar la semivida del polipéptido *in vivo* e *in vitro*. Los ejemplos no limitantes incluyen polietilenglicoles, polivinilpirrolidonas, alcoholes polivinílicos, derivados de celulosa, poliacrilatos, polimetacrilatos, azúcares, polioles y mezclas de los mismos.

10 Un "vehículo de administración génica" se define como cualquier molécula que puede portar polinucleótidos insertados en una célula huésped. Los ejemplos de vehículos de administración génica son liposomas, polímeros biocompatibles con micelas, incluyendo polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos; envolturas virales artificiales; partículas de metal; y bacterias o virus, tales como baculovirus, adenovirus y retrovirus, bacteriófago, cósmido, plásmido, vectores fúngicos y otros vehículos de recombinación normalmente usados en la técnica que se han descrito para la expresión en una variedad de huéspedes eucariotas y procariontas, y que se pueden usar para la terapia génica, así como para la expresión de proteínas simples.

20 Un polinucleótido de la presente invención se puede administrar a una célula o a un tejido usando un vehículo de administración génica. La "administración de genes", "la transferencia de genes", "la transducción" y similares, como se usa en el presente documento, son expresiones que se refieren a la introducción de un polinucleótido exógeno (a veces denominado "transgén") en una célula huésped, independientemente del método usado para la introducción. Dichos métodos incluyen una variedad de técnicas bien conocidas tales como la transferencia de genes mediada por vectores (mediante, por ejemplo, infección/transfección viral, u otros diversos complejos de administración de genes basados en proteínas o basados en lípidos), así como técnicas que facilitan la administración de polinucleótidos "desnudos" (tales como la electroporación, la administración con "pistola de genes" y otras diversas técnicas usadas para la introducción de polinucleótidos). El polinucleótido introducido se puede mantener de forma estable o transitoria en la célula huésped. El mantenimiento estable normalmente requiere que el polinucleótido introducido bien contenga un origen de replicación compatible con la célula huésped o se integre en un replicón de la célula huésped, tal como un replicón extracromosómico (por ejemplo, un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial. Se conoce una serie de vectores que son capaces de mediar la transferencia de genes a células de mamífero, como se conoce en la técnica y se describe en el presente documento.

35 Un "vector viral" se define como un virus o una partícula viral producido de forma recombinante que comprende un polinucleótido que se administra en una célula huésped, ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Los ejemplos de vectores virales incluyen vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de alfavirus y similares. Los vectores de alfavirus tales como vectores basados en virus Semliki Forest y vectores basados en el virus Sindbis, también se han desarrollado para su uso en la terapia génica y la inmunoterapia. Véase, Schlesinger y Dubensky (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 5:434-439 y Ying, *et al.* (1999) *Nat. Med.* 5(7):823-827. En aspectos en los que la transferencia génica está mediada por un vector retroviral, una construcción de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma retroviral o parte del mismo, y un gen terapéutico. Como se usa en el presente documento, "transferencia de genes mediada por retrovirus" o "transducción retroviral" tienen el mismo significado, y se refieren al proceso por el cual un gen o secuencias de ácido nucleico se transfieren de manera estable a la célula huésped en virtud del virus que entra en la célula y que integra su genoma en el genoma de la célula huésped. El virus puede entrar en la célula huésped a través de su mecanismo normal de infección o se puede modificar de manera que se una a un receptor o ligando de la superficie de la célula huésped diferente para entrar en la célula. Como se usa en el presente documento, vector retroviral se refiere a una partícula viral capaz de introducir ácido nucleico exógeno en una célula a través de un mecanismo de entrada viral o de tipo viral.

50 Los retrovirus portan su información genética en forma de ARN. Sin embargo, una vez que el virus infecta una célula, el ARN se transcribe a la inversa en la forma de ADN que se integra en el ADN genómico de la célula infectada. La forma de ADN integrada se denomina provirus.

55 En aspectos en los que la transferencia génica está mediada por un vector viral de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o virus adenoasociado (AAV), una construcción de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma viral o parte del mismo, y un transgén. Los adenovirus (Ad) son un grupo relativamente bien caracterizado, homogéneo, de virus, que incluye más de 50 serotipos. Véase, por ejemplo, la solicitud de PCT internacional n.º WO 95/27071. Los Ad no requieren la integración en el genoma de la célula huésped. También se han construido vectores derivados de Ad recombinantes, en particular, los que reducen el potencial para la recombinación y la generación del virus de tipo silvestre. Véanse las solicitudes PCT internacionales n.º WO 95/00655 y WO 95/11984. El AAV de tipo silvestre tiene alta infectividad y especificidad de integración en el genoma de la célula huésped. Véase, Hermonat y Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81:6466-6470 y Lebkowski *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:3988-3996.

65 Los vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en el que una polinucleótido puede estar ligado operativamente son bien conocidos en la técnica. Dichos vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in*

vivo, y están disponibles en fuentes comerciales tales como Stratagene (La Jolla, CA) y Promega Biotech (Madison, WI). Para optimizar la expresión y/o la transcripción *in vitro*, puede ser necesario eliminar, añadir o alterar partes no traducidas 5' y/o 3' de los clones para eliminar los posibles codones de iniciación de la traducción alternativos inapropiados, adicionales, u otras secuencias que puedan interferir con o reducir la expresión, ya sea a nivel de transcripción o de traducción. Como alternativa, se pueden insertar sitios de unión de ribosomas de consenso a inmediatamente 5' del codón de inicio para potenciar la expresión.

Los vehículos de administración génica también incluyen complejos de ADN/liposomas, micelas y complejos de proteína-ADN virales dirigidos. En los métodos de la presente invención, se pueden usar liposomas que también comprendan un anticuerpo o fragmento del mismo de dirección. Para mejorar la administración a una célula, el ácido nucleico o las proteínas de la presente invención pueden conjugarse con anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que se unan a antígenos de superficie celular, por ejemplo, un marcador de superficie celular encontrado en células madre o cardiomiocitos. Además de la administración de polinucleótidos a una célula o población de células, la introducción directa de las proteínas descritas en el presente documento en la célula o población de células se puede realizar mediante la técnica no limitante de la transfección de proteínas, y de forma alternativa, las condiciones del cultivo que puedan mejorar la expresión y/o potenciar la actividad de las proteínas de la presente invención son otras técnicas no limitantes.

La expresión "soporte sólido" se refiere a superficies no acuosas tales como "placas de cultivo", "chips de genes" o "micromatrices". Dichos chips de genes o micromatrices se pueden usar con fines de diagnóstico y terapéuticos mediante una serie de técnicas conocidas para un experto en la materia. En una técnica, los oligonucleótidos se disponen en un chip de genes para la determinación de la secuencia de ADN mediante la metodología de hibridación tal como la que se describe en las patentes de EE.UU. n.º 6.025.136 y 6.018.041. Los polinucleótidos de la presente invención se pueden modificar en sondas que, a su vez, se puedan usar para la detección de una secuencia genética. Dichas técnicas se han descrito, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 5.968.740 y 5.858.659. También se puede fijar una sonda a una superficie de electrodo para la detección electroquímica de secuencias de ácidos nucleicos tales como las descritas por Kayem *et al.* patente de EE.UU. n.º 5.952.172 y por Kelley *et al.* (1999) *Nucleic Acids Res.* 27:4830-4837.

En la técnica, se conocen diversos "chips de genes" o "micromatrices" y tecnologías similares. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, LabCard (ACLARA Bio Sciences Inc.); GeneChip (Affymetric, Inc); LabChip (Caliper Technologies Corp); una matriz de baja densidad con un sensor electroquímico (Clinical Micro SensorS); Sistema LabCD (Gamera Bioscience Corp.); cuadrícula Omni (Gen Machines); Matriz Q (Genetix Ltd.); sistemas de espectrometría de masas automatizados, de alto rendimiento, con tecnología de expresión en fase líquida (Gen Trace Systems, Inc.); un sistema de aplicación puntual mediante chorro térmico (Hewlett Packard Company); Hyseq HyChip (Hyseq, Inc.); BeadArray (Illumina, Inc. ); GEM (Incyte Microarray Systems); un sistema de micromatrices de alto rendimiento que puede dispensar de 12 a 64 puntos en múltiples portaobjetos de vidrio (Intelligent Bio-Instruments); estaciones de trabajo de biología molecular y NanoChip (Nanogen, Inc.); un chip de vidrio de microfluidos (Orchid Biosciences, Inc.); BioChip Arrayer con cuatro puntas piezoeléctricas de goteo a demanda PiezoTip (Packard Instruments, Inc.); FlexJet (Rosetta Inpharmatic, Inc.); espectrómetro de masas MALDI-TOF (Sequnome); ChipMaker 2 y ChipMaker 3 (TeleChem International, Inc.); y GenoSensor (Vysis, Inc.), como se identifican y se describen en Heller (2002) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4:129-153. También se describen ejemplos de "chips de genes" o "micromatrices" en las publicaciones de patente de EE.UU. n.º 2007-0111322, 2007-0099198, 2007-0084997, 2007-0059769 y 2007-0059765, y las patentes de EE.UU. n.º 7.138.506; 7.070.740 y 6.989.267.

En un aspecto, se preparan "chips de genes" o "micromatrices" que contienen sondas o cebadores homólogos a un polinucleótido, polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento. Se obtiene una muestra adecuada del paciente, se realiza la extracción de ADN genómico, ARN, proteína o cualquier combinación de los mismos, y se amplifica si es necesario. La muestra se pone en contacto con el grupo de chips de genes o de micromatrices en condiciones adecuadas para la hibridación del/de los gen/es o producto/s génico/s de interés con la/s sonda/s o el/los cebador/es contenido/s en el chip de genes o en la micromatriz. Las sondas o los cebadores se pueden marcar de forma detectable identificando de este modo el/los gen/es de interés. Como alternativa, se puede usar una reacción química o biológica para identificar las sondas o los cebadores que se hibridaban con el ADN o ARN del/de los gen/es de interés. A continuación, se determinan los genotipos o el fenotipo del paciente con ayuda de los aparatos y los métodos anteriormente mencionados.

Otros ejemplos no limitantes de soporte en fase sólida incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser bien soluble en cierta medida o insoluble. El material de soporte puede tener casi cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un polinucleótido, polipéptido o anticuerpo. Por lo tanto, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Como alternativa, la superficie puede ser plana tal como una lámina, tira de ensayo, etc. o, como alternativa, perlas de poliestireno. Los expertos en la materia conocerán muchos otros vehículos adecuados para unir anticuerpos o antígenos, o serán capaces de determinar los mismos mediante el uso de experimentación de rutina.

"Las células eucariotas" comprenden todos los reinos de seres vivos, a excepción de monera. Se pueden distinguir fácilmente a través de un núcleo unido a la membrana. Los animales, las plantas, los hongos y los protistas son eucariotas u organismos cuyas células están organizadas en estructuras complejas por membranas internas y un citoesqueleto. La estructura unida a la membrana más característica es el núcleo. Un huésped eucariota incluye, por ejemplo, células de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos, o como alternativa, de células procariotas como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos no limitantes incluyen simio, bovino, porcino, murino, ratas, aviar, reptiliano y ser humano.

"Las células procariotas" que, por lo general, carecen de núcleo o cualquier otros orgánulos unidos a la membrana y se dividen en dos dominios, bacterias y arqueas. Además, en lugar de tener el ADN cromosómico, la información genética de estas células está en un bucle circular denominado plásmido. Las células bacterianas son muy pequeñas, aproximadamente del tamaño de una mitocondria animal (aproximadamente 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro y 10  $\mu\text{m}$  de largo). Las células procariotas incluyen tres grandes formas: forma de varilla, esférica y espiral. En vez de ir a través de procesos de replicación elaborados como las eucariotas, las células bacterianas se dividen por fisión binaria. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, bacterias *Bacillus*, bacteria *E. coli* y bacteria *Salmonella*.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se han injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias estructurales humanas. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que esencialmente todas las partes de la proteína (por ejemplo, dominios CDR, marco,  $C_L$ ,  $C_H$  (por ejemplo,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ), bisagra, (VL, VH)) son esencialmente no inmunogénicas en seres humanos, solo con cambios o variaciones de poca importancia en la secuencia. Del mismo modo, los anticuerpos que designan primates (mono, babuino, chimpancé, etc.), roedores (ratón, rata, conejo, cobaya, hámster, y similares) y otros mamíferos designan anticuerpos específicos de dicha especie, subgénero, género, subfamilia, familia. Además, los anticuerpos quiméricos incluyen cualquier combinación de los anteriores. Dichos cambios o variaciones opcional y preferentemente conservan o reducen la inmunogenicidad en los seres humanos u otras especies con respecto a los anticuerpos no modificados. Por lo tanto, un anticuerpo humano es distinto de un anticuerpo quimérico o humanizado. Se señala que un anticuerpo humano puede ser producido por un animal no humano, o una célula procariota o eucariota que sea capaz de expresar genes de la inmunoglobulina humana funcionalmente reordenada (por ejemplo, cadena pesada y/o ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo monocatenario, puede comprender un péptido enlazador que no se encuentre en los anticuerpos humanos nativos. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido enlazador, tal como de dos a aproximadamente ocho restos de glicina o de otros aminoácidos, que una la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Dichos péptidos enlazadores se consideran que son de origen humano.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano se "deriva de" una determinada secuencia de línea germinal si el anticuerpo se obtiene a partir de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo, mediante la inmunización de un ratón transgénico portador de genes de inmunoglobulina humana o mediante la selección de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humano que se "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana se puede identificar como tal mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Un anticuerpo humano seleccionado normalmente es al menos un 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene restos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como ser humano, en comparación con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos un 95 %, o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Por lo general, un anticuerpo humano derivado de una determinada secuencia de la línea germinal humana mostrará diferencias de no más de 10 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar una diferencia de no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Un "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una sola especificidad de unión, que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. La expresión también se refiere a anticuerpos humanos recombinantes. En el presente documento, se describen métodos de fabricación de estos anticuerpos.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de

inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones de la divulgación, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*. En el presente documento, se describen métodos de fabricación de estos anticuerpos.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificado por genes de la región constante de la cadena pesada.

Las expresiones "anticuerpo policlonal" o "composición de anticuerpo policlonal", como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de anticuerpos que se derivan de diferentes líneas de linfocitos B. Se trata de una mezcla de moléculas de inmunoglobulina secretadas contra un determinado antígeno, reconociendo cada una un epítipo diferente.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad de unión y afinidad por un determinado epítipo.

Como se usa en el presente documento, el término "marcador" se refiere a un compuesto o a una composición detectable directa o indirectamente que se conjuga directa o indirectamente con la composición que se va a detectar, por ejemplo, polinucleótido o proteína tal como un anticuerpo para generar una composición "marcada". El término también incluye secuencias conjugadas al polinucleótido que proporcionará una señal después de la expresión de las secuencias insertadas, tales como la proteína verde fluorescente (GFP) y similares. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o de una composición sustrato que sea detectable. Los marcadores pueden ser adecuados para la detección a pequeña escala o más adecuados para la selección de alto rendimiento. Como tales, los marcadores adecuados incluyen, pero sin limitación, radioisótopos, fluorocromos, compuestos quimioluminiscentes, colorantes y proteínas, incluyendo enzimas. El marcador simplemente se puede detectar o se puede cuantificar. Una respuesta que simplemente se detecta comprende, en general, una respuesta cuya existencia solo se confirma, mientras que una respuesta que se cuantifica comprende, en general, una respuesta que tiene un valor cuantificable (por ejemplo, que se puede presentar numéricamente), tal como una intensidad, polarización y/u otra propiedad. En los ensayos de luminiscencia o fluorescencia, la respuesta detectable se puede generar directamente usando un luminóforo o un fluoróforo asociado a un componente del ensayo realmente implicado en la unión, o indirectamente usando un luminóforo o un fluoróforo asociado con otro componente (por ejemplo, indicador).

Los ejemplos de marcadores luminiscentes que producen señales incluyen, pero sin limitación, la bioluminiscencia y la quimioluminiscencia. La respuesta de luminiscencia detectable comprende, en general, un cambio en o la aparición de una señal de luminiscencia. Los métodos adecuados y los luminóforos para los componentes del ensayo de marcaje luminiscente son conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Haugland, Richard P. (1996) "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" (6ª ed.). Los ejemplos de sondas luminiscentes incluyen, pero sin limitación, aequorina y luciferasas.

Los ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero sin limitación, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde Malacite, estilbeno, Amarillo Lucifer, azul Cascade Blue™ y Rojo Texas. Otros colorantes ópticos adecuados se describen en Haugland, Richard P. (1996) "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" (6ª ed.).

En otro aspecto, el marcador fluorescente se funcionaliza para facilitar la unión covalente a un componente celular presente en o sobre la superficie de la célula o del tejido, tal como un marcador de superficie celular. Los grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos isotiocianato, grupos amino, grupos haloacetilo, maleimidias, succinimidilésteres y haluros de sulfonilo, pudiéndose usar todos ellos para unir el marcador fluorescente a una segunda molécula. La elección del grupo funcional del marcador fluorescente dependerá del sitio de unión ya sea a un enlazador, al agente, al marcador o al segundo agente de marcaje.

### III. Formulaciones de dosis unitarias y métodos de uso

Un aspecto de la invención proporciona una formulación de dosis unitaria que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de cadena doble que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (antídoto r) o un polipéptido que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13, en el que la secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13 (a) tiene una actividad procoagulante reducida en comparación con el factor Xa de tipo silvestre y (b) no se ensambla en un complejo de protrombinasa, para su uso en la prevención, la reducción o el cese de la hemorragia en un sujeto humano sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa, comprendiendo la prevención, reducción o cese de la hemorragia la administración al sujeto de la formulación de dosis unitaria mediante inyección de bolo intravenoso o una combinación de inyección e infusión de bolo, en la que se administran de 400 miligramos a 900 miligramos del polipéptido bicatenario. La invención se basa en el sorprendente hallazgo de que el antídoto r es capaz de neutralizar una variedad de inhibidores del factor Xa, tales como betrixabán, rivaroxabán, heparina de bajo peso molecular, enoxaparina y apixabán a una cierta dosis en ratas y monos. Estos datos se extrapolaron luego usando una modelización para obtener la dosis para los seres humanos capaz de neutralizar el inhibidor como se explica en los Ejemplos 25 y 26 que se presentan más adelante.

En ciertos aspectos de la divulgación, la formulación se administra en una cantidad de aproximadamente 10 miligramos (mg) a aproximadamente 2 gramos (g). Otras cantidades contempladas por la presente divulgación incluyen de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1,5 g; de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1 g; y de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 900 mg.

En otra realización, la formulación de dosis unitaria se administra en una cantidad de neutralización que está al menos en una relación molar de aproximadamente 1:1 veces de concentración en circulación de polipéptido frente a la concentración en circulación del inhibidor del factor Xa durante un período de al menos aproximadamente 30 minutos. En otras realizaciones, la relación molar es de aproximadamente 1:1 o de aproximadamente 2:1.

La formulación, cuando se administra, neutraliza el inhibidor del factor Xa en al menos aproximadamente un 20 %, o en al menos aproximadamente un 50 %, o en al menos aproximadamente un 75 % o en al menos aproximadamente un 90 % o en al menos aproximadamente un 95 %.

"Vehículos farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier diluyente, excipiente o vehículo que se pueda usar en las composiciones de la invención. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrógenofosfato disódico, hidrógenofosfato potásico, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y lanolina. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, un texto de referencia convencional en este campo. Se seleccionan preferentemente con respecto a la forma pretendida de administración, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes y similares, y coincidiendo con las prácticas farmacéuticas convencionales.

En una realización, la formulación comprende solución salina, y el antídoto está presente a una concentración de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 10 mg de polipéptido por mililitro de solución salina. En otra realización, la concentración es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 mg por mililitro de solución salina. En otra realización más, la concentración es de aproximadamente 2 mg por mililitro de solución salina.

Las formulaciones de la invención se pueden fabricar mediante métodos bien conocidos en la técnica tales como procesos convencionales de granulación, mezcla, disolución, encapsulación, liofilización o emulsión, entre otros. Las composiciones pueden producirse de varias formas, incluyendo gránulos, precipitados o partículas, polvos, incluyendo criodesecación, polvos secos por rotación o pulverización, polvos amorfos, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o soluciones. Las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizadores, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de los mismos.

En una realización, el antídoto está liofilizado. Los métodos de liofilización de polipéptidos son bien conocidos en la técnica.

Las formulaciones farmacéuticas también se pueden preparar como suspensiones o soluciones líquidas usando un líquido estéril tal como aceite, agua, alcohol y combinaciones de los mismos. Se pueden añadir tensioactivos, agentes de suspensión o agentes emulsionantes adecuados farmacéuticamente para la administración oral o parenteral. Las suspensiones pueden incluir aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva. El preparado en suspensión también puede contener ésteres de ácidos grasos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Las formulaciones en suspensión pueden incluir alcoholes tales como etanol, alcohol isopropílico,

alcohol hexadecílico, glicerol y propilenglicol. También se pueden usar éteres tales como poli(etilenglicol), hidrocarburos de petróleo tales como aceite mineral y vaselina, y agua en las formulaciones en suspensión.

- 5 Una formulación contemplada por el uso de la divulgación se basa en la formulación para un factor de coagulación humano recombinante VIIa (rFVIIa) disponible en el mercado. Dicha formulación emplea un polipéptido liofilizado y contiene los siguientes ingredientes adicionales:

Contenido	Vial de 1,2 mg	Vial de 4,8 mg
Polipéptido (antídoto)	1.200 microgramos	4.800 microgramos
Cloruro de sodio	6 mg	23 mg
Cloruro de calcio dihidratado	3 mg	12 mg
Glicilglicina	3 mg	11 mg
Polisorbato 80	0,2 mg	0,6 mg
Manitol	60 mg	240 mg

- 10 En un aspecto, la divulgación se dirige a métodos de unión e inhibición selectiva de un inhibidor del factor Xa administrado exógenamente en un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa que comprenden la administración al sujeto de una formulación de dosis unitaria de la invención.

- 15 En otro aspecto, la divulgación se dirige a un método de prevención, reducción o cese de la hemorragia en un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa que comprende administrar al sujeto una formulación de dosis unitaria de la invención.

- 20 En otro aspecto más, la divulgación se dirige a un método de corrección de los marcadores farmacodinámicos o sustitutos dependientes del inhibidor de fXa en un paciente sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa que comprende administrar al sujeto una formulación de dosis unitaria de la invención. El marcador farmacodinámico o sustituto puede seleccionarse entre el grupo que consiste en INR, PT, aPTT, ACT, unidades anti-fXa y la generación de trombina (Tecnotrombina TGA, tromboelastografía, CAT (Trombograma automatizado calibrado)).

- 25 Las formulaciones son para su administración a un mamífero, preferentemente a un ser humano. Dichas formulaciones de la divulgación pueden administrarse de una variedad de formas, preferentemente por vía parenteral.

- 30 Se contempla que para invertir rápidamente la actividad anticoagulante de un inhibidor de fXa presente en el plasma de un paciente en una situación de emergencia, se administra el antídoto de la presente invención en la circulación sistémica mediante administración intravenosa. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intrarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Sin embargo, en los casos en que el inhibidor de fXa que se esté neutralizando tenga una semivida larga en plasma, se pueden requerir una infusión continua o una formulación de liberación sostenida para unirse al inhibidor de fXa y liberar el fXa activo antes de la eliminación del inhibidor de fXa del organismo. Por lo tanto, en un aspecto, la formulación se administra al sujeto como un bolo. En otro aspecto de la divulgación, la formulación se administra por infusión. En otro aspecto, la formulación se administra por una combinación de bolo e infusión.

- 40 La formulación se administra hasta que la hemorragia ha cesado esencialmente. Se contempla que la infusión se puede administrar durante aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 6 a aproximadamente 12 horas, o aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas o 48 horas.

- 45 En algunas realizaciones, se infundiría aproximadamente del 10 % al aproximadamente 20 % de la dosis total y el resto durante los períodos de tiempo que se acaban de mencionar.

- 50 Las formas inyectables estériles de las composiciones de la presente invención pueden ser suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la materia, usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión. El preparado inyectable estéril también puede ser una solución o una suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como medio disolvente o de suspensión. Con este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites naturales

farmacéuticamente aceptables tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables incluyendo emulsiones y suspensiones.

Otros tensioactivos usados comúnmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables sólidas, líquidas, u otras formas de dosificación, también se pueden usar con fines de formulación. Los compuestos pueden formularse para la administración parenteral por inyección tal como por inyección en bolo o infusión continua. Una forma de dosificación unitaria para inyección puede estar en ampollas o en recipientes multidosis.

Además de las formas de dosificación descritas anteriormente, los excipientes y vehículos, y las formas de dosificación, farmacéuticamente aceptables son conocidos, en general, por los expertos en la materia, y se incluyen en la invención. Se ha de entender que la pauta posológica y de tratamiento específica para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del antídoto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta, la función renal y hepática del paciente, y el momento de la administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, el juicio del médico o veterinario tratante y la gravedad de la enfermedad que se esté tratando en particular.

#### IV. Antídotos

A continuación, se encuentran los antídotos adicionales contemplados para su uso en la formulación y en los métodos de la divulgación.

#### Derivados de factor Xa

Un aspecto de la presente invención es el uso de derivados de fXa, tales como fXa deficiente en el dominio Gla o fXa sin Gla, como antídotos seguros y eficaces para neutralizar esencialmente la actividad de un inhibidor del fXa de coagulación con el fin de prevenir o detener una hemorragia. Se contempla que los antídotos de la presente invención serán útiles en invertir el efecto anticoagulante de un inhibidor de fXa, especialmente un inhibidor de molécula pequeña dirigido a un sitio activo.

Se contempla que un antídoto contra un inhibidor de fXa tiene actividad procoagulante reducida o nula, pero que es capaz de unirse con un inhibidor de fXa. Se contempla que dicha actividad limitada permite la dosificación del antídoto a un nivel mayor que el fXa de tipo silvestre en circulación. Ciertos derivados de fXa, tales como fXa sin Gla, son antídotos adecuados de la presente invención. Además de tener la actividad procoagulante reducida o disminuida, los antídotos de la presente invención también deben ser esencialmente no inmunogénicos para el sujeto. Un antídoto puede contener una combinación de dos o más de las mutaciones y/o modificaciones anteriores. Además, cualquiera de los derivados de fXa anteriores se puede administrar solo o en combinación con otro.

El factor Xa es una serina proteasa de la vía de coagulación sanguínea responsable de la conversión de la protrombina en trombina. Se produce a partir del factor X inactivo tras la activación ya sea por el Xasa intrínseca (complejo formado por el factor IXa con su cofactor, el factor VIIIa) o la Xasa extrínseca (complejo formado por el factor VIIa con su cofactor, el factor tisular). El fX activado (fXa) puede sufrir la escisión autocatalítica posterior en el extremo C-terminal de su cadena pesada, convirtiendo fXa $\alpha$  en la subforma fXa $\beta$  (Jesty, J *et al.* *J. Biol. Chem.* 1975, 250(12):4497-4504). Tanto fXa $\alpha$  como fXa $\beta$  son materiales adecuados para la presente invención. El propio fXa convierte la protrombina a una velocidad lenta que no es suficiente para soportar la coagulación. Solo cuando forma un complejo de protrombinasa con los cofactores Ca<sup>2+</sup>, fosfolípido y factor Va, el fXa puede activar la protrombina a una velocidad suficientemente rápida para soportar la coagulación (Skogen, W. F., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1984, 259(4):2306-10). El complejo requiere la unión entre el fosfolípido cargado negativamente y los restos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico en el dominio Gla de fXa a través de la unión a Ca<sup>2+</sup>.

Por lo tanto, aunque el dominio Gla no contiene el sitio activo de fXa, permite a fXa formar el complejo de protrombinasa a través de los restos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico. Esto se demuestra por la eliminación selectiva del dominio Gla de fXa mediante digestión con quimotripsina (véanse la Figura 7 y el Ejemplo 1). Se realizaron ensayos de coagulación en fXa durante la escisión del dominio Gla mediante digestión con quimotripsina. Se ha informado (Skogen *et al.* *J. Biol. Chem.* 1984, 259(4):2306-10) que un complejo de protrombinasa reconstituido que comprende fXa sin dominio Gla, fVa, fosfolípidos e iones de calcio produce trombina a una velocidad significativamente reducida (0,5 % del producto generado en comparación con el complejo de control que contiene fXa nativo). Como se muestra en la Figura 7, la actividad de fXa en la formación de coágulos se redujo parcialmente una vez digerido fXa por quimotripsina durante 15 minutos, y la actividad se perdió completamente a los 30 minutos de la digestión. fXa infracarboxilado y descarboxilado, que carecen de los restos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico apropiados requeridos para la unión a la membrana dependiente de los iones de calcio, han resultado ser, por tanto, incapaces de ensamblarse al complejo de coagulación dependiente de la membrana y no mantienen la coagulación sanguínea (Mann, K. G. *et al.*, *Blood*, 1990, 76: 1-16).

También se ha establecido que el fXa deficiente en el dominio Gla es capaz de unirse a inhibidores dirigidos al sitio activo de fXa. (Brandstetter, H. *et al.*, *J. Bio. Chem.*, 1996, 271:29988-29992). Se han realizado informes de la cristalografía del inhibidor de fXa de bajo peso molecular unido a fXa humano sin Gla, que han proporcionado la descripción estructural de la hendidura del sitio activo (Brandstetter, *J. Bio. Chem.*, 1996, 271:29988-29992 y Roehrig, *J. Med. Chem.* 2005, 48(19):5900-8). La Figura 8 muestra que un fXa anhidro sin Gla presentó una afinidad de unión de 0,319 nM con el inhibidor de fXa betrixabán, comparable con la de fXa nativo.

Se ha descubierto ahora que fXa sin Gla, y otros derivados de fXa que tienen actividad procoagulante reducida, pero que son capaces de unirse al inhibidor de fXa, se pueden usar como un antídoto contra un inhibidor de fXa. Como se muestra en la Figura 9, fXa anhidro sin Gla presentó la inversión completa de la actividad anticoagulante de betrixabán a una concentración de 680 nM. Como se detalla en el Ejemplo 2, la generación de trombina se inició añadiendo reactivo que contenía TF (Innovin) y, por tanto, fue indicativa de que los factores de coagulación funcionan en la vía de coagulación extrínseca. También se ha demostrado en los Ejemplos 9-13 que el antídoto recombinante es útil para invertir una amplia variedad de anticoagulantes.

Los ensayos de prolongación de la coagulación con el reactivo de tiempo de tromboplastina parcial (aPTT) activado (Actina FS) que determinan la función del factor de coagulación de la vía de coagulación intrínseca también indican que el fXa anhidro sin Gla posee actividad de antídoto. La Figura 10 muestra el efecto de antídoto sensible a la dosis de fXa anhidro sin Gla contra 250 nM de betrixabán, con la inversión completa a 600 nM. La Figura 11 muestra que fXa anhidro sin Gla también fue capaz de invertir la actividad anticoagulante de otro inhibidor de fXa, la enoxaparina. La Figura 12 muestra que fXa anhidro sin Gla no mostró actividad de antídoto significativa contra el inhibidor directo de la trombina argatrobano. Por lo tanto, el fXa anhidro sin Gla es un antídoto selectivo de los inhibidores de fXa, y es capaz de restablecer la actividad procoagulante de fXa iniciada ya sea por la vía extrínseca o la vía intrínseca.

Además, se demostró la actividad de antídoto de fXa anhidro sin Gla mediante los ensayos de prolongación del aPTT medido con un contador de tiempo de coagulación tradicional. Como se muestra en la Figura 13, fXa anhidro sin Gla no tiene efecto sobre el aPTT del plasma de control a las concentraciones más altas ensayadas (2,576 nM). 400 nM de betrixabán prolongó el aPTT más del doble. Este efecto anticoagulante del betrixabán es invertido por el fXa anhidro sin Gla de una manera sensible a la dosis, con el retorno del aPTT al nivel casi normal de plasma de control a concentraciones de antídoto superiores a 1.610 nM.

Se contempla que otros truncamientos en la cadena ligera de fXa, por ejemplo, la delección adicional del dominio EGF1, los dominios EGF1 más EGF2 o fragmentos de los mismos, y el fXa inactivo solo con la cadena pesada pueden ser antídotos útiles de la presente divulgación.

El fXa deficiente en el dominio Gla no es compatible con la coagulación normal a concentración fisiológicamente relevante. Sin embargo, la proteína tiene la capacidad de escindir muchos sustratos y provocar la coagulación a concentraciones más altas. Por ejemplo, Skogen *et al.* (Skogen, W. F., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1984, 259(4):2306-10) demostraron que el fXa sin Gla bovino tiene aproximadamente del 0,5 al 1,0 % de actividad de complejo de protrombina con respecto al fXa de tipo silvestre. Por lo tanto, los métodos de la invención contemplan modificaciones que reducen aún más o eliminan por completo la actividad procoagulante de un derivado de fXa. Dicha modificación puede estar, por ejemplo, en un dominio catalítico de fXa.

Se contemplan varias formas de modificar el dominio catalítico en la cadena pesada de fXa para reducir su actividad procoagulante. El resto del sitio activo S379 de fXa (como se muestra en SEQ ID NO: 7), por ejemplo, se puede reemplazar selectivamente por deshidroalanina (véase el Ejemplo 1) o alanina (véase el Ejemplo 6) para reducir o eliminar la actividad procoagulante. También se sabe que la formación de complejos entre fXa y un reactivo dirigido al exosito de fXa puede bloquear la capacidad de unión macromolecular de fXa, reduciendo así su actividad procoagulante al tiempo que conserva la capacidad de unión a moléculas pequeñas en el sitio activo. Este reactivo dirigido al exosito incluye, sin limitación, anticuerpos monoclonales dirigidos a una región retirada del sitio activo (Wilkens, M y Krishnaswamy, S, *J. Bio. Chem.*, 2002, 277 (11), 9366-9374) o  $\alpha$ -2-macroglobulina. Se ha sabido que el complejo de  $\alpha$ -2-macroglobulina-serina proteasa, tal como con tripsina, trombina o fXa, es capaz de unirse a sustratos de moléculas pequeñas (Kuroiwa, K. *et al.*, *Clin. Chem.* 1989, 35(11), 2169-2172).

También se sabe que un fXa inactivo con modificaciones únicamente en la cadena pesada, manteniendo su cadena ligera sin cambios actuaría como un inhibidor de la protrombina (Hollenbach, S. *et al.*, *Thromb. Haemost.*, 1994, 71(3), 357-62), ya que interfiere con la actividad procoagulante del fXa normal como se muestra en la Figura 6. Por lo tanto, en una realización, el derivado de fXa tiene modificaciones tanto en la cadena ligera como en la cadena pesada. Se ha descubierto que estas modificaciones reducen o eliminan tanto la actividad procoagulante como la actividad anticoagulante, mientras que conserva la capacidad de unión a los inhibidores del derivado de fXa.

Se pueden usar varios métodos para producir derivados de fXa deficientes en el dominio Gla u otros derivados de fXa descritos en el presente documento. Por ejemplo, el dominio Gla puede eliminarse por completo a través de la escisión quimotriptica, produciendo fXa sin dominio Gla. Como alternativa, se puede producir un fX sin dominio Gla mediante la escisión quimotriptica del fX nativo. El fX sin dominio Gla se puede convertir entonces en fXa sin dominio Gla mediante un activador de fX. fX se puede aislar del plasma de la misma o de una especie diferente a la

- del sujeto que se vaya a tratar. El fX bovino, por ejemplo, ha demostrado ser funcional en ensayos de plasma humano. Los ejemplos de un activador de fX incluyen, sin limitación, un veneno de serpiente, tal como el veneno de víbora de Russell y complejos de fVIIa/factor tisular o fIXa/fVIIIa. Dicho medio es conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, Rudolph A. E. *et al.* han informado de un fXa recombinante producido a partir de un factor X recombinante (fX) con una sola sustitución de Arg347 por glutamina (fXR347N) (*Biochem.* 2000, 39 (11): 2861 - 2867). En una realización, los derivados de fXa producidos a partir de fuentes no humanas son no inmunogénicos o esencialmente no inmunogénicos. El Ejemplo 7 proporciona también un método de producción de un antídoto recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.
- Los derivados de fXa también se pueden purificar del plasma humano o se pueden producir mediante el método de ADN recombinante en el que un gen apropiado para el derivado de fXa se expresa en un organismo huésped adecuado. La expresión y purificación de fXa recombinante ha sido informada por varios grupos, véase, por ejemplo, Larson, P. J., *et al.*, *Biochem.*, 1998, 37:5029-5038, y Camire, R. M., *et al.*, *Biochem.*, 2000, 39, 14322-14329 para la producción de fX recombinante; Wolf, D. L. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1991, 266(21): 13726-13730 para la producción de fXa recombinante. El fXa modificado se puede preparar de acuerdo con estos procedimientos usando un ADNc modificado genéticamente que tenga una secuencia de nucleótidos que codifique el mutante de fXa deseado. El Ejemplo 6 proporciona más detalles para la expresión directa de un mutante fXa-S379 sin dominio Gla con actividad funcional como antídoto.
- Se contempla que el fXa modificado o mutado en el sitio activo con dominio Gla deficiente, tal como fXa infracarboxilado, también puede ser útil como antídoto contra el inhibidor de fXa. El fXa infracarboxilado se puede preparar por medios recombinantes mediante la retención de derivados de vitamina K durante la expresión de la proteína (se necesitan derivados de vitamina K para la modificación posterior a la traducción para formar los restos de Gla) o mediante la adición de antagonistas de la vitamina K tales como warfarina durante el cultivo tisular. El fXa descarboxilado se puede preparar mediante calentamiento (Bajaj P., *J. Biol. Chem.*, 1982, 257(7):3726-3731) o mediante digestión proteolítica con quimotripsina (Morita T., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1986, 261(9):4015-4023). El antídoto también se puede generar en sistemas procariotas seguido del repliegamiento *in vitro* o la constitución del sitio de unión al inhibidor de fXa.
- Los restos de Gla también se pueden modificar químicamente para eliminar el grupo carboxilo responsable de la unión a la membrana dependiente de iones de calcio. Por ejemplo, los grupos carboxilo de los restos de Gla se pueden eliminar selectivamente en condiciones de descarboxilación o se pueden proteger terminalmente, por ejemplo, por esterificación o aminación. Es deseable que dicha esterificación o aminación sea resistente a la hidrólisis *in vivo* de modo que el fXa modificado no se convierta fácilmente en fXa activo, lo que puede causar trombosis.
- Otros mutantes o derivados de fXa también pueden ser antídotos útiles de la presente invención. En una realización, la presente divulgación engloba el uso de los mutantes descritos en Peter J. Larson *et al.*, *Biochem.*, 1998, 37:5029-5038 como antídotos del inhibidor de fXa.
- En otra realización, la presente divulgación engloba el uso de mutantes de fXa catalíticamente inactivos para preparar antídotos del inhibidor de fXa. Por ejemplo, los mutantes descritos en Sinha, U., *et al.*, *Protein Expression and Purif.*, 1992, 3:518-524, mutantes rXai con modificaciones químicas tales como deshidroalanina (fXa anhídrido), como se describe en Nogami, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1999, 274(43):31000-7. También se puede usar fXa con la serina de sitio activo (Ser379 en la numeración de fX mostrada en SEQ ID NO: 7, y Ser195 en la numeración de la quimotripsina) reemplazada por alanina (fXa-S379A en la numeración de fX o fXa-S195A en la numeración de la quimotripsina), con eliminación de la actividad procoagulante, como antídotos del inhibidor de fXa. La invención también prevé derivados de fXa con el resto de serina del sitio activo acilado de manera irreversible, que todavía es capaz de unirse a inhibidores de moléculas pequeñas. El fXa con la serina del sitio activo acilado de manera reversible ha sido publicado por Wolf, *et al.*, *Blood*, 15 1995, 86(11):4153-7. Dicha acilación reversible, sin embargo, es capaz de la producción dependiente del tiempo de fXa activo y puede dar lugar a un exceso del fXa activo durante un período de tiempo. La tasa de desacilación se puede reducir mediante estrategias similares a las descritas en Lin P. H. *et al.*, *Thrombosis Res.*, 1997, 88(4), 365-372. Por ejemplo, las moléculas de fXa con Ser379 (Ser195 en la numeración de la quimotripsina) acilada por grupos 4-metoxibencilo y 3-bromo-4-metoxibencilo recuperan menos del 50 % de su actividad original cuando se incuban en un tampón que tiene pH 7,5 a 37 °C durante 4 horas.
- Una realización se dirige al uso de derivados de fXa con mutaciones en los restos de fXa que se sabe que son importantes para la interacción de fXa con el cofactor fV/fVa. Dichos restos incluyen, sin limitación, Arg306, Glu310, Arg347, Lys351 o Lys414 (SEQ ID NO: 3 y 7, estos aminoácidos corresponden a Arg125, Gla129, Arg165, Lys169, Lys230 en la numeración de la quimotripsina). Los ejemplos de dichos mutantes se presentan en Rudolph, A. E. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276:5123-5128. Además, las mutaciones en los restos de fXa que se sabe que son importantes para la interacción de fVIII/fVIIIa, tales como Arg424 de SEQ ID NO: 3 y 7 (Arg240 en la numeración de la quimotripsina), también se pueden usar como antídotos del inhibidor de fXa. Los ejemplos de dichos mutantes se describen en Nogami, K. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(32):33104-33113.

