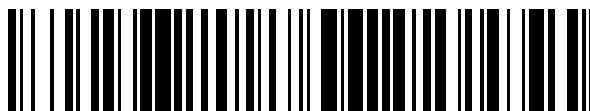


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 935**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2010 PCT/US2010/029064**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.10.2010 WO10117729**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2010 E 10723842 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2414517**

54 Título: **Antídotos para inhibidores del factor Xa y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

30.03.2009 US 164886 P

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

04.04.2017

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 y
CONLEY, PAMELA B.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 607 935 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

Antídotos para inhibidores del factor Xa y procedimientos de uso de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de derivados del factor X (fX) y el factor Xa (fXa) que tienen actividad procoagulante intrínseca reducida o carecen de ella pero también son capaces de unirse a y/o neutralizar inhibidores de fXa actuando de este modo como antídotos para anticoagulantes dirigidos a fXa.

10

Antecedentes de la invención

Los anticoagulantes atienden una necesidad en el mercado en el tratamiento o la prevención de trombosis no deseada en pacientes con una tendencia a formar coágulos de sangre, tales como, por ejemplo, aquellos pacientes que tienen trastornos de coagulación, confinados a periodos de inmovilidad o que se están sometiendo a cirugías médicas. Una de las principales limitaciones de la terapia anticoagulante, sin embargo, es el riesgo de hemorragia asociado con los tratamientos, y limitaciones en la capacidad de invertir rápidamente la actividad anticoagulante en caso de sobredosis o si se requiere un procedimiento quirúrgico urgente. Por lo tanto, antídotos específicos y eficaces para todas las formas de terapia anticoagulante son altamente deseables. Por consideraciones de seguridad, también es ventajoso tener un par anticoagulante-antídoto en el desarrollo de nuevos fármacos anticoagulantes.

15

20

Los pares anticoagulante-antídoto disponibles actualmente para sobreanticoagulación son heparina - protamina y warfarina - vitamina K. Plasma fresco congelado y factor VIIa recombinante (rfVIIa) también se han usado como antídotos inespecíficos en pacientes en tratamiento con heparina de bajo peso molecular, que padecen traumatismo grave o hemorragia grave. (Lauritzen, B. y col., Blood, 2005, 607A-608A). También se describen fragmentos de protamina (patente de Estados Unidos N.º 6.624.141) y pequeños péptidos sintéticos (patente de Estados Unidos N.º 6.200.955) como heparina o antídotos de heparina de bajo peso molecular; y muteínas de trombina (patente de Estados Unidos N.º 6.060.300) como antídotos para inhibidores de trombina. Intermedios y derivados de protrombina se han descrito como antídotos para hirudina y trombina sintética (patentes de Estados Unidos N.º 5.817.309 y 6.086.871).

25

30

Una forma prometedor de terapia anticoagulante se dirige al factor Xa (fXa), y de hecho, varios inhibidores de fXa directos están actualmente en diferentes fases de desarrollo clínico para uso en terapia anticoagulante. Se ha aprobado un inhibidor directo de fXa, Xarelto™ (rivaroxabán), para su uso clínico en la Unión Europea y Canadá para la prevención de la tromboembolia venosa en pacientes de cirugía ortopédica. Muchos de estos son moléculas pequeñas. Aunque estos nuevos inhibidores de fXa se muestran prometedores para el tratamiento, aún se necesitan antídotos específicos y eficaces. En los casos de sobreanticoagulación o requisito de cirugía en pacientes tratados con estos inhibidores de fXa, puede requerirse un agente para neutralizar sustancialmente el inhibidor o inhibidores de fXa administrados y restaurar la hemostasia normal.

35

40

Los agentes disponibles actualmente, tales como el factor VIIa recombinante (rfVIIa), están mecánicamente limitados y son inespecíficos para la inversión de inhibidores de fXa y, por lo tanto, opciones mejoradas para el facultativo son altamente deseables. En estudios en ser humano, rfVIIa se ha usado para invertir el efecto de inhibidores de fXa dependientes de antitrombina III indirectos, tales como fondaparinux e idraparinux (Bijsterveld, NR y col., Circulation, 2002, 106: 2550-2554; Bijsterveld, NR y col., British J. of Haematology, 2004(124): 653-658). El mecanismo de acción del factor VIIa (fVIIa) es actuar con el factor tisular para convertir el factor X (fX) presente en la circulación sanguínea en fXa para restaurar la hemostasia normal el pacientes. Este modo de acción dicta necesariamente que la concentración potencial más elevada de fXa que podría alcanzarse para neutralizar inhibidores de fXa dirigidos al sitio activo está limitada por la concentración plasmática circulante de fX. Dado que la concentración plasmática circulante de fX es 150 nanomolar ("nM"), la cantidad máxima de fXa producida por este modelo sería de 150 nM. Por lo tanto, el potencial de uso de rfVIIa para invertir el efecto de inhibidores de fXa directos está mecánicamente limitado. Las concentraciones terapéuticas descritas de inhibidores de fXa de molécula pequeña tales como rivaroxaban han sido mayores (aproximadamente 600 nM, Kubitza D, y col., Eur. J. Clin. Pharmacol., 2005, 61: 873-880) que la cantidad potencial de fXa generada por rfVIIa. El uso de rfVIIa para la inversión de niveles terapéuticos o supraterapéuticos de anticoagulación mediante inhibidor de fXa proporcionaría, por lo tanto, niveles inadecuados de eficacia. Tal como se muestra en la figura 4, el uso de rfVIIa tiene un efecto limitado en la neutralización de la actividad anticoagulante de un inhibidor del factor Xa Betrixaban (descrito a continuación). El fVIIa recombinante mostraba una actividad de antídoto sensible a la dosis de 50 nM a 100 nM, pero el efecto se estabilizaba entre 100 nM y 200 nM, indicando que su efecto de antídoto está limitado por factores diferentes de su concentración. En todas las concentraciones de rfVIIa ensayadas, Betrixaban seguía mostrando una inhibición en respuesta a la dosis de fXa, hasta aproximadamente el 75% de inhibición a una concentración de 250 nM. Esta observación es coherente con el mecanismo de acción propuesto de fVIIa. Esto también está apoyado por estudios que muestran que rfVIIa no invertía completamente el efecto inhibidor de fondaparinux sobre los parámetros de generación de trombina y activación de protrombina. (Gerotiafas, GT, y col., Thrombosis & Haemostasis 2204(91): 531-537).

45

50

55

60

65

El fXa activo exógeno no puede administrarse directamente a un sujeto de una manera similar a rFVIIa. A diferencia de rFVIIa, que tiene una muy baja actividad procoagulante en ausencia de su cofactor, el factor tisular, el fXa nativo es una potente enzima y tiene un riesgo potencial de causar trombosis. Por lo tanto, el uso de rFVIIa o fXa activo como antídoto para una terapia anticoagulante de fXa presenta desventajas.

Por lo tanto, existe una necesidad de agentes antídoto mejorados que no causen trombosis no deseada y que sean eficaces en neutralizar sustancialmente la actividad anticoagulante de un inhibidor de fXa en caso de una sobredosis del inhibidor de fXa o en caso de que sea necesario restaurar la hemostasia normal para prevenir o detener una hemorragia.