Otra modificación de los restos de sitio activo de fXa o de los restos que se sabe que son importantes para las interacciones de la serina proteasa también puede conducir a antídotos útiles de la presente invención, por ejemplo, el reemplazo de Glu216, Glu218 y Arg332 de SEQ ID NO: 3 y 7 (Glu37, Glu39 y Arg150 en la numeración de la quimotripsina, respectivamente) con otros restos de aminoácidos.

En una realización, la actividad procoagulante residual de un antídoto, evaluada mediante el ensayo de escisión del sustrato amidolítico, es <1 %, preferentemente < 0,1 %, más preferentemente < 0,05 % del fXa nativo derivado del plasma humano. Por ejemplo, no hay ninguna actividad procoagulante medible para fXa-S379A recombinante cuando se reemplaza el sitio activo Ser379 (S195 en la numeración de la quimotripsina) por un resto de alanina medida mediante ensayos de coagulación.

La divulgación se refiere además a secuencias de ácido nucleico, en particular, a secuencias de ADN, que codifican los derivados de fXa descritos anteriormente. Estas se pueden determinar fácilmente mediante la traducción de la secuencia polipeptídica de nuevo en la secuencia de ADN correspondiente de acuerdo con el código genético. Los codones usados preferentemente son los que conducen a una buena expresión en el organismo huésped requerido. Las secuencias de ácidos nucleicos se pueden preparar bien mediante mutagénesis específica del sitio a partir de la secuencia génica del fXa natural o mediante síntesis de ADN completa.

### Polipéptidos de la invención

En ciertos aspectos, la invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. También se engloban por la presente invención polipéptidos que tienen al menos un 95 % de homología con SEQ ID NO: 13.

Los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de la invención se pueden preparar mediante la expresión de polinucleótidos que codifican las secuencias de polipéptidos de la presente invención en una célula huésped apropiada. Esto se puede realizar mediante métodos de tecnología de ADN recombinante conocidos por los expertos en la materia. Por consiguiente, la presente invención también proporciona métodos para producir de forma recombinante los polipéptidos de la presente invención en células huésped eucariotas o procariotas. Las proteínas y los polipéptidos de la presente invención también se pueden obtener mediante síntesis química usando un sintetizador de péptidos automatizado disponible en el mercado, tal como los fabricados por Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc., Modelo 430A o 431A, Foster City, CA, EE.UU. La proteína o el polipéptido sintetizado se pueden precipitar y purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Por consiguiente, la presente divulgación también proporciona un proceso de síntesis química de las proteínas de la presente invención, proporcionando la secuencia de la proteína y de los reactivos, tales como aminoácidos y enzimas, y enlazando entre sí los aminoácidos en la orientación y secuencia lineal adecuadas.

Es conocido para los expertos en la materia que se pueden realizar modificaciones en cualquier péptido para proporcionarlo con propiedades alteradas. Los polipéptidos de la invención se pueden modificar para que incluyan aminoácidos no naturales. Por lo tanto, los péptidos pueden comprender D-aminoácidos, una combinación de D- y L-aminoácidos, y diversos aminoácidos "de diseño" (por ejemplo, aminoácidos de  $\beta$ -metilo, aminoácidos de C- $\alpha$ -metilo y aminoácidos de N- $\alpha$ -metilo, etc.) para transmitir propiedades especiales a los péptidos. Además, mediante la asignación de aminoácidos específicos en etapas de acoplamiento específicas, se pueden generar péptidos con hélices  $\alpha$ , giros  $\beta$ , láminas  $\beta$ , giros  $\alpha$  y péptidos cíclicos. En general, se cree que se prefiere la estructura secundaria  $\alpha$ -helicoidal o la estructura secundaria aleatoria.

En una realización adicional de la divulgación, se seleccionarán subunidades de polipéptidos que confieren propiedades químicas y estructurales útiles. Por ejemplo, los péptidos que comprenden D-aminoácidos pueden ser resistentes a las proteasas específicas de los L-aminoácidos *in vivo*. Los compuestos modificados con D-aminoácidos se pueden sintetizar con los aminoácidos alineados en orden inverso para producir los péptidos de la invención como péptidos retroinversos. Además, la presente divulgación prevé la preparación de péptidos que tengan mejores propiedades estructurales definidas, y el uso de peptidomiméticos y enlaces peptidomiméticos, tales como enlaces éster, para preparar péptidos con nuevas propiedades. En otra realización, se puede generar un péptido que tenga incorporado un enlace peptídico reducido, es decir,  $R_1-CH_2NH-R_2$ , donde  $R_1$  y  $R_2$  son restos o secuencias de aminoácidos. Se puede introducir un enlace peptídico reducido como una subunidad de dipéptido. Dicha molécula sería resistente a la hidrólisis del enlace peptídico, por ejemplo, la actividad de la proteasa. Dichas moléculas proporcionarían ligandos con función y actividad únicas, tales como semividas prolongadas *in vivo* debido a la resistencia a la ruptura metabólica, o actividad proteasa. Además, es bien sabido que los péptidos constreñidos en determinados sistemas muestran una mayor actividad funcional (Hruby (1982) *Life Sciences* 31:189-199 y Hruby *et al.* (1990) *Biochem J.* 268:249-262); la presente divulgación proporciona un método de producción de un péptido constreñido que lleva incorporadas secuencias aleatorias en el resto de las posiciones.

Los siguientes aminoácidos no clásicos pueden incorporarse en los péptidos de la invención para introducir determinados motivos conformacionales: 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato de etilo (Kazmierski *et al.* (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113:2275-2283); (2S,3S)-metil-fenilalanina, (2S,3R)-metil-fenilalanina, (2R,3S)-metil-fenilalanina y (2R,3R)-metil-fenilalanina (Kazmierski y Hruby (1991) *Tetrahedron Lett.* 32(41):5769-5772); ácido 2-aminotetrahidro-

naftalen-2-carboxílico (Landis (1989) Tesis doctoral, Universidad de Arizona); hidroxil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato (Miyake *et al.* (1989) *J. Takeda Res. Labs.* 43:53-76), ácido histidina-isoquinolin-carboxílico (Zechel *et al.* (1991) *Int. J. Pep. Protein Res.* 38(2):131-138); y HIC (urea cíclica de histidina), (Dharanipragada *et al.* (1993) *Int. J. Pep. Protein Res.* 42(1):68-77) y (Dharanipragada *et al.* (1992) *Acta. Crystallogr. C.* 48:1239-1241).

Los siguientes análogos de aminoácidos y peptidomiméticos pueden incorporarse en un péptido para inducir o favorecer estructuras secundarias específicas: LL-Acp (ácido LL-3-amino-2-propenidon-6-carboxílico), un análogo de dipéptido inductor del giro  $\beta$  (Kemp *et al.* (1985) *J. Org. Chem.* 50:5834-5838); análogos inductores de la lámina  $\beta$  (Kemp *et al.* (1988) *Tetrahedron Lett.* 29:5081-5082); análogos inductores de la lámina  $\beta$  (Kemp *et al.* (1988) *Tetrahedron Lett.* 29:5057-5060); análogos inductores de la hélice  $\alpha$  (Kemp *et al.* (1988) *Tetrahedron Lett.* 29:4935-4938); análogos inductores del giro  $\alpha$  (Kemp *et al.* (1989) *J. Org. Chem.* 54:109:115); análogos proporcionados por las siguientes referencias: Nagai y Sato (1985) *Tetrahedron Lett.* 26:647-650; y DiMaio *et al.* (1989) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* pág. 1687; un análogo del giro Gly-Ala (Kahn *et al.* (1989) *Tetrahedron Lett.* 30:2317); isómero de enlace amida (Clones *et al.* (1988) *Tetrahedron Lett.* 29:3853-3856); tetrazol (Zabrocki *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:5875-5880); DTC (Samanen *et al.* (1990) *Int. J. Protein Pep. Res.* 35:501:509); y los análogos enseñados en Olson *et al.* (1990) *J. Am. Chem. Sci.* 112:323-333 y Garvey *et al.* (1990) *J. Org. Chem.* 56:436. En la patente de EE.UU. n.º 5.440.013, expedida el 8 de agosto de 1995 a Kahn, se describen miméticos restringidos conformacionalmente de giros beta y protuberancias beta, y los péptidos que los contienen.

Es conocido para los expertos en la materia que se pueden realizar modificaciones en cualquier péptido mediante la sustitución de uno o más aminoácidos con uno o más aminoácidos funcionalmente equivalentes que no modifiquen la función biológica del péptido. En un aspecto, el aminoácido está sustituido con un aminoácido que posee propiedades intrínsecas similares, incluyendo, pero sin limitación, hidrofobicidad, tamaño o carga. Los métodos usados para determinar el aminoácido apropiado que se va a sustituir y con qué aminoácido se va a sustituir son conocidos para un experto en la materia. Los ejemplos no limitantes incluyen modelos de sustituciones empíricas como los descritos por Dahoff *et al.* (1978) en "Atlas of Protein Sequence and Structure" Vol. 5 supl. 2 (ed. M.O. Dayhoff), pág. 345-352. National Biomedical Research Foundation, Washington DC; matrices PAM incluyendo las matrices de Dayhoff (Dahoff *et al.* (1978), *supra*, o matrices JTT según lo descrito por Jones *et al.* (1992) *Comput. Appl. Biosci.* 8:275-282 y Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256:1443-1145; el modelo empírico descrito por Adach y Hasegawa (1996) *J. Mol. Evol.* 42:459-468; las matrices de sustitución de bloques (BLOSUM) descritas por Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:10915-10919; los modelos de Poisson descritos por Nei (1987) "Molecular Evolutionary Genetics". Columbia University Press, Nueva York.; y el método de máxima probabilidad (ML) descrito por Muller *et al.* (2002) *Mol. Biol. Evol.* 19:8-13.

### 35 Conjugados polipeptídicos

Los polipéptidos y los complejos de polipéptidos de la invención se pueden usar en una variedad de formulaciones, que pueden variar en función del uso previsto. Por ejemplo, se pueden unir uno o más de forma covalente o no covalente (formación de complejos) con otras diversas moléculas, cuya naturaleza puede variar dependiendo de la finalidad concreta. Por ejemplo, un péptido de la invención puede formar un complejo de manera covalente o no covalente con un vehículo macromolecular, incluyendo, pero sin limitación, polímeros naturales y sintéticos, proteínas, polisacáridos, polipéptidos (aminoácidos), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y lípidos. Un péptido puede conjugarse con un ácido graso para la introducción en un liposoma, véase la patente de EE.UU. n.º 5.837.249. Un péptido de la invención puede formar un complejo covalente o no covalente con un soporte sólido, conociéndose una variedad de los mismos en la técnica y estando descritos en el presente documento. Un epítipo de péptido antigénico de la invención se puede asociar con una matriz de presentación de antígeno tal como un complejo MHC con o sin moléculas coestimulantes.

Los ejemplos de vehículos proteicos incluyen, pero sin limitación, superantígenos, albúmina de suero, toxoide tetánico, ovoalbúmina, tiroglobulina, mioglobulina e inmunoglobulina.

Los polímeros portadores de péptidos-proteínas se pueden formar usando agentes de reticulación convencionales tales como carbodiimidas. Los ejemplos de carbodiimidas son 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida (CMC), 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida (EDC) y 1-etil-3-(4-azonia-44-dimetilpentil)carbodiimida.

Los ejemplos de otros agentes de reticulación adecuados son el bromuro de cianógeno, glutaraldehído y anhídrido succínico. En general, se puede usar cualquiera de una serie de agentes homobifuncionales incluyendo un aldehído homobifuncional, un epóxido homobifuncional, un imido-éster homobifuncional, un éster de *N*-hidroxisuccinimida homobifuncional, una maleimida homobifuncional, un alquilhaluro homobifuncional, un piridildisulfuro homobifuncional, un arilhaluro homobifuncional, una hidracida homobifuncional, un derivado de diazonio homobifuncional y un compuesto fotorreactivo homobifuncional. También se incluyen compuestos heterobifuncional, por ejemplo, compuestos que tienen un grupo amina reactivo y un grupo sulfhidrilo reactivo, compuestos con un grupo amina reactivo y fotorreactivo, y compuestos con un grupo carbonilo reactivo y un grupo sulfhidrilo reactivo.

Los ejemplos específicos de dichos agentes de reticulación homobifuncionales incluyen los ésteres de *N*-hidroxisuccinimida bifuncionales ditiobis(succinimidilpropionato), disuccinimidil-suberato y disuccinimidil-tartrato; los

imido-ésteres bifuncionales dimetil-adipimidato, dimetil-pimelimidato y dimetil-suberimidato; los agentes de reticulación reactivos con sulfhidrido bifuncionales 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)propionamido]butano, bismaleimidohexano y bis-*N*-maleimido-1,8-octano; los arilhaluros bifuncionales 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno y 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona; agentes fotorreactivos bifuncionales tales como bis-[b-(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro; los aldehídos bifuncionales formaldehído, malondialdehído, succinaldehído, glutaraldehído y adipaldehído; un epóxido bifuncional tal como 1,4-butaneodiol-diglicidiléter; las hidrazidas bifuncionales dihidrazida de ácido adípico, carbohidrazida y dihidrazida de ácido succínico; los diazonios bifuncionales o-tolidina, benzidina diazotizada y bis-diazotizada; los alquilhaluros bifuncionales N1N'-etilen-bis(yodoacetamida), N1N'-hexameten-bis(yodoacetamida), N1N'-undecameten-bis(yodoacetamida), así como bencilhaluros y halo-mostazas, tales como ácido ala'-diyodo-*p*-xileno-sulfónico y tri(2-cloroetil)amina, respectivamente.

Los ejemplos de agentes de reticulación heterobifuncionales comunes que se pueden usar para efectuar la conjugación de proteínas con péptidos incluyen, pero sin limitación, SMCC (succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato), MBS (éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida), SIAB (*N*-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato), SMPB (succinimidil-4-(*p*-maleimidofenil)butirato), GMBS (éster de *N*-( $\gamma$ -maleimidobutiriloxi)succinimida), MPBH (hidrazida de ácido 4-(4-*N*-maleimidofenil)butírico), M2C2H (4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil-hidrazida), SMPT (succinimidiloxicarbonil- $\alpha$ -metil- $\alpha$ -(2-piridilditio)torueno) y SPDP (*N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato).

La reticulación se puede realizar mediante el acoplamiento de un grupo carbonilo a un grupo amino o a un grupo hidrazida mediante aminación reductora.

Los péptidos de la invención también se pueden formular como la unión no covalente de monómeros a través de interacciones iónicas, de adsorción o bioespecíficas. Los complejos de péptidos con moléculas muy cargadas positiva o negativamente se pueden realizar a través de la formación de puentes de sal en ambientes de fuerza iónica baja, tales como en agua desionizada. Se pueden crear complejos grandes usando polímeros cargados tales como poli(ácido L-glutámico) o poli(L-lisina) que contienen numerosas cargas negativas y positivas, respectivamente. La adsorción de péptidos se puede realizar a superficies tales como perlas de látex de micropartículas o de otros polímeros hidrófobos, formando complejos de péptido-superantígeno asociados de forma no covalente, que imitan eficazmente a la proteína reticulada o químicamente polimerizada. Por último, los péptidos se pueden enlazar de forma no covalente a través del uso de las interacciones bioespecíficas entre otras moléculas. Por ejemplo, la utilización de la alta afinidad de la biotina por las proteínas tales como la avidina o la estreptavidina, o sus derivados, se podría usar para formar complejos de péptidos. Estas proteínas de unión a biotina contienen cuatro sitios de unión que pueden interactuar con la biotina en solución o unirse de forma covalente con otra molécula. (véase Wilchek (1988) *Anal. Biochem.* 171:1-32). Los péptidos se pueden modificar para que posean grupos de biotina usando reactivos de biotinilación comunes tales como el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo de D-biotina (NHS-biotina) que reacciona con los grupos amino disponibles en la proteína. Los péptidos biotinilados se pueden incubar luego con avidina o estreptavidina para crear complejos de gran tamaño. La masa molecular de dichos polímeros se puede regular a través de un control cuidadoso de la relación molar del péptido biotinilado con respecto a la avidina o a la estreptavidina.

También se proporcionan en la presente solicitud los péptidos y polipéptidos descritos en el presente documento conjugados con un marcador, por ejemplo, un marcador fluorescente o bioluminiscente, para su uso en los métodos de diagnóstico. Por ejemplo, los péptidos y polipéptidos marcados de manera detectable se pueden unir a una columna, y usarse para la detección y purificación de anticuerpos. Los marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero sin limitación, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde Malacite, estilbeno, amarillo Lucifer, azul Cascade Blue™ y Rojo Texas. Otros colorantes ópticos adecuados se describen en Haugland, Richard P. (1996) "Molecular Probes Handbook".

Los polipéptidos de la presente invención también se pueden combinar con diversos vehículos en fase líquida, tales como soluciones estériles o acuosas, vehículos farmacéuticamente aceptables, suspensiones y emulsiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos incluyen propiltilenglicol, polietilenglicol y aceites vegetales. Cuando se usan para preparar anticuerpos, los vehículos también pueden incluir un adyuvante que sea útil para aumentar de forma no específica una respuesta inmune específica. Un experto en la materia puede determinar fácilmente si se requiere un adyuvante y seleccionarlo. Sin embargo, solo con fines ilustrativos, los adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund y sales minerales.

### Células huésped

La divulgación también proporciona células huésped que comprenden uno o más de los polipéptidos de la presente invención. En un aspecto, los polipéptidos se expresan y se presentan en la superficie celular (extracelularmente). Las células adecuadas que contienen los polipéptidos de la invención incluyen células procariotas y eucariotas, que incluyen, pero sin limitación, células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células animales, células de mamífero, células murinas, células de rata, células de oveja, células de simio y células humanas. Los ejemplos de células bacterianas incluyen *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Streptococcus gordonii*. Las células se pueden adquirir en un proveedor comercial tal como la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville Maryland,

EE.UU.) o cultivarse a partir de un aislado usando métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de células eucariotas adecuadas incluyen, pero sin limitación, las células HEK 293T, así como la línea celular de hámster CHO, BHK-21; las líneas celulares murinas designadas NIH3T3, NSO, C127, las líneas celulares de simio COS, Vero; y las líneas celulares humanas HeLa, PER.C6 (disponible comercialmente en Crucell) U-937 y G2 Hep. Un ejemplo no limitante de células de insecto incluye *Spodoptera frugiperda*. Los ejemplos de levadura útiles para la expresión incluyen, pero sin limitación, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*, *Yarrowia* o *Pichia*. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.812.405; 4.818.700; 4.929.555; 5.736.383; 5,955,349; 5.888.768 y 6.258.559.

Además de la especificidad de la especie, las células pueden ser de cualquier tipo de tejido en particular, tal como una célula neuronal o, como alternativa, una célula madre somática o embrionaria, tal como una célula madre que pueda o no pueda diferenciarse en una célula neuronal, por ejemplo, una célula madre embrionaria, célula madre adiposa, célula madre neuronal y célula madre hematopoyética. La célula madre puede ser de origen humano o animal, tal como de mamífero.

### Polinucleótidos aislados y composiciones

La presente divulgación también proporciona los polinucleótidos complementarios a las secuencias identificadas anteriormente o sus complementos. La complementariedad se puede determinar usando la hibridación tradicional en condiciones de rigurosidad moderada o alta. Como se usa en el presente documento, el término polinucleótido se refiere a ADN y ARN, así como a nucleótidos modificados. Por ejemplo, la presente divulgación también proporciona la cadena de polinucleótido antisentido, por ejemplo, ARN antisentido a estas secuencias o a sus complementos.

La divulgación también proporciona polinucleótidos que codifican polipéptidos esencialmente homólogos y biológicamente equivalentes a los polipéptidos y complejos de polipéptidos de la invención. Esencialmente homólogo y biológicamente equivalente se refiere a aquellos que tienen diversos grados de homología, tales como al menos un 65 %, o como alternativa, al menos un 70 %, o como alternativa, al menos un 75 %, o como alternativa, al menos un 80 %, o como alternativa, al menos un 85 % o, como alternativa, al menos un 90 %, o como alternativa, al menos un 95 %, o como alternativa, al menos un 97 % homólogos según lo definido anteriormente y que codifican polipéptidos que tienen la actividad biológica de unirse a inhibidores del factor Xa y no ensamblarse en el complejo de protrombina como se describe en el presente documento. Se ha de entender, aunque no siempre se establezca de forma explícita, que las realizaciones de polipéptidos y polinucleótidos esencialmente homólogos se refieren para cada aspecto de la presente invención, por ejemplo, polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos.

Los polinucleótidos de la presente divulgación se pueden replicar usando técnicas recombinantes convencionales. Como alternativa, los polinucleótidos se pueden replicar usando la tecnología de PCR. La PCR es la materia objeto de las patentes de EE.UU. n.º 4.683.195; 4.800.159; 4.754.065; y 4.683.202, y se describe en "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis *et al.* eds, Birkhauser Press, Boston (1994)) y las referencias citadas en el mismo. Aún más, un experto en la materia puede usar las secuencias proporcionadas en el presente documento y un sintetizador de ADN comercial para replicar el ADN. Por consiguiente, la presente divulgación también proporciona un proceso de obtención de los polinucleótidos de la presente invención proporcionando la secuencia lineal del polinucleótido, moléculas de cebador adecuadas, productos químicos tales como enzimas e instrucciones para su replicación, y de replicación química o enlace de los nucleótidos en la orientación correcta para obtener los polinucleótidos. En una realización separada de la divulgación, estos polinucleótidos además se aíslan. Aún más, un experto en la materia puede enlazar operativamente los polinucleótidos a secuencias reguladoras para su expresión en una célula huésped. Los polinucleótidos y las secuencias reguladoras se insertan en la célula huésped (procariota o eucariota) para su replicación y amplificación. El ADN así amplificado se puede aislar de la célula mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia. En el presente documento, se proporciona además un proceso de obtención de polinucleótidos mediante este método, así como los polinucleótidos así obtenidos.

El ARN se puede obtener insertando primero un polinucleótido de ADN en una célula huésped procariota o eucariota adecuada. El ADN se puede insertar mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, mediante el uso de un vehículo de administración de genes apropiado (por ejemplo, liposoma, plásmido o vector) o mediante electroporación. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN, el ARN se puede aislar usando métodos bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como los expuestos en Sambrook y Russell (2001) *supra*. Por ejemplo, el ARNm puede aislarse usando diversas enzimas líticas o soluciones químicas de acuerdo con los procedimientos establecidos en Sambrook y Russell (2001) *supra* o extraídas con resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones adjuntas proporcionadas por los fabricantes.

En un aspecto de la divulgación, el ARN es ARN de interferencia pequeño, también conocido como ARNip. Los métodos de preparación y de rastreo del ARN de interferencia, y de selección para la capacidad de bloquear la expresión de los polinucleótidos son conocidos en la técnica, y más adelante, se presentan ejemplos no limitantes de los mismos. Dichos ARN de interferencia son proporcionados por la presente divulgación.

Las secuencias de ARNip se pueden diseñar mediante la obtención de la secuencia de ARNm diana y la determinación de una secuencia complementaria de ARNip apropiada. Los ARNip de la divulgación están diseñados

para interactuar con una secuencia diana, lo que significa que complementan una secuencia diana lo suficiente como para hibridarse a la secuencia. Un ARNip puede ser un 100 % idéntico a la secuencia diana. Sin embargo, la homología de la secuencia de ARNip con la secuencia diana puede ser inferior al 100 %, siempre que el ARNip pueda hibridarse con la secuencia diana. Así pues, por ejemplo, la molécula de ARNip puede ser al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia diana o al complemento de la secuencia diana. Por lo tanto, también se pueden usar moléculas de ARNip con inserciones, deleciones o mutaciones de un solo punto con respecto a una diana. Se recomienda la generación de diversas secuencias de ARNip diferentes por ARNm diana para permitir la detección de la secuencia diana óptima. Se debe realizar una búsqueda de homología, tal como una búsqueda con BLAST, para garantizar que la secuencia de ARNip no contenga homología con ningún gen de mamífero conocido.

En general, es preferible que la secuencia diana se encuentre a al menos 100-200 nucleótidos del codón de iniciación AUG y al menos 50-100 nucleótidos alejado del codón de terminación del ARNm diana (Duxbury (2004) *J. Surgical Res.* 117:339-344).

Los investigadores han determinado que hay ciertas características comunes en las moléculas de ARNip que silencian eficazmente su gen diana (Duxbury (2004) *J. Surgical Res.* 117:339-344; Ui-Tei *et al.* (2004) *Nucl. Acids Res.* 32:936-48). Como guía general, los ARNip que incluyen una o más de las siguientes condiciones son particularmente útiles en el silenciamiento de los genes en la proporción de células de mamífero: GC de entre el 45 y el 55 %, sin series de más de 9 restos de G/C, G/C en el extremo 5' de la cadena sentido; A/U en el extremo 5' de la cadena antisentido; y al menos 5 restos de A/U en las 7 primeras bases de extremo terminal 5' de la cadena antisentido.

En general, los ARNip son de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, el ARNip puede ser de 10 a 30 nucleótidos de longitud, de 12 a 28 nucleótidos de longitud, de 15 a 25 nucleótidos de longitud, de 19 a 23 nucleótidos de longitud o de 21 a 23 nucleótidos de longitud. Cuando un ARNip contiene dos cadenas de diferentes longitudes, la más larga de las cadenas designa la longitud del ARNip. En esta situación, los nucleótidos no apareados de la cadena más larga formarían un saliente.

El término ARNip incluye ARN horquillados cortos (ARNhc). Los ARNhc comprenden una sola cadena de ARN que forma una estructura de tallo-bucle, en la que el tallo consiste en cadenas sentido y antisentido complementarias que comprenden un ARNip bicatenario, y el bucle es un enlazador de tamaño variable. La estructura del tallo de los ARNhc, en general, es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, el tallo puede ser de 10 a 30 nucleótidos de longitud, de 12 a 28 nucleótidos de longitud, de 15 a 25 nucleótidos de longitud, de 19 a 23 nucleótidos de longitud o de 21 a 23 nucleótidos de longitud.

Las herramientas de ayuda en el diseño de ARNip se encuentran fácilmente a disposición del público. Por ejemplo, hay una herramienta informática de diseño de ARNip disponible en Internet en [www.dharmacon.com](http://www.dharmacon.com), último acceso el 26 de noviembre de 2007.

### Síntesis de ARNbc y ARNip

El ARNbc y el ARNip pueden sintetizarse química o enzimáticamente *in vitro* como se describe en Micura (2002) *Agnes Chem. Int. Ed. Emgl.* 41:2265-2269; Betz (2003) *Promega Notes* 85:15-18; y Paddison y Hannon (2002) *Cancer Cell.* 2:17-23. La síntesis química se puede realizar a través de métodos manuales o automatizados, ambos de los cuales son bien conocidos en la técnica, como se describe en Micura (2002), *supra*. El ARNip también se puede expresar de manera endógena dentro de las células en forma de ARNhc como se describe en Yu *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 99:6047-6052; y McManus *et al.* (2002) *RNA* 8:842-850. La expresión endógena se ha obtenido usando sistemas de expresión basados en plásmidos usando promotores de ARN nuclear de pequeño tamaño, tales como ARN polimerasa III U6 o H1, o ARN polimerasa II U1 como se describe en Brummelkamp *et al.* (2002) *Science* 296:550-553 (2002); y Novarino *et al.* (2004) *J. Neurosci.* 24:5322-5330.

La síntesis de ARNbc y ARNip enzimática *in vitro* se puede realizar usando un proceso mediado por una ARN polimerasa para producir cadenas sentido y antisentido individuales que se hibriden *in vitro* antes de la administración a las células de elección como se describe en Fire *et al.* (1998) *Nature* 391:806-811; Donze y Picard (2002) *Nucl. Acids Res.* 30(10):e46; Yu *et al.* (2002); y Shim *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:30413-30416. Varios fabricantes (Promega, Ambion, New England Biolabs y Stragene) producen kits de transcripción útiles en la realización de la síntesis *in vitro*.

La síntesis *in vitro* de ARNip se puede realizar, por ejemplo, mediante el uso de un par de oligonucleótidos híbridos, cortos, que contienen promotores T7 de ARN polimerasa cadena arriba de las secuencias sentido y antisentido de ARN como molde de ADN. Cada oligonucleótido del híbrido es un molde separado para la síntesis de una cadena del ARNip. Las cadenas de ARN cortas separadas que se sintetizan se hibridan luego para formar ARNip como se describe en "Protocols and Applications", Capítulo 2: "RNA interferente", Promega Corporation, (2005).

La síntesis *in vitro* de ARNbc se puede realizar, por ejemplo, mediante el uso de un promotor de ARN polimerasa de T7 en los extremos 5' de ambas cadenas de la secuencia diana de ADN. Esto se logra mediante el uso de moldes de ADN separados, cada uno de los cuales contiene la secuencia diana en una orientación diferente con relación al promotor T7, que se transcribe en dos reacciones separadas. Las transcripciones resultantes se mezclan y se hibridan después de la transcripción. Los moldes de ADN usados en esta reacción se pueden crear mediante PCR o mediante el uso de dos moldes de plásmido linealizados, cada uno de los cuales contiene el promotor T7 de la polimerasa en un extremo diferente de la secuencia diana. "Protocols and Applications", Capítulo 2: "RNA interferente", Promega Corporation, (2005).

Para expresar las proteínas descritas en el presente documento, la administración de las secuencias de ácido nucleico que codifican el gen de interés se puede realizar mediante varias técnicas. Los ejemplos de las mismas incluyen tecnologías virales (por ejemplo, vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de alfavirus y similares) y tecnologías no virales (por ejemplo, complejos de ADN/liposomas, micelas y complejos virales de proteína-ADN dirigidos) como se describe en el presente documento. Una vez dentro de la célula de interés, la expresión del transgén puede estar bajo el control de promotores ubicuos (por ejemplo, EF-1 $\alpha$ ) o promotores específicos del tejido (por ejemplo, promotor de la calmodulina quinasa 2 del calcio (CaMKI), el promotor NSE y el promotor Thy-1 humano). Como alternativa, los niveles de expresión se pueden controlar mediante el uso de un sistema promotor inducible (por ejemplo, promotor de Tet activado/desactivado) como se describe en Wiznerowicz *et al.* (2005) *Stem Cells* 77:8957-8961.

Los ejemplos no limitantes de promotores incluyen, pero sin limitación, el promotor de citomegalovirus (CMV) (Kaplit *et al.* (1994) *Nat. Genet.* 8:148-154), promotor de CMV/ $\beta$ 3-globina humana (Mandel *et al.* (1998) *J. Neurosci.* 18:4271-4284), promotor NCX1, promotor  $\alpha$ MHC, promotor MLC2v, promotor GFAP (Xu *et al.* (2001) *Gene Ther.*, 8:1323-1332), el promotor de enolasa específico de neuronas de 1,8 kb (NSE) (Klein *et al.* (1998) *Exp. Neurol.* 150:183-194), promotor de la actina beta de pollo (CBA) (Miyazaki (1989) *Gene* 79:269-277) y el promotor de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUSB) (Shibley *et al.* (1991) *Genetics* 20 10:1009-1018), el promotor de la albúmina de suero humano, el promotor de alfa-1-antitripsina. Para mejorar la expresión, se pueden enlazar operativamente además otros elementos reguladores al transgén, tales como, por ejemplo, el elemento postregulador del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) (Donello *et al.* (1998) *J. Virol.* 72: 5085-5092) o el sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH).

También se proporcionan en la divulgación una sonda o un cebador de polinucleótido que comprenden al menos 10, o como alternativa, al menos 17, o como alternativa, al menos 20, o como alternativa, al menos 50, o como alternativa, al menos 75 polinucleótidos, o como alternativa, al menos 100 polinucleótidos que codifican las SEQ ID NO: 12 a 15 o sus complementos. Las sondas y los cebadores adecuados se describen *supra*. Se sabe en la técnica que no es necesaria una sonda "perfectamente coincidente" para una hibridación específica. Los pequeños cambios en la secuencia de la sonda obtenidos mediante sustitución, delección o inserción de un pequeño número de bases no afectan a la especificidad de hibridación. En general, se puede tolerar una falta de coincidencia de tanto como el 20 % de los pares de bases (cuando se alinean óptimamente). Una sonda útil para detectar el ARNm anteriormente mencionado es al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la región homóloga de tamaño comparable contenida en las secuencias previamente identificadas (identificadas anteriormente) que corresponden a los polinucleótidos de la presente invención caracterizados anteriormente. Como alternativa, la sonda es un 85 % idéntica a la secuencia del gen correspondiente tras la alineación de la región homóloga; y aún más, presenta un 90 % de identidad, o aún más, es al menos un 95 % idéntica.

Estas sondas se pueden usar en radioensayos (por ejemplo, análisis de transferencia de Southern y Northern) para detectar o controlar la expresión de los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención. Las sondas también se pueden unir a un soporte sólido o a una matriz tal como un chip para su uso en ensayos de rastreo de alto rendimiento para la detección de la expresión del gen correspondiente a uno o más polinucleótidos de la presente invención.

Los polinucleótidos y los fragmentos de los polinucleótidos de la presente divulgación también pueden servir como cebadores para la detección de genes o transcripciones de genes que se expresan en las células neuronales, por ejemplo, para confirmar la transducción de los polinucleótidos en las células huésped. En este contexto, la amplificación se refiere a cualquier método que emplee una polimerasa dependiente del cebador capaz de replicar una secuencia diana con fidelidad razonable. La amplificación puede llevarse a cabo mediante ADN polimerasas naturales o recombinantes tales como ADN polimerasa de T7, fragmento de Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* y transcriptasa inversa. La longitud del cebador es igual a la identificada para las sondas anteriormente.

La divulgación proporciona además los polinucleótidos aislados de la presente divulgación unidos operativamente a un promotor de la transcripción del ARN, así como a otras secuencias reguladoras para la replicación y/o expresión transitoria o estable del ADN o ARN. Como se usa en el presente documento, la expresión "unido operativamente" significa situado de tal manera que el promotor dirigirá la transcripción del ARN de la molécula de ADN. Los ejemplos de dichos promotores son SP6, T4 y T7. En ciertas realizaciones de la divulgación, los promotores específicos de la célula se usan para la expresión específica de la célula del polinucleótido insertado. Los vectores que contienen un promotor o un promotor/potenciador, con codones de terminación y secuencias de marcadores de

selección, así como un sitio de clonación en el que un trozo insertado de ADN se puede unir operativamente a ese promotor son bien conocidos en la técnica y se encuentran disponibles en el mercado. Para la metodología general y las estrategias de clonación, véase "Gene Expression Technology" (Goeddel ed., Academic Press, Inc. (1991)) y las referencias citadas en el mismo, y "Vectors: Essential Data Series" (Gacasa and Ramji, eds., John Wiley & Sons, N. Y. (1994)), que contiene mapas, propiedades funcionales, proveedores comerciales y una referencia a los números de acceso del GenEMBL de diversos vectores adecuados. Preferentemente, estos vectores son capaces de transcribir el ARN *in vitro* o *in vivo*.

Los vectores de expresión que contienen estos ácidos nucleicos son útiles para obtener sistemas de vectores huésped para producir proteínas y polipéptidos. Se da a entender que estos vectores de expresión deben ser replicables en los organismos huésped, bien como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen plásmidos, vectores virales, incluyendo adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos, etc. Los vectores adenovirales son particularmente útiles para la introducción de genes en tejidos *in vivo* debido a sus altos niveles de expresión y a la transformación eficaz de las células tanto *in vitro* como *in vivo*. Cuando se inserta un ácido nucleico en una célula huésped adecuada, por ejemplo, una célula procariota o una célula eucariota y las repeticiones de células huésped, la proteína se puede producir de forma recombinante. Las células huésped adecuadas dependerán de la vector, y pueden incluir células de mamífero, células animales, células humanas, células de simio, células de insecto, células de levadura y células bacterianas, como se describe anteriormente, y se construyen usando métodos bien conocidos. Véase Sambrook and Russell (2001), *supra*. Además del uso del vector viral para la inserción de ácido nucleico exógeno en las células, el ácido nucleico se puede insertar en la célula huésped mediante métodos bien conocidos en la técnica tales como la transformación para células bacterianas; la transfección usando precipitación en fosfato cálcico para células de mamífero; DEAE-dextrano; electroporación; o microinyección. Véase Sambrook y Russell (2001), *supra* para esta metodología.

La presente divulgación también proporciona vehículos de administración adecuados para la administración de un polinucleótido de la divulgación en las células (ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*). Un polinucleótido de la divulgación puede estar contenido dentro de un vehículo de administración de genes, un vector de clonación o un vector de expresión. Estos vectores (especialmente, los vectores de expresión), a su vez, se pueden manipular para que adopten cualquiera de una serie de formas que pueden, por ejemplo, facilitar la administración y/o la entrada en una célula.

Estas células huésped aisladas que contienen los polinucleótidos de la presente divulgación son útiles para la replicación recombinante de los polinucleótidos, y para la producción recombinante de péptidos y para el rastreo de alto rendimiento.

Los polinucleótidos de la presente divulgación se pueden conjugar con un marcador detectable o combinar con un vehículo tal como un soporte sólido o un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los soportes sólidos adecuados se han descrito anteriormente, así como los marcadores adecuados. Los métodos para unir un marcador a un polinucleótido son conocidos por los expertos en la materia. Véase Sambrook y Russell (2001), *supra*.

### **Composiciones terapéuticas de anticuerpos**

La presente divulgación también proporciona un anticuerpo capaz de formar específicamente un complejo con una proteína o con un polipéptido de la presente invención que sea útil en los métodos terapéuticos de la presente divulgación. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, así como derivados de los mismos (descritos anteriormente). Los anticuerpos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos de ratón, rata y conejo o de seres humanos. Los anticuerpos se pueden producir en cultivo celular, en fagos o en varios animales, incluyendo, pero sin limitación, vacas, conejos, cabras, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, ovejas, perros, gatos, monos, chimpancés, simios, etc. Los anticuerpos también son útiles para identificar y purificar polipéptidos terapéuticos.

La presente divulgación también proporciona un complejo de anticuerpo-péptido que comprende los anticuerpos descritos anteriormente y un polipéptido que se une específicamente al anticuerpo. En un aspecto de la divulgación, el polipéptido es el polipéptido contra el cual se generó el anticuerpo. En un aspecto, el complejo de anticuerpo-péptido es un complejo aislado. En un aspecto adicional de la divulgación, el anticuerpo del complejo es, pero sin limitación, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un derivado de anticuerpo descrito en el presente documento. Cualquiera o tanto el anticuerpo como el péptido del complejo de anticuerpo-péptido se puede marcar de forma detectable. En un aspecto de la divulgación, el complejo de anticuerpo-péptido de la divulgación se puede usar como una muestra de control o de referencia en los ensayos de diagnóstico o de selección.

Los anticuerpos policlonales de la divulgación pueden generarse usando técnicas convencionales conocidas en la materia y que están bien descritas en la literatura. Existen diversas metodologías para la producción de anticuerpos policlonales. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales normalmente se producen mediante la inmunización de un mamífero adecuado, tal como, pero sin limitación, pollos, cabras, cobayas, hámsteres, caballos, ratones, ratas y

5 conejos. Un antígeno se inyecta en el mamífero, lo que induce linfocitos B para producir inmunoglobulinas IgG específicas del antígeno. Esta IgG se purifica del suero de mamíferos. Las variaciones de esta metodología incluyen la modificación de adyuvantes, vías y zona de administración, los volúmenes de inyección por zona y el número de zonas por animal para la producción óptima y el trato humano de los animales. Por ejemplo, los adyuvantes normalmente se usan para mejorar o potenciar una respuesta inmune hacia los antígenos. La mayoría de los adyuvantes proporcionan un depósito de antígenos en la zona de inyección que permite una liberación lenta del antígeno en los ganglios linfáticos de drenaje. Otros adyuvantes incluyen tensioactivos que potencian la concentración de moléculas de antígeno de proteína sobre una gran superficie y moléculas inmunoestimulantes. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes para la generación de anticuerpos policlonales incluyen adyuvantes de Freund, sistema de adyuvantes Ribi y Titermax. Los anticuerpos policlonales se pueden generar usando métodos descritos en las patentes de EE.UU. n.º 7.279.559; 7.119.179; 7.060.800; 6.709.659; 6.656.746; 6.322.788; 5.686.073; y 5.670.153.

15 Los anticuerpos monoclonales de la divulgación se pueden generar usando técnicas de hibridoma convencionales conocidas en la materia y bien descritas en la literatura. Por ejemplo, se produce un hibridoma mediante la fusión de una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, pero sin limitación, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U397, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K- 562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, CHO, PerC.6, YB2/O) o similares o heteromielomas, productos de fusión de las mismas o cualquier célula o célula de fusión derivada de las mismas, o cualquier otra línea celular adecuada conocida en la técnica (véase, por ejemplo, [www.atcc.org](http://www.atcc.org), [www.lifetech.com](http://www.lifetech.com), último acceso el 26 de noviembre de 2007, y similares), con células productoras de anticuerpos tales como, pero sin limitación, bazo aislado o clonado, sangre periférica, linfa, amígdala, u otras células inmunes o células que contengan linfocitos B, o cualquier otras células que expresen las secuencias de la región constante o variable de cadena pesada o ligera, o la región marco o CDR, ya sea como ácido nucleico endógeno o heterólogo, como recombinante o endógeno, viral, bacteriano de algas, procarionta, de anfibio, de insecto, de reptil, de pez, de mamífero, de roedor, equino, ovino, de cabra, de oveja, de primate, eucariota, ADN genómico, ADNc, ADNr, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN de cloroplasto, ARNnh, ARNm, ARNt, monocatenario, bicatenario o de triple cadena, hibridado, y similares o cualquier combinación de los mismos. Las células productoras de anticuerpos también se pueden obtener a partir de la sangre periférica o, preferentemente, de bazo o ganglios linfáticos, de seres humanos u otros animales adecuados que han sido inmunizados con el antígeno de interés. También se puede usar cualquier otra célula huésped adecuada para expresar el ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifique un anticuerpo, un fragmento especificado o una variante del mismo, de la presente divulgación. Las células fusionadas (hibridomas) o las células recombinantes se pueden aislar usando condiciones de cultivo selectivas u otros métodos conocidos adecuados, y clonarse mediante dilución limitante o clasificación de células, u otros métodos conocidos.

40 En una realización de la divulgación, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden generar usando un sistema de múltiples péptidos antigénicos (MAP). El sistema MAP utiliza un núcleo de peptidilo de tres o siete restos de lisina radialmente ramificados, en el que se pueden escribir los péptidos antigénicos de interés usando la química en fase sólida convencional. El núcleo de lisina produce el MAP que porta aproximadamente de 4 a 8 copias del epítipo peptídico en función del núcleo interno que, en general, representa menos del 10 % del peso molecular total. El sistema MAP no requiere un vehículo proteico para la conjugación. La alta relación molar y el denso empaquetamiento de múltiples copias del epítipo antigénico de un MAP ha mostrado producir una fuerte respuesta inmunogénica. Este método se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.229.490.

45 Se pueden usar otros métodos adecuados para producir o aislar anticuerpos de la especificidad requerida, incluyendo, pero sin limitación, métodos que seleccionan anticuerpos recombinantes de una biblioteca de péptidos o proteínas (por ejemplo, pero sin limitación, una biblioteca de presentación de bacteriófagos, ribosomas, oligonucleótidos, ARN, ADNc o similares, por ejemplo, como la que se puede obtener de diversos proveedores comerciales tales como Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, RU), MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), Biovation (Aberdeen, Escocia, RU) BioInvent (Lund, Suecia), usando métodos conocidos en la técnica. Véanse las patentes de EE.UU. n.º 4.704.692; 5.723.323; 5.763.192; 5.814.476; 5.817.483; 5.824.514; 5.976.862. Otros métodos alternativos se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen *et al.* (1977) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907 (1997); Sandhu *et al.* (1996) *Crit. Rev. Biotechnol.* 16:95-118; Eren *et al.* (1998) *Immunol.* 93:154-161 que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se conoce en la técnica y/o como se describe en el presente documento. Dichas técnicas incluyen, pero sin limitación, presentación en ribosomas (Hanes *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 94:4937-4942; Hanes *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 95:14130-14135); tecnologías productoras de anticuerpos unicelulares (por ejemplo, el método de anticuerpos de linfocitos seleccionados ("SLAM") (patente de EE.UU. n.º 5.627.052, Wen *et al.* (1987) *J. Immunol.* 17:887-892; Babcook *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1996) 93:7843-7848); microgota gel y citometría de flujo (Powell *et al.* (1990) *Biotechnol.* 8:333-337; Sistemas unicelulares (Cambridge, Mass); Gray *et al.* (1995) *J. Imm. Meth.* 182:155-163; y Kenny *et al.* (1995) *Bio. Technol.* 13:787-790); selección de linfocitos B (Steenbakkers *et al.* (1994) *Molec. Biol. Reports* 19:125-134.

65 Los derivados de anticuerpos de la presente divulgación también se pueden preparar mediante la administración de un polinucleótido que codifique un anticuerpo de la presente invención a un huésped adecuado para proporcionar

animales o mamíferos transgénicos tales como cabras, vacas, caballos, ovejas y similares, que produzcan dichos anticuerpos en su leche. Estos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 5.827.690; 5.849.992; 4.873.316; 5.849.992; 5.994.616; 5.565.362; y 5.304.489.

5 La expresión "derivado de anticuerpo" incluye la modificación después de la traducción de la secuencia de polipéptido lineal del anticuerpo o fragmento. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.602.684 B1 describe un método de generación de formas de glicol modificadas de anticuerpos, incluyendo moléculas de anticuerpo completas, fragmentos de anticuerpos o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, con una mayor toxicidad celular mediada por Fc, y glicoproteínas así generadas.

10 Los derivados de anticuerpos también se pueden preparar mediante la administración de un polinucleótido de la presente invención para proporcionar plantas transgénicas y células vegetales cultivadas (por ejemplo, pero sin limitación, tabaco, maíz y lenteja de agua) que produzcan dichos anticuerpos, partes especificadas o variantes en las partes de la planta o en sus células cultivadas. Por ejemplo, Cramer *et al.* (1999) *Curr. Top. Microbol. Immunol.* 240:95-118 y las referencias citadas en el mismo, describen la producción de hojas de tabaco transgénico que expresan grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, usando un promotor inducible. El maíz transgénico se ha usado para expresar proteínas de mamífero a niveles de producción comercial, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes o purificadas de fuentes naturales. Véase, por ejemplo, Hood *et al.* (1999) *Adv. Exp. Med. Biol.* 464:127-147 y las referencias citadas en el mismo. Los derivados de anticuerpos también se han producido en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas, incluyendo fragmentos de anticuerpos, tales como anticuerpos monocatenarios (scFv), incluyendo semillas de tabaco y tubérculos de patata. Véase, por ejemplo, Conrad *et al.* (1998) *Plant Mol. Biol.* 38:101-109 y las referencias citadas en el mismo. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden producir usando plantas transgénicas, de acuerdo con métodos conocidos.

25 Los derivados de anticuerpos también se pueden producir, por ejemplo, mediante la adición de secuencias exógenas para modificar la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, la afinidad, la velocidad de activación, la velocidad de desactivación, la avidéz, la especificidad, la semivida o cualquier otra característica adecuada. En general, una parte o la totalidad de las secuencias CDR no humanas o humanas se mantienen, mientras que las secuencias no humanas de las regiones variables y constantes se sustituyen con aminoácidos humanos o de otro tipo.

30 En general, los restos de CDR están directamente y los que más esencialmente implicados en influir en la unión al antígeno. La humanización o la ingeniería de anticuerpos de la presente invención se pueden realizar usando cualquier método conocido tal como, pero sin limitación, los descritos en las patentes de EE.UU. n.º 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; y 4.816.567.

35 Las técnicas para fabricar anticuerpos parcial o completamente humanos son conocidas en la materia, y se puede usar cualquiera de dichas técnicas. De acuerdo con una realización de la divulgación, se fabrican secuencias de anticuerpos completamente humanos en un ratón transgénico que ha sido diseñado para expresar genes de anticuerpos humanos de cadena pesada y ligera. Se han fabricado múltiples cepas de dichos ratones transgénicos que pueden producir diferentes clases de anticuerpos. Se pueden fusionar linfocitos B de ratones transgénicos que producen un anticuerpo deseable para fabricar líneas celulares de hibridoma para la producción continua del anticuerpo deseado. (Véase, por ejemplo, Russel *et al.* (2000) "Infection and Immunity", April 2000:1820-1826; Gallo *et al.* (2000) *European J. of Immun.* 30:534-540; Green (1999) *J. of Immun. Methods* 231:11-23; Yang *et al.* (1999A) *J. of Leukocyte Biology* 66:401-410; Yang (1999B) *Cancer Research* 59(6):1236-1243; Jakobovits. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 31:33-42; Green y Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188(3):483-495; Jakobovits (1998) *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7(4):607-614; Tsuda *et al.* (1997) *Genomics* 42:413-421; Sherman-Gold (1997) *Genetic Engineering News* 17(14); Mendez *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Jakobovits (1996) "Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System" Vol. IV, 194.1-194.7; Jakobovits (1995) *Current Opinion in Biotechnology* 6:561-566; Mendez *et al.* (1995) *Genomics* 26:294-307; Jakobovits (1994) *Current Biology* 4(8):761-763; Arbones *et al.* (1994) *Immunity* 1(4):247-260; Jakobovits (1993) *Nature* 362(6417):255-258; Jakobovits *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90(6):2551-2555; y la patente de EE.UU. n.º 6.075.181).

40 Los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden modificar para crear anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos quiméricos son aquellos en los que los diversos dominios de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos están codificados por el ADN de más de una especie. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.816.567.

45 Como alternativa, los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden modificar para crear anticuerpos sustituidos en superficie. Los anticuerpos sustituidos en superficie son aquellos en los que los restos de aminoácidos exteriores del anticuerpo de una especie se sustituyen juiciosamente o "se sustituyen en superficie" con los de una segunda especie de manera que los anticuerpos de la primera especie no serán inmunogénicos en la primera especie, reduciendo de ese modo la inmunogenicidad del anticuerpo. Dado que la antigenicidad de una proteína depende principalmente de la naturaleza de su superficie, la inmunogenicidad de un anticuerpo se podría reducir

mediante la sustitución de los restos expuestos que difieren de los que normalmente se encuentran en otros anticuerpos de especies de mamíferos. Esta sustitución juiciosa de restos exteriores debe tener poco o ningún efecto sobre los dominios interiores o sobre los contactos entre dominios. Por lo tanto, las propiedades de unión del ligando deben permanecer invariables como consecuencia de alteraciones que se limitan a los restos marco de la región variable. El proceso se conoce como "sustitución en superficie", ya que se altera solo la superficie exterior o la piel del anticuerpo, y los restos de soporte permanecen invariables.

El procedimiento de "sustitución en superficie" hace uso de los datos de secuencia disponibles para los dominios variables de anticuerpos humanos compilados por Kabat *et al.* (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 4ª ed., Bethesda, Md., National Institutes of Health, las actualizaciones de esta base de datos, y otras bases de datos estadounidenses y extranjeras accesibles (tanto de ácidos nucleicos como de proteínas). Los ejemplos no limitantes de los métodos usados para generar anticuerpos sustituidos en superficie incluyen el documento EP 519.596; la patente de EE.UU. n.º 6.797.492; y se describen en Padlan *et al.* (1991) *Mol. Immunol.* 28(4-5):489-498.

La expresión "derivado de anticuerpo" también incluye "diacuerpos", que son fragmentos pequeños de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, en los que los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica. (Véanse, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:6444-6448). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear sitios de unión a dos antígenos. (Véase también, la patente de EE.UU. n.º 6.632.926, concedida a Chen *et al.*, que desvela variantes de anticuerpos que tienen uno o más aminoácidos insertados en una región hipervariable del anticuerpo parental y una afinidad de unión por un antígeno diana que es al menos aproximadamente dos veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo parental por el antígeno).

La expresión "derivado de anticuerpo" incluye además "anticuerpos lineales". El procedimiento de fabricación de anticuerpos lineales se conoce en la técnica y se describe en Zapata *et al.* (1995) *Protein Eng.* 8(10):1057-1062. En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1) que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos conocidos incluyendo, pero sin limitación, purificación de proteína A, precipitación en sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxipatita y cromatografía de lectina. La cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") también se puede usar para la purificación.

Los anticuerpos de la presente divulgación incluyen productos purificados de manera natural, productos de procedimientos sintéticos químicos y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped eucariota, incluyendo, por ejemplo, células de levaduras, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos o, como alternativa, a partir de unas células procariontas como se ha descrito anteriormente.

Si un anticuerpo monoclonal que se está ensayando se une con una proteína o un polipéptido, entonces, el anticuerpo que se está ensayando y los anticuerpos proporcionados por los hibridomas de la presente divulgación son equivalentes. También es posible determinar, sin la necesidad de experimentación, si un anticuerpo tiene la misma especificidad que el anticuerpo monoclonal de la presente divulgación mediante la determinación de si el anticuerpo que se está ensayando impide que un anticuerpo monoclonal de la presente divulgación se una con la proteína o el polipéptido con el que el anticuerpo monoclonal es normalmente reactivo. Si el anticuerpo que se está ensayando compite con el anticuerpo monoclonal de la divulgación como se muestra mediante una reducción en la unión mediante el anticuerpo monoclonal de la presente divulgación, entonces es probable que los dos anticuerpos se unan al mismo o a un epítipo estrechamente relacionado. Como alternativa, se puede preincubar el anticuerpo monoclonal de la presente divulgación con una proteína con la que sea normalmente reactivo, y determinar si el anticuerpo monoclonal que se está ensayando es inhibido en su capacidad para unirse al antígeno. Si el anticuerpo monoclonal que se está ensayando se inhibe entonces, con toda probabilidad, tiene la misma especificidad epitópica que, o una estrechamente relacionada con, el anticuerpo monoclonal de la presente divulgación.

El término "anticuerpo" también pretende incluir anticuerpos de todos los isotipos. Los isotipos particulares de un anticuerpo monoclonal se pueden preparar ya sea directamente mediante la selección de la fusión inicial o se pueden preparar secundariamente, a partir de un hibridoma parental que secreta un anticuerpo monoclonal de diferente isotipo usando la técnica de selección sib para aislar variantes de cambio de clase usando el procedimiento descrito en Steplewski, *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82:8653 o Spira, *et al.* (1984) *J. Immunol. Methods* 74:307.

El aislamiento de otros hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales con la especificidad de los anticuerpos monoclonales de la divulgación también puede ser realizado por un experto habitual en la materia mediante la

producción de anticuerpos antidiotípicos. Herlyn, *et al.* (1986) *Science* 232:100. Un anticuerpo antidiotípico es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos presentes en el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma de interés.

5 La identidad idiotípica entre los anticuerpos monoclonales de dos hibridomas demuestra que los dos anticuerpos monoclonales son iguales con respecto a su reconocimiento del mismo determinante epitópico. Por lo tanto, mediante el uso de anticuerpos para los determinantes epitópicos en un anticuerpo monoclonal, es posible identificar otros hibridomas que expresen anticuerpos monoclonales de la misma especificidad epitópica.

10 También es posible usar la tecnología de antidiotipo para producir anticuerpos monoclonales que imiten un epítipo. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal antidiotípico generado contra un primer anticuerpo monoclonal tendrá un dominio de unión en la región hipervariable que es la imagen especular del epítipo unido mediante el primer anticuerpo monoclonal. Así pues, en este ejemplo, el anticuerpo monoclonal antidiotípico se podría usar para inmunización para la producción de estos anticuerpos.

15 En algunos aspectos de la presente divulgación, será útil marcar detectable o terapéuticamente el anticuerpo. Los marcadores adecuados se describen *supra*. Los métodos de conjugación de anticuerpos con estos agentes son conocidos en la técnica. Solo a efectos ilustrativos, los anticuerpos se pueden marcar con una fracción detectable tal como un átomo radiactivo, un cromóforo, un fluoróforo o similares. Dichos anticuerpos marcados se pueden usar para técnicas de diagnóstico, ya sea *in vivo* o en una muestra de ensayo aislada.

20 El acoplamiento de anticuerpos a haptenos de bajo peso molecular puede aumentar la sensibilidad del anticuerpo en un ensayo. Los haptenos pueden detectarse entonces específicamente por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es común usar haptenos tales como biotina, que reaccionen con avidina o dinitrofenol, piridoxal y fluoresceína, que puedan reaccionar con anticuerpos anti-hapteno específicos. Véase, Harlow y Lane (1988) *supra*.

Los anticuerpos pueden marcarse con una fracción detectable tal como un átomo radiactivo, un cromóforo, un fluoróforo o similares. Dichos anticuerpos marcados se pueden usar para técnicas de diagnóstico, ya sea *in vivo* o en una muestra de ensayo aislada. Los anticuerpos también pueden conjugarse, por ejemplo, a un agente farmacéutico, tal como fármaco quimioterapéutico o una toxina. Se pueden unir a una citoquina, a un ligando, a otro anticuerpo. Los agentes adecuados para el acoplamiento a anticuerpos para lograr un efecto antitumoral incluyen citocinas tales como interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral (TNF); fotosensibilizadores, para su uso en terapia fotodinámica, incluyendo tetrasulfonato de ftalocianina de aluminio (III), hematoporfirina y ftalocianina; radionucleidos tales como el yodo-131 (<sup>131</sup>I), itrio-90 (<sup>90</sup>Y), bismuto-212 (<sup>212</sup>Bi), bismuto-213 (<sup>213</sup>Bi), tecnecio-99m (<sup>99m</sup>Tc), renio-186 (<sup>186</sup>Re) y renio-188 (<sup>188</sup>Re); antibióticos tales como doxorubicina, adriamicina, daunorubicina, metotrexato, daunomicina, neocarzinostatina y carboplatino; toxinas bacterianas, vegetales y otras toxinas tales como toxina de la difteria, exotoxina de pseudomonas A, enterotoxina estafilocócica A, toxina abrina-A, ricina A (ricina A desglucosilada y ricina A natural), toxina TGF-alfa, citotoxina de cobra china (naja naja atra) y gelonina (una toxina vegetal); proteínas vegetales desactivadoras del ribosoma, bacterias y hongos tales como restrictocina (una proteína desactivadora del ribosoma producida por *Aspergillus restrictus*), saporina (una proteína desactivadora del ribosoma de *Saponaria officinalis*) y RNasa; inhibidores de la tirosina quinasa; ly207702 (un nucleósido de purina difluorado); liposomas que contienen agentes antiquímicos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, plásmidos que codifican toxinas, metotrexato, etc.); y otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos tales como F(ab).

45 Los anticuerpos de la divulgación también se pueden unir a muchos vehículos diferentes. Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona composiciones que contienen los anticuerpos y otra sustancia, activa o inerte. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser bien soluble o insoluble para los fines de la divulgación. Los expertos en la materia conocerán otros vehículos adecuados para la unión de anticuerpos monoclonales o serán capaces de determinarlos, usando la experimentación de rutina.

## V. Antídotos alternativos y métodos de la invención

55 La divulgación contempla que la formulación de dosis unitaria es útil y eficaz para los antídotos, además del polipéptido de SEQ ID NO: 13.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de prevención o de reducción de la hemorragia en un sujeto sometido a terapia anticoagulante mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un derivado de la proteína del factor Xa. En una realización de la divulgación, el derivado tiene un sitio activo modificado y/o un dominio Gla modificado que, por tanto, tiene bien actividad procoagulante reducida o nula. El derivado actúa como un antídoto y neutraliza esencialmente la actividad o el efecto anticoagulante del inhibidor. En una realización de la divulgación, el derivado bien es deficiente en Gla o no tiene dominio Gla. El sujeto puede ser un mamífero o, más concretamente, un ser humano.

65

En otra realización de la divulgación, la divulgación se dirige a un método de unión e inhibición selectiva de un inhibidor de factor Xa administrado exógenamente en un sujeto. El método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un derivado de un derivado de factor Xa como se describe anteriormente. El sujeto puede ser una célula o un mamífero, tal como un ser humano.

5 Los pacientes adecuados para este tratamiento han sido sometidos a terapia anticoagulante previamente, por ejemplo, han recibido uno o más de un anticoagulante, tal como un inhibidor del factor Xa. Los ejemplos de los anticoagulantes que son inhibidores del factor Xa, incluyen, pero sin limitación, fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmin, NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la vía del factor tisular, DX-9065A, YM-60828, YM-150, apixabán, rivaroxabán, PD-348292 otamixabán, edoxabán, LY517717, GSK913893, heparina de bajo peso molecular y betrixabán, o cualquier combinación de los mismos. La fuente de diversos anticoagulantes se encuentra a lo largo de la descripción.

15 En un aspecto de la divulgación, el derivado tiene un sitio activo modificado y/o un dominio Gla modificado o eliminado. En un aspecto, el derivado de factor Xa no tiene o presenta actividad procoagulante. En este aspecto de la divulgación, el derivado comprende al menos los restos de aminoácidos 40 a 448, 45 a 448 o 46 a 448 de SEQ ID NO: 3 o equivalentes de los mismos. En otro aspecto de la divulgación, el derivado comprende al menos los restos de aminoácidos 45 a 139 y 195 a 448 o 46 a 139 y 195-448 de SEQ ID NO: 3 o equivalentes de los mismos.

20 El derivado de fXa conserva la estructura tridimensional del sitio activo de la proteína fXa. La información relativa a la estructura tridimensional de fXa sin Gla puede encontrarse en Brandstetter, H *et al. J. Bio. Chem.*, 1996, 271:29988-29992.

25 En otro aspecto de la divulgación, los derivados de fXa pueden carecer del dominio Gla, así como uno cualquiera de los dos dominios EGF. En otro aspecto de la divulgación, los derivados de fXa carecen por completo de la cadena ligera. Otras modificaciones de la cadena pesada pueden comprender el dominio catalítico de serina proteasas relacionadas que son capaces de unirse a inhibidores. Las serina proteasas relacionadas tienen dominios catalíticos que poseen la suficiente similitud estructural con el dominio catalítico de fXa y que son, por lo tanto, capaces de unirse a inhibidores de fXa de molécula pequeña. Los ejemplos de serina proteasas relacionadas incluyen, pero sin limitación, proteasas de mamífero tales como la calicreína plasmática, trombina y tripsina o la proteasa subtilisina bacteriana. Estos derivados incluyen, además, las modificaciones en los restos de aminoácidos equivalentes a restos de serina (SER379) o ácido aspártico (ASP282) del sitio activo descritos en el presente documento.

35 En algunas realizaciones de la divulgación, la proteína del factor Xa con la actividad procoagulante reducida comprende una cadena ligera modificada, en la que la modificación es la sustitución, adición o delección del dominio Gla para reducir la unión a la membrana de fosfolípidos de fXa. En algunas realizaciones de la divulgación, la secuencia de aminoácidos principal de fXa no se cambia, pero la cadena lateral de ciertos aminoácidos se ha cambiado. Los ejemplos del dominio Gla modificado que reduce la unión a la membrana de fosfolípidos de fXa comprende polipéptidos o proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos primaria de SEQ ID NO: 3 o un equivalente de la misma, la sustitución, adición o eliminación de al menos un aminoácido en comparación con el dominio Gla de una proteína de factor Xa humano de tipo silvestre. En algunas realizaciones de la divulgación, al menos un aminoácido que está sustituido o eliminado es un ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla). Los restos de Gla se muestran en SEQ ID NO: 3 en las posiciones de aminoácido 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 32 y 39. En algunas realizaciones de la divulgación, la secuencia primaria de aminoácidos del antídoto es idéntica a SEQ ID NO: 3 o equivalente a la misma, pero que es una proteína de factor Xa descarboxilada, infracarboxilada o no carboxilada. En algunas realizaciones, el antídoto es un fXa anhidro sin Gla o fX-S379A sin Gla. En algunas realizaciones de la divulgación, la proteína de factor Xa con unión a la membrana de fosfolípidos reducida comprende además la modificación o supresión de EGF1 y/o EGF2 (que se muestra en la Figura 3 como los aminoácidos 46 a 84 y 85 a 128, respectivamente) o una parte, es decir, fragmento de los dominios EGF1 y/o EGF2. En algunas realizaciones de la divulgación, la cadena ligera completa o la cadena ligera esencialmente completa se modifica o se elimina. Por ejemplo, la proteína fXa modificada con unión reducida a la membrana de fosfolípidos puede contener solamente la cadena pesada o la fXa modificada puede contener la cadena pesada y un fragmento de la cadena ligera que contiene Cys132, el resto de aminoácido que forma el enlace disulfuro único con Cys302 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el derivado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, el derivado es el polipéptido de cadena doble que comprende SEQ ID NO: 13. En otras realizaciones de la divulgación, el derivado es el polipéptido de SEQ ID NO: 15.

60 En algunas realizaciones, el derivado de la proteína de factor Xa comprende una cadena pesada modificada que contiene el dominio catalítico de dicha proteína de factor Xa. En algunas realizaciones, hay presente al menos una sustitución de aminoácido en una o más posiciones de aminoácidos de fXa seleccionadas del grupo que consiste en Glu216, Glu218, Arg332, Arg347, Lys351 y Ser379 de SEQ ID NO: 3 y 7 (Glu37, Glu39, Arg150, Arg165, Lys169 y Ser195 en la numeración de la quimotripsina, respectivamente). En algunas realizaciones, el antídoto es una proteína de factor Xa con el resto de serina del sitio activo (Ser379 en SEQ ID NO: 3 y 7, Ser195 en la numeración de quimotripsina) modificado a deshidroalanina o alanina. Dichas modificaciones se pueden realizar en la proteína de fXa de tipo silvestre o en cualquiera de las proteínas o fragmentos de fXa modificados descritos anteriormente. Por ejemplo, el fXa anhidro sin Gla con restos de serina del sitio activo reemplazados por deshidroalanina descrito

en el Ejemplo 1 ha mostrado actividad de antídoto.

En otras realizaciones, el derivado tiene interacción reducida con ATIII, cofactores FV/fVa y fVIII/fVIIIa en comparación con el de tipo silvestre o de origen natural factor Xa. En algunas realizaciones, al menos una sustitución de aminoácido está presente en la posición de aminoácidos Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 o Arg424 de SEQ ID NO: 3 y 7 (Arg125, Glu129, Arg165, Lys169, Lys230 o Arg240 en la numeración de quimotripsina, respectivamente). Dichas modificaciones se pueden realizar en la proteína de fXa de tipo silvestre o en cualquiera de las proteínas o fragmentos de fXa modificados descritos anteriormente.

En otras realizaciones de la divulgación, el antídoto es una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio catalítico de serina proteasa que pueda imitar la capacidad de unión del inhibidor de la cadena pesada de fXa. Dichas proteínas pueden incluir proteasas de mamífero tales como la calicreína plasmática, la trombina, la tripsina (o su homólogo bacteriano subtilisina) que se han modificado de forma recombinante para que carezcan de actividad de serina proteasa capaz de escindir sustratos de proteína, pero que todavía poseen las características estructurales de la hendidura del sitio activo.

La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que contienen uno o más de los derivados de factor Xa modificados y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones se administran a un sujeto que las necesita en una cantidad que proporcionará el beneficio deseado, una reducción o una interrupción de la hemorragia. Las composiciones pueden administrarse junto con cualquier agente o terapia adecuada que complemente o mejore la actividad del derivado de factor Xa. Un ejemplo de este tipo es un segundo agente capaz de prolongar la semivida en plasma del antídoto. Los ejemplos de segundos agentes adecuados incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo anti-fXa que reconoce el exosito de la cadena pesada de fXa o un derivado de fXa unido a alfa-2-macroglobulina. La formación del complejo entre derivado de fXa y un segundo agente (anticuerpo exosito o alfa-2-macroglobulina) bloquearía las interacciones macromoleculares, pero conserva la capacidad de unión al inhibidor dependiente del sitio activo. Los ejemplos de anticuerpos anti-fXa adecuados para la administración conjunta incluyen, pero sin limitación, los descritos en Yang Y. H., *et al.*, *J. Immunol.* 2006, 1; 177(11): 8219-25, Wilkens, M. y Krishnaswamy, S., *J. Bio. Chem.*, 2002, 277 (11), 9366-9374, y Church W. R., *et al.*, *Blood*, 1988, 72(6), 1911-1921.

En algunas realizaciones, una proteína de factor Xa se modifica mediante medios químicos, enzimáticos o recombinantes. Por ejemplo, el sitio activo Ser379 se puede modificar químicamente en deshidroalanina, y el dominio Gla puede eliminarse enzimáticamente mediante digestión con quimotripsina como se describe en el Ejemplo 1. Un fXa modificado descrito en el presente documento también se puede producir mediante medios recombinantes modificando la secuencia del ADNc que codifica el fX de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) descrito más detalladamente en el Ejemplo 7 para dirigir la expresión del antídoto recombinante (antídoto r) o, como alternativa, una proteína fX con la modificación deseada se puede producir mediante medios recombinantes seguido de la activación al fXa modificado por un activador, tal como un veneno de serpiente, por ejemplo, veneno de víbora de Russell, y los complejos de fVIIa/factor tisular o fIXa/fVIIIa.

Los sujetos que se beneficiarán de la administración de las composiciones descritas en el presente documento y los métodos que se acompañan incluyen aquellos que están padeciendo o que tienen predisposición a padecer una hemorragia mayor clínica o una hemorragia no mayor clínicamente relevante. Los ejemplos de hemorragias mayores clínicas se seleccionan del grupo que consiste en hemorragia, hemorragia en los órganos vitales, hemorragia que requiere volver a operar o un nuevo procedimiento terapéutico, y un índice de hemorragia de  $\geq 2,0$  con una hemorragia manifiesta asociada. (Turpie A. G. G., *et al.*, *NEJM*, 2001, 344: 619-625). Además, el sujeto puede estar experimentando o estar predispuesto a experimentar una hemorragia no mayor seleccionada del grupo que consiste en epistaxis que es persistente o recurrente y en una cantidad sustancial o que no se detendrá sin intervención, hemorragia del tracto rectal o urinario que no llega a un nivel que requiere un procedimiento terapéutico, hematomas sustanciales en los sitios de inyección o en otros lugares que son espontáneos o se producen con un traumatismo trivial, pérdida importante de sangre más de lo habitual asociada con un procedimiento quirúrgico que no requiere drenaje y hemorragia que requiere transfusión no planificada.

En algunas realizaciones, el antídoto se administra después de la administración de una sobredosis de un inhibidor de fXa o antes de una cirugía electiva programada, que puede exponer a los sujetos al riesgo de hemorragia.

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se ha de entender, aunque no siempre se indique de manera explícita, que se administra una cantidad eficaz del derivado al sujeto. La cantidad puede ser determinada empíricamente por el médico tratante y variará con la edad, el sexo, el peso y el estado de salud del sujeto. Los factores adicionales que deben ser considerados por el médico tratante incluyen, pero sin limitación, la identidad y/o la cantidad de inhibidor del factor Xa, que se puede haber administrado, el método o el modo por el que el antídoto se administrará al sujeto, la formulación del antídoto y el punto final terapéutico para el paciente. Con estas variables en mente, un experto en la materia administrará una cantidad terapéuticamente eficaz al sujeto que vaya a tratar. En otro aspecto más de la divulgación, la invención se refiere a una composición farmacéutica para invertir o neutralizar la actividad anticoagulante de un inhibidor del factor Xa administrado a un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un antídoto contra el inhibidor del factor Xa y un vehículo

farmacéuticamente aceptable, con la condición de que el antídoto no sea factor VIIa derivado del plasma, factor VIIa recombinante, plasma recién congelado, concentrados de complejo de protrombina y sangre entera.

En algunas realizaciones de la divulgación, el antídoto es uno cualquiera de los antídotos que se han descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el antídoto se conjuga con una fracción capaz de extender la semivida en circulación del antídoto. En algunas realizaciones, la fracción se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, un grupo acilo, un liposoma, un vehículo proteico, una membrana de fosfolípido artificial y una nanopartícula. Por ejemplo, un resto de lisina o cisteína de sitio no activo de un derivado de fXa descrito en el presente documento puede modificarse químicamente para unirse a una molécula de polietilenglicol. Otros métodos proporcionados en Werle, M. & Bernkop-Schnürch, A. "Strategies to Improve Plasma Half Life Time of Peptide and Protein Drugs, Amino Acids" 2006, 30(4):351-367 pueden usarse para prolongar la semivida en plasma de los antídotos de la presente invención.

En otras realizaciones de la invención, la semivida del derivado de fXa se mejora mediante el acoplamiento del antídoto a dominios Fc de soporte. En una realización, el antídoto se acopla a un fragmento Fc, tal como una parte de péptido de inmunoglobulina o un fragmento de IgG1. En una realización, se contempla una proteína quimérica que comprende el derivado de fXa y la parte de péptido de inmunoglobulina. En otra realización más, el derivado de fXa y el péptido de inmunoglobulina se acoplan mediante una reacción química, tal como un enlace disulfuro con las regiones constantes de cadena pesada y de cadena ligera kappa de IgG humana.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un agente capaz de prolongar la semivida en plasma del antídoto. En otro aspecto, la composición farmacéutica se ha formulado junto con un agente capaz de prolongar la semivida en plasma del antídoto. En algunas realizaciones, el agente administrado o formulado conjuntamente es un anticuerpo anti-fXa que reconoce el exosito de fXa o un derivado de fXa unido a alfa-2-macroglobulina.

## VI. Terapias

La presente invención se refiere a una formulación de dosis unitaria para su uso en un método terapéutico de prevención, reducción o interrupción de una hemorragia en un sujeto sometido a terapia anticoagulante. Se contempla que los antídotos o derivados de la presente invención pueden ser fármacos de corta duración para su uso en situaciones de emergencia o electivas que puedan neutralizar de forma segura y específica las propiedades anticoagulantes convencionales de un inhibidor de fXa sin causar efectos secundarios hemodinámicos perjudiciales o el agravamiento de la respuesta vascular proliferativa a una lesión.

En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de un antídoto presenta un alto índice terapéutico. El índice terapéutico es la relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos que se pueden expresar como la relación entre la DL<sub>50</sub> y la DE<sub>50</sub>. La DL<sub>50</sub> es la dosis letal para el 50 % de la población y la DE<sub>50</sub> es la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población. La DL<sub>50</sub> y la DE<sub>50</sub> se determinan mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos de células animales o animales experimentales. Los antídotos o derivados de la presente invención se pueden administrar una o varias veces cuando sea necesario para neutralizar el efecto de un inhibidor de fXa presente en el plasma de un sujeto. Preferentemente, el antídoto de la presente divulgación es suficiente cuando se administra en una sola dosis.

Se contempla que una dosis típica de los antídotos de la invención dependerá del entorno clínico real y de la concentración de inhibidor en plasma. En el ensayo *in vitro*, tal como la generación de trombina, ensayos de coagulación clínicos tales como aPTT, PT y ACT, se espera que una cantidad terapéuticamente eficaz de un antídoto produzca una corrección de la actividad de coagulación *ex vivo* del 10 % o más. Los ensayos *in vitro* indican que una relación de antídoto/inhibidor > 1,0 debe mostrar un efecto de inversión. Se espera que la concentración en plasma máxima de antídoto esté en el intervalo micromolar, probablemente entre 10 micromolar o inferior.

En un entorno clínico, uno de los criterios en determinación de la eficacia de un antídoto es que produzca cualquier cambio de las medidas reales de hemorragia. En los ensayos clínicos, las categorías de hemorragias mayores incluyen la hemorragia letal, las hemorragias en los órganos vitales (intracraneal, intraocular, retroperitoneal, espinal, pericárdica), cualquier hemorragia que requiera volver a intervenir o un nuevo procedimiento terapéutico (por ejemplo, la aspiración de una rodilla operada, inserción de tubo de toracotomía para hemotórax, electrocoagulación endoscópica, etc.) o un índice de hemorragia de  $\geq 2,0$  si se asocia con una hemorragia manifiesta. El índice de hemorragia se define como el número de unidades de los glóbulos rojos empaquetados o la sangre entera transfundida, además de los valores de hemoglobina antes del episodio de hemorragia, menos los valores de hemoglobina una vez estabilizada la hemorragia (en gramos por decilitro).