Resumen de la invención

Se ha descubierto ahora que la administración de derivados modificados de proteínas de fX son útiles como antídotos para anticoagulantes dirigidos a fXa. Los derivados modificados de proteínas de fX no compiten con fXa para ensamblarse en el complejo de protrombinasa, sino que en su lugar se unen a y/o neutralizan sustancialmente los anticoagulantes, tales como inhibidores de fXa. Los derivados útiles como antídotos se modifican para reducir o eliminar actividades procoagulante y anticoagulante intrínsecas, mientras conservan la capacidad de unirse a los inhibidores. Se contempla que los derivados de la invención pueden incluir modificar el sitio activo y cambiar o eliminar todo el dominio Gla de fXa. Se contempla, además, que la modificación del dominio Gla reduce o elimina el efecto anticoagulante del derivado de fX sobre la hemostasia normal, debido a que se sabe que un fXa de longitud completa modificado en el sitio activo es un anticoagulante.

Por tanto, en una realización, la invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende

(A)

(i) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 12 o 13 que comprende adicionalmente una modificación en el bucle de autólisis de la cadena pesada de la SEQ ID NO. 12 o 13 o

(ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 12 o 13, y que comprende adicionalmente una o más mutaciones seleccionadas entre el grupo que consiste en Arg366Q/A, Lys370Q/A, Arg372Q/A, Arg376Q/A, y combinaciones de los mismos; en el que el bucle de autólisis corresponde a los restos de aminoácidos 366-376 de la SEQ ID NO. 1;

(B) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 20 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 20, en la que el polipéptido no contiene el extremo C-terminal del factor Xa de tipo silvestre después del resto de aminoácido que corresponde a Arg429 de la SEQ ID NO. 3;

(C) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 21 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 21, en la que el polipéptido tiene Gln en el resto de aminoácido correspondiente a Arg429 de la SEQ ID NO. 3; o

(D) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 22 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 22, en la que el polipéptido tiene Gln en el resto de aminoácido que corresponde a Arg429 de la SEQ ID NO. 3, y tiene Ala en el resto de aminoácido que corresponde a Thr443 de la SEQ ID NO. 3,

en el que el polipéptido (a) tiene una actividad procoagulante reducida en comparación con el factor Xa de tipo silvestre, (b) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa, y (c) no se ensambla en un complejo de protrombinasa.

Las modificaciones adicionales de la divulgación incluyen, pero no se limitan a lo siguiente: la totalidad o parte del péptido de activación se elimina en un extremo N de una cadena pesada; el derivado tiene una modificación de aminoácido que impide la escisión de un péptido β ; se elimina un péptido β ; modificación de un dominio de tipo EGF; el derivado comprende un péptido señal; hay una mutación en el bucle de autólisis del factor Xa de la cadena pesada; y/o el enlazador que conecta la cadena ligera al péptido de activación está modificado.

El derivado conserva las características estructurales necesarias para unirse al anticoagulante (o inhibidor de fXa) dirigido a fXa. Mediante la unión del derivado, directa o indirectamente, al inhibidor, el inhibidor es sustancialmente neutralizado.

En un aspecto, la invención proporciona una composición de la invención para su uso en un método de neutralización o inversión de la anticoagulación en un sujeto sometido a tratamiento anticoagulante con un factor inhibidor de Xa que necesita cesar la anticoagulación o que padece sangrado. El derivado tiene ya sea una actividad procoagulante reducida o ninguna. El derivado de la invención se une selectivamente a, e inhibe, un inhibidor del factor Xa administrado de forma exógena neutralizando sustancialmente de este modo la actividad anticoagulante de un inhibidor de fXa. Este método contempla métodos tanto *in vitro* como *in vivo*. Se contempla adicionalmente que las composiciones de la invención son también para su uso en la prevención o la reducción del sangrado en un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa.

Debe entenderse que los derivados contemplados por esta invención no son factor VIIa derivado de plasma, factor VIIa recombinante, plasma fresco congelado, concentrados del complejo de protrombina, o sangre completa.

5 Un aspecto de la presente divulgación es el uso de derivados del factor X y composiciones que los contienen para el tratamiento de pacientes que han recibido o están recibiendo terapia de sobreanticoagulación con un inhibidor del factor Xa o pacientes a los que se había administrado previamente un inhibidor del factor Xa y que necesitan entonces hemostasia, tal como la requerida por cirugía opcional o de urgencia. Los derivados de fX se distinguen del fX o fXa de origen natural en que tienen actividad procoagulante intrínseca reducida o eliminada y no interferirán en la función fisiológica de fXa en la hemostasia, mientras siguen siendo capaces de unirse a y sustancialmente neutralizar inhibidores de fXa.

15 En otro aspecto, el polipéptido de la invención se coadministra con un agente capaz de prolongar la semivida en plasma (o semivida en circulación) del derivado del factor X. En otro aspecto más, el antídoto está conjugado con un resto para prolongar su semivida en plasma.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen el polipéptido de la invención que se une a (y/o sustancialmente neutraliza) el inhibidor del factor Xa pero no se ensambla en el complejo de protrombinasa. La composición farmacéutica comprende opcionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable.

20 En otro aspecto, esta invención proporciona un kit que comprende un inhibidor de fX para uso anticoagulante y un polipéptido de la invención para uso cuando se necesita neutralización sustancial de la actividad anticoagulante del inhibidor de fXa.

25 Una realización de la divulgación se refiere a un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 12, 13, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 o un polipéptido que tiene al menos el 80 % de homología a 12, 13, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25. Los polipéptidos incluidos la invención incluyen tanto el polipéptido de cadena única (es decir, antes de que el polipéptido se excrete de la célula), así como el polipéptido de dos cadenas (es decir, después de la escisión en el enlazador después de que se secreta de la célula).

30 Se contempla que los polipéptidos de las SEQ ID NO. 19-25 mejoren la expresión general del antídoto funcional y/o reduzcan la heterogeneidad en el extremo C de la cadena pesada.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un transportador y un polipéptido que se acaba de describir.

35 También se proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido que se acaba de describir.

40 En el presente documento se proporciona, además, un conjugado peptídico que comprende un transportador enlazado covalente o no covalentemente a un polipéptido que se acaba de describir. El transportador puede ser un liposoma, una micela, un polímero farmacéuticamente aceptable, o un transportador farmacéuticamente aceptable.

45 Esta divulgación también se refiere a un anticuerpo que se une a un polipéptido que se acaba de describir. El anticuerpo es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. También está proporcionado por la divulgación un fragmento biológicamente activo del anticuerpo. El anticuerpo puede estar etiquetado de forma detectable. El anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) también es proporcionado por la divulgación como parte de una composición que comprende además un transportador.

50 En una realización de la divulgación, se proporciona un complejo anticuerpo-peptido que comprende el anticuerpo de la invención y un polipéptido que se une específicamente al anticuerpo. El polipéptido es el polipéptido contra el que se genera el anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

55 En otra realización, se proporciona un procedimiento para preparar un polipéptido de la invención que comprende expresar un polinucleótido que codifica el polipéptido en una célula huésped procariota o eucariota. En una realización, la célula huésped es una célula eucariota y en particular es una célula de ovario de hámster chino. En otra realización, el polipéptido está aislado.

60 En otra realización más de la divulgación, se proporciona una célula huésped procariota o eucariota aislada que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención. En una realización de la divulgación, la célula huésped está en una composición que comprende además un transportador.