Otro criterio para la eficacia del antídoto en el entorno clínico es que reduce la hemorragia no mayor clínicamente significativa. Esta categoría de hemorragias incluye la hemorragia que no es mayor, pero que es más de la habitual y garantiza la atención clínica, incluyendo la epistaxis que es persistente o recurrente y en cantidad sustancial o que no se detendrá sin la intervención; hemorragia del tracto urinario o rectal que no se eleva a un nivel que requiera un procedimiento terapéutico (por ejemplo, la nueva inserción de un catéter de Foley o inspección cistoscopia),

hematomas sustanciales en los sitios de inyección o en otros lugares que son espontáneas o que se producen con un traumatismo trivial; pérdida considerable de sangre; hemorragia que requiere transfusión no planificada. Como se usa en el presente documento, "la pérdida considerable de sangre" se refiere a la cantidad de pérdida de sangre que es mayor a esa cantidad habitualmente asociada con el procedimiento quirúrgico. La pérdida considerable de sangre conduce a la inflamación que se trata de forma conservativa, ya que está a la altura de requerir drenaje.

En una realización, los derivados de la presente invención tienen suficiente semivida en circulación en plasma para neutralizar esencialmente el inhibidor de fXa presente en el plasma. El fXa activado no tiene esencialmente semivida en circulación en seres humanos, ya que es inhibido eficazmente por ATIII, TFPI y otros inhibidores plasmáticos (Fuchs, H. E. y Pizzo, S. V., *J. Clin. Invest.*, 1983, 72:2041-2049). El fXa inactivo ha mostrado tener una semivida en circulación de 2-3 horas en los seres humanos. En un modelo de babuino, la semivida de un fXa bloqueado en el sitio activo por DEGR ([5-(dimetilamino)-1-naftalenosulfonil]-glutamilglicilarginil-clorometilcetona) fue de aproximadamente 10 horas o 2 horas, determinada por ensayos isotópicos o de inmunoabsorción ligada a una enzima, respectivamente (Taylor, F. B. *et al.*, *Blood*, 1991, 78(2):364-368).

Puede ser deseable prolongar la semivida de un derivado de fXa antídoto hasta 24-48 horas. Se contempla que la conjugación o adición de uno o más de las siguientes fracciones aumentará la semivida en plasma de un antídoto:

- a) polietilenglicol;
- b) un grupo acilo;
- c) liposomas y agentes de encapsulamiento;
- d) vehículos proteicos;
- e) membrana fosfolipídica artificial;
- f) inmunoglobulina; y
- g) nanopartícula.

El sitio de conjugación puede no limitarse a una cadena o a un resto especial, siempre que la conjugación no enmascare el/los sitio/s de unión al inhibidor del antídoto. Los antídotos descritos en el presente documento se pueden administrar en combinación con uno cualquiera o más de uno de los compuestos descritos anteriormente.

En general, los anticuerpos administrados tienen una semivida mucho mayor que las proteínas de coagulación sanguínea en circulación. Es posible usar un complejo que consista en el fXa deficiente en el dominio Gla y un anticuerpo unido al exosito de fXa como antídoto con una semivida prolongada en circulación. La formación de un complejo entre fXa y el anticuerpo dirigido al exosito puede reducir la interacción de un fXa deficiente en el dominio Gla con sustratos e inhibidores macromoleculares, tales como protrombina y antitrombina III, dejando a la vez la hendidura del sitio activo inalterada, de manera que el complejo pueda actuar como un antídoto para unirse al inhibidor de molécula pequeña dirigido al sitio activo. La formación del complejo de  $\alpha$ -2-macroglobulina-fXa también puede ser de utilidad como antídoto para los inhibidores de molécula pequeña de fXa.

La eficacia de los antídotos en la inversión de la actividad anticoagulante de los inhibidores de fXa, así como su actividad procoagulante se pueden determinar mediante ensayos *in vitro* y modelos en animales realizados por los expertos en la materia. Los ejemplos de ensayos *in vitro* son la generación de trombina, los ensayos clínicos de coagulación tales como aPTT, PT y ACT. Se contempla que un antídoto de la presente invención es capaz de producir el 10 % o más de la corrección de la actividad de coagulación *ex vivo*. Para medir la eficacia, se pueden usar varios modelos animales *in vivo* de duración de la hemorragia y/o pérdida de sangre en, por ejemplo, roedores tales como ratones, perros y primates, tales como monos.

## VII. Kits

La divulgación proporciona además kits o envases. En algunas realizaciones, el kit de la presente invención comprende: (a) un primer recipiente que contiene un inhibidor de fXa para la administración regular para el tratamiento de la trombosis, y (b) un segundo recipiente que contiene un antídoto de la presente divulgación para su uso en los casos que haya una sobredosis del inhibidor de fXa en (a) o cuando se requiera reestablecer la hemostasis normal para detener o prevenir la hemorragia. En otras realizaciones, el kit comprende además un marcador que explique cuándo se deben usar estos dos agentes de (a) y (b).

El primer y segundo recipiente pueden ser un frasco, un tarro, un vial, un matraz, una jeringa, un tubo, una bolsa o cualquier otro recipiente usado en la fabricación, en el almacenamiento o en la distribución de un producto farmacéutico. El prospecto puede ser una etiqueta, un marcador o similares, en el que figure la información relativa a la composición farmacéutica del kit. La información que figura normalmente estará determinada por la agencia reguladora que gobierne la zona en la que se vaya a comercializar la composición farmacéutica, tal como la Food and Drug Administration de Estados Unidos. Preferentemente, en el prospecto se mencionan específicamente las indicaciones para las que se ha aprobado la composición farmacéutica. El prospecto puede estar hecho de cualquier material en el que una persona pueda leer la información contenida en el mismo o sobre el mismo. Preferentemente, el prospecto es un material imprimible, tal como papel, cartón adhesivo, papel de aluminio o plástico, y similares, en el que se haya impreso o aplicado la información deseada.

## Ejemplos

La invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que pretenden ser puramente ilustrativos de la invención. La presente invención no está limitada en el alcance por las realizaciones ilustradas, que solo pretenden ser ilustraciones de aspectos individuales de la invención.

A menos que se indique lo contrario todas las temperaturas están en grados centígrados. También, en estos ejemplos y en otras partes, las abreviaturas tienen los siguientes significados:

10	aa	= aminoácido
	Ac	= anticuerpo
	ACT	= tiempo de coagulación activado
	aPTT	= tiempo parcial de tromboplastina activado
	célula CHO	= célula de ovario de hámster chino
15	células CHO dhfr (-)	= células CHO que carecen de gen dhfr
	h	= hora
	INR	= razón normalizada internacional
	IV	= intravenosa
	kg	= kilogramo
20	M	= molar
	mg	= miligramos
	mg/kg	= miligramos/kilogramo
	mg/ml	= miligramos/mililitro
	min	= minutos
25	ml	= mililitro
	mM	= milimolar
	nm	= nanómetro
	nM	= nanomolar
	PO	= oral
30	PPP	= plasma pobre en plaquetas
	PRP	= plasma rico en plaquetas
	PT	= tiempo de protrombina
	UFR	= unidad de fluorescencia relativa
	S	= segundo
35	TF	= factor tisular
	U/ml	= unidades/mililitro
	μl o ul	= microlitro
	μM	= micromolar
	μg	= microgramo.

### Ejemplo 1. Preparación de fXa anhidro sin Gla mediante digestión con quimotripsina

Se preparó fXa anhidro sin Gla de acuerdo con el procedimiento del Morita, T. *et al.*, *J. Bio. Chem.*, 1986, 261(9): 4015-4023 mediante la incubación de fXa anhidro, en la que la deshidroalanina reemplaza a la serina del sitio activo, con quimotripsina en Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, a pH 7,5 y 22 °C durante 60 minutos. En un entorno experimental típico, se incubaron 0,5 miligramos/mililitro (mg/ml) de fXa anhidro con 5 unidades/mililitro (U/ml) de perlas de α-quimotripsina-agarosa con agitación suave. Al final de la reacción, se retiraron las perlas de α-quimotripsina-agarosa mediante centrifugación o filtración. A esto, le siguió la incubación con un exceso de cantidad de los inhibidores fluoruro de 4-amidino-fenil-metano-fulfonil (APMSF), tosil-L-lisina-clorometil-cetona (TLCK) y tosil-L-fenilalanina-clorometil-cetona (TPCK) para inactivar la actividad de fXa residual o cualquier actividad de la quimotripsina posiblemente lixiviada de las perlas. Se retiraron el fragmento del dominio Gla y los inhibidores del producto final, fXa anhidro sin Gla, mediante un dispositivo de filtración centrífuga Amicon Ultra (membrana YM10) o mediante diálisis convencional. En caso de necesitarse, también se realizaron al mismo tiempo la concentración o el intercambio de tampón. Se preparó fXa anhidro que contenía el dominio Gla de acuerdo con el procedimiento presentado por Nogami, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1999, 274(43):31000-7.

El fXa anhidro que contiene Gla se preparó de acuerdo con el procedimiento presentado por Nogami *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(43):31000-7. Como se muestra en la Figura 5, el fXa anhidro que contiene Gla tiene actividad enzimática disminuida, pero es capaz de unirse a inhibidores de fXa tales como el betrixabán. Esto se describe detalladamente en el Ejemplo 4.

Las perlas de α-quimotripsina-agarosa se adquirieron en Sigma, y la actividad específica (U/ml) se basa en los datos del fabricante para el número de lote específico usado.

La digestión con quimotripsina del fXa activo puede llevarse a cabo de acuerdo con el procedimiento anterior sin usar APMSF. Se determinó la actividad de coagulación de fXa activo antes de la digestión con quimotripsina, y

después de 15, 30 y 60 minutos de digestión con quimotripsina de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 que figura más adelante. La Figura 7 muestra la pérdida completa de la actividad de coagulación tras 30 minutos de digestión con quimotripsina. El tiempo de incubación se prolongó a 60 minutos para garantizar la eliminación completa del dominio Gla.

### 5 **Ejemplo 2. Ensayo de la generación de trombina en plasma pobre en plaquetas (PPP) o plasma rico en plaquetas (PRP)**

10 En el presente ejemplo, las muestras humanas de plasma rico en plaquetas o de plasma pobre en plaquetas se prepararon a partir de sangre de donantes sanos extraída en citrato al 0,32 %. El PRP y el PPP se prepararon haciendo girar la sangre anticoagulada a gravedad de ~100 X o 1.000 X durante 20 minutos, respectivamente, a temperatura ambiente. Se mezclaron 75-100 microlitros (ul) de plasma con CaCl<sub>2</sub> y Z-Gly-Gly-Arg-aminometilcumarina (Z-GGR-AMC, un sustrato fluorogénico de trombina). Se añadió el factor tisular (Innovin, Dade Behring) para iniciar la generación de trombina. Para un experimento típico, la mezcla de reacción contenía Ca<sup>2+</sup> 15 milimolar (mM), Z-GGR-AMC 100 micromolar (μM) y factor tisular 0,1 nanomolar (nM) (TF) (Innovin). La formación de trombina se controló de forma continua a 37 °C mediante un lector de placas fluorométrico (Molecular Devices) midiendo las unidades de fluorescencia relativa (UFR). Se preincubaron el inhibidor y el antídoto, cuando estaban presente, con plasma durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de iniciarse la generación de la trombina.

20 Los resultados de diversos experimentos usando dicho ensayo pueden encontrarse en las Figuras 4, 6 y 9.

### **Ejemplo 3. Ensayos de prolongación de la coagulación**

25 Se usaron dos formatos de ensayo de coagulación para ensayar los efectos de los inhibidores del factor Xa y el antídoto sobre la prolongación de la coagulación. En el primer formato, se usó una placa de 96 pocillos para medir varias muestras al mismo tiempo. En el segundo formato de ensayo, se midió el aPTT con un instrumento de coagulación convencional (temporizador de coagulación automático MLA Electra 800).

30 En el método del formato de placa de 96 pocillos, el plasma pobre en plaquetas y rico en plaquetas humano se preparó de manera similar a los procedimientos del Ejemplo 2. Se recalcificaron de 75 a 100 μl de plasma con CaCl<sub>2</sub>, se incubaron a 37 °C durante 3 minutos y se inició la formación de coágulos mediante la adición de factor tisular (Innovin, Dade Behring) o un reactivo aPTT (Actin FS, Dade Behring). Se controló el cambio de DO<sub>405</sub> de manera continua mediante un lector de placas (Molecular Devices). El tiempo de coagulación se definió como el tiempo (segundos) para alcanzar el valor máximo medio para el cambio en la absorbancia (DO<sub>405nm</sub>). Se preincubaron el inhibidor del Factor Xa y el antídoto, cuando estaban presente, con plasma a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de iniciarse la reacción.

40 Al ensayarse un fXa activo para determinar su actividad de coagulación como se muestra en la Figura 7, se recalcificaron 75-100 ul de plasma deficiente en fX (George King Bio-Medical, Inc.) con CaCl<sub>2</sub>, se incubaron a 37 °C durante 3 minutos y se añadieron productos de fXa tras la digestión con quimotripsina al plasma para iniciar la formación de coágulos. Se controló de manera continua el cambio de DO<sub>405</sub> mediante un lector de placas como se ha descrito anteriormente.

45 En la Figura 13, se midió el efecto de betrixabán 400 nM en la prolongación del aPTT de plasma humano normal y la inversión del efecto inhibidor del betrixabán por el antídoto fXa anhidro sin Gla con un contador del tiempo de coagulación automático MLA Electra 800. Se mezclaron 100 μl de plasma humano agrupado con betrixabán 400 nM y diferentes concentraciones de antídoto. Se añadieron reactivo aPTT (actina FS, Dade Behring) y CaCl<sub>2</sub> según las instrucciones del fabricante para la medición de los tiempos de coagulación.

50 Los resultados de experimentos adicionales usando dicho ensayo pueden encontrarse en las Figuras 10 y 11.

### **Ejemplo 4. Inversión de la inhibición del fXa por el betrixabán mediante fXa anhidro o fXa anhidro sin Gla**

55 Para medir la inhibición de la actividad de fXa por parte del betrixabán y la inversión de su efecto inhibidor, se añadieron fXa activo purificado, diferentes concentraciones de betrixabán y fXa anhidro o fXa anhidro sin Gla a Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Ca<sup>2+</sup> 5 mM y albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1 %. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos, se añadió Spectrozyme-fXa 100 μM (un sustrato cromogénico del factor Xa, Chromogenix) a la mezcla y se midió la velocidad de escisión del sustrato de manera continua durante 5 minutos a 405 nanómetros (nm) mediante un lector de placas. En la Figura 5, se normalizó la actividad cromogénica con respecto al fXa activo en ausencia de cualquier inhibidor. Se analizó la velocidad inicial de formación de producto en función de la concentración de inhibidor y de antídoto mediante regresión no lineal para estimar la afinidad del betrixabán hacia el antídoto (Figura 8).

65

Se midió el efecto del antídoto fXa anhidro sin Gla sobre la actividad de la trombina hacia un sustrato cromogénico S2288 (200  $\mu$ M) de manera similar a la anterior, con o sin Argatrobano, un inhibidor específico de IIa de molécula pequeña. Como era de esperar, el antídoto (538 nM) no afecta a la actividad amidolítica de IIa (5 nM) ni a su inhibición por parte de Argatrobano 50 nM.

5

#### **Ejemplo 5. Preparación de fXa con restos de ácido $\gamma$ -carboxiglutámico descarboxilados**

Un derivado de fXa con restos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico descarboxilados se puede preparar mediante el tratamiento de la proteína fXa, por ejemplo, basándose en el procedimiento descrito por Bajaj, *et al. J. Biol. Chem.*, 1982, 257(7): 3726-3731. Se liofilizan de 2 a 5 mg de fXa purificado o recombinante en 2 ml de bicarbonato de amonio 0,1 molar a pH 8,0. Se sella el polvo resultante al vacío de menos de 20  $\mu$ m y se calienta a 110  $^{\circ}$ C durante diversos períodos de tiempo para obtenerse fXa descarboxilado.

10

#### **Ejemplo 6. Preparación de fXa-S379A sin Gla-recombinante**

15

Los derivados de fXa se pueden producir mediante el método de ADN recombinante con uno de los siguientes procedimientos basados en ADNc de fX (SEQ ID NO: 2) para la expresión de fX (SEQ ID NO: 1, 3) o derivados de fXa (SEQ ID NO: 4, 5, 9 y 11) en un organismo huésped adecuado de acuerdo con los procedimientos generales de mutagénesis y biología molecular.

20

El fX recombinante y los derivados de fX se pueden expresar en, por ejemplo, células de riñón embrionario humano HEK293 basadas en procedimientos descritos en Larson, P. J., *et al., Biochem.*, 1998, 37:5029-5038, y Camire, R. M., *et al., Biochem.*, 2000, 39, 14322-14329. El fX recombinante se puede activar a rfXa mediante veneno de víbora de Russell (RVV) activador del factor X. El rfXa se puede procesar adicionalmente a fXa anhidro sin Gla basado en procedimientos descritos en el Ejemplo 1.

25

El fX-S379A recombinante (S195A en la numeración de la quimotripsina) con el resto de serina del sitio activo reemplazado por alanina, y preferentemente el mutante fXa activado, rfXa-S379A, puede expresarse, por ejemplo, en células de ovario de hámster chino (CHO) basadas en procedimientos descritos por Sinha *et al., Protein Expression and Purif.* 1992, 3: 518-524; Wolf, D. L. *et al., J. Biol. Chem.*, 1991, 266(21):13726-13730.

30

El fXa-S379A sin Gla se puede preparar mediante la digestión con quimotripsina de fXa-S379A de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1.

35

Más preferentemente, fXa-S379A sin Gla se puede expresar directamente de acuerdo con los procedimientos anteriores con la delección del fragmento de dominio Gla mediante procedimientos de mutagénesis. Por ejemplo, se puede usar la expresión de proteína recombinante para expresar: fXa-S379A sin Gla(1-39), tras la eliminación del fragmento del dominio Gla de 1-39 de SEQ ID NO: 3; fXa-S379A sin Gla(1-44), equivalente a SEQ ID NO: 10, estando la deshidroalanina reemplazada por alanina; y fXa-S379A sin Gla(1-45) con toda dominio Gla eliminado (SEQ ID NO: 11).

40

También se pueden realizar más truncamientos en el dominio EGF1 o EGF1 más EGF2 (Figura 2) para expresar derivados de fXa-S379A sin Gla(1-84) o fXa-S379A sin Gla(1-128).

45

#### **Ejemplo 7. Expresión de fXa mutante recombinante en célula CHO**

El presente ejemplo describe la construcción de expresión de proteína recombinante y la línea celular para la expresión directa de una variante de fXa-S379A sin dominio Gla (S195A en la numeración de quimotripsina). El antídoto recombinante no requiere etapas de activación o ni de modificación química necesarias para producir el antídoto dp y tiene afinidad comparable a la proteína derivada de plasma en los ensayos *in vitro* descritos en el presente documento.

50

En el presente ejemplo, se expresó directamente un fXa mutante (SEQ ID NO: 13, Tabla 25) en la célula CHO (véase la Figura 14 para el vector de expresión) y la proteína funcional se purificó a partir de medio acondicionado como se describe más adelante. Se ensayó la actividad funcional del antídoto recombinante (antídoto r) *in vitro* y en un modelo animal (Ejemplo 8).

55

Se usó la PCR para mutar la secuencia de ADNc de fX (SEQ ID NO: 2) en tres regiones. La primera mutación fue la delección de los aa 6 a 39 del dominio Gla de FX (SEQ ID NO: 3, Figura 3). La segunda mutación fue la sustitución de la secuencia del péptido de activación de los aa 143-194 con RKR (SEQ ID NO: 16). Esto produjo un enlazador RKRKR (SEQ ID NO: 17) que conecta la cadena ligera y la cadena pesada. Tras la secreción, se retiró dicho enlazador en CHO, dando lugar a una molécula bicatenaria de fXa. La tercera mutación es la mutación del resto del sitio activo S379 a un resto de Ala.

60

El polipéptido producido por el ADNc (SEQ ID NO: 16) que se acaba de describir se describe en la Tabla 24 (SEQ ID. NO: 12). La alineación del ADNc para el polipéptido se muestra en la Tabla 29. La molécula de fXa bicatenaria

65

producida tras la secreción es un fragmento de cadena ligera descrito en la Tabla 26 (SEQ ID NO: 14) y un fragmento de cadena pesada descrito en la Tabla 27 (SEQ ID NO: 15).

5 Se reservaron los primeros 1 a 5 aa de la secuencia de fX y se usaron para conectar el polipéptido del fXa mutante con el péptido prepro de fX (SEQ ID NO: 1, Figura 1), garantizando el procesamiento apropiado del péptido prepro en el fXa mutante.

10 Se secuenció la secuencia de ADN codificante del polipéptido de fXa mutante descrito anteriormente y se insertó en el vector de expresión mostrado en la Figura 14. El polinucleótido del vector de expresión se muestra en SEQ ID NO: 18. Se linealizó el ADN del plásmido y se transfectó en células CHO dhfr (-) de las células. Las células se seleccionaron usando medios deficientes en tetrahidrofolato (HT) más metotrexato (MTX). Se seleccionaron clones estables para la expresión de alto contenido proteínico usando un kit ELISA para fX (Enzyme Research Laboratories, número de catálogo FX-EIA). Se expresó la proteína fXa mutante en medio exento de suero, y el medio acondicionado se recogió y se procesó para la purificación.

15 La proteína diana del medio acondicionado se puede aislar mediante cromatografía de intercambio iónico y purificarse posteriormente mediante cromatografía de afinidad de una sola etapa (tal como un anticuerpo anti-fXa acoplado a una matriz) o mediante una combinación de varias etapas de cromatografía tales como matrices hidrófobas y de exclusión de tamaño. Las purificaciones de afinidad pueden incluir material cromatográfico que se une selectivamente a la hendidura del sitio activo de fXa, tal como benzamidina-sefarosa o inhibidor de tripsina de soja-agarosa (STI agarosa).

20 La Figura 15A muestra las transferencias Western de afinidad (azarosa STI, n.º de catálogo Sigma T0637) del fXa mutante purificado usando anticuerpos monoclonales (Enzyme Research Laboratories, FX-EIA) que reconocen la cadena pesada y ligera de fX, respectivamente. Tras la reducción del enlace disulfuro que une la cadena ligera y pesada, el antídoto r muestra la banda de la cadena pesada de la movilidad esperada (similar al fXa derivado del plasma) en la transferencia Western. La eliminación de restos de aminoácidos (numeradas del 6 al 39) del dominio Gla de fXa mutante da lugar a una banda de menor peso molecular para la cadena ligera del Antídoto r en comparación con el fXa derivado del plasma. También se puede ver la posición de los marcadores de peso molecular en la transferencia. La Figura 15B y 15C muestra una SDS-PAGE y transferencia Western del antídoto r purificado mediante purificación de intercambio iónico y de afinidad seguida de cromatografía de exclusión por tamaños usando una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, n.º de cat. 17-5174-01).

### 35 **Ejemplo 8. Modelo de ratón *in vivo***

Se ensayó el perfil farmacocinético y farmacodinámico (PK-PD) de betrixabán en ratones macho C57B1/6 con o sin la administración de antídoto. Se realizó la administración oral única de betrixabán a 0, 15, 25 y 75 mg/kg para los grupos de control. Se usaron 15 mg/kg para el grupo tratado con antídoto. Se administró una sola inyección intravenosa (IV) de antídoto (300 µg/200 µl) o vehículo (solución salina normal, 200 µl) 5 minutos antes del punto temporal de 1,5 h..

45 A las 1,5, 2,0 y 4,0 horas de la administración oral de betrixabán, los ratones fueron anestesiados con un cóctel de ketamina (SC) y se desangraron mediante punción cardiaca. Se obtuvieron muestras de sangre (0,5 ml) en 50 µl de citrato trisódico. Se midió el INR de sangre entera usando cartuchos de Hemochron Jr. (International Technidyne Corporation) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se preparó plasma pobre en plaquetas de ratón mediante centrifugación para determinar las concentraciones de betrixabán y antídoto (ELISA) en plasma.

50 Para el experimento con el antídoto recombinante (antídoto r), los ratones recibieron por vía oral betrixabán a 0, 15, 25 y 75 mg/kg para los grupos de control. Se usaron 15 mg/kg para el grupo tratado con antídoto (300 µg/200 µl). Se tomaron muestras a las 1,5 horas de la administración oral de betrixabán (5 min después de la inyección de antídoto).

55 Como se muestra en las Figuras 16 y 17 y las Tablas 1 y 2, una sola inyección (300 µg, IV) de antídoto derivado de plasma (antídoto dp) o fXa mutante recombinante (antídoto r) a ratones tras la administración de betrixabán (15 mg/kg, PO) capturaron eficazmente al inhibidor *in vivo*. La correlación PK-PD de INR de sangre entera y la concentración de antídoto en plasma (Tablas 1 y 2) indicó una reducción de > 50 % de betrixabán funcional basada en las mediciones de INR, y justificó la neutralización eficaz de los inhibidores de fXa por el antídoto a través de múltiples inyecciones u otros regímenes. Se contempla que estos resultados demuestran que los derivados de fXa de la presente invención tienen el potencial de actuar como antídotos universales para invertir el efecto anticoagulante de los inhibidores de fXa en pacientes con hemorragia u otras urgencias médicas.

60

**Tabla 1 - Correlación PK-PD en los ratones tratados con antídoto dp a las 1,5 horas de la administración oral de betrixabán a 15 mg/kg (5 min después de la inyección del antídoto)**

Animal tratado con antídoto dp	1	2	3	4	5	6	7	Media
betrixabán (ng/ml)	673	793	1.170	415	217	664	879	687
INR esperado	4,2	4,5	5,2	3,3	2,3	4,1	4,7	4,0
INR medido	2,3	2,3	3,3	0,8	0,8	1,5	2,0	1,9
% de corrección	63,9	66,6	52,3	100	100	83,1	74,4	77,2

**Tabla 2- correlación PK-PD en ratones tratados con Antídoto r a las 1,5 horas de la administración oral de betrixabán a 15 mg/kg (5 min después de la inyección del antídoto)**

Animal tratado con Antídoto r	1	2	3	4	Mean
betrixabán (ng/ml)	434	262	335	494	381
INR esperado	3,2	2,5	2,8	3,5	3,0
INR medido	2,0	0,9	1,2	0,9	1,3
% de corrección	50,0	94,1	80,0	93,6	77,3

La Figura 22 muestra el experimento con ratones con una sola inyección IV (1 inyección) o dos inyecciones (2 inyecciones) del antídoto r (n = 5 por grupo, 312 ug/200 ul de antídoto r) tras la administración oral de betrixabán (15 mg /kg). Para el grupo de una sola inyección, se tomaron muestras de sangre de ratón a la 1 h de la administración oral de betrixabán. Se administró vehículo (control\_1) o antídoto r (1 inyección) 5 min antes del punto de tiempo de 1 h. Para el grupo de doble inyección, se inyectó vehículo o antídoto r a los 55 min y se repitió a los 115 min de la administración oral de betrixabán. Se tomaron muestras de sangre a las 2 h de los ratones tratados con vehículo (control\_2) y con antídoto r (2 inyecciones). En la Figura 22B, se muestra el INR medido en función de la proporción de antídoto/betrixabán en el plasma de ratón tras una o dos inyecciones del antídoto.

#### Ejemplo 9. Inversión *in vitro* de rivaroxabán y apixabán mediante el antídoto

Como era de esperar, los antídotos contemplados por la presente invención también fueron capaces de unirse y neutralizar otros inhibidores de fXa dirigidos al sitio activo. Las Tablas 3 y 4 muestran la corrección *in vitro* de la inhibición mediante betrixabán, rivaroxabán y apixabán por parte del Antídoto dp y el Antídoto r. Se incubaron fXa purificado (3,0 nM), inhibidor (7,5 nM) y diferentes concentraciones de antídoto durante 10 min a 22 °C en un tampón con Tris 20 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,1 %, pH 7,4. Se ensayó la actividad de fXa similar al Ejemplo 4.

**Tabla 3- % de corrección de la inhibición por los inhibidores de fXa**

Antídoto dp (nM)	betrixabán	rivaroxabán	apixabán
0	0	0	0
10,2	13,1	10,6	6,5
20,4	34,8	37,4	11,4
40,7	47,1	46,8	15,0
61,1	68,4	55,7	40,3
101,8	67,5	69,4	52,3
162,9	80,5	74,0	56,0
203,7	82,6	72,6	60,2

**Tabla 4-% de corrección de la inhibición por los inhibidores de fXa**

Antídoto dp (nM)	betrixabán	rivaroxabán	apixabán
0	0	0	0
9,3	21,5	23,2	13,3

Antídoto dp (nM)	betrixabán	rivaroxabán	apixabán
18,6	52,7	54,2	33,5
37,2	75,5	72,6	49,9
55,8	86,5	79,9	59,2
93,1	94,9	89,1	64,4
148,9	99,3	96,7	74,8
186,1	99,5	94,8	72,6

Como se muestra en la Tabla 3, el antídoto dp 204 nM produce al menos un 60 % de corrección de los efectos inhibidores de los inhibidores ensayados, mientras que, en la Tabla 4, se alcanzó una corrección de la inhibición >95 % mediante el Antídoto r (186 nM) para el betrixabán y el rivaroxabán y inversión > 70 % para el apixabán.

5

#### Ejemplo 10. Inversión *in vitro* de betrixabán por el Antídoto r

En la Tabla 5, se ensayó el efecto de la proteína antídoto recombinante sobre la inversión de anticoagulación por el betrixabán en un ensayo de coagulación de plasma humano. Se midió el efecto de betrixabán 300 nM y 400 nM en la prolongación del aPTT del plasma y la inversión del efecto inhibitor mediante un contador de tiempo de coagulación automático MLA Electra 800. Se mezclaron 100  $\mu$ l de plasma humano anticoagulado con citrato agrupado con betrixabán 300 nM o 400 nM y diferentes concentraciones de antídoto. Se añadieron reactivo aPTT (Actina FS, Dade Behring) y  $\text{CaCl}_2$  de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10

15

**Tabla 5-Inversión por el Antídoto r de la actividad anticoagulante de betrixabán**

	aPTT (s)	Veces de cambio	% de corrección de la anticoagulación
Plasma humano de control	35,2	1,00	-
betrixabán 300 nM	61,8	1,76	-
betrixabán 300 nM + Antídoto r 570 nM	38,3	1,09	88
betrixabán 300 nM + Antídoto r 760 nM	38,2	1,09	88
betrixabán 300 nM + Antídoto r 1.140 nM	38,1	1,08	90
betrixabán 400 nM	66,3	1,88	-
betrixabán 400 nM + Antídoto r 380 nM	47,1	1,34	61
betrixabán 400 nM + Antídoto r 570 nM	39,9	1,13	85
betrixabán 400 nM + Antídoto r 760 nM	39,9	1,13	85
betrixabán 400 nM + Antídoto r 1.140 nM	37,8	1,07	92
betrixabán 400 nM + Antídoto r 1.520 nM	39,4	1,12	86
Antídoto r 1.140 nM	38,9	1,11	-
Antídoto r 1.520 nM	38,8	1,10	-

#### Ejemplo 11. Inversión *in vitro* de heparina de bajo peso molecular ("HBPM") por el Antídoto r

En la Figura 18, se ensayó el efecto del antídoto r para invertir el efecto inhibitor de la enoxaparina HBPM (Sanofi-Aventis) mediante los cambios de turbidez en el plasma humano. Se incubó enoxaparina (0-1,25 U/ml) a 22 °C durante 20 min con o sin antídoto r 508 nM. Se midieron los cambios de turbidez de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 3. El antídoto r 508 nM corrigió esencialmente (> 75 %) el efecto inhibitor de 0,3125-1,25 U/ml de enoxaparina.

20

25

En la Figura 19, se ensayó el efecto del antídoto r en la inversión de la anticoagulación mediante una heparina de bajo peso molecular (enoxaparina HBPM, Sanofi-Aventis) en un ensayo de coagulación de plasma humano. Se midió el efecto de 1 unidad/ml de HBPM anti-Xa sobre la prolongación del aPTT del plasma y la inversión del efecto inhibitor mediante un contador de tiempo de coagulación automático MLA Electra 800. Se mezclaron 100  $\mu$ l de plasma humano anticoagulado con citrato agrupado con enoxaparina y diferentes concentraciones de antídoto. Antes de la medición del tiempo de coagulación, se añadieron el reactivo aPTT (Actina FS, Dade Behring) y  $\text{CaCl}_2$

30

de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La adición de antídoto recombinante 1,14  $\mu\text{M}$  produjo una corrección del 52 % de la anticoagulación producida por 1 unidad/ml de enoxaparina.

#### Ejemplo 12. Inversión *in vitro* de rivaroxabán por el antídoto r

5 En la Figura 20, se ensayó el efecto de la proteína antídoto recombinante sobre la inversión de la anticoagulación mediante inhibidor del factor Xa de molécula pequeña (rivaroxabán, Bay 59-7939) en un ensayo de coagulación de plasma humano. Según lo publicado por Perzborn *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 3: 514-521, 2005; las mediciones del tiempo de protrombina son un método preciso para evaluar el efecto anticoagulante del rivaroxabán. Se midió el efecto de rivaroxabán 1  $\mu\text{M}$  en la prolongación del tiempo de protrombina (PT) del plasma humano agrupado y la inversión de efecto inhibidor mediante un contador de tiempo de coagulación automático MLA Electra 800. Se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de plasma humano anticoagulado con citrato agrupado con rivaroxabán y diferentes concentraciones de antídoto. Antes de la medición del tiempo de coagulación, se añadió el reactivo de tromboplastina C Plus de cerebro de conejo (Dade Behring) a las muestras de plasma de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La adición de antídoto recombinante 1,9  $\mu\text{M}$  produjo una corrección del 100 % de la anticoagulación producida por rivaroxabán 1  $\mu\text{M}$ .

#### Ejemplo 13. Inversión *in vitro* de apixabán por el antídoto r

20 En la Tabla 6, se ensayó el efecto de la proteína antídoto recombinante sobre la inversión de la anticoagulación por apixabán en un ensayo de coagulación de plasma humano. Según lo publicado por Pinto *et al.*, *J. Med. Chem.* 55(22):5339-5356, 2007; las mediciones del tiempo de protrombina (PT) son un método preciso de la evaluación de los efectos anticoagulantes *ex vivo* del apixabán. Se midió el efecto de apixabán 1  $\mu\text{M}$  y 1,5  $\mu\text{M}$  en la prolongación del tiempo de protrombina (PT) de plasma humano agrupado y la inversión del efecto del inhibidor mediante un contador del tiempo de coagulación automático MLA Electra 800. Se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de plasma humano anticoagulado con citrato agrupado con apixabán y diferentes concentraciones de antídoto. Antes de la medición del tiempo de coagulación, se añadió el reactivo de tromboplastina C Plus de cerebro de conejo (Dade Behring) a las muestras de plasma de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La adición de antídoto recombinante 1,9  $\mu\text{M}$  produjo una corrección del 97 % de la anticoagulación producida por apixabán 1,5  $\mu\text{M}$ .

30 **Tabla 6-Inversión por el antídoto r de la actividad anticoagulante de apixabán**

	PT (s)	Veces de cambio
Plasma humano de control	14,1	-
apixabán 1 $\mu\text{M}$	16,4	1,16
apixabán 1 $\mu\text{M}$ + Antídoto r 380 nM	15,3	1,09
apixabán 1 $\mu\text{M}$ + Antídoto r 760 nM	14,9	1,06
apixabán 1 $\mu\text{M}$ + Antídoto r 1,14 $\mu\text{M}$	14,2	1,01
apixabán 1 $\mu\text{M}$ + Antídoto r 1,52 $\mu\text{M}$	14,2	1,01
apixabán 1,5 $\mu\text{M}$	18,4	1,31
apixabán 1,5 $\mu\text{M}$ + Antídoto r 1,52 $\mu\text{M}$	14,6	1,04
apixabán 1,5 $\mu\text{M}$ + Antídoto r 1,90 $\mu\text{M}$	14,3	1,01
Antídoto r 1,52 $\mu\text{M}$	14	-
Antídoto r 1,90 $\mu\text{M}$	14,2	-

#### Ejemplo 14. Inhibición *in vitro* de Argatrobano mediante fXa anhidro sin Gla

35 Para medir la inhibición de la actividad de la trombina mediante el Argatrobano y la inversión de su efecto inhibidor, se añadieron trombina humana purificada (5 nM), argatrobano (50 nM) y diferentes concentraciones de antídoto fXa anhidro fXa sin Gla a un tampón que contenía Tris 20 mM, NaCl 0,15 M, cloruro de calcio 5 mM, albúmina de suero bovino al 0,1 %, pH 7,4. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 20 min, se añadió un sustrato amidolítico S2288 (200  $\mu\text{M}$ ) a la mezcla y se controló la velocidad de escisión de la *p*-nitroanilida mediante absorbancia a 405 nm. Los resultados se presentan en la Figura 12.

#### Ejemplo 15. Inversión de la actividad de los inhibidores directos de fXa por el Antídoto r

45 Para medir la inhibición de la actividad de fXa por un inhibidor del fXa de molécula pequeña y la inversión de su efecto inhibidor, se añadieron fXa derivado de plasma humano activo purificado (3 nM), diferentes concentraciones

de inhibidor (0, 2,5, 5,0, 7,5 nM) y Antídoto r (0-125 nM) a un tampón que contenía Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Ca<sup>2+</sup> 5 mM y albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1 % en una placa de 96 pocillos. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos, se añadió Spectrozyme-fXa 100 μM (un sustrato cromogénico del factor Xa, American Diagnostica) a la mezcla y se controló la velocidad de escisión del sustrato de manera continua durante 5 minutos a 405 nanómetros (nm) mediante un lector de placas (Molecular Devices). El ensayo se llevó a cabo en un volumen total de 200 μl. Se analizó la velocidad inicial de escisión del sustrato en función de la concentración de inhibidor y antídoto mediante regresión no lineal para estimar la afinidad del antídoto hacia los inhibidores. Se usó el software Dynafit para el análisis de los datos.

La Figura 23 muestra la inversión mediante el Antídoto r del efecto inhibitor sobre la actividad de fXa mediante: rivaroxabán (A), betrixabán (B) y apixabán (C). Los ajustes de curva se extrajeron usando la afinidad estimada del Antídoto r (Kd) y la Ki presentada del fXa de plasma humano para cada inhibidor como se muestra en la Tabla 7. Las constantes de inhibición (Ki) se presentan en las siguientes referencias bibliográficas: rivaroxabán (Perzborn E., Strassburger J., Wilmen A., Pohlmann J., Roehrig S., Schlemmer K. H., Straub A. *J Thromb Haemost.* Marzo de 2005; 3(3):514-21), betrixabán (Sinha U., Edwards S. T., Wong P. W., *et al.* "Antithrombotic activity of PRT54021, a potent oral direct factor Xa inhibitor, can be monitored using a novel prothrombinase inhibition bioassay". *Blood* 2006; 108: Sumario 907) y apixabán (Pinto D. J., Orwat M. J., Koch S., Rossi K. A., Alexander R. S., Smallwood A., Wong P. C., Rendina A. R., Luetzgen J. M., Knabb R. M., He K., Xin B., Wexler R. R., Lam P. Y. *J Med Chem.* Noviembre de 2007, 1;50 (22):5339-56. Epub 3 de octubre de 2007).

Los resultados mostrados en la Figura 23 y la Tabla 7 indican que el Antídoto r puede unirse a estos inhibidores directos de fXa con alta afinidad y que es capaz de invertir de manera dependiente de la dosis sus efectos inhibitorios sobre el fXa humano.

**Tabla 7. Afinidad estimada de antídoto r para los inhibidores de fXa de molécula pequeña**

Inhibidor	Ki, Xa (nM)*	Kd, Antídoto r (nM)
rivaroxabán	0,4	3,3
betrixabán	0,1	0,7
apixabán	0,1	1,1
* Constantes de inhibición publicadas en la literatura		

#### **Ejemplo 16. Inversión de la actividad anticoagulante ex vivo de los inhibidores directos de fXa por el Antídoto r**

El rivaroxabán (Xarelto™, Bay 59-7939) es un inhibidor directo del fXa indicado para la prevención del tromboembolismo venoso en pacientes sometidos a cirugía ortopédica. Según lo informado por Perzborn *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 3:514-521, 2005; las mediciones del tiempo de protrombina (PT) son un método preciso para evaluar el efecto anticoagulante del rivaroxabán. Las dosis clínicamente eficaces de rivaroxabán producen concentraciones máximas en plasma tan altas como de 318 ng/ml (730 nM, Kubitz *et al.*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 61:873-880, 2005). Para imitar el efecto anticoagulante de las concentraciones supratrapéuticas, a niveles que puedan estar implicados en escenarios de hemorragia clínicamente significativos, se ensayó la viabilidad de la inversión de las concentraciones de rivaroxabán que fueron superiores a 730 nM.

Se midió el efecto de rivaroxabán 1 μM sobre la prolongación del tiempo de protrombina (PT) de plasma humano agrupado (preparado según lo informado en Sinha U., Lin P. H., Edwards S. T., Wong P. W., Zhu B., Scarborough R. M., Su T., Jia Z. J., Song Y., Zhang P., Clizbe L., Park G., Reed A., Hollenbach S. J., Malinowski J., Arfsten A. *E.Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 de junio de 2003; 23(6):1098-104. Epub 15 de mayo de 2003) en un contador de tiempo de coagulación automático MLA Electra 800. Se usó la combinación de plasma anticoagulado con citrato de ocho donantes voluntarios sanos para los experimentos. Para medir el tiempo de coagulación, se añadió reactivo de tromboplastina C Plus de cerebro de conejo (Dade Behring) a muestras de plasma (100 ul) según las instrucciones del fabricante.

Como se muestra en la Figura 24, la PT inicial (14,1 s) se prolongó hasta 23,4 segundos tras la adición de rivaroxabán 1 μM. El efecto anticoagulante del rivaroxabán fue dependiente de la dosis y se invirtió por completo mediante la adición de antídoto r, mientras que la adición de Antídoto r 1,9 μM solo no produjo un efecto notable en el PT (14,2 s).

El apixabán (BMS-562247) es un inhibidor de fXa directo que se está ensayando para la prevención de accidentes tromboembólicos en pacientes con fibrilación auricular y para la prevención del tromboembolismo venoso en pacientes sometidos a cirugía ortopédica (Lassen M. R., Davidson B. L., Gallus A., Pineo G., Ansell J., Deitchman D. *J Thromb Haemost.* Diciembre de 2007; 5(12):2368-75. Epub 15 de septiembre de 2007. Según lo publicado por Luetzgen *et al.*, *Blood* 108 (11) Sumario 4130, 2006, las mediciones de PT son un método preciso para evaluar el

efecto anticoagulante del apixabán.

La Figura 25 muestra la prolongación del PT mediante apixabán y la inversión de sus efectos mediante la adición de Antídoto r.

5

#### **Ejemplo 17. Inversión de la inhibición de los inhibidores de fXa indirectos por el Antídoto r**

Se usó un ensayo de la turbidez para ensayar el efecto de los inhibidores de fXa y el Antídoto r en la prolongación de los tiempos de coagulación. En este formato, se usó una placa de 96 pocillos para medir varias muestras al mismo tiempo. Se preparó plasma pobre en plaquetas humano como en el Ejemplo 2. Se recalcificaron de 75 a 100  $\mu$ l de plasma con  $\text{CaCl}_2$ , se incubaron a 37 °C durante 3 minutos y se inició la formación de coágulos mediante la adición de factor tisular (Innovin, Dade Behring) o un reactivo de tiempo de protombina parcial activado (aPTT, actina FS, Dade Behring). Se controló el cambio de  $\text{DO}_{405}$  de manera continua mediante un lector de placas (Molecular Devices). El tiempo de coagulación se definió como el tiempo (segundos) para alcanzar el valor máximo medio para el cambio de absorbancia ( $\text{DO}_{405\text{nm}}$ ). Se preincubaron el inhibidor del Factor Xa (heparina de bajo peso molecular tal como enoxaparina, Aventis Pharma) y antídoto r, cuando estaba presente, con plasma a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de iniciarse la reacción.

La Figura 26 muestra el cambio del parámetro de coagulación (veces) al añadirse 1 U/ml de heparina de bajo peso molecular (enoxaparina, Lovenox) a plasma pobre en plaquetas humano, seguido de la adición de diferentes cantidades de Antídoto r. Cuando se midió el cambio de turbidez tras la adición de reactivo aPTT, 1 U/ml de enoxaparina produjo una prolongación superior a 5 veces del tiempo de coagulación en comparación con el plasma de control. La dosis prescrita (dosificación subcutánea a 1 mg/kg) de enoxaparina en pacientes con síndrome coronario agudo corresponde a aproximadamente 1 U/ml. Este marcador farmacodinámico (unidad anti-fXa) se ha desarrollado específicamente para las HBPM y se ha correlacionado con la eficacia y la seguridad clínica (Montalescot G., Collet J. P., Tanguy M. L., Ankri A., Payot L., Dumaine R., Choussat R., Beygui F., Gallois V., Thomas D. "Circulation". 27 de julio de 2004; 110(4):392-8. Epub 12 de julio de 2004). Para imitar el efecto anticoagulante que es probable que esté implicado cuando es necesario invertir el estado de anticoagulación del paciente debido a una cirugía de urgencia, se ha ensayado la viabilidad de la inversión de las concentraciones terapéuticas de enoxaparina. Como se muestra en la Figura 26, el Antídoto r invirtió de manera dependiente de la dosis el efecto anticoagulante de la enoxaparina (1 unidad/ml de fXa), alcanzándose la corrección casi completa de aPTT tras la adición de antídoto r 4  $\mu$ M.

#### **Ejemplo 18. Inversión de la anticoagulación inducida por rivaroxabán mediante la administración intravenosa de Antídoto r en ratas**

Se anestesiaron ratas con la administración intraperitoneal de cóctel de ketamina, se aplicó rápidamente un catéter para la administración por la vena yugular de rivaroxabán y antídoto, y se colocó un segundo catéter para el muestreo de la sangre en serie de la vena femoral. La permeabilidad del catéter en el muestreo de sangre se mantuvo mediante la infusión lenta de solución salina normal entre las muestras. Las ratas recibieron rivaroxabán a 0,25 mg/kg/h IV o vehículo (polietilenglicol al 50 % en agua) durante 30 minutos (5,24 ml/kg/h). A los 30 minutos, se suspendió la infusión de rivaroxabán, y se administró Antídoto r a 1,0 o 3,4 mg como en forma de bolo IV (2 ml) durante 5 minutos. Se obtuvieron muestras de sangre en serie anticoaguladas con citrato de sodio al 3,2 % (dilución 1:10) para la medición del INR de sangre entera, las concentraciones de rivaroxabán en plasma y las concentraciones de antídoto a los 0, 30 (antes del final de la infusión de rivaroxabán), 35 (al final de la administración del tratamiento en bolo), 60, 90 y 120 minutos. Se determinaron las mediciones de INR y de PT de sangre entera en un Hemochron Jr usando los cartuchos de PT con citrato. El INR y el PT de sangre entera se usan para el seguimiento de pacientes sometidos a anticoagulación con warfarina, y se presentan como métodos validados para evaluar el alcance de la anticoagulación. Las muestras de plasma se analizaron para la determinar la concentración de rivaroxabán usando de cromatografía de líquidos de alto rendimiento con espectrometría de masas en tándem. La cuantificación se realizó usando una curva de calibración convencional generada a partir del análisis de regresión de mínimos cuadrados ponderados, las concentraciones de Antídoto r se determinaron mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 23. La Figura 27 muestra la inversión sensible a la dosis del efecto de rivaroxabán tras la administración de Antídoto r. Se cuantificó el estado de anticoagulación de las ratas tratadas mediante un ensayo de punto de atención de la coagulación (INR de sangre entera). La diferencia en el INR de sangre entera entre los grupos tratados con rivaroxabán y con Antídoto r fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0,004$  para la dosis de 1 mg y  $p \leq 0,001$  para la dosis de 3,4 mg) mediante la prueba t de Student (no pareada de dos colas).

#### **Ejemplo 19. Medición de la reducción de la concentración en plasma sin unir de rivaroxabán tras la dosis de Antídoto r**

Se anestesiaron ratas con la administración intraperitoneal de cóctel de ketamina, se aplicó rápidamente un catéter para la administración por la vena yugular de rivaroxabán y antídoto, y se colocó un segundo catéter para el muestreo de la sangre en serie de la vena femoral. La permeabilidad del catéter en el muestreo de sangre se mantuvo mediante la infusión lenta de solución salina normal entre las muestras. Las ratas recibieron rivaroxabán a 0,25 mg/kg/h IV o vehículo (polietilenglicol al 50 % en agua) durante 30 minutos (5,24 ml/kg/h). A los 30 minutos, se

suspendió la infusión de rivaroxabán, y se administró Antídoto r a 1,0 o 3,4 mg como en forma de bolo IV (2 ml) durante 5 minutos. Se obtuvieron muestras de sangre en serie anticoaguladas con citrato de sodio al 3,2 % (dilución 1:10) para la medición del INR de sangre entera, las concentraciones de rivaroxabán en plasma (concentraciones totales y sin unión) y las concentraciones de antídoto a los 0, 30 (antes del final de la infusión de rivaroxabán), 35 (al final de la administración del tratamiento en bolo), 60, 90 y 120 minutos. Se determinó la fracción de rivaroxabán no unida a proteínas de plasma de rata y/o a proteína de antídoto r mediante un método de ultrafiltración usando dispositivos Microcon. Las muestras de plasma se analizaron para determinar la concentración de rivaroxabán mediante cromatografía líquida de alta resolución con la espectrometría de masas en tándem. La cuantificación se realizó usando una curva de calibración convencional generada a partir de análisis de regresión de mínimos cuadrados ponderados. Los resultados se muestran en la Figura 28.

#### **Ejemplo 20. Inversión sostenida de la actividad de rivaroxabán tras la dosificación de Antídoto r en ratas**

Se anestesiaron las ratas y se cateterizaron como se describe en el Ejemplo 18. Las ratas recibieron rivaroxabán o vehículo a 0,25 mg/kg/h mediante administración intravenosa (vehículo = polietilenglicol al 50 % en agua a razón de 5,24 ml/kg/h). A los 30 minutos, se suspendió la infusión de rivaroxabán, y se administró Antídoto r a 4 mg como un bolo IV durante 5 minutos, seguido de una infusión de mantenimiento de 4 mg/h durante el resto del estudio (otros 55 minutos más). Se obtuvieron muestras de sangre en serie anticoagulada con citrato de sodio al 3,2 % (dilución 1:10) para la medición del INR de sangre entera, las concentraciones en plasma de rivaroxabán (concentraciones en plasma total y sin unión) y de Antídoto r a los 0, 30 (antes del final de la infusión de rivaroxabán), 35 (al final de la administración del tratamiento en bolo), 60, 90 y 120 minutos. Se determinó el INR/PT de sangre entera como se describe en el Ejemplo 18. Se determinaron las concentraciones Antídoto r mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 23. Se analizaron las muestras de plasma para determinar la concentración de rivaroxabán usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento y espectrometría de masas en tándem. La cuantificación se realizó usando una curva de calibración convencional generada a partir de análisis de regresión de mínimos cuadrados ponderados. La fracción de rivaroxabán no unida a las proteínas plasmáticas de rata y/o a la proteína antídoto r se determinó mediante un método de ultrafiltración usando dispositivos Microcon.

Las Figura 29 A y B muestran la inversión sostenida de la anticoagulación inducida por rivaroxabán mediante administración IV del Antídoto r en ratas medida mediante la proporción entre el INR y del PT en sangre entera. La diferencia en el INR de sangre entera (panel A) entre los grupos tratados con vehículo y con Antídoto r fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ) mediante la prueba t de Student (no pareada de dos colas) a los 35 y 60 minutos. La diferencia en la proporción de PT (panel B) entre los grupos tratados con vehículo y con Antídoto r fue estadísticamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) mediante la prueba t de Student (no pareada de dos colas) a los 35 y 60 minutos. Al igual que en el Ejemplo 19, la concentración libre (sin unión) de rivaroxabán se redujo en gran medida tras la dosificación del Antídoto r.

#### **Ejemplo 21. Inversión de la actividad de la heparina de BPM enoxaparina por el Antídoto r**

Se anestesiaron ratas con la administración intraperitoneal de cóctel de ketamina, se aplicó rápidamente un catéter para la administración (por la vena yugular) de enoxaparina, y se colocó un segundo catéter (vena femoral) para el muestreo de la sangre en serie. La permeabilidad del catéter en el muestreo de sangre se mantuvo mediante la infusión lenta de solución salina normal entre las muestras. Las ratas recibieron enoxaparina (Aventis Pharma, 100 mg/ml) diluida en solución salina normal a 6, 3 o 1 mg/kg como una inyección IV en bolo (1 ml). Se obtuvieron muestras de sangre en serie anticoagulada con citrato de sodio al 3,2 % (dilución 1:10) para la medición del INR de sangre entera a los 0, 2, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos de la inyección de enoxaparina. Las mediciones de INR se determinaron usando el dispositivo de ensayo de punto de atención de Hemochron Jr.

Como se muestra en la Figura 30, las tres dosis ensayadas (1, 3 y 6 mg/kg de enoxaparina) produjeron prolongaciones proporcionales a la dosis en el INR de sangre entera. La evaluación de las unidades anti-fXa (medidas mediante el ensayo de heparina de BPM Coatest) en plasma de rata mostró que la anticoagulación máxima correspondía a 4 U/ml de anti-fXa para la dosis de 3 mg/kg y 1 U/ml de anti-fXa para la dosis de 1 mg/kg. Como se describe en el Ejemplo 17, U/ml de anti-fXa = 1 corresponde a los niveles terapéuticos humanos de anticoagulación.

No hay agentes de inversión específicos disponibles para las heparinas de bajo peso molecular. Por lo tanto, el sulfato de protamina, un agente desarrollado para la inversión de la actividad de la heparina no fraccionada durante procedimientos tales como la cirugía de injerto de derivación de la arteria coronaria, se usa con este fin. Para la enoxaparina, la información de prescripción describe que se puede obtener la neutralización de hasta el 60 % de la actividad mediante infusión intravenosa lenta de sulfato de protamina. Sin embargo, dada la prolongación incompleta de la inversión, junto con la posibilidad de efectos secundarios hemodinámicos y anafilácticos (Weiss y Adkinson, *Clin Rev Allergy*, 1991; 9: 339), este modo de inversión rara vez se usa como primer modo de acción en pacientes tratados con enoxaparina.

Para ensayar la capacidad del Antídoto r para invertir la anticoagulación inducida por la enoxaparina y para comparar los resultados con la inversión de la protamina, se ensayaron los agentes en el siguiente régimen: las

ratas recibieron enoxaparina diluida en solución salina normal a 3,0 mg/kg o vehículo (solución salina normal) como una inyección en bolo intravenoso (1 ml) a  $t = 0$ . A los 10 minutos de la inyección de enoxaparina, se administró vehículo, antídoto (5 mg) o sulfato de protamina (0,9 mg, Sigma) por vía intravenosa como una inyección en bolo de 5 minutos. A esto le siguió una infusión de mantenimiento durante el resto del estudio (45 minutos más, 5 mg/h para el Antídoto r y solución salina normal para la protamina). Se obtuvieron muestras en serie de sangre anticoagulada con citrato de sodio al 3,2 % (dilución 1:10) para la medición de las concentraciones en plasma de aPTT y de antídoto a los 0, 5, 15 (final de la administración del tratamiento en bolo), 30 y 60 minutos. Se determinaron las mediciones de aPTT en plasma usando un contador de tiempo de coagulación automático MLA Electra 800. Se dispensaron de manera automática cloruro de calcio y el reactivo Actina FS PTT (Dade Behring) a muestras de plasma (100 ul) según las instrucciones del fabricante.

La Figura 31 muestra la inversión sostenida de la anticoagulación inducida por la enoxaparina tras la administración del Antídoto r, así como protamina. La diferencia en aPTT entre los grupos tratados con vehículo y Antídoto r o protamina fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0,04$ ) mediante la prueba t de Student (no pareada de dos colas) a los 15, 30 y 60 minutos. No hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,27$ ) entre la corrección de aPTT por el grupo de Antídoto r o de protamina. Por lo tanto, en esta serie de estudios en ratas, el Antídoto r podría coincidir con la capacidad de inversión de la anticoagulación del antídoto disponible actualmente para la heparina de bajo peso molecular (sulfato de protamina).

#### 20 **Ejemplo 22. Inversión sostenida de la anticoagulación inducida por el betrixabán mediante la administración IV de Antídoto r medida mediante el INR de sangre entera**

Se anestesiaron las ratas y se cateterizaron como se describe en el Ejemplo 18. Las ratas recibieron betrixabán a 1,0 mg/kg/h IV o vehículo (polietilenglicol al 50 % en agua) durante 30 minutos (4,0 ml/kg/h). A los 30 minutos, se suspendió la infusión de betrixabán, y se administró Antídoto r a 5 mg como un bolo IV durante 5 minutos, seguido de una infusión de mantenimiento de 5 mg/h durante el resto del estudio (otros 55 minutos más). Se obtuvieron muestras de sangre en serie anticoagulada con citrato de sodio al 3,2 % (dilución 1:10) para la medición del INR de sangre entera, las concentraciones en plasma de betrixabán y de Antídoto r a los 0, 30 (antes del final de la infusión de betrixabán), 35 (al final de la administración del tratamiento en bolo), 60 y 90 minutos. Se determinaron las mediciones de INR de sangre entera en un dispositivo Hemochron Jr usando cartuchos de PT citrada. Se analizaron las muestras de plasma para determinar la concentración de betrixabán usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento con espectrometría de masas en tándem. La cuantificación se realizó usando una curva de calibración convencional generada a partir de análisis de regresión de mínimos cuadrados ponderados. Las concentraciones de Antídoto r se determinaron mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 23.

La Figura 32 muestra el grado de inversión de la actividad de betrixabán tras la dosis del antídoto r. La diferencia en el INR de sangre entera entre los grupos tratados con vehículo y Antídoto r fue estadísticamente significativa a los 60 minutos ( $p \leq 0,05$ ) y a los 35 y 90 minutos ( $p \leq 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student (no pareada de dos colas). La Tabla 8 muestra la proporción del Antídoto r con respecto al betrixabán que se requiere para esta corrección sostenida de la anticoagulación en ratas. Se requirió una proporción del doble de Antídoto r con respecto a betrixabán para la inversión sostenida de la anticoagulación en ratas.

**Tabla 8. Proporción del Antídoto r con respecto al betrixabán que se requiere para la corrección sostenida en ratas**

Punto temporal	30'	35'	60'	90'
Betrixabán solo (uM)	0,169	0,062	0,045	0,048
Betrixabán + Antídoto (uM)	0,154	1,571	1,879	1,190
Concentración de antídoto (uM)	0,0	5,5	3,5	2,5
Antídoto/betrixabán (proporción molar)	0,0	3,5	1,9	2,1

#### 45 **Ejemplo 23. Farmacocinética del Antídoto r en rata**

Se administró un mg de antídoto en forma de infusión intravenosa corta durante cinco minutos a cuatro ratas Sprague-Dawley. Se recogieron muestras de plasma en serie y se analizaron para determinar la concentración de antídoto usando un ensayo de inmunosorción ligado a la enzima (ELISA, Enzyme Research Laboratory, n.º de cat. FX-EIA). Se describieron los perfiles de concentración en plasma-tiempo del antídoto mediante un modelo de dos compartimentos. El aclaramiento sistémico del antídoto fue bajo (1,65 ml/min/kg) y el volumen de distribución fue escaso (0,27 l/kg). La semivida de distribución fue de 19 minutos, seguida de una semivida terminal mucho más larga de 10 horas. Si se ha de conseguir una inversión inmediata y casi completa de la anticoagulación en un paciente, basándose en los experimentos con ratas (Ejemplos 18, 19, 20 y 22), se espera dirigir la proporción de la concentración de Antídoto r con respecto a la concentración de inhibidor de fXa en circulación en torno a 2. Por lo tanto, para mantener inmediatamente la concentración en plasma de antídoto por encima de la de un inhibidor de

fXa, se espera que la semivida de distribución tenga un impacto mucho mayor que la semivida terminal en la selección de la dosis para seres humanos durante un tratamiento por sobredosis.

La Figura 33 muestra el perfil de concentración en plasma-tiempo del Antídoto r en ratas Sprague-Dawley.

#### **Ejemplo 24. Farmacocinética del Antídoto r en macaco Rhesus**

Se administraron a cada uno de dos animales antídoto a 10 mg mediante dosis intravenosa durante un período de diez minutos. Se llevó a cabo el análisis de las muestras de plasma anticoagulado con citrato para la determinación de  $T_{1/2}$  de una manera similar a la del estudio en ratas (Ejemplo 23), excepto para el tratamiento previo de las muestras de plasma con absorción de citrato de bario para eliminar el fX endógeno de mono. La semivida en plasma de eliminación ( $T_{1/2}$ ) fue de aproximadamente 30 minutos (Figura 34, concentración media en plasma de antídoto).

Para eliminar el fX endógeno del plasma de mono para reducir la interferencia con la medición de ELISA, se mezcló la muestra de plasma de mono (50 ul) con citrato de sodio al 3,2 % (5 ul), seguido de la adición de  $BaCl_2$  1 M (5 ul). Se mantuvo la mezcla en hielo durante 60 min y se clarificó mediante centrifugación con un microcentrifugador a 13.000 rpm durante 15 min. Se mezcló el sobrenadante (30 ul) con 20 ul de tampón TBS/EDTA (Tris 20 mM/NaCl 150 mM/EDTA 50 mM, pH 7,4). Esto resultó en 50 ul de mezcla final con una dilución a 1:2 de la muestra de plasma de partida. A continuación, se determinó la concentración de Antídoto mediante el mismo procedimiento de ELISA que para el plasma de rata (Ejemplo 23).

La Figura 34 muestra el perfil de concentración en plasma-tiempo del Antídoto r en macacos Rhesus.

#### **Ejemplo 25. Modelización de la dosis humana proyectada para la inversión mediante el Antídoto r de los inhibidores de fXa**

Para predecir las dosis terapéuticas humanas de Antídoto r, se llevó a cabo una serie de simulaciones usando el programa de software WinNonlin, versión 5.2. Los supuestos relacionados con la simulación fueron los siguientes:

1. La semivida proyectada de circulación de Antídoto r (1 a 3 horas) se basó en la farmacocinética en ratas Sprague-Dawley (volumen de distribución,  $V_c = 13$  ml en ratas, 3.033 ml en seres humanos mediante la escala alométrica) (Ejemplo 23).
2. La concentración en plasma de rivaroxabán tras una dosis de 20 mg se extrapoló de los informes de la literatura (dosis de 30 mg en voluntarios sanos de edad avanzada, Kubitz D., Becka M., Roth A., Mueck W. *Curr Med Res Opin.* Octubre de 2008; 24(10):2757-65. Epub 19 de agosto de 2008). Para simular el exceso de anticoagulación en pacientes tratados con rivaroxabán, una concentración del doble fue objeto de inversión mediante el Antídoto r.
3. La concentración en plasma de betrixabán tras dosis de 40 mg y 80 mg se extrapoló del documento WO 2008/073670 y Turpie *et al.*, *Thromb Haemost.* Enero de 2009; 101(1):68-76. Para simular la anticoagulación excesiva en los pacientes tratados betrixabán, una concentración cinco veces superior fue objeto de inversión mediante el Antídoto r.
4. El Antídoto r se administró a concentración máxima en plasma ( $C_{m\acute{a}x}$ ) de rivaroxabán o betrixabán.
5. Los niveles de Antídoto r se mantuvieron a una concentración molar 1-2 veces superior a la de un inhibidor de fXa durante un corto período de tiempo (1 hora) o durante períodos prolongados (6 horas). Esto era para garantizar la inversión casi completa de la actividad anticoagulante del inhibidor de fXa.
6. La farmacocinética del Antídoto r se siguió en un modelo abierto de un compartimiento.

Las Figuras 35A y 35B muestran el perfil de evolución en el tiempo simulada de la neutralización de la actividad de rivaroxabán mediante la administración de Antídoto r. En la Fig. 35A, se invierte una dosis de 20 mg de rivaroxabán mediante una dosis de 400 mg de Antídoto r (dosis en bolo), a la vez que se supone una  $T_{1/2}$  de 3 horas para el Antídoto r. En la Fig. 35B, se invierte una dosis de 20 mg de rivaroxabán usando una dosis de 900 mg de Antídoto r (bolo más infusión de 6 horas) y se supone una  $T_{1/2}$  de 1 hora para el Antídoto r.

Las Tablas 9-12 muestran las proyecciones de dosis basándose en las predicciones mencionadas anteriormente.

**Tabla 9. Proyección de dosis de Antídoto r necesarias para la inversión de la anticoagulación con rivaroxabán (10 mg)**

Aumento de la conc. de rivaroxabán	Tiempo de cobertura	Conc. de Antídoto r por encima del inhibidor	T <sub>1/2</sub> del antídoto (h)	Dosis de antídoto (mg)	Dosis total (mg)
x1	1 h	x1	1	bolo IV	60
x1	1 h	x1	3	bolo IV	40
x1	1 h	x2	1	bolo IV	120
x1	1 h	x2	3	bolo IV	80
x2	1 h	x1	1	bolo IV	120
x2	1 h	x1	3	bolo IV	80
x2	1 h	x2	1	bolo IV	240
x2	1 h	x2	3	bolo IV	160
x1	6 h	x1	1	Bolo + Infusión	50 + 62,5
				o bolo IV	800
x1	6 h	x1	3	bolo IV	50
x1	6 h	x2	1	Bolo + Infusión	100 + 125
				o bolo IV	1.600
x1	6 h	x2	3	bolo IV	100
x2	6 h	x1	1	Bolo + Infusión	100 + 125
				o bolo IV	1.600
x2	6 h	x1	3	bolo IV	100
x2	6 h	x2	1	Bolo + Infusión	200 + 250
				o bolo IV	3.200
x2	6 h	x2	3	bolo IV	200

**Tabla 10. Proyección de dosis de Antídoto r necesarias para la inversión de la anticoagulación con betrixabán (80 mg al día)**

Aumento de la conc. de rivaroxabán	Tiempo de cobertura	Conc. de Antídoto r por encima del inhibidor	T <sub>1/2</sub> del antídoto (h)	Dosis de antídoto (mg)	Dosis total (mg)
x1	1 h	x1	1	bolo IV	20
x1	1 h	x1	3	bolo IV	13
x1	1 h	x2	1	bolo IV	40
x1	1 h	x2	3	bolo IV	26
x5	1 h	x1	1	bolo IV	103
x5	1 h	x1	3	bolo IV	66,5
x5	1 h	x2	1	bolo IV	206
x5	1 h	x2	3	bolo IV	133
x1	6 h	x1	1	Bolo + Infusión	40+50
				o bolo IV	190
x1	6 h	x1	3	bolo IV	40
x1	6 h	x2	1	Bolo + Infusión	80 + 100
				o bolo IV	380
x1	6 h	x2	3	bolo IV	80
x5	6 h	x1	1	Bolo + Infusión	200 +250
				o bolo IV	950

5

Aumento de la conc. de rivaroxabán	Tiempo de cobertura	Conc. de encima del inhibidor	Antídoto r por	T <sub>1/2</sub> del antídoto (h)	Dosis de antídoto (mg)	Dosis total (mg)
x5	6 h	x1		3	bolo IV 200	200
x5	6 h	x2		1	Bolo + Infusión 400 + 500	900
					o bolo IV 1.900	1.900
x5	6 h	x2		3	bolo IV 400	400

**Tabla 11. Proyección de dosis de Antídoto r necesarias para la inversión de la anticoagulación con rivaroxabán (20 mg)**

Dosis de rivaroxabán	Aumento de la conc. de rivaroxabán	Tiempo de cobertura	Conc. de Antídoto por encima del inhibidor	T <sub>1/2</sub> del antídoto (h)	Dosis de antídoto	Dosis total (mg)
20 mg	x1	1 h	x1	1	bolo IV 120 mg	120
	x1	1 h	x1	3	bolo IV 80 mg	80
	x1	1 h	x2	1	bolo IV 240 mg	240
	x1	1 h	x2	3	bolo IV 160 mg	160
	x2	1 h	x1	1	bolo IV 240 mg	240
	x2	1 h	x1	3	bolo IV 160 mg	160
	x2	1 h	x2	1	bolo IV 480 mg	480
	x2	1 h	x2	3	bolo IV 320 mg	320
	x1	6 h	x1	1	Bolo + Infusión 100 + 125 mg	225
					o bolo IV 1.600 mg	1.600
	x1	6 h	x1	3	bolo IV 100 mg	100
	x1	6 h	x2	1	Bolo + Infusión 200 + 250 mg	450
	x1	6 h	x2	3	bolo IV 200 mg	200
	x2	6 h	x1	1	Bolo + Infusión 200 + 250 mg	450
	x2	6 h	x1	3	bolo IV 100 mg	100
	x2	6 h	x2	1	Bolo + Infusión 400 + 500 mg	900
	x2	6 h	x2	3	bolo IV 200 mg	200

5 **Tabla 12. Proyección de dosis de Antídoto r necesarias para la inversión de la anticoagulación con betrixabán (40 mg al día)**

Dosis de betrixabán	Aumento de la conc. de betrixabán	Tiempo de cobertura	Conc. de Antídoto por encima del inhibidor	T <sub>1/2</sub> del antídoto (h)	Dosis de antídoto	Dosis total (mg)
40 mg al día	x1	1 h	x1	1	bolo IV 20 mg	20
	x1	1 h	x1	3	bolo IV 13 mg	13
	x1	1 h	x2	1	bolo IV 40 mg	40
	x1	1 h	x2	3	bolo IV 26 mg	26
	x5	1 h	x1	1	bolo IV 103 mg	103
	x5	1 h	x1	3	bolo IV 66.5 mg	66.5
	x5	1 h	x2	1	bolo IV 206 mg	206
	x5	1 h	x2	3	bolo IV 133 mg	133
	x1	6 h	x1	1	Bolo + 40+50 mg	90

Dosis de betrixabán	Aumento de la conc. de betrixabán	Tiempo de cobertura	Conc. de Antídoto por encima del inhibidor	T <sub>1/2</sub> del antídoto (h)	Dosis de antídoto			Dosis total (mg)
					Infusión			
					o	190	mg	190
					Bolo IV			
	x1	6 h	x1	3	bolo IV	40	mg	40
	x1	6 h	x2	1	Bolo +	80 +	mg	180
					Infusión	100		
					o bolo IV	380	mg	380
	x1	6 h	x2	3	bolo IV	80	mg	80
	x5	6 h	x1	1	Bolo +	200	mg	450
					Infusión	+250		
					o bolo IV	950	mg	950
	x5	6 h	x1	3	bolo IV	200	mg	200
	x5	6 h	x2	1	Bolo +	400 +	mg	900
					Infusión	500		
					o bolo IV	1900	mg	1900
	x5	6 h	x2	3	bolo IV	400	mg	400

**Ejemplo 26. Modelización de la proyección de dosis para seres humanos para la inversión mediante el Antídoto r de heparinas de bajo peso molecular**

5 Para predecir las dosis terapéuticas humanas de Antídoto r, se llevó a cabo una serie de simulaciones usando los siguientes supuestos:

10 1. De acuerdo con la información de la prescripción de la enoxaparina, la actividad de anti-fXa máxima en pacientes con angina inestable tratados con 1 mg/kg de enoxaparina mediante administración subcutánea se corresponde con 1,1 U/ml. Para imitar los niveles de anticoagulación supratrapéuticos, un intervalo de unidades anti-fXa en circulación de 2-4 u/ml fue objeto de la inversión.

15 2. La biodisponibilidad absoluta media de la enoxaparina mediante administración subcutánea es del 92 % en voluntarios humanos sanos. Por lo tanto, los resultados de los estudios de dosificación intravenosa en rata se supusieron equivalentes a los obtenidos mediante la administración subcutánea.

20 3. La proyección de dosis para los seres humanos para invertir el efecto anticoagulante de las heparinas de bajo peso molecular se calculó a partir de la dosis eficaz en la rata y se extrapoló a los seres humanos mediante la corrección de la diferencia en el volumen de sangre entre las especies (B. Davies y T Morris, *Pharm Res*, 10 (7), 1993, pág. 1093-1095).

25 4. Las mediciones de las unidades anti-fXa para las heparinas de bajo peso molecular en el plasma de rata se consideran equivalentes a las medidas en el plasma humano.

5. Fue necesaria la inversión completa del marcador farmacodinámico (unidades de aPTT o anti-fXa) para la neutralización de la actividad del inhibidor de fXa y el restablecimiento de la capacidad hemostática (es decir, la inversión completa de la anticoagulación).

30 Los resultados de la simulación mostraron que:

A) La dosis total de Antídoto r para la inversión de la actividad de los niveles terapéuticos de enoxaparina fue de entre 500 mg y 1 g.

35 B) La dosis total de Antídoto r para la inversión de la actividad de los niveles supratrapéuticos de enoxaparina fue de entre 500 mg y 2 g.

Las Figuras 36A y 36B muestran el perfil de evolución en el tiempo simulada de la neutralización de la actividad del betrixabán por el Antídoto r. En la Fig. 36A, se invierte una dosis de 80 mg de betrixabán mediante una dosis de

400 mg de Antídoto r (dosis en bolo), suponiendo una  $T_{1/2}$  de 3 horas para la Antídoto r. En la Fig.36B, se invierte una dosis de 80 mg de betrixabán usando una dosis de 900 mg de Antídoto r (bolo más infusión de 6 horas), suponiendo una  $T_{1/2}$  de 1 hora para el Antídoto r.

#### 5 **Ejemplo 27. Inversión del rivaroxabán en macaco Rhesus mediante el Antídoto r**

En la Figura 37, se proporciona el efecto del Antídoto r sobre la inversión de la anticoagulación por el rivaroxabán basándose en los ensayos realizados en el plasma anticoagulado con citrato de cuatro macacos Rhesus. Los tiempos de protrombina se midieron como en el Ejemplo 12. La adición del rivaroxabán (250 nM o 1  $\mu$ M) produjo una prolongación sensible a la dosis de los tiempos de protrombina (PT) durante los tiempos de coagulación basales de cada macaco. La adición de rivaroxabán 250 nM produjo una prolongación de  $32,3 \pm 6,1$  s (media  $\pm$  desviación típica) de un valor basal de  $17,5 \pm 1,6$  s. La adición del Antídoto r a la muestra de plasma tratada con rivaroxabán invirtió el efecto anticoagulante con 244 nM corrigiendo el PT a  $25 \pm 7$  s y 488 nM corrigiendo el PT a  $19,9 \pm 1,9$  s. La adición de Antídoto r solo al plasma basal no cambió el PT (17,7 s).

#### 15 **Ejemplo 28. Inversión de la pérdida de sangre debida a la enoxaparina y al fondaparinux en rata mediante el Antídoto r**

Se ensayó el efecto del Antídoto r en la inversión de la pérdida de sangre debida a la anticoagulación de la enoxaparina en ratas Sprague-Dawley. En concreto, se empleó el modelo de pérdidas de sangre por transacción de la cola de rata para restablecer la hemostasia. La enoxaparina se administró por vía intravenosa en bolo IV (4,5 mg/kg). El Antídoto r se administró en dos dosis: 1) un bolo de 2 miligramos y luego se infundió a una velocidad de 2 mg/hora durante un total de 15 minutos; y 2) un bolo de 4 miligramos y luego se infundió a una velocidad de 4 mg/hora durante un total de 15 minutos. También se ensayó la inversión de la pérdida de sangre usando el vehículo. Inmediatamente después de completarse la inyección en bolo del Antídoto r y de iniciarse la infusión, se seccionó la punta de la cola de la rata con una hoja de bisturí y se colocó en un vial que contenía solución salina fisiológica a 37 °C. Se dejó que sangrara la cola durante 15 minutos. Se determinó el volumen de sangre resultante mediante la lisis de los glóbulos rojos, midiendo la concentración de hemoglobina mediante espectrofotometría y estimando el volumen de sangre mediante la comparación con una curva patrón. La reducción de la pérdida de sangre se correlacionó con ambas concentraciones de Antídoto r en plasma ( $r^2 = 0,80$ ) y una reducción de las unidades anti-fXa ( $r^2 = 0,89$ ). Los resultados se proporcionan en la Figura 38 (AD se refiere al Antídoto r).

En el mismo modelo, el Antídoto r corrigió por completo el aumento de la pérdida de sangre debida a la administración de fondaparinux (25 mg/kg). La protamina (proporcionada como un bolo IV de 0,9 mg) no logró mostrar la actividad correctora. El Antídoto r se proporcionó en forma de bolo de 6 mg y luego otro a 6 g/h durante 15 min en forma de infusión. Los resultados se proporcionan en la Figura 39.

Como puede verse en la Figura 38 y la Figura 39, estos resultados demuestran que, además de neutralizar los inhibidores directos del fXa, el Antídoto r también es capaz de neutralizar los inhibidores indirectos del fXa y tiene el potencial para restablecer la hemostasia mediante la inversión de la anticoagulación medicada por ambas clases de fármacos.

En el mismo modelo, la pérdida de sangre debida a la enoxaparina (dosificada en forma de bolo IV de 4,5 mg/kg) se redujo hasta el 42 % mediante la administración de Antídoto r en bolo de 2 mg, seguida de una infusión de 2 mg/h, y se invirtió por completo mediante la administración del Antídoto r en bolo de 4 mg, seguida de una infusión de 4 mg/h. Estos resultados se representan en la Figura 41.

En el mismo modelo, la pérdida de sangre debida a fondaparinux (proporcionado en forma de bolo IV de 25 mg/kg) se invirtió por completo mediante la administración de Antídoto r en forma de bolo de 6 mg, seguida de una infusión de 6 mg/h. Por el contrario, la protamina administrada como un bolo de 0,9 mg no invirtió la pérdida de sangre. Estos resultados se representan en la Figura 43.

Estos datos coinciden con la invención actualmente reivindicada, basándose en la suposición de que la rata pesa aproximadamente 200 veces un ser humano.