65 En aún otra realización más de la divulgación, se proporciona un procedimiento de prevención o reducción de hemorragia en un sujeto sometido a terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición que comprende un polipéptido de la invención y un transportador. Se proporciona, además, la composición de la invención para uso en un procedimiento de unión selectivamente e inhibición de un inhibidor del factor Xa administrado de forma exógena en un sujeto sometido a

terapia anticoagulante que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición recién descrita.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 muestra esquemáticamente la estructura del dominio del factor X humano (SEQ ID NO. 1) mostrada en la tabla 1 tal como se describe en Leytus y col., Biochem., 1986, 25, 5098-5102. La SEQ ID NO. 1 es la secuencia de aminoácidos de fX humano codificada por la secuencia de nucleótidos de fX humano (SEQ ID NO. 2) tal como se muestra en la tabla 2 conocida en la técnica anterior. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos traducida se describe en Leytus y col., Biochem., 1986, 25, 5098-5102 y puede encontrarse en el GenBank, "NM_000504" en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=89142731>>. La numeración de aminoácidos en 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 la SEQ ID NO. 1) seguida por secuencias correspondientes a la cadena ligera de fX (LC) (aminoácidos 41 a 179 de la SEQ ID NO. 1), el triplete RKR (aminoácidos 180 a 182 de la 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 la SEQ ID NO. 1) y el dominio catalítico (aminoácidos 235 a 488 de la SEQ ID NO. 1).

20 La figura 2 (SEQ ID NO. 3) muestra la secuencia de aminoácidos de factor X humano maduro. La numeración de aminoácidos en esta figura se basa en la secuencia fX madura comenzando desde el extremo N de la cadena ligera de fX. El factor X circula en el plasma como una molécula bicaténaria enlazada por un puente disulfuro. La cadena ligera (LC) tiene 139 residuos de aminoácidos (aminoácidos 41 a 179 de la SEQ ID NO. 1) y contiene el dominio rico en ácido γ -carboxiglutámico (Gla) (aminoácidos 1-45 de la SEQ ID NO. 3), incluyendo un corto apilamiento aromático (AS) (aminoácidos 40-45 de la SEQ ID NO. 3), seguido por dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (EGF1: aminoácidos 46-84, EGF2: aminoácidos 85-128 de la 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 la SEQ ID NO. 3) seguido por el dominio catalítico (aminoácidos 195-448 de la SEQ ID NO. 3). Los equivalentes de tríada catalítica a H57-D102-S195 en numeración de quimotripsina están ubicados en His236, Asp282 y Ser379 en la secuencia fX y están subrayados (aminoácidos 236, 282 y 379 de la SEQ ID NO. 3).

35 La figura 3 muestra esquemáticamente la estructura del dominio de factor X humano maduro mostrada en la figura 2. La numeración de aminoácidos en esta figura se basa en la secuencia de fX maduro. Los sitios de escisión para digestión con quimotripsina para eliminar el fragmento que contiene el dominio Gla (aminoácidos 1-44 de la SEQ ID NO. 3) y activación de fX para eliminar el péptido de activación están resaltados. La digestión con quimotripsina de fXa da como resultado un fXa sin dominio Gla que carece de los residuos de aminoácidos 1-44 (SEQ ID NO. 4).

40 La figura 4 muestra el efecto de concentraciones variables de rFVIIa (denominado VIIa en la figura) en presencia de factor tisular (FT) sobre la actividad anticoagulante de un inhibidor de fXa Betrixaban (descrito a continuación) en un ensayo de generación de trombina (expresada como unidades de fluorescencia relativa (RFU) tal como se describe en el ejemplo 2). Los datos muestran que una combinación de rFVIIa y factor tisular fue incapaz de neutralizar completamente la actividad anticoagulante de un inhibidor de fXa, Betrixaban, en concentraciones hasta 200 nM de rFVIIa.

45 La figura 5 muestra que anhidro-fXa con su dominio Gla intacto invierte la inhibición de fXa por Betrixaban en un sistema purificado que comprende fXa activo y Betrixaban (círculo abierto), mientras que anhidro-fXa en solitario tiene actividad procoagulante despreciable (triángulo abierto) en comparación con fXa activo. La actividad cromógena de fXa se normalizó respecto a fXa activa en ausencia de cualquier inhibidor (cuadrado abierto). Esto se describe más exhaustivamente en el ejemplo 4. Los datos muestran que anhidro-fXa es inactivo hacia sustrato fXa aunque conserva la afinidad de unión al inhibidor de fXa.

50 La figura 6 muestra que el anhidro-fXa con dominio Gla intacto en la figura 5 es un potente inhibidor en ensayo de generación de trombina en plasma (expresada como unidades de fluorescencia relativa (RFU)) (tal como se describe en el ejemplo 2). Éste inhibía casi completamente la generación de trombina a aproximadamente 115 nM. Los datos muestran que anhidro-fXa sin modificación del dominio Gla no es adecuado para uso como un antídoto para el inhibidor de fXa.

55 La figura 7 muestra la comparación de la actividad de coagulación de 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 digestión con quimotripsina. Tal como se muestra en esta figura, el tiempo de coagulación (cambio de DO405) se retrasó significativamente después de que el fXa se hubiera digerido por quimotripsina durante 15 minutos y no se observó coagulación durante hasta 20 minutos cuando el fXa se digirió durante 30 minutos. Este resultado se usó también para establecer condiciones para digestión con quimotripsina de anhidro-fXa dado que no tienen ninguna actividad que pueda ser monitorizada durante la digestión. Esto se describe más exhaustivamente en el ejemplo 3.

La figura 8 muestra la afinidad de unión de des-Gla anhidro-fXa por un inhibidor del factor Xa Betrixaban tal como se describe en el ejemplo 4. Los datos muestran que des-Gla anhidro-fXa, preparado mediante digestión quimotróptica de anhidro-fXa para eliminar el fragmento que contiene el dominio Gla (residuos 1-44), es capaz de unirse a Betrixaban con afinidad similar a fXa nativo (fXa: $K_i=0,12$ nM, des-Gla anhidro-fXa: $K_d=0,32$ nM).

La figura 9 muestra la inversión de la actividad anticoagulante de concentraciones variables de Betrixaban mediante la adición de un concentrado de 680 nM del antídoto (des-Gla anhidro-fXa) en un ensayo de generación de trombina del ejemplo 2. A la concentración de 680 nM, des-Gla anhidro-fXa fue capaz de producir restauración sustancialmente completa de actividad de fXa.

La figura 10 muestra la inversión de la actividad anticoagulante de 250 nM de Betrixaban mediante concentraciones variables del antídoto (des-Gla anhidro-fXa) en ensayos de prolongación de la coagulación usando reactivo de aPTT en un formato de placa de 96 pocillos (tal como se describe en el ejemplo 3). Los datos muestran que el tiempo de coagulación era comparable al del plasma pobre en plaquetas (PPP) de control cuando se usaron aproximadamente 608 nM del antídoto para neutralizar 250 nM del inhibidor de fXa Betrixaban.

La figura 11 muestra el efecto sobre la actividad anticoagulante de enoxaparina (0,3125 - 1,25 U/ml) mediante 563 nM del antídoto (des-Gla anhidro-fXa) en ensayos de prolongación de la coagulación usando un reactivo de aPTT en un formato de placa de 96 pocillos, expresado como cambios en veces después de la normalización. El protocolo de ensayo se describe en el ejemplo 3. Los datos muestran que la adición de 563 nM del antídoto neutralizaba significativamente la actividad de una heparina de bajo peso molecular, enoxaparina.

La figura 12 muestra el efecto del antídoto, des-Gla anhidro-fXa, sobre la actividad de trombina (5 nM) y su inhibición por 50 nM de argatroban, un inhibidor de trombina específico, en un ensayo cromógeno. El antídoto del inhibidor de fXa no afecta de forma detectable a la actividad trombina o su inhibición por el inhibidor específico argatroban a concentraciones hasta 538 nM. Esto se describe más exhaustivamente en el ejemplo 14.

La figura 13 muestra el efecto sobre la actividad anticoagulante de Betrixaban 400 nM mediante concentraciones variables del antídoto, des-Gla anhidro-fXa, en un ensayo aPTT usando un temporizador de coagulación estándar. El protocolo de ensayo se describe en el ejemplo 3. Los datos muestran que el antídoto del inhibidor de fXa sustancialmente invierte la inhibición de fXa por 400 nM de Betrixaban. Se estimó que la CE50 del antídoto era de aproximadamente 656 nM con Betrixaban 400 nM.

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. ADN plasmídico se linealizó y se transfirió en células CHO dhfr(-). Las células se seleccionaron usando medios deficientes en tetrahidrofolato (HT) más metotrexato (MTX). Se criaron clones estables para expresión de proteínas elevada mediante ELISA. El mutante triple de fXa se produjo en medio libre de suero y se purificó mediante combinación de columnas de intercambio iónico y afinidad. La numeración en el mapa se basaba en la secuencia de polinucleótidos que codifica fX humano, 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 en toda la solicitud y más particularmente, en el ejemplo 7. Los cebadores utilizados para construir el polipéptido que codifica el mutante triple r-Antídoto se enumeran en la Tabla 28.

La figura 15A muestra una transferencia de Western de r-Antídoto purificado mediante intercambio iónico y purificación por afinidad. Tras la reducción del puente disulfuro que conecta las cadenas ligera y pesada, la cadena pesada de r-antídoto migra a un peso molecular esperado similar al del fXa derivado de plasma. La delección de 6-39 aa en el dominio Gla de fXa mutante da como resultado una banda de peso molecular más bajo de la cadena ligera de r-antídoto en comparación con fXa normal. La figura 15B y la figura 15C muestran un SD-PAGE y una transferencia de Western del mutante triple r-Antídoto purificado mediante intercambio iónico y purificación por afinidad seguidos de cromatografía de exclusión por tamaño.

La figura 16 muestra el nivel en plasma de Betrixaban en ratones ($n=7-10$ por grupo) después de administración oral de Betrixaban en solitario (15 mg/kg), o Betrixaban (15 mg/kg) seguido por inyección intravenosa (300 μ g, IV) de antídoto derivado de plasma (pd-antídoto) preparado de acuerdo con el ejemplo 1. El pd-antídoto se administró 5 minutos antes del punto temporal de 1,5 h, y muestras de sangre de ratón (0,5 ml) se extrajeron a 1,5, 2,0 y 4,0 h después de administración oral de Betrixaban. Los niveles en plasma de INR en sangre completa, Betrixaban y antídoto se analizaron. El nivel de Betrixaban (Media \pm SEM) en plasma de ratón se representó gráficamente en función del tiempo para ratones después de 15 mg/kg (cuadrado abierto) y 15 mg/kg seguido por inyección del antídoto (círculo abierto). La correlación PK-PD del grupo tratado con antídoto en el punto temporal de 1,5 h (5 min después de la inyección del antídoto) se resumió en la tabla A. Una única inyección del antídoto dio como resultado una reducción >50% de Betrixaban funcional basándose en mediciones de INR. Esto se describe más exhaustivamente en el ejemplo 8.

Las figuras 17A y B muestran los resultados de un experimento en ratón con r-antídoto purificado ($n=4-10$ por grupo). El nivel de Betrixaban en plasma de ratón (figura 17A) e INR en sangre completa (figura 17B) se compararon después de administración oral de Betrixaban en solitario (15 mg/kg) o Betrixaban (15 mg/kg)

- 5 seguido por inyección intravenosa (300 µg) de r-antídoto. Se indicaron valores medios para cada grupo tratado. Tal como se resume en la tabla B, una única inyección IV del r-antídoto dio como resultado >50% de corrección de IRN en sangre completa ex vivo, justificando la neutralización eficaz de inhibidores de fXa por el antídoto mediante una sola o múltiples inyecciones u otros regímenes. Estos resultados demuestran que las variantes de fXa de esta invención tienen potencial de actuar como antídotos universales para invertir el efecto anticoagulante de inhibidores de fXa en pacientes con hemorragia u otras urgencias médicas. Esto se describe más exhaustivamente en el ejemplo 8.
- 10 La figura 18 muestra la inversión con r-antídoto del efecto inhibitor de enoxaparina en un ensayo de coagulación por cambio de turbidez de 96 pocillos. Los resultados son esencialmente similares a pd-antídoto (figura 11) lo que indica que ambos derivados de fXa tienen actividad de antídoto funcional comparable. r-antídoto 50 nM sustancialmente corregía (>75%) el efecto inhibitor de 1,25 U/ml de enoxaparina. El protocolo de ensayo se presenta en el ejemplo 11.
- 15 La figura 19 muestra la inversión con r-antídoto del efecto inhibitor de heparina de bajo peso molecular (LMWH) como se ensaya en un ensayo de coagulación en plasma humano. Ambas figuras 18 y 19 se describen en el ejemplo 11.
- 20 La figura 20 muestra la inversión con r-antídoto del efecto anticoagulación de rivaroxaban. Esto se describe más exhaustivamente en el ejemplo 12.
- La figura 21 muestra el alineamiento de la secuencia de polinucleótidos y la secuencia de polipéptidos traducida de r-antídoto.
- 25 Las figuras 22A y B muestran los resultados de un experimento en ratón con una única inyección IV (1 inyección) o dos inyecciones (2 inyecciones) del r-antídoto (n=5 por grupo, 312 µg/200 µl de r-antídoto). El nivel de Betrixaban en plasma (figura 22A) se comparó después de la administración oral de Betrixaban (15 mg/kg) seguida por inyección intravenosa de vehículo o r-antídoto (véase el ejemplo 8 para detalles). Tal como se muestra en la figura 22A, una única inyección IV de r-antídoto incrementaba el nivel de Betrixaban en plasma en más de 8 veces en comparación con control con vehículo (control_1), indicando la capacidad del antídoto para unir eficazmente Betrixaban in vivo. Una segunda inyección del antídoto incrementaba adicionalmente el nivel de Betrixaban en menos de 2 veces en comparación con la única inyección, indicando cantidad limitante de Betrixaban en sangre de ratón y inversión de su efecto anticoagulante por el antídoto. La figura 22B demuestra que la INR medida disminuye a medida que la relación de antídoto/Betrixaban se incrementa en plasma de ratón después de inyecciones individuales y dobles del antídoto.
- 30
- 35 La figura 23 muestra el perfil de concentración plasmática-tiempo del r-antídoto en ratas Sprague-Dawley basado en los datos recogidos en el Ejemplo 15.
- 40 La figura 24 muestra el perfil de concentración plasmática-tiempo del r-antídoto en macacos de la India basado en los datos recogidos en el Ejemplo 15.

45 Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de cultivo tisular, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro del alcance de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición; la serie Ausubel y col. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson y col. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson y col. (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 Synthesis*; patente de Estados Unidos N.º 4.683.195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, Londres); Herzenberg y col. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002)).

65 Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluyendo intervalos, son aproximaciones que se modifican (+) o (-) en incrementos de 0,1. Debe entenderse,

aunque no se afirme siempre explícitamente, que todas las designaciones numéricas vienen precedidas por el término “aproximadamente”. Debe entenderse también, aunque no siempre se afirme explícitamente, que los reactivos descritos en el presente documento son meramente ejemplares y que los equivalentes de estos se conocen en la técnica.