#### 55 **Ejemplo 29. Inversión de la anticoagulación inducida por la enoxaparina y el fondaparinux tras la administración de Antídoto r en bolo medida en unidades anti-fXa en plasma**

La actividad anti-fXa se ha usado en el entorno clínico para la medición de los niveles de anticoagulación obtenidos con el tratamiento con HBPM y se ha correlacionado con los resultados clínicos (Montalescot *et al.*, "Circulation", 2004, 110 (4):392-8).

Se midió el efecto del Antídoto r sobre la anticoagulación inducida por la enoxaparina mediante el ensayo de la actividad anti-fXa en plasma. El ensayo de la actividad anti-fXa se basa en un kit de ensayo de HBPM modificado (Coamatic HBPM) que expresa la actividad anticoagulante de la HBPM en términos de unidades anti-fXa. El ensayo de unidades anti-fXa mide la actividad de fXa (fXa bovina) residual en plasma usando un sustrato cromogénico de

fXa (S2732). Se usaron concentraciones conocidas de patrón de enoxaparina (U/ml) para construir una curva patrón para la medición de las unidades anti-fXa (U/ml) en las muestras desconocidas.

5 El Antídoto r se administró en forma de bolo a una dosis de 1 mg, 2 mg o 4 mg. Estos resultados se representan en la Figura 40. Como puede verse, el antídoto invierte la anticoagulación inducida por la enoxaparina de una manera sensible a la dosis.

10 En el mismo modelo, el fondaparinux se administró a una dosis de 1 mg/kg (bolo IV), seguido de Antídoto r (bolo de 4 mg comenzando a los 5 minutos + infusión de 4 mg/h durante el experimento). Como se muestra en la Figura 44, el aumento de actividad anti-fXa debida al fondaparinux fue rápido, y se invirtió esencialmente mediante la administración de Antídoto r.

15 La actividad anti-fXa para el fondaparinux se expresó como µg/ml mediante el uso de una concentración conocida de fondaparinux como patrón. Cuando se midió usando la enoxaparina como patrón, 1 µg/ml de fondaparinux equivalieron a 0,66 U/ml de enoxaparina en plasma de rata o a 0,80 U/ml de enoxaparina en el plasma humano.

**Ejemplo 30. Correlación de la pérdida de sangre, unidad anti-fXA y concentraciones de antídoto r fXa en el modelo de transección en la cola de la rata**

20 La Figura 42a, 42b y 42c muestran la correlación entre la pérdida de sangre en el modelo de transección en la cola de la rata y las concentraciones de enoxaparina medidas en unidades anti-fXa ( $r^2 = 0,887$ ). Las unidades anti-fXa y la concentración de antídoto r fXa se refieren a los niveles obtenidos en el punto de tiempo de 15 minutos - justo antes de la transección en la cola. Los resultados demostraron un fuerte aumento de la pérdida de sangre, pues las concentraciones de enoxaparina aumentaron hasta  $> 1,5$  unidades anti-fXa/ml con una meseta en la pérdida de sangre máxima alcanzada con este modelo que representaba aproximadamente el 5 % de la pérdida de volumen normal de sangre de la rata durante el tiempo de recogida de 15 minutos. Se ensayaron dosis superiores de enoxaparina durante los experimentos iniciales de desarrollo de modelos, pero no se demostró una pérdida de sangre mayor. Un análisis de correlación más detallado mostró una  $r^2 = 0,887$  entre la pérdida de sangre y las concentraciones de antídoto r fXa y una  $r^2 = 0,689$  entre las unidades anti-fXa y las concentraciones de antídoto r fXa.

30

**Tabla 13 - Secuencia ID NO: 1- Secuencia polipeptídica del factor X humano**

1	MGRPLHLVLL	SASLAGLLLL	GESLFIRREQ	ANNILARVTR	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE
61	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQ GK	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN
121	CELFTRKLCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVCS	CARGYTLADN	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR
181	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE
241	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE
301	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLR LKT	PITFRMN VAP	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI
361	VSGFGRTHEK	GRQSTR LKML	EVPIVDRNSC	KLSSSF IITQ	NMFCAGYDTK	QEDACQGD SG
421	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE
481	VITSSPLK					

**Tabla 14 - Secuencia ID NO: 2 - Una secuencia polinucleotídica que codifica el Factor X**

1	gactttgctc	cagcagcctg	tcccagtgag	gacagggaca	cagtactcgg	ccacaccatg
61	gggcgccac	tgcacctcgt	cctgctcagt	gcctccctgg	ctggcctcct	gctgctcggg
121	gaaagtctgt	tcatecgcag	ggagcaggcc	aacaacatcc	tggcgagggt	cacgagggcc
181	aattcctttc	ttgaagagat	gaagaaagga	cacctcgaaa	gagagtgcac	ggaagagacc
241	tgctcatacg	aagaggcccg	cgaggtcttt	gaggacagcg	acaagacgaa	tgaattctgg
301	aataaataca	aagatggcga	ccagtgtgag	accagtcctt	gccagaacca	gggcaaatgt
361	aaagacggcc	tcggggaata	cacctgcacc	tgtttagaag	gattcgaagg	caaaaactgt
421	gaattattca	cacggaagct	ctgcagcctg	gacaacgggg	actgtgacca	gttctgccac
481	gaggaacaga	actctgtggt	gtgctcctgc	gcccgcgggt	acaccctggc	tgacaacggc
541	aaggcctgca	ttcccacagg	gcctacccc	tgtgggaaac	agaccctgga	acgcaggaag
601	aggtcagtgg	cccaggccac	cagcagcagc	ggggaggccc	ctgacagcat	cacatggaag
661	ccatatgatg	cagccgacct	ggaccccacc	gagaaccctt	tcgacctgct	tgacttcaac
721	cagacgcagc	ctgagagggg	cgacaacaac	ctcaccagga	tcgtgggagg	ccaggaatgc
781	aaggacgggg	agtgtccctg	gcaggccctg	ctcatcaatg	aggaaaacga	gggtttctgt
841	ggtggaacca	ttctgagcga	gttctacatc	ctaacggcag	cccactgtct	ctaccaagcc
901	aagagattca	aggtgagggg	aggggaccgg	aacacggagc	aggaggaggg	cggtgaggcg
961	gtgcacgagg	tggaggtggt	catcaagcac	aaccggttca	caaaggagac	ctatgacttc
1021	gacatcgccg	tgctccggct	caagacccc	atcaccttc	gcatgaacgt	gggcctgcc
1081	tgctccccg	agcgtgactg	ggccgagtcc	acgctgatga	cgcagaagac	gggattgtg
1141	agcggcttcg	ggcgcacca	cgagaagggc	cggcagtcca	ccaggetcaa	gatgctggag
1201	gtgccctacg	tggaccgcaa	cagctgcaag	ctgtccagca	gcttcatcat	caccagaac
1261	atgttctgtg	ccggctacga	caccaagcag	gaggatgcct	gccaggggga	cagcgggggc
1321	ccgcacgtea	cccgttcaa	ggacacctac	ttcgtgacag	gcacgtcag	ctggggagag
1381	ggctgtgccc	gtaaggggaa	gtacgggatc	tacaccaagg	tcaccgcctt	cctcaagtgg
1441	atcgacaggt	ccatgaaaac	caggggcttg	cccaaggcca	agagccatgc	cccggaggtc
1501	ataacgtcct	ctccattaa	gtgagatccc	actcaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa

**Tabla 15 - Secuencia ID NO: 3 - Secuencia polipeptídica del Factor X humano maduro**

1	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE	TCSYEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQ GK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRK LCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSV VCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFLLDF
181	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLR LKT	PITFRMN VAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTR LKML	EVPIVDR NSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGD SG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKG KYG	IYTKVIAFLK
421	WIDRSMKIRG	LPKAK\$HAPE	VIT\$\$PLK			

Tabla 16 - Secuencia ID NO: 4 - Secuencia polipeptídica del Factor Xa sin dominio Gla que carece de 1 a 44 restos de aminoácido

<b>Cadena ligera</b>			
1		KDGDQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCSC
		LDNGDCDQFC	HEEQNSVVCSC
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER	
<b>Cadena pesada</b>			
181		IVGGQE	CKDGECPWQA
		LLINEENEGF	CGGTILSEFY
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK
		HNRFTKETYD	FDIAVLRLLKT
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK
		GRQSTRLLKML	EVPYVDRNSC
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSD	GPHVTRFKDT
		YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK

Tabla 17 - Secuencia ID NO: 5 - Secuencia polipeptídica del Factor Xa sin dominio Gla que carece de 1 a 45 restos de aminoácido

<b>Cadena ligera</b>					
1				DGDQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVCS CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER			
<b>Cadena pesada</b>					
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKGTI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVPYVDRNSC KLSSSFIIQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSDG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		

Tabla 18 - Secuencia ID NO: 6 - Secuencia polipeptídica del Factor Xa humano activado antes de la traducción del ácido glutámico en ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico

<b>Cadena ligera</b>						
1	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGQDC	ETSPCQNGGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSWCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				
<b>Cadena pesada</b>						
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVWIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLLK	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLLKML	EVPYWRNSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDG	GPHVTRFKDT	YFVTGMSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

Tabla 19 - Secuencia ID NO: 7 - Secuencia polipeptídica del Factor Xa humano activado después de la traducción del ácido glutámico en ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico y representa resto de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico)

<b>Cadena ligera</b>									
1	ANSFL $\gamma$ MKK	GHL $\gamma$ R $\gamma$ CM $\gamma\gamma$	TCSY $\gamma$ AR $\gamma$ V	F $\gamma$ DSDKTN $\gamma$ F	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQGK			
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRK LCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSWCS	CARGYTLADN			
121	GKACIPTGPY	PCGKOTLER							
<b>Cadena pesada</b>									
181		IVGGQE	CKDGCEPWQA	LLINEENEGF	CGGTLSEFY	ILTAAHCLYQ			
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLR LKT	PITFRMNVAP			
301	ACLPERDWAE	STLMTOKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTR LKML	EVPYVDRNSC	KLSSSFIITQ			
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGD SG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK			
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK						

Tabla 20 - Secuencia ID NO: 8 - Secuencia polipeptídica de la cadena ligera del Factor Xa humano activado después de la traducción del ácido glutámico en ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico

<b>Cadena ligera</b>								
1	ANSFL <sub>177</sub> MKK	GHL <sub>17</sub> R <sub>7</sub> CM <sub>177</sub>	TCSY <sub>177</sub> AR <sub>7</sub> V	F <sub>7</sub> DSDKTN <sub>7</sub> F	WNKYKDGDDQC	ETSPCCNQGK		
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFRKLCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVWCS	CARGYTLADN		
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER						

**Tabla 21 - Secuencia ID NO: 9 - Secuencia polipeptídica de la cadena pesada del factor Xa humano activado**

181	IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ	
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRKLT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVPIVDRNSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

Tabla 22 - Secuencia ID NO: 10 - Secuencia polipeptídica del Factor Xa anhidro sin Gla (A representa deshidroalanina)

<b>Cadena ligera</b>									
1								KDGDQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVCS				CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER							
<b>Cadena pesada</b>									
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY				ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEWIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRKLT				PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLKML	EVPYVDRNSC				KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG				IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK						

Tabla 23 - Secuencia ID NO: 11 - Secuencia polipeptídica de fXa-S379A sin Gla

<b>Cadena ligera</b>						
1					DGDQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRK LCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSV VCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				
<b>Cadena pesada</b>						
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLR LKT	PITFRMNVAP
301	ACLP ERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTR LKML	EV PYVDRNSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

Tabla 24 - Secuencia ID NO: 12 - Secuencia polipeptídica de un mutante triple del Factor Xa humano antes de eliminar el enlazador RKRRKR (SEQ ID NO: 17)

<b>Cadena ligera</b>					
1	ANSFL		F	WNKYKGDQDC	ETSPQGNQGGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	LDNGDCDQFC	HEEQNSVCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER			
<b>Enlazador</b>					
RKRRKR					
<b>Cadena pesada</b>					
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTEKETYD	FDIAVLRLLKT
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVPPYVDRNSC
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		YTKVTAFLK

Tabla 25 - Secuencia ID NO: 13 - Secuencia polipeptídica de un mutante triple del Factor Xa humano después de eliminar el enlazador RRRKR (SEQ ID NO: 17)

<b>Cadena ligera</b>									
1	ANSFL					F	WNKYKGDQQC		ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC		LDNGDCDQFC		HEEQNSVWCS		CARGYTLADN
121	GKACIPTY	PCGKQTLER							
<b>Cadena pesada</b>									
181		IVGGQE	CKDGECPWQA		LLINEENEGF		CGGTILSEFY		ILTAAHCLYQ
241	AKRFKRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVIK		HNRFKETYD		FDIAVLRLLK		PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK		GRQSTRLLKML		EPYVDRNSC		KLSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT		YFVTGIVSWG		EGCARKGKYG		IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK						

Tabla 26 - Secuencia ID NO: 14 - Secuencia polipeptídica de fragmento de cadena ligera del mutante triple del Factor Xa humano tras la secreción

1	ANSFL	F	WNKYKDGDDQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCS	LDNGDCCDQFC
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER	HEEQNSVVCS	CARGYTLADN

Tabla 27 - Secuencia ID NO: 15 - Secuencia polipeptídica de fragmento de cadena pesada del mutante triple del Factor Xa humano tras la secreción

Cadena pesada						
181		IVGGQE	CKDGCEPWQA	LLINEEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLLKT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLLKML	EVYVYDRNSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVT AFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

**Tabla 28 - Secuencia ID NO: 16 - Una secuencia de polinucleótido que codifica el Antídoto r (un mutante triple del Factor X)**

```

1 ATGGGGCGCC CACTGCACCT CGTCCTGCTC AGTGCCTCCC TGCGTGGCCT CCTGCTGCTC GGGGAAAGTC TGTTCATCCG CAGGGAGCAG GCCAACCAAC
101 TCCTGGCGAG GGTCCACGAGG GCCAATTCCCT TTCCTTTCTG GAATAAATAC AAAGATGGCG ACCAGTGTGA GACCAGTCCCT TGCCAGAACC AGGGCAAAT
201 TAAAGACGGC CTCGGGGGAA ACACCTGCAC CTGTTTAGAA GGATTCGAAG GCAAAAACCTG TGAATTATTC ACACGGAAAGC TCTGCAGCCT GGCAACCGG
301 GACTGTGACC AGTTCGTGCCA CGAGGAACAG AACTCTGTGG TGTGCTCCTG CGCCCGCGGG TACACCCTGG CTGACAACGG CAAAGCCTGC ATTCCACAA
401 GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGACCCTGG AACCGAGGAA GAGGAGGAAG AGGATCGTGG GAGGCCAGGA ATGCAAGGAC GGGGAGTGTG CCTGGCAGG
501 CCTGCTCATC AATGAGGAAA ACGAGGGTIT CTGTGGTGGG ACCAITCTGA GCGAGTCTA CATCCTAACG GCAGCCCACT GTCTCTACCA AGCCAAGAG
601 TTCAAGGTGA GGGTAGSGGA CCGGAACACG GAGCAGGAGG AGGGCGGTGA GCGCGTGCAC GAGGTGGAGG TGGTCACTAA GCACAACCGG TTCACAAAG
701 AGACCTATGA CTTCCGACATC GCCGTGCTCC GGCTCAAGAC CCCCATCACC TTCGCGATGA ACGTGGCGCC TGCCTGCCTC CCCGAGCGTG ACTGGSCCG
801 GTCCACGCTG ATGACGCAGA AGACGGGGAT TGTGAGCGCG TTCGGGCGCA CCCACGAGAA GGGCCGGCAG TCCACCAGGC TCAAGATGCT GGAGGTGCG
901 TACGTGGACC GCARCAGCTG CAAGCTGTCC AGCAGCTTCA TCATCACCCA GAACATGTTC TGTGCCGGCT ACGACACCAA GCAGGAGGAT GCCTGCCAG
1001 GGGACGCGAG GGGCCCGCAC GTACCCGGCT TCAAGGACAC CTACTTCTCG ACAGGCATCG TCAGCTGGGG AGAGGGCTGT CCCCCTAAGG GGAAGTACG
1101 GATCTACACC AAGGTACCG CCTTCTCAA GTGGATCGAC AGGTCCATGA AAAACAGGGG CTTGCCCAAG GCCAAGAGCC ATGCCCCGGA GGTCAATAA
1201 TCCTCTCCAT TAAAGTGA
    
```

**5 Tabla 29 - Secuencia ID. NO: 18- Secuencia de polinucleótido del vector de expresión del Antídoto r**

```

1 TCTAGACACA GTACTCGGCC ACACCATGGG GCGCCCACTG CACCTCGTCC TGCTCAGTGC CTCCTTGGCT GGCCTCCTGC TGCTCGGGGA AAGTCTGTT
101 ATCCGCGAGG AGCAGGCCAA CAACATCCTG GCGAGGGTCA CGAGGGCCAA TTCCTTCTT TTCTGGAATA AATACAAAGA TGGCGACCAG TGTGAGACC
201 GTCCCTTGCCA GAAOCAGGGC AAATGTAAG ACCGCCCTCG GGAATACACC TGCACTGTT TAGAAGGATT CGAAGGCCAAA AACTGTGAAT TATTCCACAC
301 GAAGCTCTGC AGCCTGGACA ACGGGGACTG TGACCCAGTT TGCCACGAGG AACAGAACTC TGTGGTGTGC TCCTGCGCCC GCGGGTACAC CCTGGCTGA
401 AACGGCAAGG CCTGCATTCC CACAGGGCCC TACCCTGTGT GGAACACAGC CTTGGAACCG AGGAAGAGGA GGAAGAGGAT CGTGGGAGGC CAGGAATGC
501 AGGACGGGGA GTGTCCTCTG CAGGCCCTGC TCATCAATGA GGAACACGAG GGTTCCTGTG GTGGAACCAT TCTGAGCGAG TTCATCATCC TAACGGCAG
601 CCACTGTCTC TACCAGGCCA AGAGATTCAA GGTGAGGGTA GGGGACCGGA ACACGGAGCA CACCGAGGCG GGTGAGGCGG TGCACGAGGT GGAGTGGT
701 ATCAAGCACA ACCGGTTCAC AAAGGAGACC TATGACTTGG ACATCGCCGT GCTCCGGCTC AAGACCCCCA TCACCTTCCG CATGAACGTG CGCCCTGCC
801 GCCTCCCGCA GCGTGACTGG CCGGATCCA CGCTGATGAC CCGGATGAGG GGGATTGTGA GCGGCTTCGG GCGCACCCAC GAGAGGGGCC GCGATCCA
901 CAGGCTCAAG ATGCTGGAGG TGCCCTACGT GGACCCGCAAC AGCTGCAAGC TGTCACGACG CTTTATCATC ACCCAGAAAC TGTCTGTGTC CGGCTACGA
1001 ACCAAGCAGG AAGATGCTCG CAGAGGGGAC GCGAGGGGCC CCGACGTAC CCCTTCAAG GACACCTACT TCGTACAGG CATCGTCAAG TGGGAGAGG
1101 GCTGTGCCCC TAAGGGGAAG TACGGGATCT ACACCAAAGT CACCGCCTTC CTCAAAGTGA TCGACAGGTC CATGAAAACC AGGGCTTGC CCAAGGCCA
1201 GAGCCATGCC CCGGAGGTCA TAACGTCTC TCCATTAAG TGAGATCCCA CTCGGATCCC TATTCTATAG TGTACCTAA ATGCTAGAGC TCGCTGATC
1301 GCCTCGACTG TGCCTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTGTTT GCCCTCCCC CGTGCCTTCC TTGACCTTGG AAGGTGCCAC TCCACATGTC CTTTCTTAA
1401 AAAATGAGGA AATTGCAATG CATTGTCTGA GTAGGTGTA TTCTATTCTG GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGCAATA
1501 CAGGCAATGT GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGCCTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCGAGCGGC CGCCCTTCT GAGGCGGAAA GAACCAAGT
1601 TGGAAATGTG TCCAGTTAGG GTGTGGAAAG TCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAAC AGGTGTGGA
1701 AGTCCCCAGG CTCGCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAAAGCAT GCATCTCAAT TAGTCAGCAA CCATAGTCCC GCCCTAACT CCGCCATCC CGCCCTTAA
1801 TCCGCCAGT TCCGCCATT CTCGCCCCA TGCTGACTA ATTTTTTTTA TTTATGAGA GGGCGAGGCC GCCTCGGCTC CTGAGCTATT CCAGAGTA
1901 TGAGGAGGCT TTTTGGAGG CCTAGGCTTT TGCAAAAAG CTAGCTTCCC CTGCGCATCA TGGTTCGACC AITGACTGC ATGCTCGCGG TGTCCCAA
2001 TATGGGGATT GGCRAAGAC GAGACTACC CTGGCCTCCG CTCAGGAACG AGTTCAAAGTA CTTCCAAAGA ATGACCACAA CCTCTTCACT GGAAGGTA
2101 CAGAATCTGG TGAATTATGG TAGGAAAACC TGGTCTCCA TTCTGAGAA GAATCGACTT TTAAGGACA GAATTAATAT AGTCTCAGT AGAGAACTC
2201 AAGAACCACC ACGAGGAGCT CATTTTCTTG CCAAAAGTTT GGATGATGCC TTAAGACTTA TTGACAAACC GGAATTGGCA AGTAAAGTAG ACAITGTTT
2301 GATAGTCGGA GGCAGTCTG TTTACCAGGA AGCCATGAAT CAACCAGGCC ACCTTAGACT CTTTGTGACA AGGATCATGC AGGAATTTGA AAGTACAC
2401 TTTTCCAG AAATTGATTT GGGGAATAT AAATCTTCC CAGAATACC AGGCGTCTC TCTGAGTCC AGGAGGAAA AGGCATCAAG TATAAGTT
2501 AAGTCTACGA GAAGAAAGAC TAACAGGAG ATGCTTTCAA GTTCTCTGCT CCCCCTCTAA AGCTATGCAT TTTATAAGA CCATGGGACT TTTGCTGGC
2601 TTAGATCCCC CCGAGATCCA GACATGATAA GATACATGA TGAGTTTGGG CAACCCACAA CTAGAATGCA GTGAAAAAAA TGCTTTATTT GTGAAATTT
2701 TGATGCTATT GCTTTATTTG TAACATTAT AAGCTGCAAT AAACAAGTTA ACAACAACAA TTGCATTAT TTTATGTTT AGGTTACAGG GAGAGGTGTG
2801 GAGGTTTTT AAAGCAAGTA AAACCTTAC AAATGTGGTA TGGCTGATTA TGAGCTCCAG CTTTGTGTT CTTTATGTAG GGTAAATTTG CGCCTTGGC
2901 TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTTGTTATC CGCTCACAAT TCCACACAA ACAGGACCGG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGTGCCC
3001 AATGAGTGA CTAATCACA TFAATTGCGT TGCCTCACT GCCCGCTTC CAGTCGGGAA ACCTGTGCTG CAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACCGG
3101 GGGGAGAGGC GGTITGCGTA TTGGGCGTCT TTCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTCG CCGGCTGTT CCGGTCGGG GAGCGGTATC AGCTCACTC
3201 AAGCGGTAA TACGGTATC CACAGATCA GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCCGG
3301 TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCGCCCCC CTGACGACA TCACAAAAT CAGCCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACC
3401 GCGGTTTCCC CCTGGAAGCT CCCTCGTGG CTTCTCTGTT CCGACCTGC CCGTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC CTTGCGGAA GCTGGCGCT
3501 TCTCATAGCT CAGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG TCGTCTGCTC CAAGCTGGG TGTGTGACG AACCCCGCT TCAGCCCGAC CCGTGGCGC
3601 TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAG
3701 CCGTCTTACA GAGTCTTGA AGTGGTGGCC TAACCTAGGC TACACTGAAA GGCAGATAT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCCGAAA
3801 AGAGTTGGTA GCTCTGTAT CCGCAACAA ACCACCGCTG GTAGCGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACCG CAGAAAAAAA GGATCTCAA
3901 AAGATCTTCT GATTTTTTCT ACGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCAGCTTAGG GGAATTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACTT
    
```

(Continuación)

4001 GATCCITTTA AATTAATAAT GAAGTITTTAA ATCAATCIAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTC TGACAGT TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTAI  
4101 TCAGCGATCT GTC TATTTTCG TTCATCCATA GTTGCCTGAC TCCCGTCTGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGC TGCA  
4201 TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCTGSCAA CTTTATCCG  
4301 CTCATCCAG TCTATTAATT GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCCG CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTGGCCA TTGCTACAGG CATCGTGGT  
4401 TCACCGCTCGT CGTTTGGTAT GGTTCATTC AGCTCCGGTT CCGAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCAATGTTGT CAAAAAAGCG GTTAGCTCC  
4501 TCGGTCCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCCTT ACTGTCATGC CATCCGTAA  
4601 ATGCTTTTCT GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCAATC TGAGAAATAGT GTATGCGGGC ACCGAGTTC TCTTGCCCGG CGTCAATACG GGATAATAC  
4701 GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCCTG GTTGAGATCC AGTTCGATG  
4801 AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCCACAGC GTTTCGTTGGT GAGCAAAAAC AGGAAGGCRA AATGCCGCAA AAAAGGGAA  
4901 AAGGGCGACA CCGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCTT TTTCAATATT ATTTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGA  
5001 TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT TTCCCGGAAA AGTGCCACCT GGGAAATGTT AAACGTTAAT ATTTTGTAA AATTCGCT  
5101 AAATTTTTGT TAAATCAGCT CATTTTTTAA CCAATAGGCC GAAATCGGCA AAATCCCTTA TAAATCAAAA GAATAGACCG AGATAGGGTT GAGTGTGT  
5201 CCGATTTGGA ACARGAGTCC ACTATTAAG AACGTGGACT CCAACGTCAA AGGGCGAAAA ACCGTCATC AGGGCGATGG CCCAGTACGT GAACCATCA  
5301 CCTAATCAAG TTTTGTGGGG TCGAGGTGCC GTAAGCACT AAATCGGAAC CCTAAAGGGA GCCCCCGATT TAGAGCTTGA CGGGGAAAAGC CGCGCAACG  
5401 GCGAGAAAAG GAAGGGAAGA AAGCGAAAG AGCGGGCGCT AGGGCGCTG CAAGTGTIAG GGTACCGCTG CCGGTAAACCA CCACACCCGC CGCGCTTA  
5501 GCGCCGCTAC AGSGCGCGTC GCGCCATTCC CCATTCAGGC TGCGCAACTG TGGGAAAGGG CGATCGGTGC GGGCCTCTC GCTATTACGC CAGCTGGCG  
5601 AAGGGGGATG TCGTCAAGG CGATTAAGTT GGGTAACGCC AGGGTTTTCC CAGTCACGAC GTTGTAAAA GACGGCCAGT GAGCGCGGT AATACGACT  
5701 ACTATAGGGC GAAITGGAAT TAATTCGCTG GCGTGAAGC CCGAGAGGA GACGCTCTAG GGAITTTGCC CGGACTAGCG AGATGGCAG GCTGAGGAC  
5801 GGAGGCTGAT TGAGAGGCGA AGGTACACCC TAATCTCAAT ACAACCCITG GAGCTAAGCC AGCAATGGTA GAGGGAAAGT TCTGCACGTC CCTTCCAGG  
5901 GGCTTCCCCG TCACCAACCA CCCCACCCG CCCCAGCCG AGCTGAGAGT AATTCATACA AAAGGACTCG CCCCCTGCTT GGGGAATCCC AGGGACCGT  
6001 GTTAAACTCC CACTAACGTA GAACCCAGAG ATCGCTGCGT TCCCGCCCC TCACCCGCC GCTCTCGTCA TCACTGAGT GAGAAAGAGC ATGCTGAG  
6101 CTCGGTGCC CGTCACTGGC CAGAGCGCAC ATCGCCACA GTCCCGAGA AGTTGGGGG AGGGTCCGC AATTGAACCG GTGCTAGAG AAGGTGGC  
6201 GGGTAAACT GGGAAAGTGA TGTCGTGTAC TGGCTCCGCC TTTTCCCGA GGGTGGGGGA GAACCGTATA TAAGTGCAGT AGTCCCGTG AACGTTCT  
6301 TTCCGCAACGG GTTTGCCGCC AGAACACAGG TAAGTGCCTG GTTGGTTCC CCGGGCCCTG GCCTCTTAC GGGTATAGG CTTTGCCTG CTTGAATTA  
6401 TTCCAGGCC CTGGCTGCAG TACGTGATTC TTGATCCCGA GCTTCGGGTT GAAAGTGGGI GGGAGAGTTC GAGGCTTGC GCTTAAGGAG CCCCCTCC  
6501 TCGTCTTGA GTTGAGGCTT GGCTTGGGCG CTGGGCGCG CCGTGGCGA TCTGGTGGCA CCTTCGCGC TATCTCGCTG CTTTCGATA GTCTTAGC  
6601 ATTTAAATTT TTTGATGACC TGCTGCGACG CTTTTTTTCT GGCAAGATAG TCTTGTAAAT GCGGGCCAAAG ATCTGCACAC TGGTATTTCC GTTTTGGG  
6701 CCGCGGGCGG CGACGGGGCC CGTGCCTCC AGCGCACATG TTCGGCAGG CCGGGCTGCG GAGCGCGGCC ACCGAGAATC GGACGGGGT AGTCTCAAG  
6801 TGGCCGGCCT GCTCTGTGCG CTGGCTCGC GCCGCCGTGT ATCGCCCGC CCGTGGCGGC AAGGCTGGCC CCGTCCGAC CAGTTGGGTG AGCGGAAG  
6901 TGGCCGCTTC CCGGCCCTGC TGCAGGGAGC TCAAAATGGA GGACGCGCG CTCGGGAGAG CCGGGCGGGT AGTCAACCCAC ACAAAGGAAA AGGGCCTTT  
7001 CGTCTCAGC CGTCTCTCA TGTAGCTCCA CCGAGTACCG GCGCCCGTCC AGGCACCTCG ATTAGTTCTC GAGCTTTTGG AGTACGCTGT CTTTAGGTT  
7101 GGGGAGGGG TTTTATGCGA TGGAGTTTCC CCACACTGAG TGGGTGGAGA CTGAAGTTAG GCCAGCTTGG CACTTGATGT AATTCCTCTT GGAATTTGC  
7201 CTTTTTGAAT TTGGATCTTG GTTCATTCTC AAGCCTCAGA CAGTGGTTCA AAGTTTTTTT CTTCATTTCC AGGTGTCGTG AAAACTACCC CTAAGGCC

## REIVINDICACIONES

1. Una formulación de dosis unitaria que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y de 400 miligramos a 900 miligramos de un polipéptido bicatenario que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13, en la que la secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13 (a) tiene actividad procoagulante reducida en comparación con el factor Xa de tipo silvestre y (b) no se ensambla en un complejo de protrombinasa, para su uso en la prevención, la reducción o la interrupción de la hemorragia en un sujeto humano sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa,
- 5 10 en la que la prevención, la reducción o la interrupción de la hemorragia comprende la administración al sujeto de la formulación de dosis unitaria mediante inyección de bolo intravenoso o una combinación de una inyección de bolo y una infusión en la que se administran de 400 miligramos a 900 miligramos del polipéptido bicatenario.
- 15 2. La formulación de dosis unitaria para el uso de la reivindicación 1, en la que el inhibidor del factor Xa se selecciona del grupo que consiste en fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmin, NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la vía del factor tisular, DX-9065a, YM-60828, YM-150, apixabán, rivaroxabán, TAK-442, PD-348292, otamixabán, edoxabán, LY517717, GSK913893, razaxabán, heparina de bajo peso molecular, betrixabán o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y combinaciones de los mismos.
- 20 3. La formulación de dosis unitaria para el uso de la reivindicación 2, en la que el inhibidor del factor Xa se selecciona del grupo que consiste en betrixabán, rivaroxabán, apixabán, heparina de bajo peso molecular y sus combinaciones.
- 25 4. La formulación de dosis unitaria para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el polipéptido comprendido en la formulación de dosis unitaria está liofilizado.
5. La formulación de dosis unitaria para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la infusión se administra durante aproximadamente 6 horas.
- 30 6. La formulación de dosis unitaria para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la infusión se administra durante de 6 a 12 horas.
- 35 7. La formulación de dosis unitaria para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la infusión se administra durante de 12 a 24 horas.
8. La formulación de dosis unitaria para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la infusión se administra durante hasta 48 horas.
- 40 9. Uso de una formulación de dosis unitaria que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y de 400 miligramos a 900 miligramos de un polipéptido bicatenario que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13, en la que la secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13 (a) tiene actividad procoagulante reducida en comparación con el factor Xa de tipo silvestre y (b) no se ensambla en un complejo de protrombinasa, en la fabricación de un medicamento para la prevención, la reducción o la interrupción de la hemorragia en un sujeto humano sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa, en un método que comprende administrar la formulación de dosis unitaria al sujeto mediante inyección de bolo intravenoso o una combinación de una inyección de bolo y una infusión en la que se administran de 400 miligramos a 900 miligramos del polipéptido bicatenario.
- 45 50 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la formulación de dosis unitaria es como se ha definido en la reivindicación 4.
- 55 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el inhibidor del factor Xa es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el medicamento es para la administración como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8.