5 Tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular “un”, “uno” y “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión “un transportador farmacéuticamente aceptable” incluye una pluralidad de transportadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo mezclas de los mismos.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “que comprende” pretende significar que las composiciones y procedimientos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. “Que consiste/n esencialmente en” cuando se usa para definir composiciones y procedimientos, significará que excluye otros elementos de cualquier importancia esencial para la combinación para el uso pretendido. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos tal como se definen en el presente documento no excluiría contaminantes traza procedentes del procedimiento de aislamiento and purificación y transportadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes, y similares. “Que consiste/n en” significará que excluye más de un elemento traza de otros ingredientes y etapas del procedimiento sustanciales para administrar las composiciones de esta invención. Realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

25 Un “sujeto” de diagnóstico o tratamiento es una célula o un mamífero, incluyendo un ser humano. Los sujetos animales no humanos para diagnóstico o tratamiento incluyen, por ejemplo, murinos, tales como ratas, ratones, caninos, tales como perros, lepóridos, tales como conejos, ganado, animales para la práctica deportiva, y mascotas.

30 El término “proteína” y “polipéptido” se usan de forma indistinta y en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácido, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar enlazadas mediante enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede estar enlazada mediante otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se establece ninguna limitación sobre el número máximo de aminoácidos que puede comprender una secuencia de proteína o péptido. Tal como se usa en el presente documento, el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y los isómeros ópticos tanto D como L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Abreviaturas de una letra y de tres letras de los aminoácidos de origen natural se enumeran a continuación. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina habitualmente un oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido se denomina habitualmente un polipéptido o una 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	Ácido L-glutámico
W	Trp	L-triptófano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	Ácido L-aspártico
N	Asn	L-asparagina
C	Cys	L-cisteína

40 “Factor Xa” o “fXa” o “proteína fXa” se refiere a una serina proteasa en la ruta de coagulación sanguínea, que es producida a partir del factor X inactivo (fX). El factor Xa es activado por el factor IXa con su cofactor, el factor VIIIa, en un complejo conocido como Xasa intrínseca, o factor VIIa con su cofactor, el factor tisular, en un complejo conocido como Xasa extrínseca. fXa forma un complejo protrombinasa unido a la membrana con el factor Va y es el componente activo en el complejo de protrombinasa que cataliza la conversión de protrombina en trombina. La trombina es la enzima que cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina, que, en última instancia, causa la

formación del coágulo sanguíneo. Por lo tanto, la actividad biológica de fXa se denomina algunas veces “actividad procoagulante” en el presente documento.

El factor Xa es una molécula de dos cadenas unidas por un enlace disulfuro entre las dos cadenas. La cadena pesada contiene la serina proteasa, el sitio activo similar a la tripsina y el péptido de activación N-terminal que está glucosilado. La cadena pesada tiene al menos tres formas, α , β , y γ , que difieren debido a la escisión de un péptido C-terminal en la cadena pesada (Aronson, D. L. y col.. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137(4):1262-1266 (1971); Mertens, K. y col., *Biochem J.* 185:647-658 (1980)). Esto se analiza adicionalmente en las secciones que describen los derivados de fX y fXa.

La secuencia de nucleótidos que codifica el factor X humano (“fX”) puede encontrarse en el GenBank, “NM_000504” en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=89142731>>, y se enumera en la SEQ ID NO. 2. La secuencia de aminoácidos y la estructura del dominio correspondientes de fX se describen en Leytus y col., *Biochemistry*, 1986, 25: 5098-5102. La estructura del dominio de fX maduro también se describe en Venkateswarlu, D. y col., *Biophysical Journal*, 2002, 82: 1190-1206. Tras la escisión catalítica de los primeros 52 residuos (aminoácidos 143 a 194 de la SEQ ID NO. 3) de la cadena pesada, fX es activado a fXa (SEQ ID NO. 6). FXa contiene una cadena ligera (mostrada en la SEQ ID NO. 8 con postraducción de restos de ácido glutámico a ácido gamma-carboxiglutámico) y una cadena pesada (SEQ ID NO. 9). Los primeros 45 residuos de aminoácido (residuos 1-45 de la SEQ ID NO. 6) de la cadena ligera se denomina el dominio Gla porque contiene 11 residuos de ácido γ -carboxiglutámico modificados de forma posttraduccional (Gla). También contiene una corta secuencia de apilamiento aromático (6 residuos de aminoácido) (residuos 40-45 de la SEQ ID NO. 6). La digestión con quimotripsina elimina selectivamente los 1-44 residuos dando como resultado fXa sin dominio Gla (SEQ ID NO. 4). El dominio catalítico de serina proteasa de fXa se ubica en la cadena pesada C-terminal. La cadena pesada de fXa es altamente homóloga con otras serina proteasas tales como trombina, tripsina, y proteína C activada.

La estructura del dominio de factor X maduro puede encontrarse en Venkateswarlu D. y col., *Biophysical J.*, 2002, 82, 1190-1206. La numeración de aminoácidos en esta figura es la misma que en la figura 3. El tripéptido de Arg140-Lys141-Arg142 (el triplete RKR tal como se muestra en la figura 1) que conecta la cadena ligera con el péptido de activación no se muestra, dado que la forma que carece del tripéptido es predominante en el plasma sanguíneo en circulación. Dominios individuales se muestran en cuadros. Esto incluye los aminoácidos 1-45 en la figura 2 (SEQ ID NO. 3). Residuos catalíticos funcionalmente importantes están rodeados por un círculo, y “ γ ” representa el residuo Gla (ácido γ -carboxiglutámico).

“fXa nativo” o “fXa de tipo silvestre” se refiere al fXa presente de forma natural en plasma o que está aislado en su forma original, sin modificar, que procesa la actividad biológica de activar protrombina promoviendo, por lo tanto, la formación del coágulo sanguíneo. La expresión incluye polipéptidos de origen natural aislados a partir de muestras de tejido, así como fXa producido de forma recombinante. “fXa activo” se refiere a fXa que tiene la actividad biológica de activar protrombina. “fXa activo” puede ser fXa nativo o fXa modificado que conserva actividad procoagulante.

“Derivados de fX” o derivados de “fXa modificado” se refieren a proteínas fX que han sido modificados de manera que se unen, ya sea directa o indirectamente, a un inhibidor del factor Xa y no se ensamblan en el complejo de protrombinasa. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, el polipéptido de la SEQ ID NO. 19. Se incluyen dentro de la definición de derivados de fX los derivados de fXa que se analizan a continuación. En algunas realizaciones, el derivado modificado también puede utilizar la expresión “Factor Xai”.

“Derivados de fXa” o “fXa modificado” o “derivados de una proteína de factor Xa” se refiere a proteínas de fXa que han sido modificadas de modo que se unan, 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 ninguna actividad procoagulante o actividad procoagulante reducida. “Actividad procoagulante” se denomina en el presente documento como la capacidad de un agente para causar coagulación sanguínea o formación de coágulos. Actividad procoagulante reducida significa que la actividad procoagulante se ha reducido en al menos aproximadamente el 50%, o más de aproximadamente el 90%, o más de aproximadamente el 95% en comparación con fXa de tipo silvestre durante el mismo período. Por ejemplo, fX-S395A recombinante esencialmente no tiene ninguna actividad procoagulante, según lo medido mediante ensayos in vitro, tales como ensayos de actividad de fXa.

Los derivados tienen sitios activos modificados y un dominio Gla modificado. Modificaciones adicionales también son contempladas. Se contempla que dichas modificaciones pueden realizarse de una o más de las siguientes maneras: deleción de uno o más de los aminoácidos de la secuencia, sustitución de uno o más residuos de aminoácidos con uno o más residuos de aminoácidos diferentes, y/o manipulación de una o más cadenas laterales de aminoácido o sus extremos “C” o “N”.

La expresión “sitio activo” se refiere a la parte de una enzima o anticuerpo donde se produce una reacción química. Un “sitio activo modificado” es un sitio activo que ha sido modificado estructuralmente para proporcionar al sitio activo reactividad o especificidad química incrementada o reducida. Se contempla que el sitio activo incluya no solo el sitio real sino también un dominio que contiene el sitio activo. Ejemplos de sitios activos incluyen, aunque sin

- limitarse a, el dominio catalítico de factor X humano que comprende los 235-488 residuos de aminoácido (figura 1), y el dominio catalítico de factor Xa humano que comprende los 195-488 residuos de aminoácido (figuras 2 y 3). La triada catalítica equivalente a H57-D102-S195 en la numeración de la quimotripsina se localiza en His236, Asp282, y Ser379. Ejemplos de sitio activo modificado incluyen, aunque sin limitarse a, los residuos de la triada catalítica individualmente o en combinación. Una modificación se refiere a un derivado de fXa que tiene un sitio activo modificado Ser379/A. Ejemplos adicionales incluyen el dominio catalítico de factor Xa humano que comprende 195-448 residuos de aminoácido en la SEQ ID NO. 10, 11, 12, 13 o 15 con al menos una sustitución de aminoácidos en la posición Arg306, Gly310, Arg347, Lys351, Lys414 o Arg424.
- 10 Los derivados de la invención tienen todo el dominio Gla eliminado. Los ejemplos de derivados de fXa adecuados como antídotos en los procedimientos de esta invención son FXa sin dominio Gla (SEQ ID NO. 20, 21 o 22). Ejemplos adicionales de los derivados de fX y fXa contemplados por esta invención se proporcionan a continuación.
- 15 "sin dominio Gla" o "des-Gla" se refiere a fXa o fX que no tiene un dominio Gla y abarca derivados de fXa y fX que portan otras modificaciones además de la eliminación del dominio Gla. Los ejemplos de FXa sin dominio Gla incluyen, aunque sin limitarse a, derivado de fXa que carece de los 1-39 residuos de aminoácido de la SEQ ID NO. 3; derivado de fXa que carece de los 6-39 residuos de aminoácido de la SEQ ID NO. 3, correspondientes a un mutante de fXa expresado en células CHO descrito con más detalle a continuación (SEQ ID NO. 12, tabla 12); derivado de fXa que carece de los 1-44 residuos de aminoácido de la SEQ ID NO. 3, correspondientes a des-Gla fXa después de digestión quimotróptica de fXa humano (SEQ ID NO. 4, figura 3); y derivado de fXa que carece de todos los residuos 1-45 del dominio Gla de la SEQ ID NO. 3 tal como se describe en Padmanabhan y col., *Journal Mol. Biol.*, 1993, 232: 947-966 (SEQ ID NO 5). Otros ejemplos incluyen des-Gla anhidro fXa (SEQ ID NO. 10, tabla 10) y des-Gla fXa-S379A (SEQ ID NO. 11, tabla 11).
- 20 En algunas realizaciones, el des-Gla fXa comprende al menos los residuos de aminoácido 40 a 448 de la SEQ ID NO. 3 o un equivalente de la misma. En alguna realización, el des-Gla fXa comprende al menos los residuos de aminoácido 45 a 488 (SEQ ID NO. 4) o 46 a 488 (SEQ ID NO. 5) de la SEQ ID NO. 3 o equivalentes de la misma.
- 30 En alguna realización, el des-Gla fXa comprende al menos los residuos de aminoácido 40 a 139 y 195 a 448 de la SEQ ID NO. 3 o equivalentes de la misma. En alguna realización, el des-Gla fXa comprende al menos los residuos de aminoácido 45 a 139 y 195 a 448 de la SEQ ID NO. 3 o equivalentes de la misma. En otra realización, el des-Gla fXa comprende al menos residuos de aminoácido 46 a 139 y 195 a 448 de la SEQ ID NO. 3 o equivalentes de la misma.
- 35 "Deficiente en Gla" se refiere a fXa o fX con número reducido de grupos γ -carboxilo de cadena lateral libre en su dominio Gla. Como FXa sin dominio Gla, FXa deficiente en Gla también puede portar otras modificaciones. FXa deficiente en Gla incluye fXa no carboxilado, subcarboxilado y descarboxilado. "fXa no carboxilado" o "fXa descarboxilado" se refiere a derivados de fXa que no tienen los grupos γ -carboxilo de los residuos de ácido γ -carboxiglutámico del dominio Gla, tal como fXa que tiene todos su ácido γ -carboxiglutámico del dominio Gla sustituido por diferentes aminoácidos, o fXa que tiene todo su γ -carboxilo de cadena lateral eliminado o enmascarado por medios tales como aminación, esterificación, etc. Para proteína expresada de forma recombinante, fXa no carboxilado se denomina, algunas veces, fXa sin carboxilar. "fXa subcarboxilado" se refiere a derivados de fXa que tienen un número reducido de grupo γ -carboxilo en el dominio Gla en comparación con fXa de tipo silvestre, tal como fXa que tiene uno o más pero no todos de sus ácidos γ -carboxiglutámicos del dominio Gla sustituidos por uno o más aminoácidos diferentes, o fXa que tiene al menos uno pero no todos de sus γ -carboxilos de cadena lateral eliminados o enmascarados mediante medios tales como aminación y esterificación, etc.
- 40 La estructura del dominio de factor Xa sin dominio Gla humano puede encontrarse en Padmanabhan y col., *J. Mol. Biol.*, 1993, 232, 947-966. La numeración de los aminoácidos se basa en equivalencias topológicas con quimotripsina, donde, por ejemplo, Ser195 corresponde a Ser379 en la figura 2 cuando se usa la numeración de fX maduro humano. Las inserciones se indican con letras, y las deleciones se indican mediante 2 numeraciones sucesivas. Se añade 300 a la numeración de cadena ligera para diferenciarla de la numeración de cadena pesada. β 363 es β -hidroxi aspartato. Las barras diagonales indican escisiones proteolíticas observadas en material cristalizado. La secuencia de FXa sin dominio Gla que carece del fX maduro basado en 1-45 residuos de aminoácido (SEQ ID NO. 3) se enumera en la SEQ ID NO. 5.
- 50 En una realización de la invención, la totalidad o parte del "péptido de activación" (PA) se elimina. Lo que se entiende por el péptido de activación es los aminoácidos 183 a 234 de la SEQ ID NO. 1, o como alternativa, los aminoácidos 143-194 de la SEQ ID NO. 3.
- 60 En otra realización, se incluye un péptido señalizador en el derivado. La expresión "péptido señalizador" se refiere a un péptido señalizador del factor X (SEQ ID NO. 18), un péptido señalizador de la transferrina (residuos de aminoácidos SP1 a SP19 de la SEQ ID NO. 27), o un péptido señalizador de la protrombina (residuos de aminoácidos SP1 a SP24 de la SEQ ID NO. 26).
- 65

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

5 Un "péptido β" se refiere a la totalidad o a una parte de la cadena pesada.

"pd-antídoto" o "antídoto derivado de plasma" se refiere al derivado de des-Gla anhidro fXa y tiene los residuos de aminoácido de la SEQ ID NO. 10.

10 "r-antídoto" o "antídoto recombinante" se refiere a un derivado de fXa que carece de los 6-39 residuos de aminoácido de la SEQ ID NO. 3, correspondientes a un mutante de fXa expresado en células CHO y después de la eliminación del enlazador que se describe con más detalle a continuación (SEQ ID NO. 13, tabla 13).