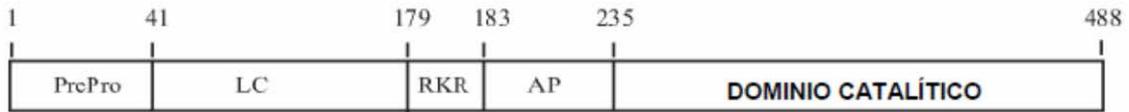


FIG. 1

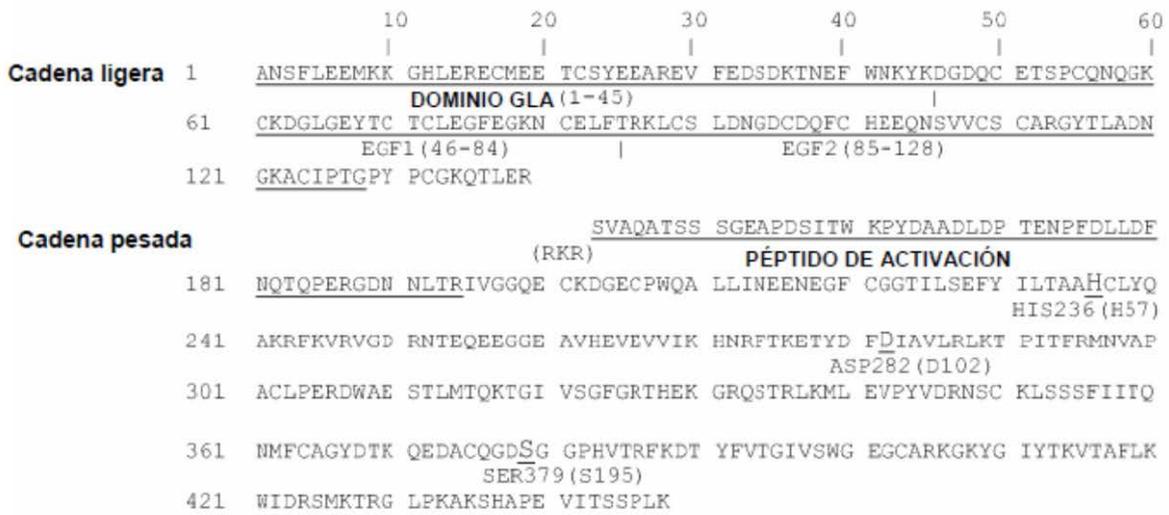


FIG. 2

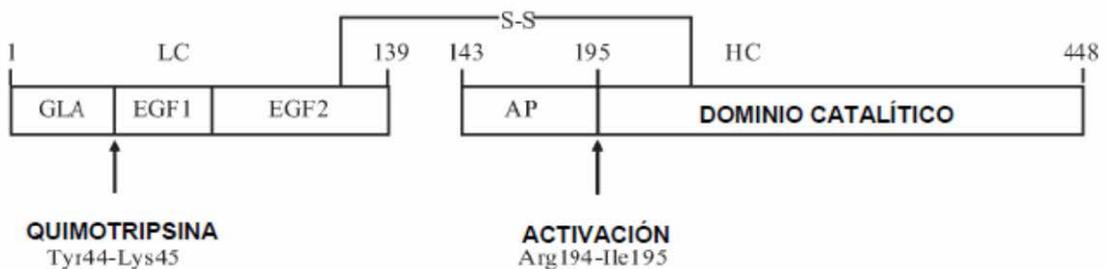


FIG. 3

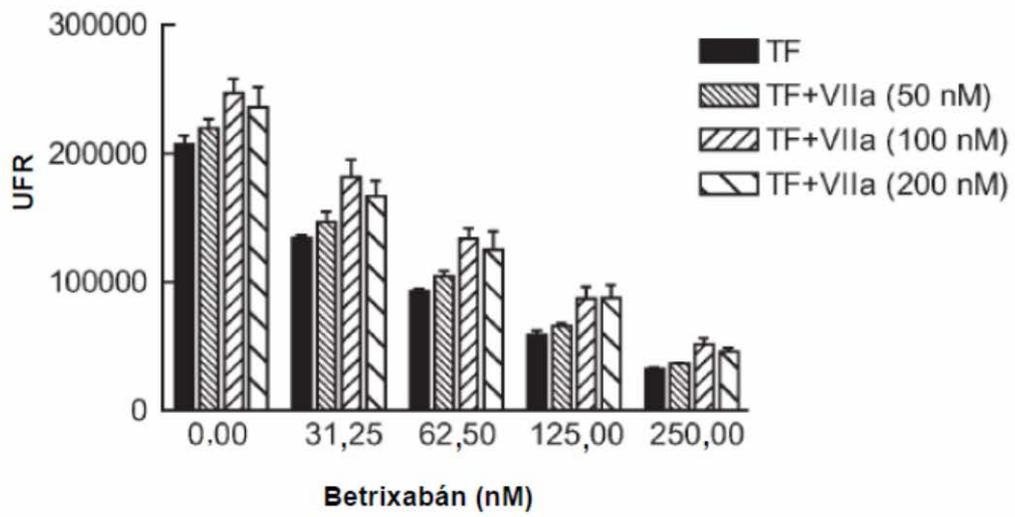


FIG. 4

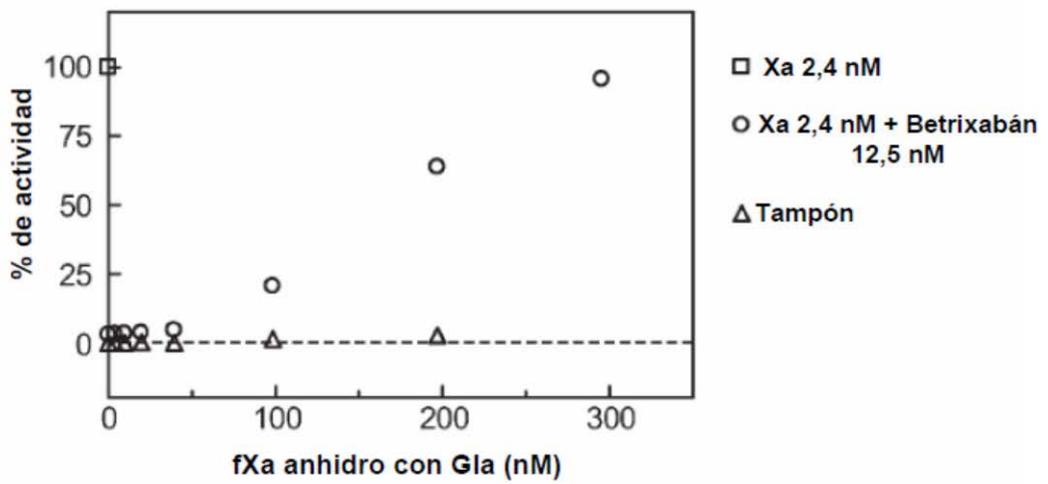


FIG. 5

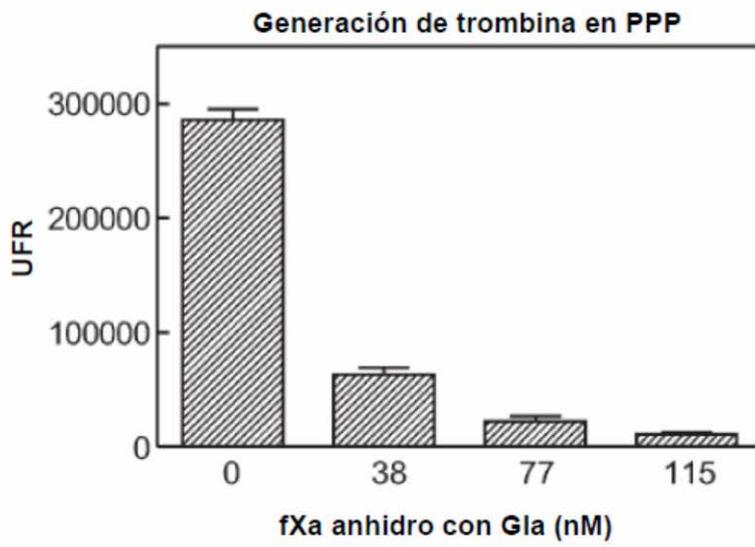


FIG. 6

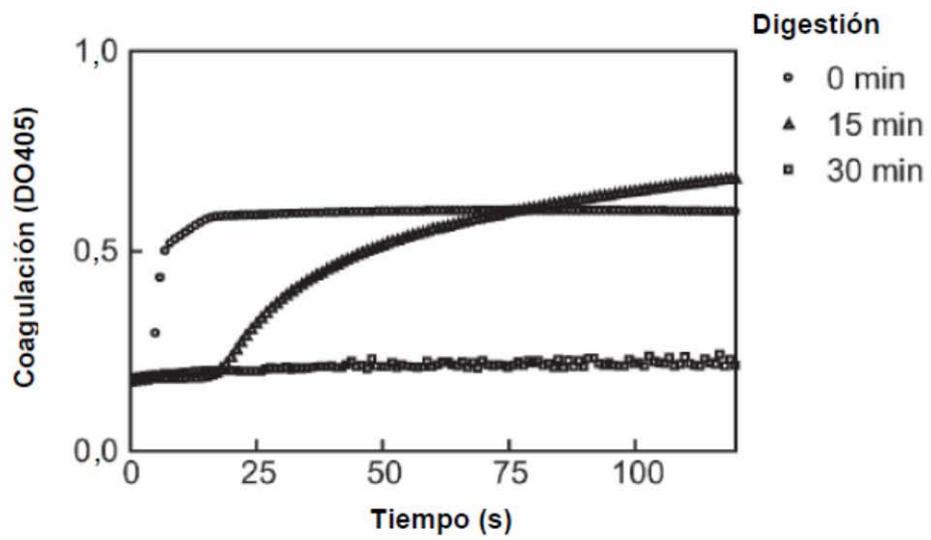


FIG. 7

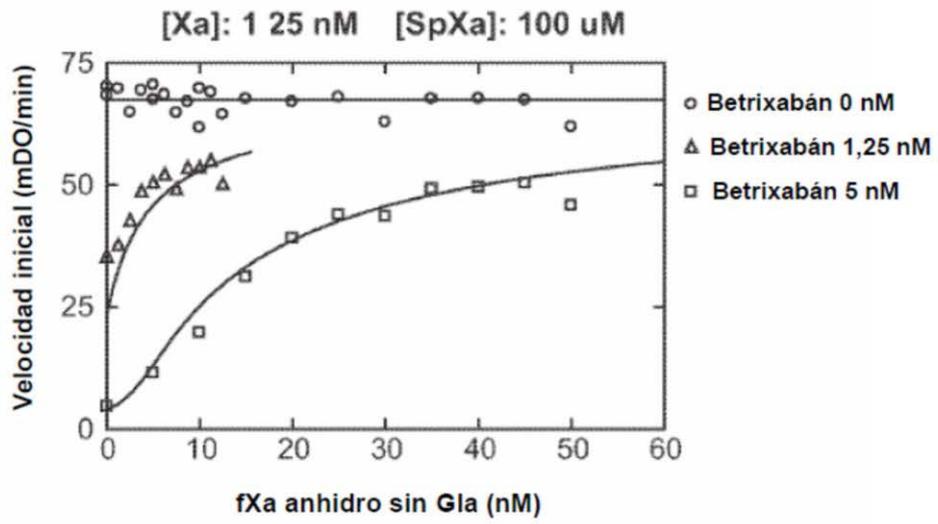


FIG. 8

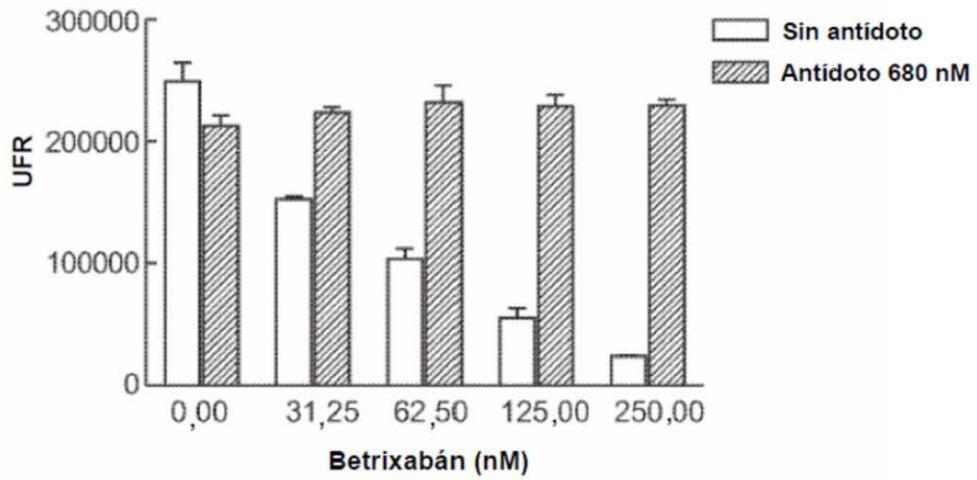


FIG. 9

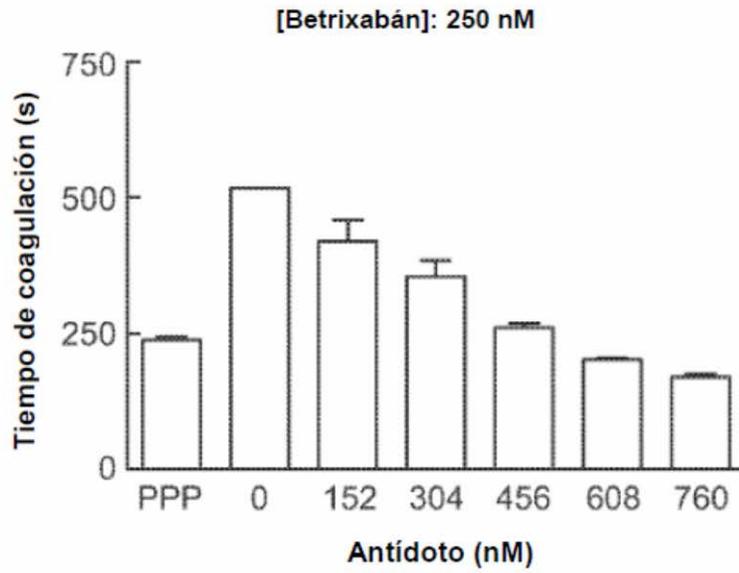


FIG. 10

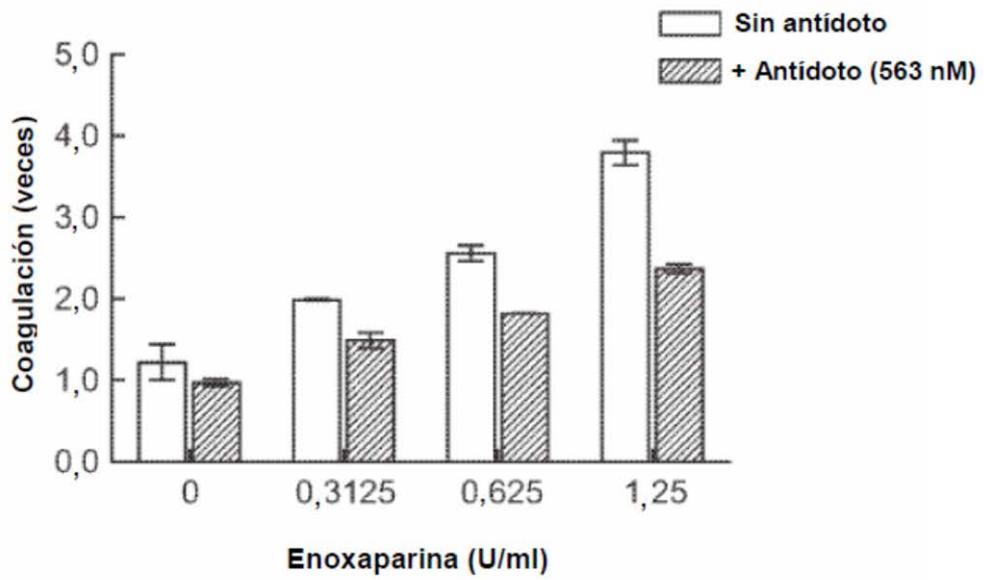


FIG. 11

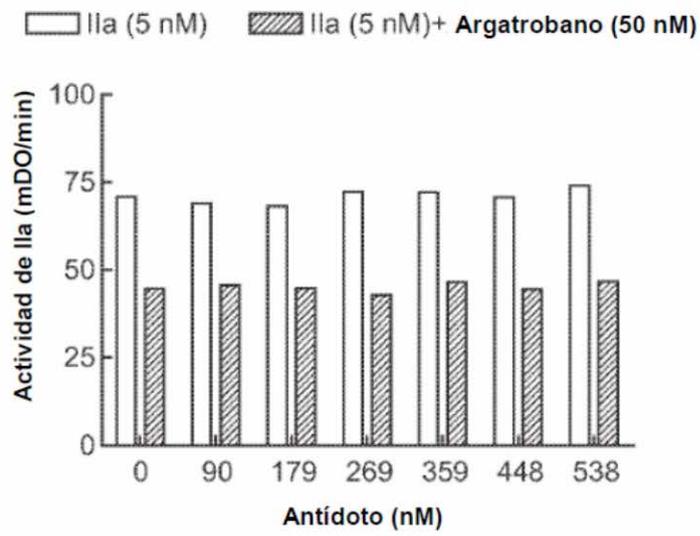


FIG. 12

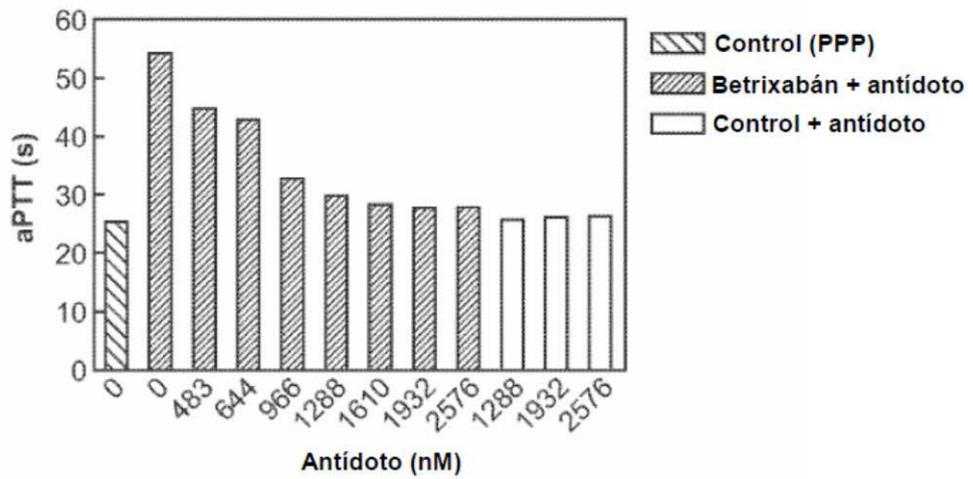


FIG. 13

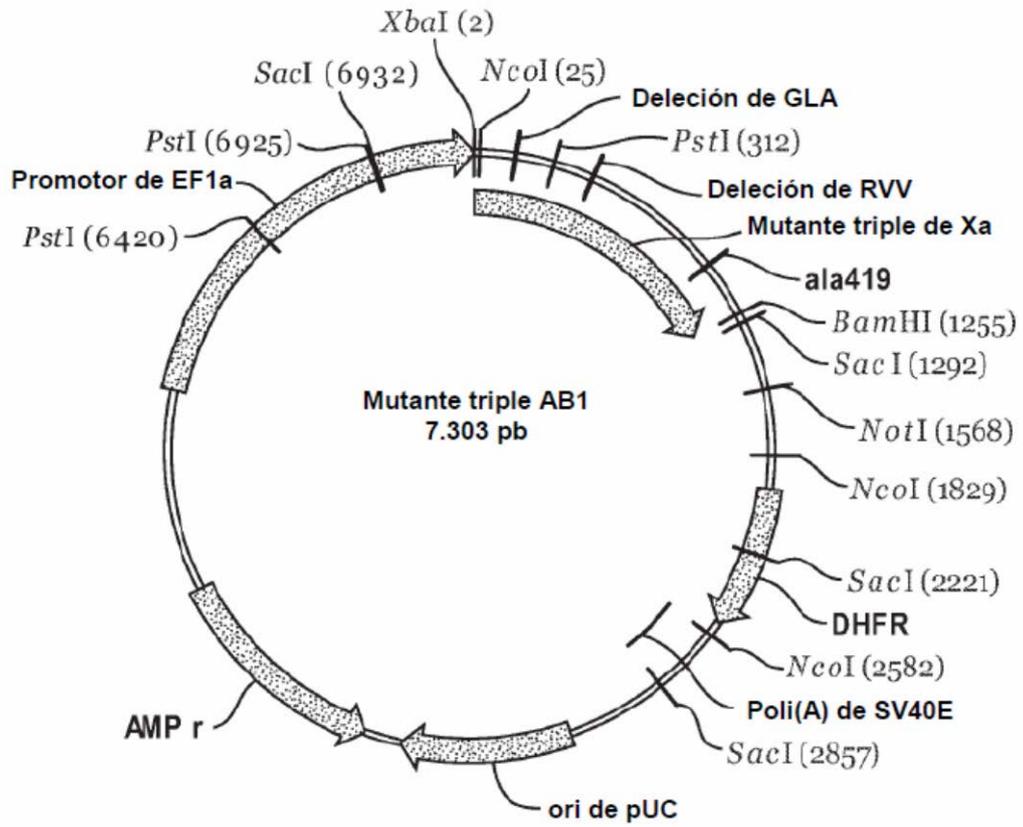


FIG. 14

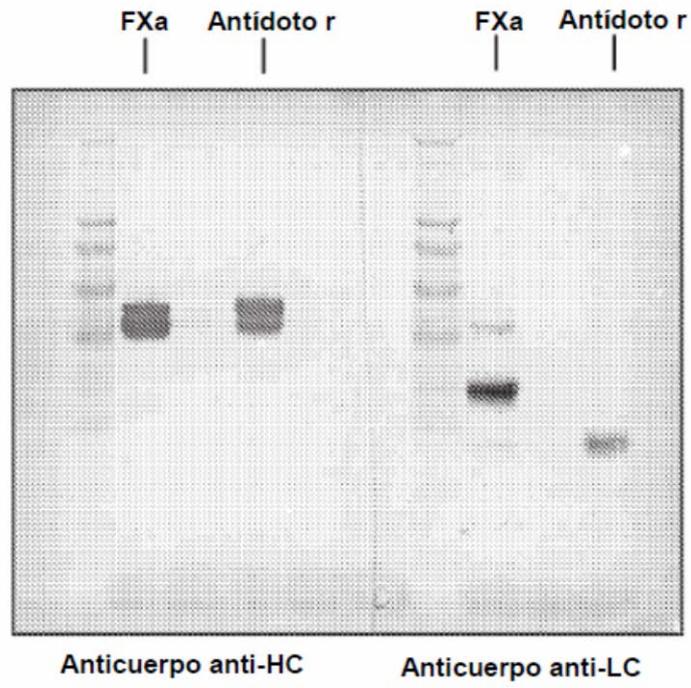


FIG. 15A

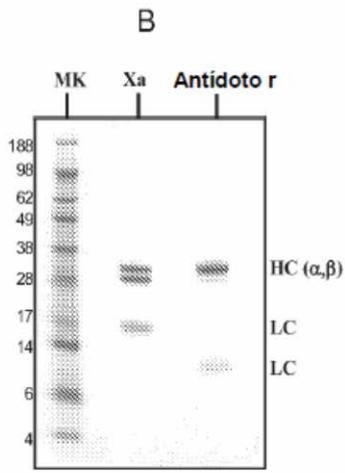


FIG. 15B

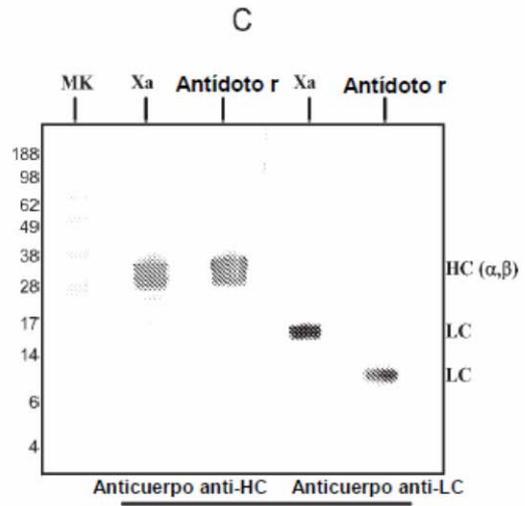


FIG. 15C

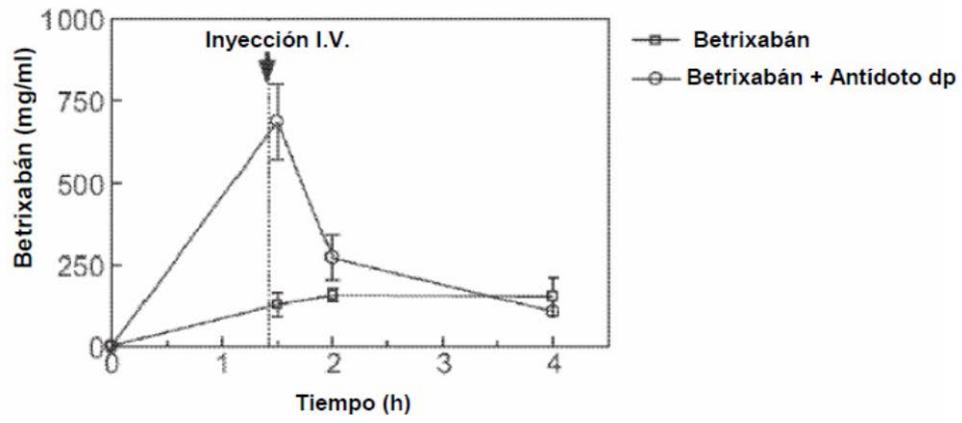


FIG. 16

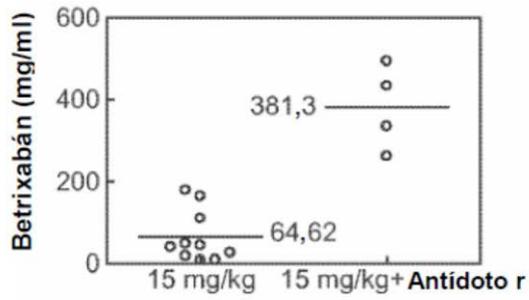


FIG. 17A

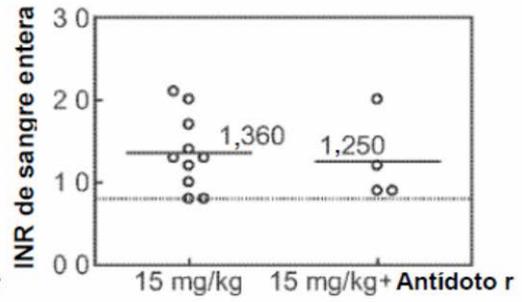


FIG. 17B

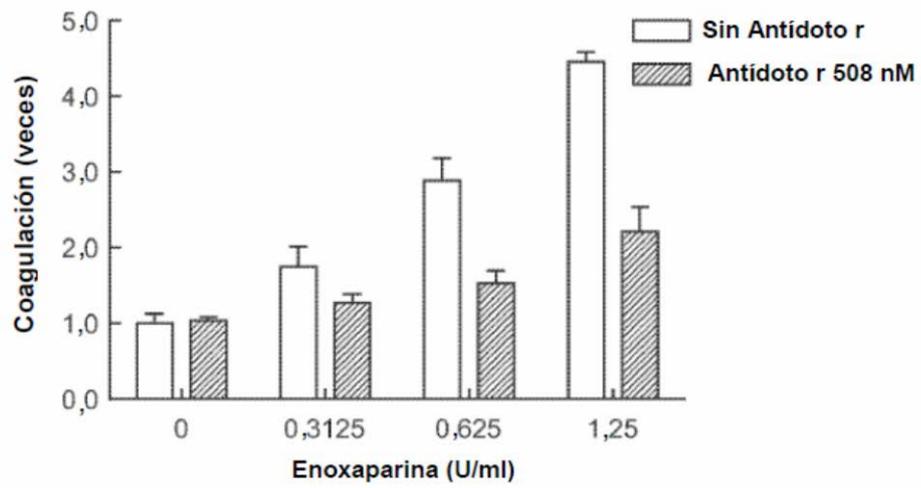
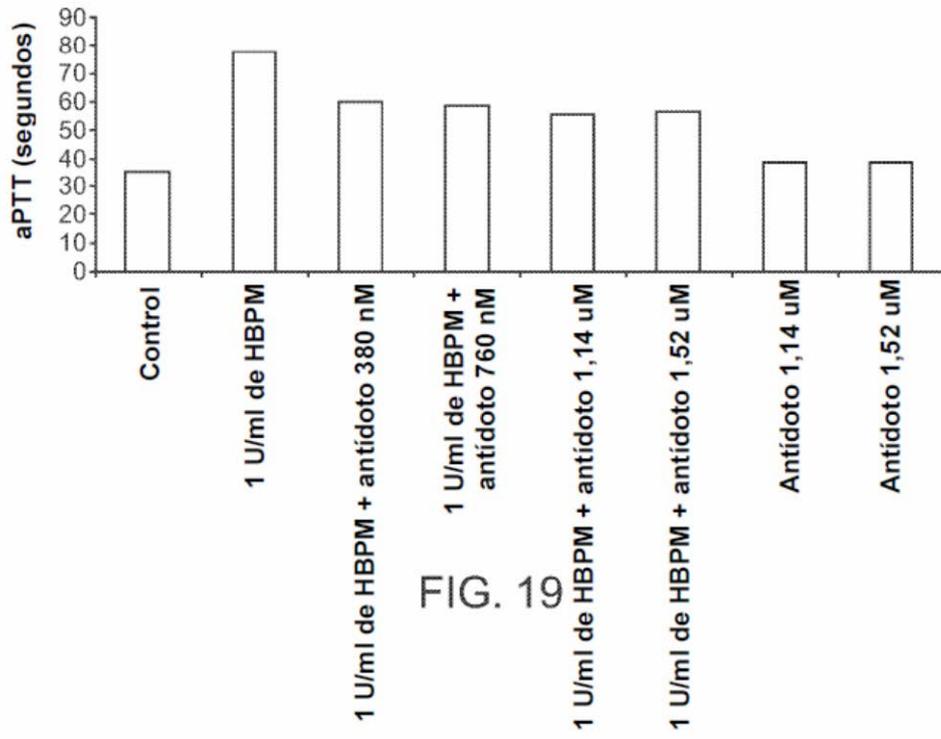


FIG. 18



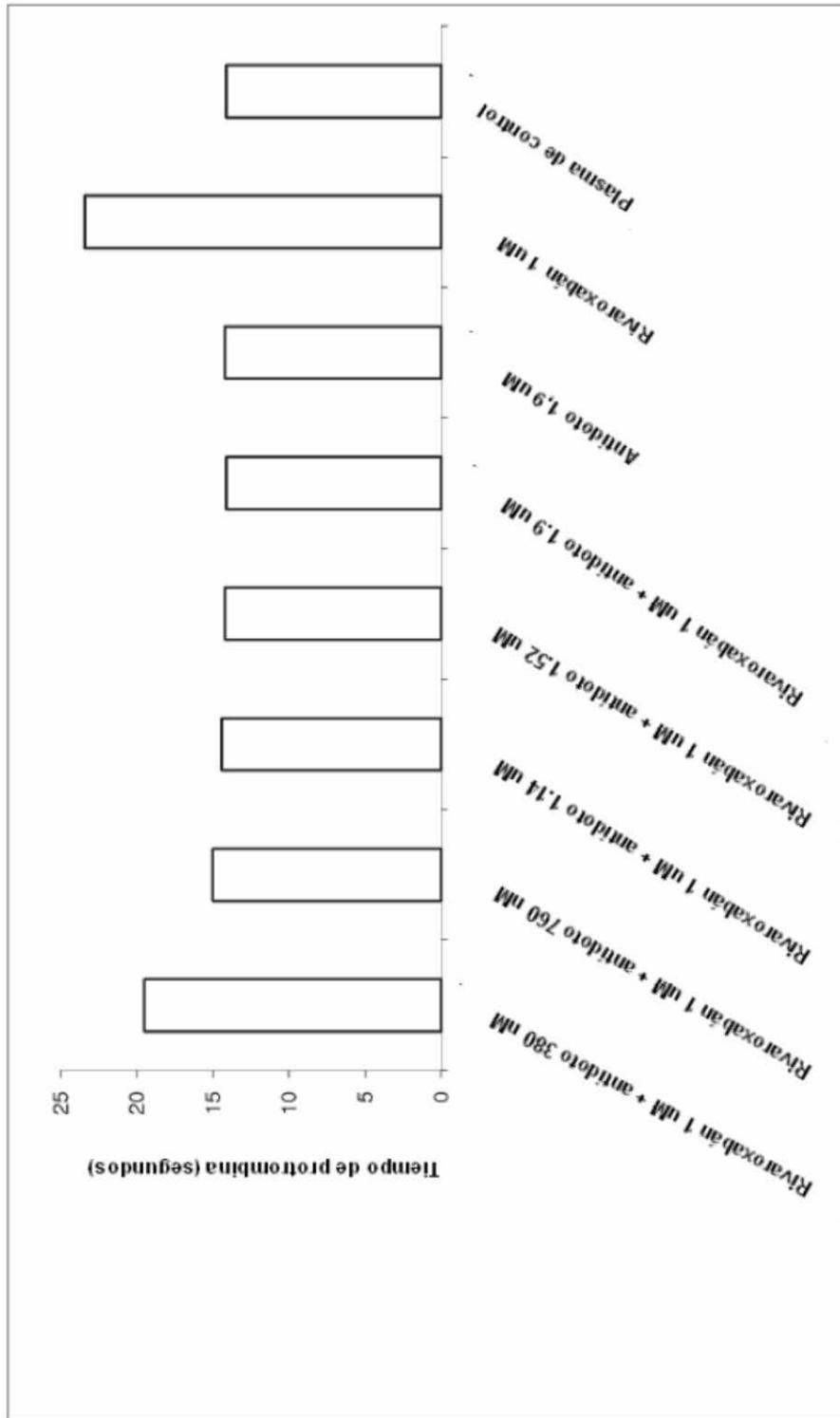


FIG. 20

atggggcgcccactgcacctcgtcctcgtcagtgccctccctggctggcctcctcgtcgtc  
 M G R P L H L V L L S A S L A G L L L L  
 ggggaaagtctgttcatccgcagggagcaggccaacaacatcctggcgaggggtcacgagg  
 G E S L F I R R E Q A N N I L A R V T R  
 gccaatcctttctttctggaataaatacaaaagatggcgaccagtgtagaccagtcct  
 A N S F L F W N K Y K D G D Q C E T S P  
 tgccagaaccagggcaaatgtaaagacggcctcggggaatacacctgcacotggttagaa  
 C Q N Q G K C K D G L G E Y T C T C L E  
 ggattcgaaggcaaaaactgtgaattattcacacggaagctctgcagcctggacaacggg  
 G F E G K N C E L F T R K L C S L D N G  
 gactgtgaccagttctgccacgaggaacagaactctgtggtgtgctcctgcgccccggg  
 D C D Q F C H E E Q N S V V C S C A R G  
 tacaccctggctgacaacggcaaggcctgcattccacagggccctaccctgtgggaaa  
 Y T L A D N G K A C I P T G P Y P C G K  
 cagaccctggaaacgcaggaagaggaggaagaggatcgtgggaggccaggaatgcaaggac  
 Q T L E R R K R R K R I V G G Q E C K D  
 ggggagtgtccctggcagggcctgctcatcaatgaggaaaacgaggggttctgtggtgga  
 G E C P W Q A L L I N E E N E G F C G G  
 accattctgagcaggttctacatcctaacggcagcccactgtctctaccaagccaagaga  
 T I L S E F Y I L T A A H C L Y Q A K R  
 ttcaaggtgagggtaggggaccggaacacggagcaggaggagggcggtgagggcggtgcac  
 F K V R V G D R N T E Q E E G G E A V H  
 gaggtggaggtggtcatcaagcacaaccgggttcacaaaggagacctatgacttcgacatc  
 E V E V V I K H N R F T K E T Y D F D I  
 gcctgctccggctcaagacccccatcaccttcgcgatgaacgtggcgccctgctgctc  
 A V L R L K T P I T F R M N V A P A C L  
 cccgagcgtgactgggcccaggtccacgctgatgacgcagaagacggggattgtgagcggc  
 P E R D W A E S T L M T Q K T G I V S G  
 ttggggcgaccccacgagaaggccggcagtcaccaggctcaagatgctggaggtgccc  
 F G R T H E K G R Q S T R L K M L E V P  
 tacgtggaccgcaacagctgcaagctgtccagcagcttcatcatcaccagaacatgttc  
 Y V D R N S C K L S S S F I I T Q N M F  
 tgtgccggctacgacaccaagcaggaggatgctgccagggggacgcagggggcccgac  
 C A G Y D T K Q E D A C Q G D A G G P H  
 gtcaccgccttcaaggacacctacttcgtgacagggcatcgtcagctggggagagggctgt  
 V T R F K D T Y F V T G I V S W G E G C  
 gcccgtaaggggaagtacgggatctacaccaaggtcaccgccttctcaagtggatcgac  
 A R K G K Y G I Y T K V T A F L K W I D  
 aggtccatgaaaaccaggggttgcccaaggccaagagccatgccccggaggtcataacg  
 R S M K T R G L P K A K S H A P E V I T  
 tctctccattaaagtga  
 S S P L K -

FIG. 21

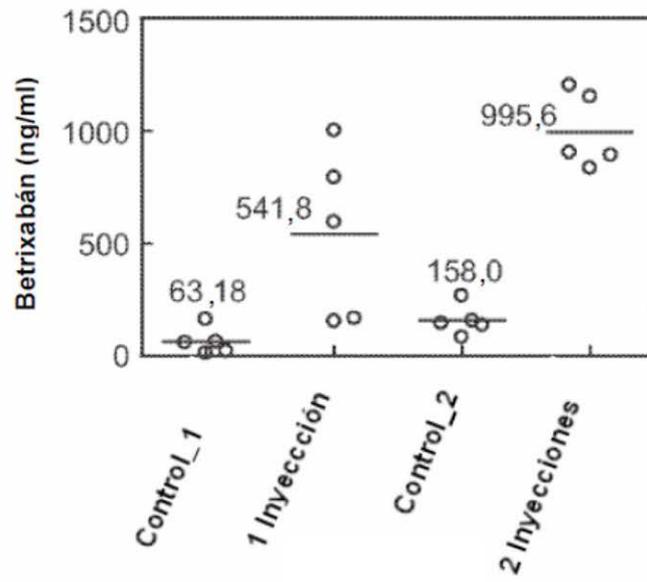


FIG. 22A

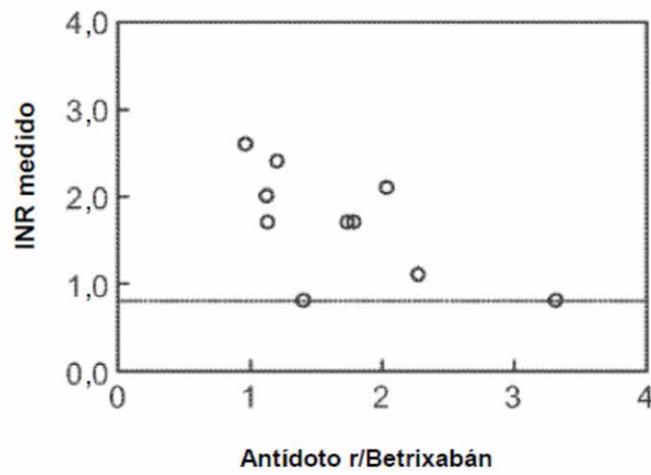


FIG. 22B

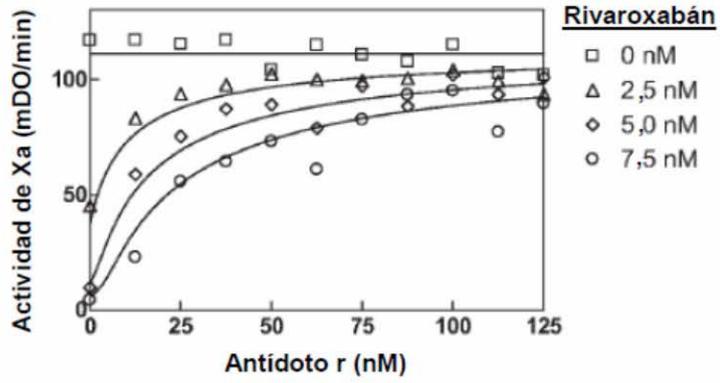


FIG. 23A

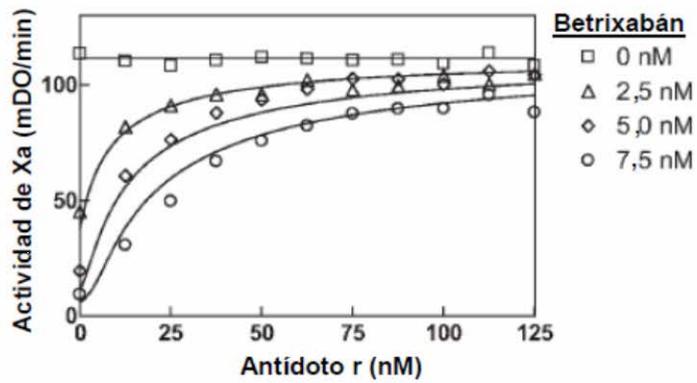


FIG. 23B

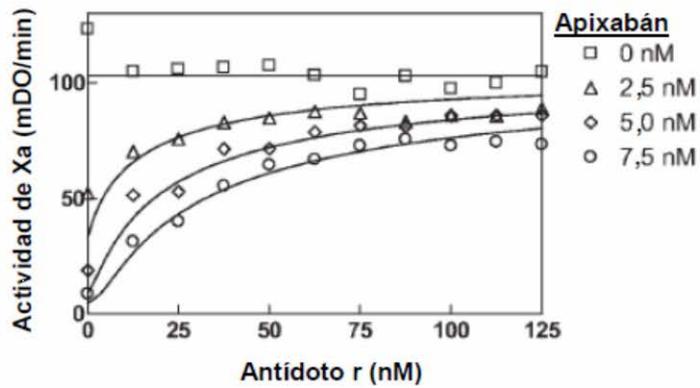


FIG. 23C

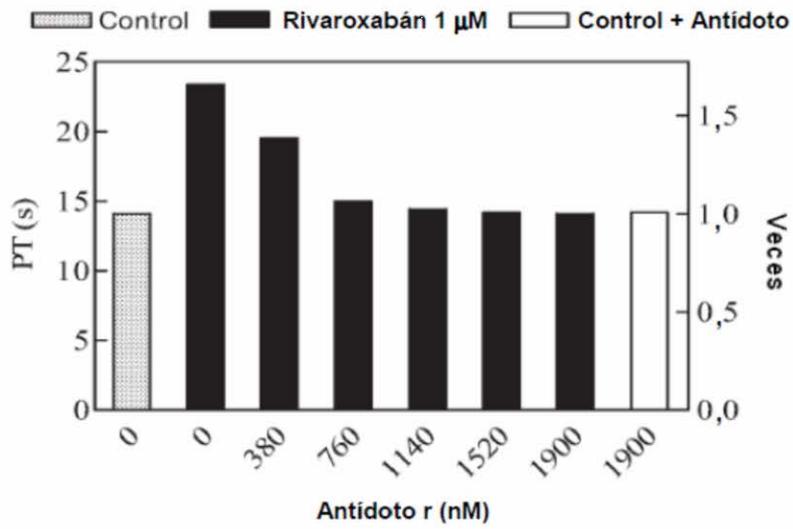


FIG. 24

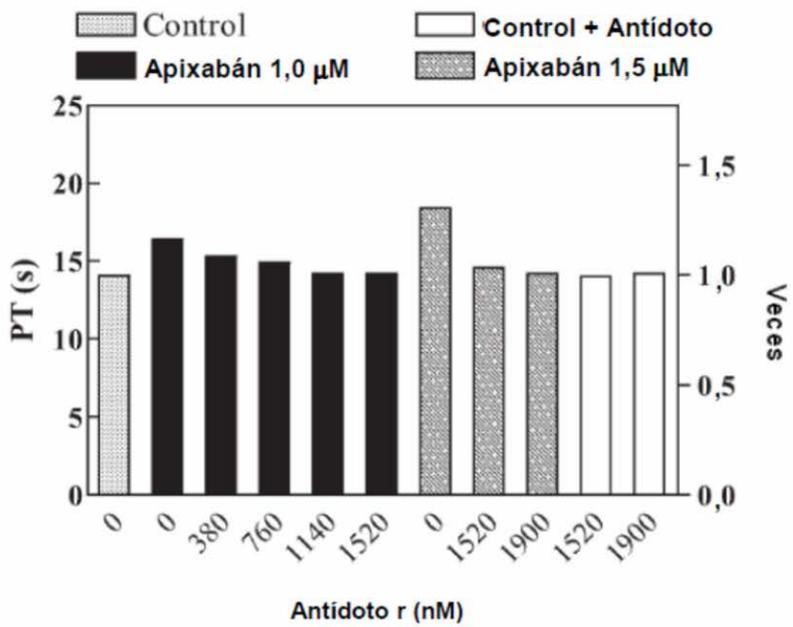


FIG. 25

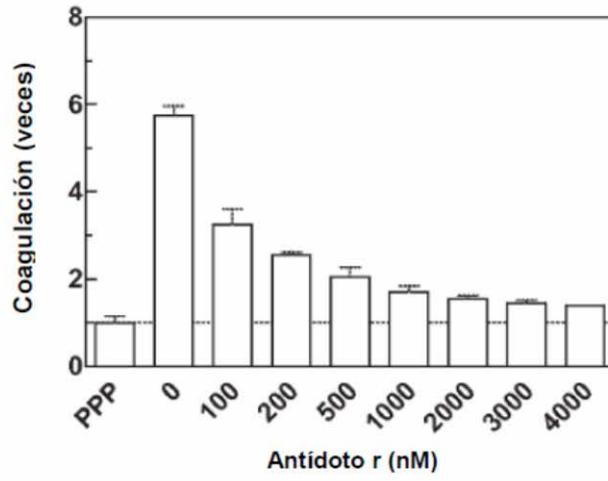


FIG. 26

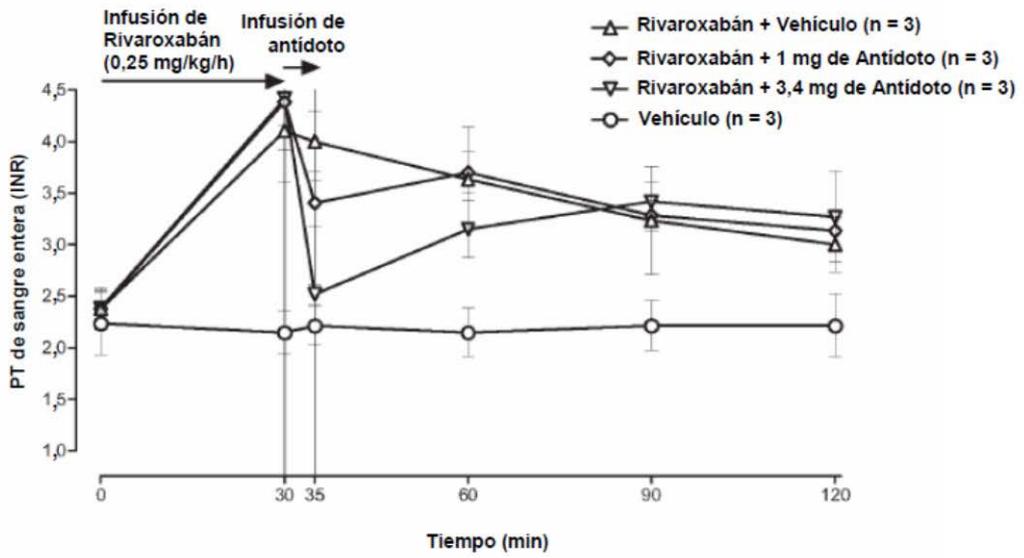


FIG. 27

Concentración en plasma total y sin unir de Rivaroxabán:  
Rivaroxabán (0,25 mg/kg/h, IV) +/- Antidoto (1 y 3,4 mg, IV)  
(n = 3 por grupo)