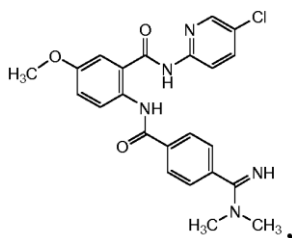
15 "Agentes anticoagulantes" o "anticoagulantes" son agentes que inhiben la formación de coágulos sanguíneos. Los ejemplos de agentes anticoagulantes incluyen, aunque sin limitarse a, inhibidores específicos de trombina, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa o factor VIIa, heparina y derivados, antagonistas de vitamina K, y anticuerpos anti-factor tisular. Los ejemplos de inhibidores específicos de trombina incluyen hirudina, bivalirudina (Angiomax®), argatroban y lepirudina (Refludan®). Los ejemplos de heparina y derivados incluyen heparina no fraccionada (UFH), heparina de bajo peso molecular (LMWH), tal como enoxaparina (Lovenox®), dalteparina (Fragmin®), y danaparoid (Orgaran®); y pentasacárido sintético, tales como fondaparinux (Arixtra®). Los ejemplos de antagonistas de vitamina K incluyen warfarina (Coumadin®), fenocumarol, acenocumarol (Sintrom®), clorindiona, dicumarol, difenadiona, biscoumacetato de etilo, fenprocoumon, fenindiona y ticloamarol. En una realización, el anticoagulante es un inhibidor del factor Xa. En una realización, el anticoagulante es Betrixaban.

25 "Terapia anticoagulante" se refiere a un régimen terapéutico que se administra a un paciente para prevenir coágulos sanguíneos o trombosis no deseados. Una terapia anticoagulante comprende administrar uno o una combinación de dos o más agentes anticoagulantes u otros agentes a una dosificación y calendario adecuados para tratar o prevenir los coágulos sanguíneos o trombosis no deseados en el paciente.

30 La expresión "inhibidores del factor Xa" o "inhibidores de factor Xa" se refieren a compuestos que pueden inhibir, directa o indirectamente, la actividad del factor de coagulación Xa de catalizar la conversión de 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, fragmina, NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la ruta del factor tisular, DX-9065a (tal como se describe en, por ejemplo, Herbert, J.M., y col., J Pharmacol Exp Ther. 1996 276(3): 1030-8), YM-60828 (tal como se describe en, por ejemplo, Taniuchi, Y., y col., Thromb Haemost. 1998 79(3): 543-8), YM-150 (tal como se describe en, por ejemplo, Eriksson, B.I. et. al, Blood 2005; 106(11), Resumen 1865), apixaban, rivaroxaban, PD-348292 (tal como se describe en, por ejemplo, Pipeline Insight: Antithrombotics - Reaching the Untreated Prophylaxis Market, 2007), otamixaban, razaxaban (DPC906), BAY 59-7939 (tal como se describe en, por ejemplo, Turpie, A.G., y col., J. Thromb. Haemost. 2005, 3(11): 2479-86), edoxabán (tal como se describe en, por ejemplo, Hylek EM, Curr Opin Invest Drugs 2007 8(9): 778-783), LY517717 (tal como se describe en, por ejemplo, Agnelli, G., y col., J. Thromb. Haemost. 2007 5(4): 746-53), GSK913893, Betrixaban (tal como se describe a continuación) y derivados de los mismos. La heparina de bajo peso molecular ("LMWH") también se considera un inhibidor del factor Xa.

45 En una realización, el inhibidor del factor Xa se selecciona de entre Betrixaban, rivaroxaban, apixabán, edoxabán, LMWH, y combinaciones de los mismos.

50 El término "Betrixaban" se refiere al compuesto "[2-({4-[(dimetilamino)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:



55 o un tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El Betrixaban se describe en las patentes de Estados Unidos N.º 6.376.515 y 6.835.739 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2007/0112039, presentada el 7 de noviembre de 2006. Se sabe que el Betrixaban

es un inhibidor específico del factor Xa.

Tal como se usa en el presente documento, el término “antídoto” o la expresión “antídoto para un inhibidor del factor Xa” se refiere a moléculas, tales como derivados de fXa, que pueden neutralizar o invertir sustancialmente 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 esta invención son derivados de fXa con unión a la membrana fosfolipídica reducida, tal como des-Gla fXa o FXa deficiente en Gla, y derivados de fXa con actividad catalítica reducida, tal 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 membrana reducida y actividad catalítica reducida incluyen, aunque sin limitarse a, des-Gla anhidro-fXa mediante digestión quimotriptica de anhidro-fXa (tal como se describe en el ejemplo 1); des-Gla fXa-S379A (S 195A en numeración de quimotripsina) mediante mutagénesis (tal 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 son, por lo tanto, capaces de unirse a inhibidores de fXa molécula pequeña. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitarse a, trombina que se une al inhibidor de fXa GSK913893 (Young R., y col., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2007, 17(10): 2927-2930); calicreína plasmática que se une al inhibidor de fXa apixaban (Luettgen J., y col., Blood, 2006, 108(11) resumen 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, y col., Biochem., 1999, 38(44): 14582-14591).

En una realización, el derivado de la invención se une, directa o indirectamente a un inhibidor del factor Xa. Los términos “unión”, “se une” “reconocimiento” o “reconocer”, tal como se usan en el presente documento, pretenden incluir interacciones entre moléculas que pueden detectarse 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”. Unión “directa” comprende contacto físico directo entre moléculas. Unión “indirecta” entre molécula comprende las moléculas que tienen contacto físico directo con una o más moléculas intermedias simultáneamente. Por ejemplo, se contempla que derivados de la invención se unen indirectamente y neutralizan sustancialmente heparina de bajo peso molecular y otros inhibidores de factor Xa indirectos. Esta unión puede dar como resultado la formación de un “complejo” que comprende las moléculas de interacción. Un “complejo” se refiere a la unión de dos o más moléculas mantenidas juntas mediante enlaces, interacciones o fuerzas covalentes o no covalentes.

“Neutralizar” “invertir” o “contrarrestar” la actividad de un inhibidor de fXa o frases similares se refieren a inhibir o bloquear la función inhibidora del factor Xa o anticoagulante de un inhibidor de fXa. Dichas frases se refieren a inhibición o bloqueo parcial de la función, así como a inhibir o bloquear la mayoría o todo de la actividad inhibidora de fXa, *in vitro* y/o *in vivo*. Estos términos también se refieren a correcciones de al menos aproximadamente el 20 % de los marcadores farmacodinámicos o sustitutos dependientes del inhibidor de FXa. Los ejemplos de marcadores incluyen, pero no se limitan a INR, PR, aPTT, ACT, unidades anti-fXa, la generación de trombina (Technothrombin TGA), tromboelastografía, CAT (Trombograma automatizado calibrado) y similares.

En ciertas realizaciones, el inhibidor del factor Xa es neutralizado sustancialmente (o es corregido como se acaba de describir), lo que significa que su capacidad de inhibir el factor Xa, 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 un fXa activo de unirse a la membrana fosfolipídica cargada negativamente u otra membrana celular, tal como plaquetas, en presencia de iones Ca²⁺. Esta unión está medida por los residuos de ácido γ -carboxiglutámico en el dominio Gla de fXa.

La expresión “interacción reducida” se refiere a la capacidad disminuida del derivado de fXa de unirse o formar un complejo con iones u otros cofactores que normalmente se unen a o complejan con fXa silvestre. Los ejemplos de dicha interacción incluyen, aunque sin limitarse a, unión de fXa con iones de Ca²⁺ y membrana fosfolipídica, interacción con fV/fVa, o fVIII/fVIIIa, etc. Se prefiere que la interacción de un derivado de fXa de la divulgación con los iones u otros cofactores se reduzca al 50% de la de un fXa silvestre. Más preferentemente, la interacción se reduce al 10%, 1%, y 0,1% de la de un fXa de tipo silvestre. Esto se refiere a la capacidad de los derivados de “ensamblarse en el complejo de protrombinasa”.