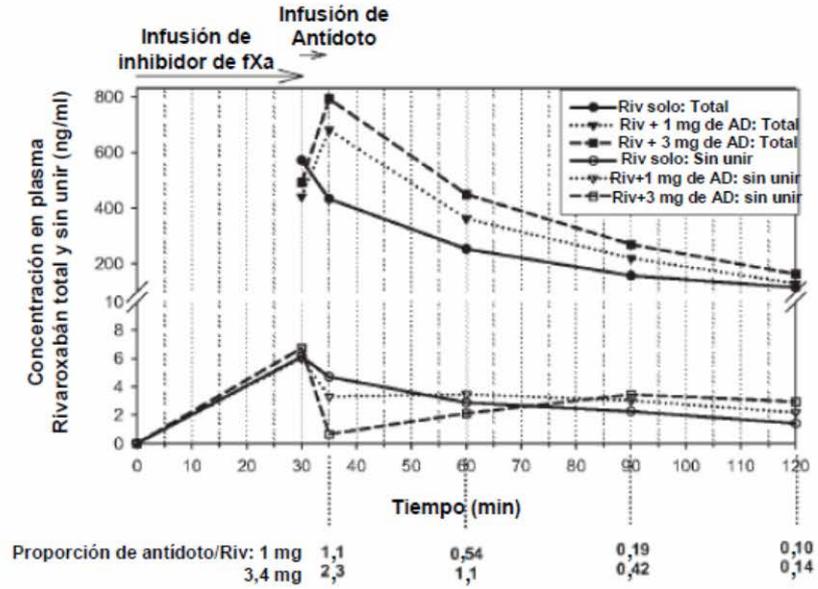


FIG. 28

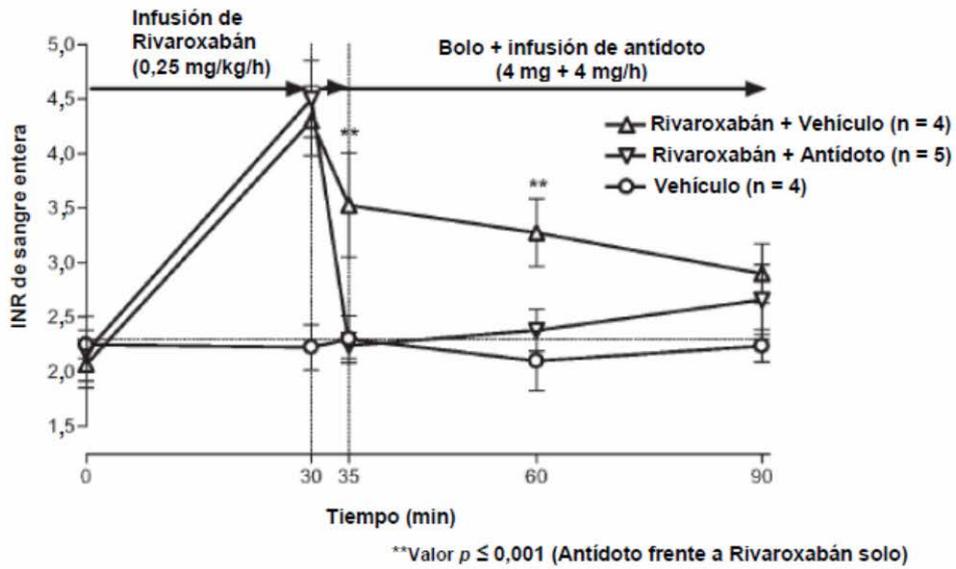


FIG. 29A

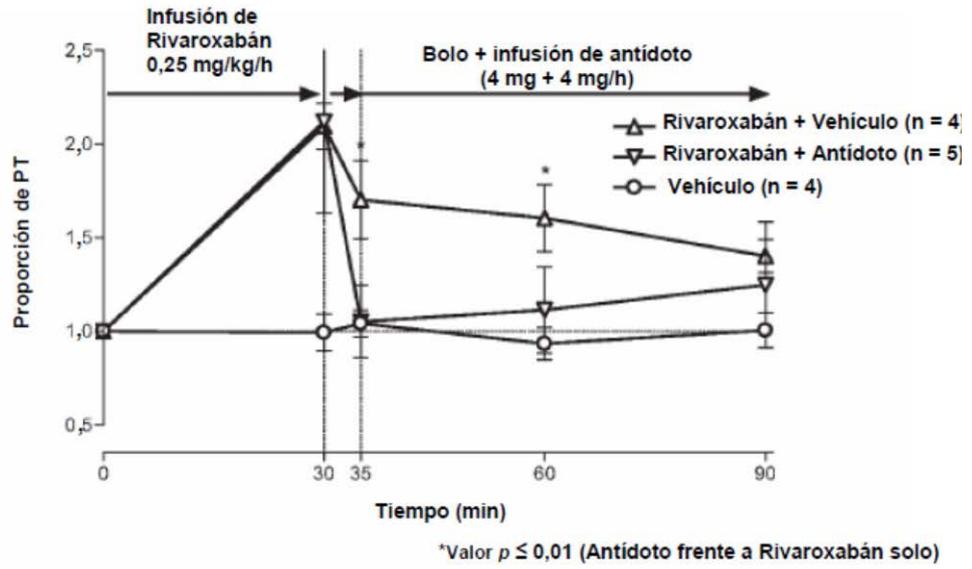


FIG. 29B

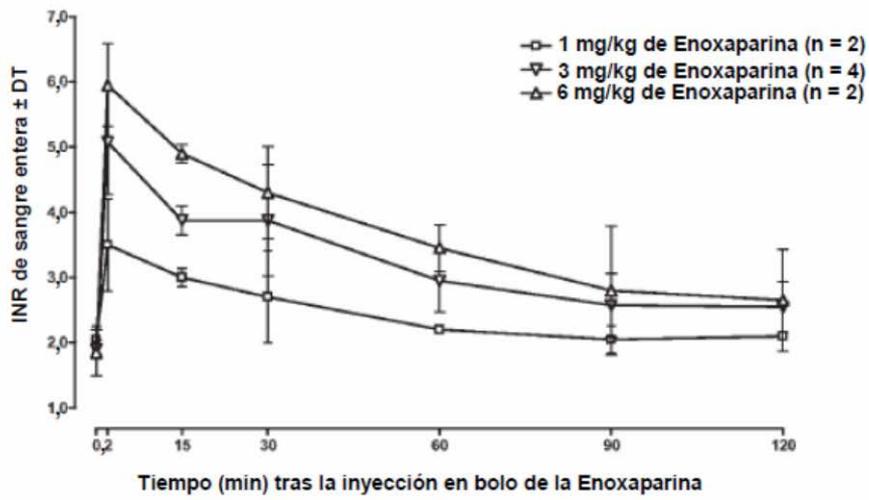
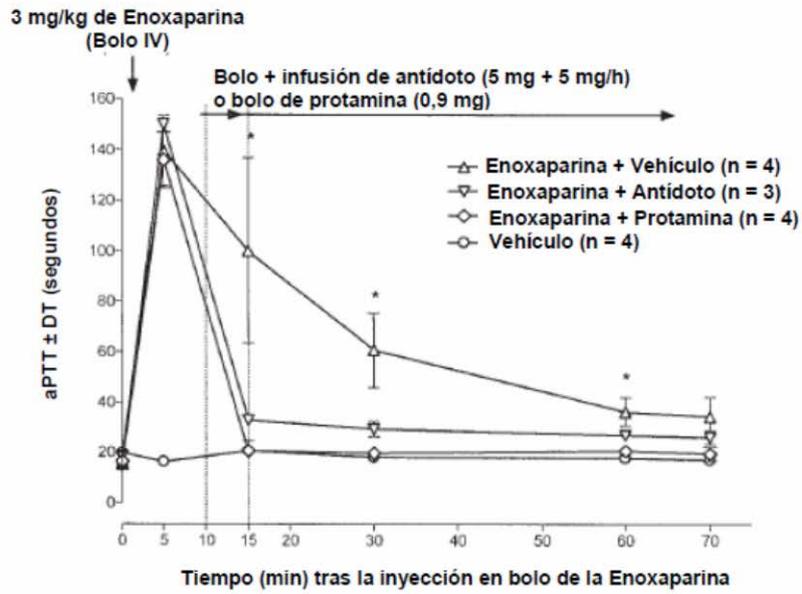
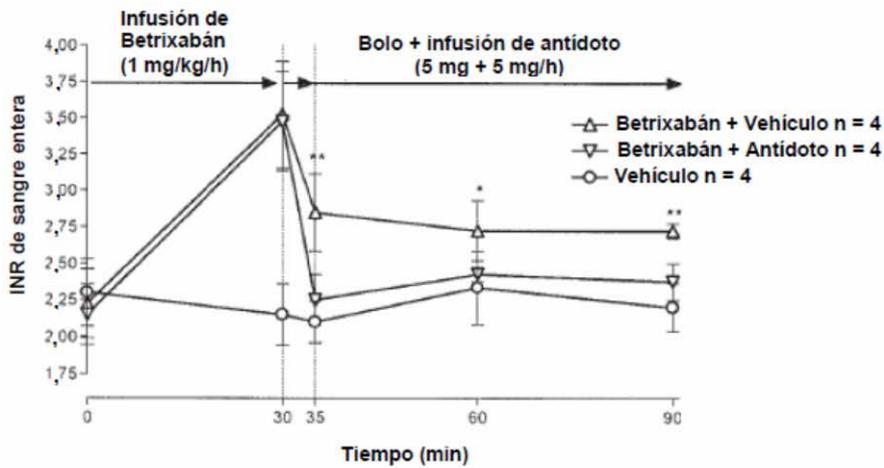


FIG. 30



\*Valor  $p \leq 0,04$  (Enoxaparina + Vehículo frente a Enoxaparina + Antidoto y Enoxaparina + Protamina)

FIG. 31



\*Valor  $p \leq 0,05$  (Betrixabán + Vehículo frente a Betrixabán + Antidoto)

\*\*Valor  $p \leq 0,01$  (Betrixabán + Vehículo frente a Betrixabán + Antidoto)

FIG. 32

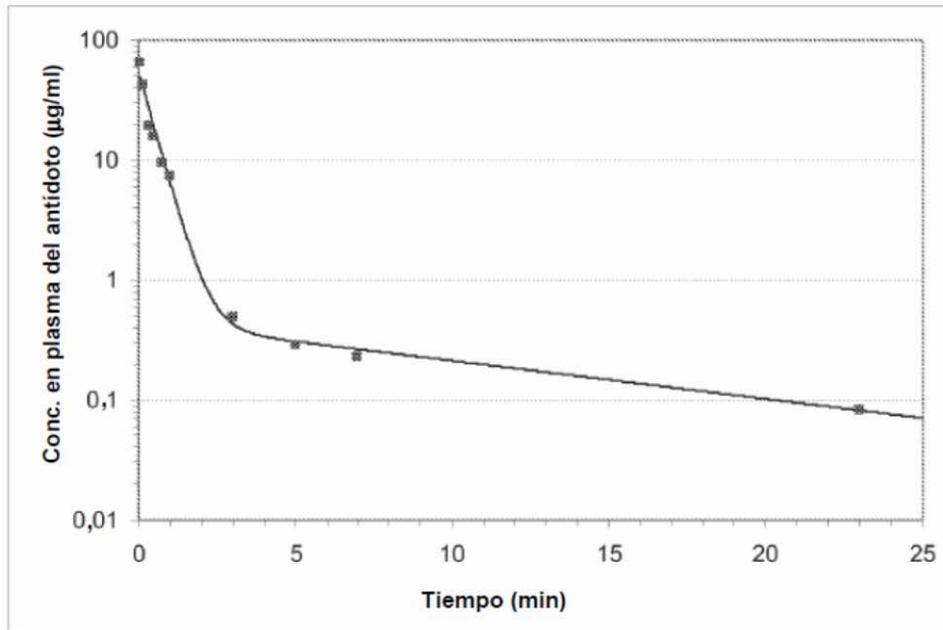


FIG. 33

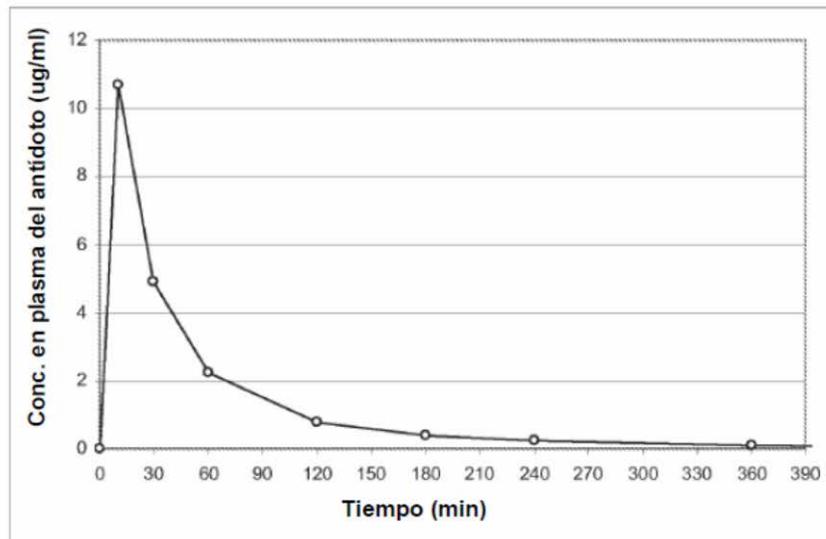


FIG. 34

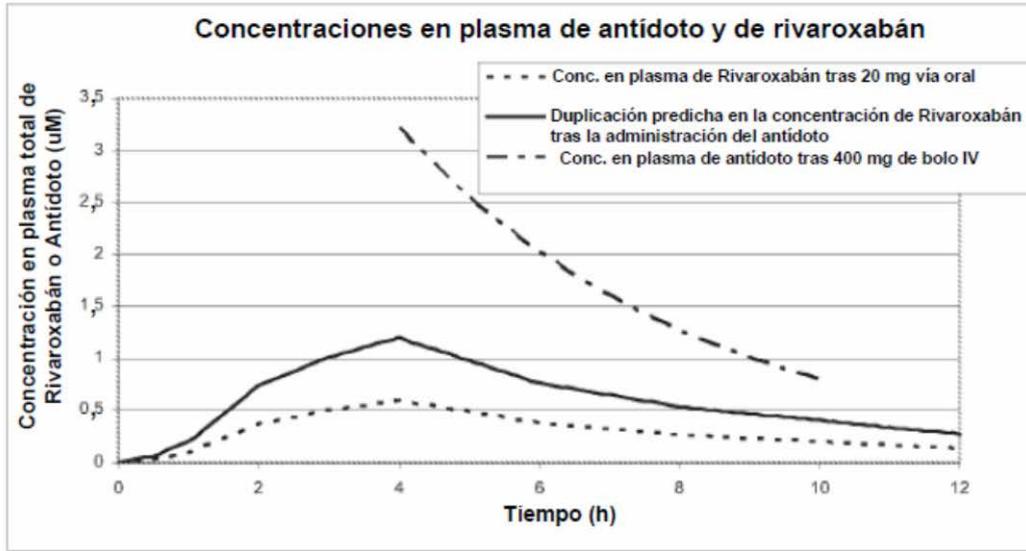


FIG. 35A

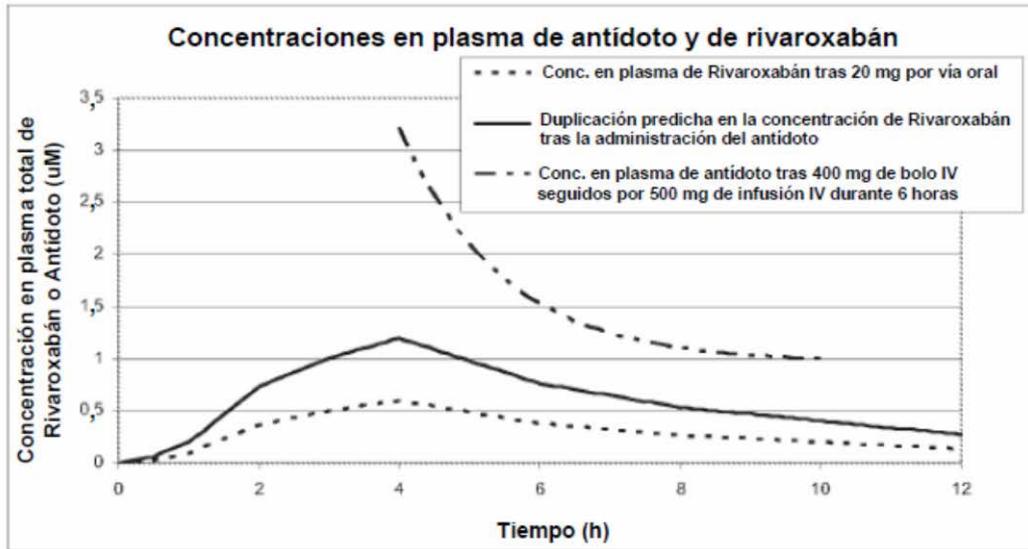


FIG. 35B

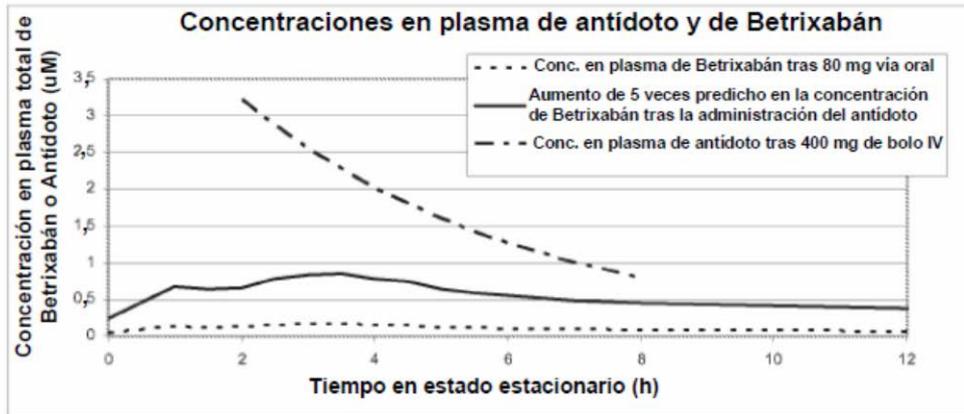


FIG. 36A

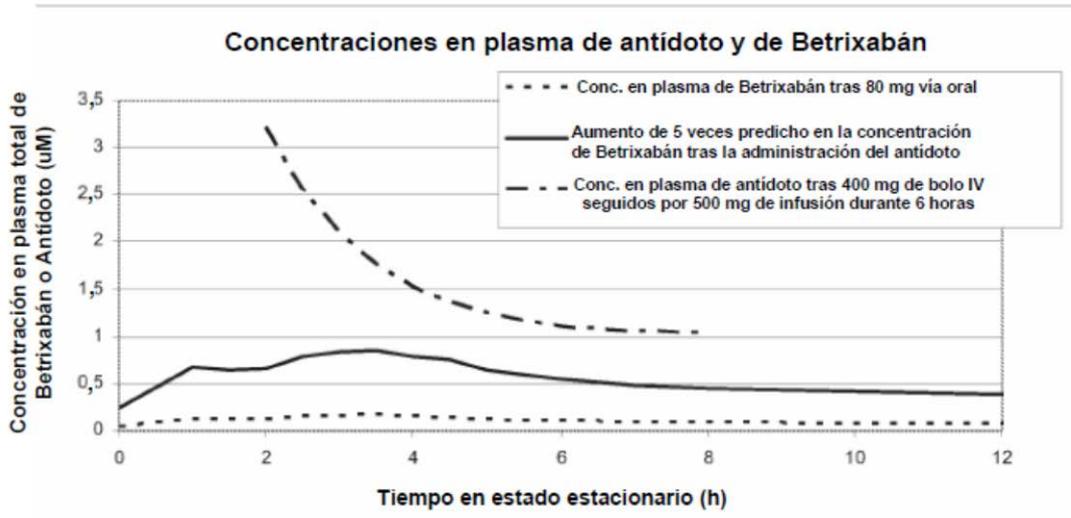


FIG. 36B

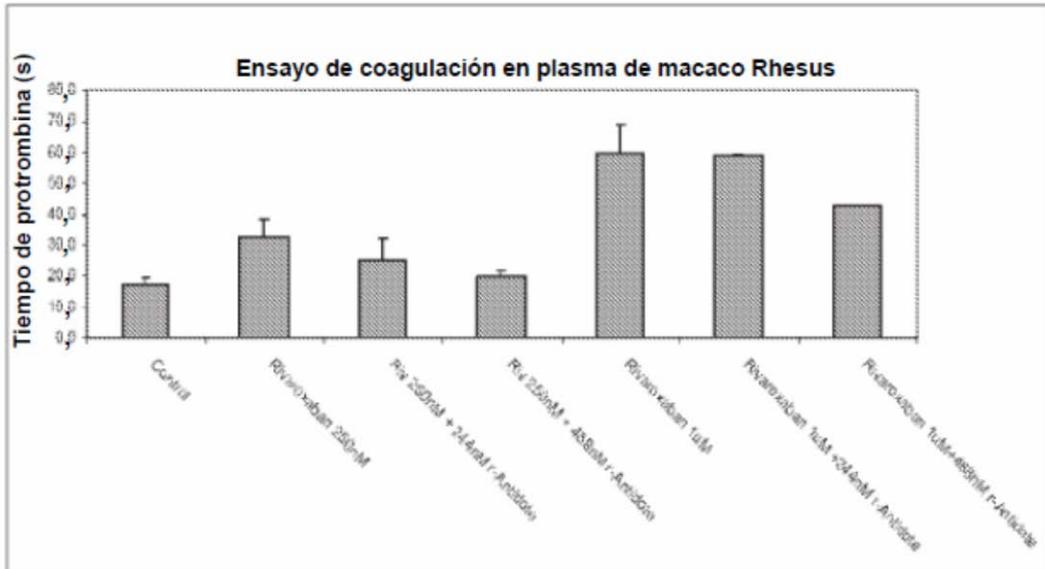


FIG. 37

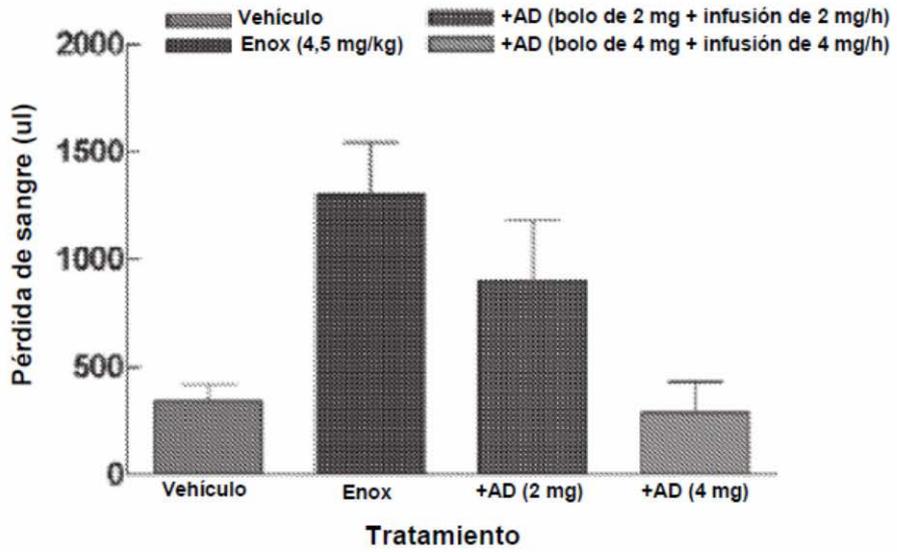


FIG. 38

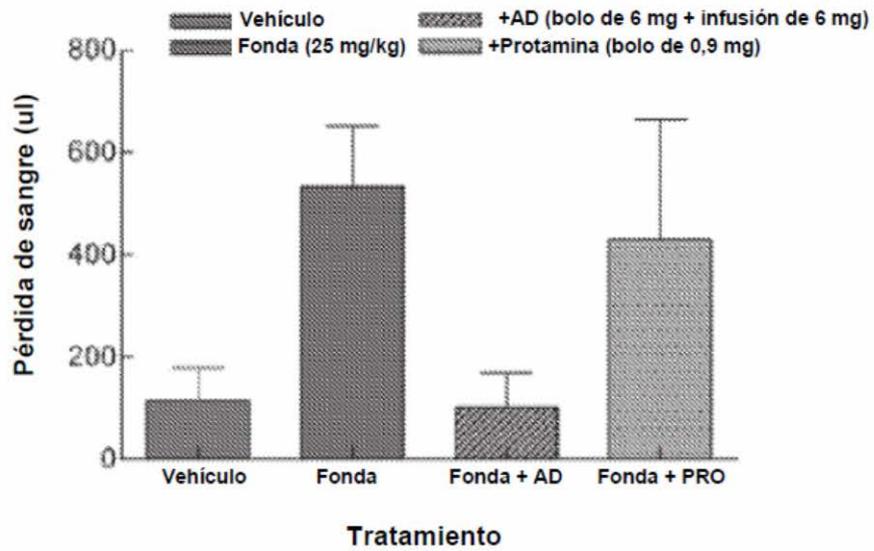


FIG. 39

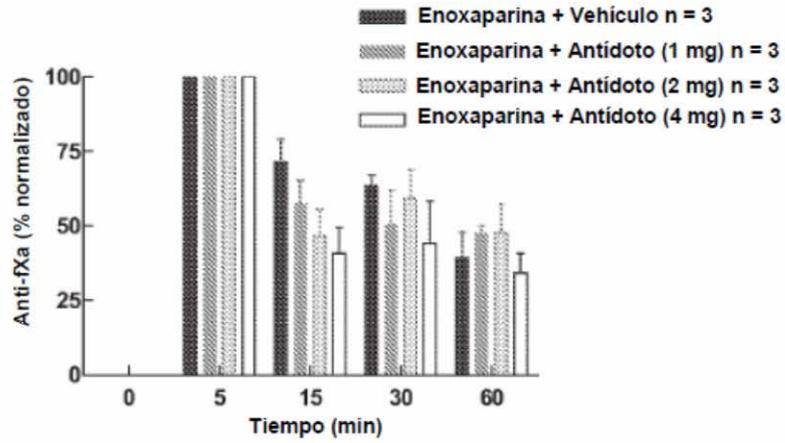
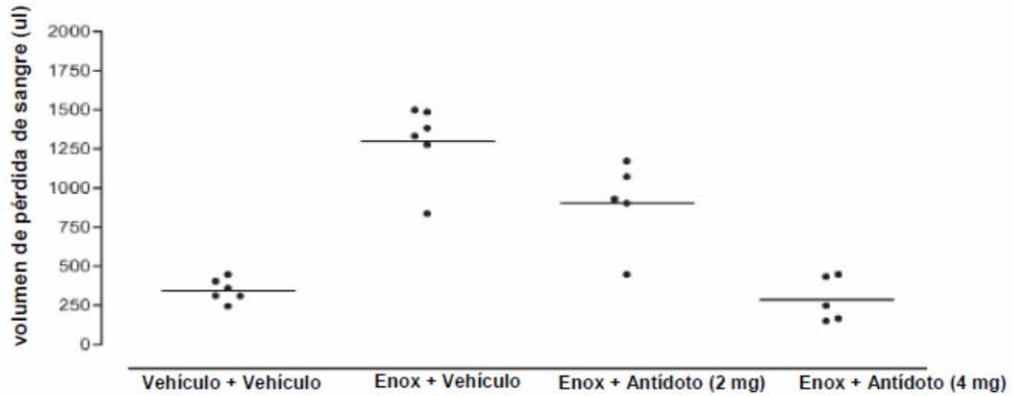


FIG. 40

Pérdida de sangre de rata  
Enoxaparina (4,5 mg/kg, bolo IV) ±  
Antídoto (bolo + infusión)



	Vehículo + Vehículo	Enox + Vehículo	Enox + Antídoto (2 mg)	Enox + Antídoto (4 mg)
Media	343	1300	902	286
Desv. típica	73,0	244	278	143
Valor p (frente a Vehículo+Vehículo)		P<0,0001	0,0010	0,4151
Valor p (frente a Enoxaparina + Vehículo)			0,0324	P<0,0001

2 mg = bolo de 2,03 mg + infusión de 2,03 mg/h  
4 mg = bolo de 4,07 mg + infusión de 4,07 mg/h

FIG. 41

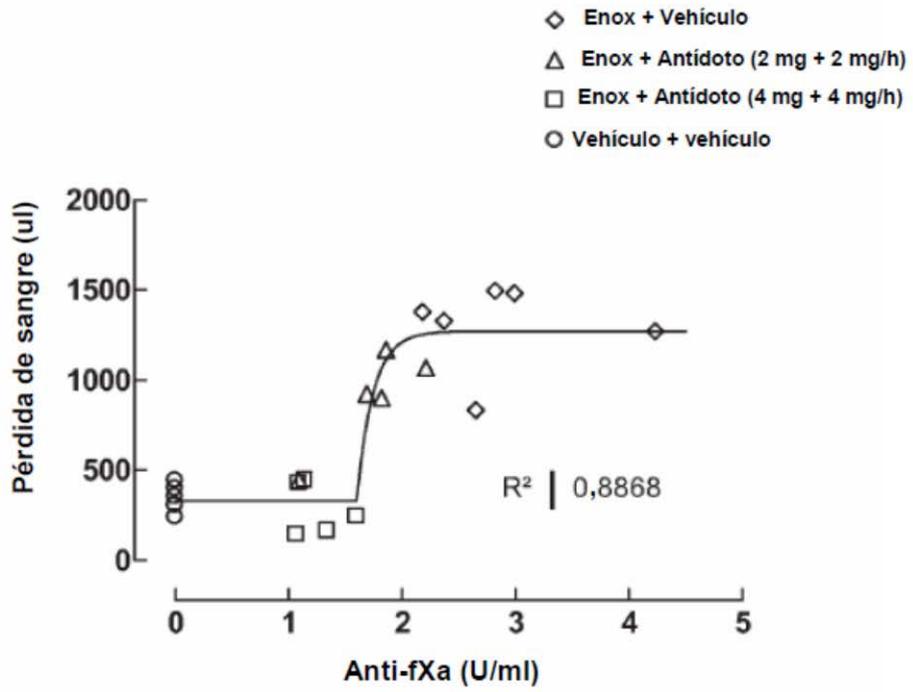


FIG. 42a

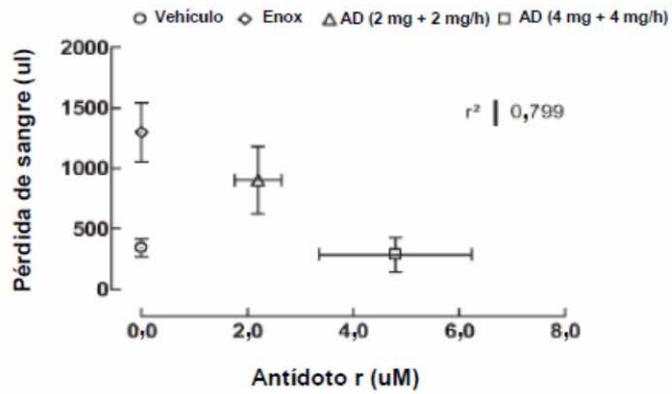


FIG. 42b

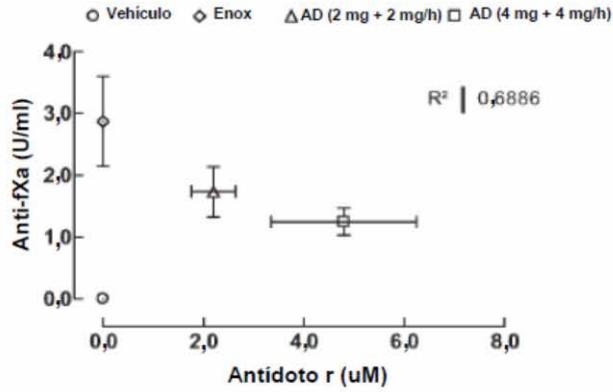
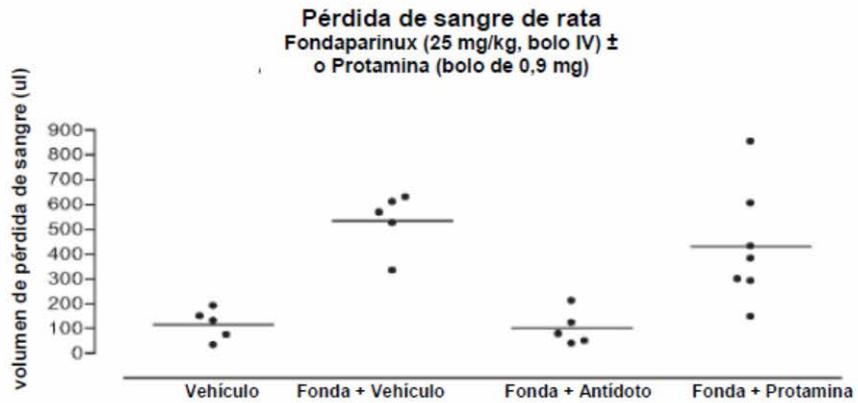


FIG. 42c

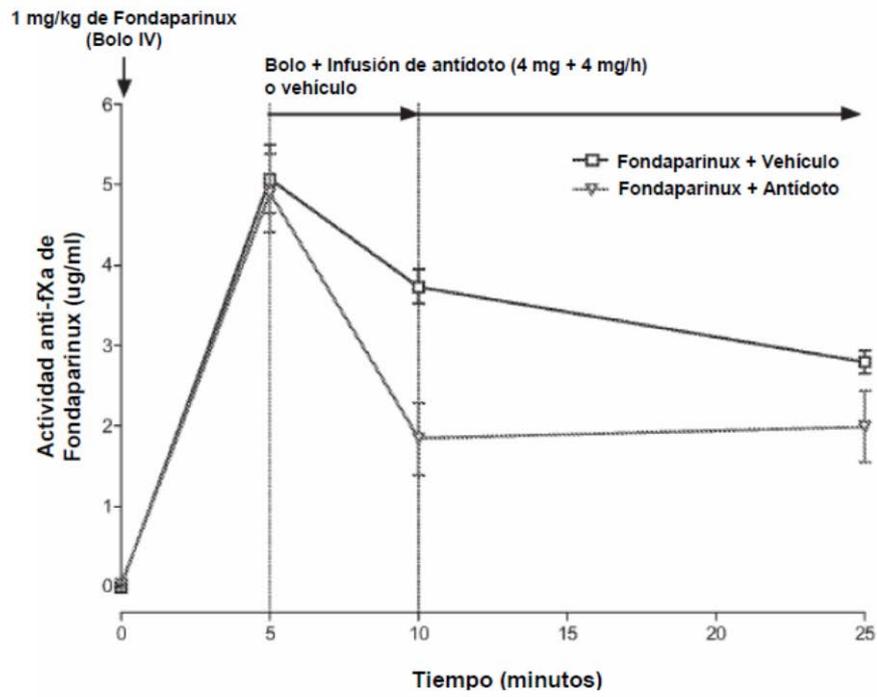


	Vehículo	Fonda + Vehículo	Fonda + Antidoto	Fonda + Protamina
<b>Mínimo</b>	32,9	333	39,2	149
<b>Máximo</b>	191	630	211	854
<b>Media</b>	116	534	101	430
<b>Desv. típica</b>	62,6	119	69,8	234

**Resumen de valor p**

frente a Vehículo	ND	<b>0,0001</b>	0,7200	<b>0,0160</b>
frente a Fonda + Antidoto	ND	ND	<b>0,0001</b>	0,3891
frente a Fonda + Vehículo	ND	ND	ND	<b>0,0129</b>

FIG. 43



Las concentraciones de Fondaparinux se determinaron a partir de la curva patrón en la que 1 U/ml de Fondaparinux = 0,66 UI/ml de Enoxaparina anti-FXa

FIG. 44