“Actividad de unión al inhibidor de fXa” se refiere a la capacidad de una molécula de 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 requerido para que la concentración plasmática de un antídoto que circula en el plasma se reduzca a la mitad de su concentración inicial después de una única administración o después del cese de la infusión.

La expresión “resto conjugado” se refiere a un resto que puede añadirse a un derivado de fXa formando un enlace

covalente con un residuo del derivado de fXa. El resto puede unirse directamente a un residuo del derivado de fXa o puede formar un enlace covalente con un enlazador que, a su vez, forma un enlace covalente con un residuo del derivado de fXa.

5 Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno o una cadena sencilla del mismo. Por lo tanto, el término "anticuerpo" incluye cualquier molécula que contiene proteína o péptido que comprende al menos una parte de una molécula de inmunoglobulina. Los ejemplos de estos incluyen, aunque sin limitarse a una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una parte de unión a ligando del mismo, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región marco (FR), o cualquier parte de las mismas, o al menos una parte de una proteína de unión.

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

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

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

25 "Una cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de derivado suficiente para inducir un resultado biológico y/o terapéutico deseado. Ese resultado puede ser alivio de los signos, síntomas, o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente invención, el resultado implicará normalmente uno o más de los siguientes: neutralización de un inhibidor de fXa que ha sido administrado a un paciente, inversión de la actividad anticoagulante del inhibidor de fXa, eliminación del inhibidor de fXa del plasma, restauración de la hemostasia, y reducción o cese de hemorragia. La cantidad efectiva variará dependiendo del agente antídoto específico usado, el inhibidor de fXa específico que ha sido administrado al sujeto, el régimen de dosificación del inhibidor de fXa, la temporización de administración del antídoto, el estado del sujeto y la enfermedad que están siendo tratados, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la patología, la vía de administración y similares, todos los cuales pueden ser determinados fácilmente por un experto en la materia.

30 Se describen dosis unitarias eficaces de los antídotos descritos en el presente documento en la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º de Serie 61/225.887, presentada el 15 de julio de 2009 y titulada "*Unit Dose Formulation of Antidotes for Factor Xa Inhibitors and Methods of Using the Same*". Específicamente, se contempla que la formulación de dosis unitaria que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido que comprende dos cadenas de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 13 o un polipéptido que tiene al menos un 80 % de homología a SEQ ID NO. 13 es una cantidad desde aproximadamente 10 miligramos a aproximadamente 2 gramos o de aproximadamente 100 miligramos a aproximadamente 1,5 gramos o de aproximadamente 200 miligramos a aproximadamente 1 gramo o de aproximadamente 400 miligramos a aproximadamente 900 miligramos. Se contempla, además, que otros antídotos de la invención se pueden dosificar de una manera similar.

45 Tal como se usan en el presente documento, los términos "tratar" "tratamiento" y similares se usan en el presente documento para significar obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente un trastorno o signo o síntoma del mismo, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno.

50 "Tratar" también cubre cualquier tratamiento de un trastorno en un mamífero, e incluye: (a) prevenir que se produzca un trastorno en un sujeto que puede estar predispuesto a un trastorno, pero al que aún puede no habersele diagnosticado que lo tiene, 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.

55 Tal como se usa en el presente documento, "tratar" incluye además mejora sistémica de los síntomas asociados con la patología y/o un retardo de la aparición de los síntomas. Las evidencias clínicas y subclínicas de "tratamiento" variarán con la patología, el individuo y el tratamiento. Adicionalmente, el término "prevenir" también se refiere a inhibir.

60 La "administración" puede efectuarse en una dosis, de forma continua o de forma intermitente durante todo el tratamiento. Procedimientos de determinación de los medios y dosificación de administración más eficaces son conocidos por los expertos en la materia y variarán con la composición usada para terapia, el propósito de la terapia, la célula diana que está siendo tratada, y el sujeto que está siendo tratado. Administraciones individuales o múltiples pueden llevarse a cabo con el nivel de dosis y el patrón que es seleccionado por el facultativo encargado del tratamiento. En la técnica se conocen formulaciones de dosificación y procedimientos de administración de los agentes.

65

Los agentes y composiciones de la presente invención pueden usarse en la fabricación de medicamentos y para el tratamiento de seres humanos y otros animales mediante administración de acuerdo con procedimientos convencionales, tal como un ingrediente activo en composiciones farmacéuticas.

- 5 Un agente de la presente invención puede administrarse para terapia mediante cualquier vía adecuada, específicamente mediante administración parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). También se apreciará que la vía preferida variará con el estado y la edad del receptor, y la enfermedad que está siendo tratada.
- 10 Se puede determinar si se consigue el procedimiento, es decir, la inhibición o inversión de un inhibidor del factor Xa, mediante un número de ensayos in vitro, tales como ensayo de generación de trombina y unidades de anti-fXa y ensayos de coagulación clínica tales como aPTT, PT y ACT.

15 El término "aislado/a", tal como se usa en el presente documento, con respecto a 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" pretende incluir fragmentos de ácido nucleico que no son de origen natural como fragmentos y no se encontrarían en el estado natural. El término "aislado/a" también se usa en el presente documento para referirse a polipéptidos y proteínas que están aisladas de otras proteínas celulares y pretende abarcar polipéptidos tanto purificados como recombinantes. En otras realizaciones, el término

20 "asilado/a" significa separado de constituyentes, celulares y otros, en los que la célula, tejido, polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o un fragmento o fragmentos de los mismos, que están normalmente asociados en la naturaleza. Por ejemplo, una célula aislada es una célula que está separada de tejido o células de fenotipo o genotipo distinto. Tal como es evidente para los expertos en la materia, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento o fragmentos de los mismos no de origen natural, no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su contrapartida de origen natural.

25

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "equivalente del mismo/de la misma" cuando se refiere a una proteína, polipéptido o ácido nucleico de referencia, pretende incluir aquellos que tienen homología mínima mientras siguen manteniendo la funcionalidad deseada. Por ejemplo, la homología puede ser, al menos el 75% de homología y como alternativa, al menos el 80%, o como alternativa al menos el 85%, o como alternativa al menos el 90%, o como alternativa al menos el 95%, o como alternativa el 98% de porcentaje de homología y muestran actividad biológica sustancialmente equivalente al polipéptido o proteína de referencia. Que un polinucleótido o región de polinucleótido (o un polipéptido o región de polipéptido) tiene 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 los mismos al comparar las dos secuencias. Debe observarse que, cuando solamente se usa la cadena pesada de fXa (o una serina proteasa relacionada), la homología global podría ser inferior al 75%, tal como, por ejemplo, 65% o 50% sin embargo, la funcionalidad deseada permanece. Este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M. Ausubel y col., eds., 1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, se usan parámetros por defecto para el alineamiento. Un programa de alineamiento preferido es BLAST, usando parámetros por defecto. En particular, programas preferidos son BLASTN y BLASTP, usando los siguientes parámetros por defecto: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; límite = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripción = 50 secuencias; clasificadas por = PUNTUACIÓN ELEVADA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Detalles de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>.

30

35

40

45

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, 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, marca EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (mARN), ARN transferente, ARN ribosómico, ribozimas, cADN, plinucleótidos recombinantes, plinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas y cebadores de ácido nucleico. Un plinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, modificaciones a la estructura de nucleótidos pueden impartirse antes o después del ensamblaje del plinucleótido. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de etiquetado. El término también se refiere a moléculas tanto bi- como monocatenarias. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de esta invención que es un polinucleótido abarca tanto la forma bicatenaria como cada una de dos formas monocatenarias complementarias que se sabe o se ha predicho que componen la forma bicatenaria.

50

55

60

Un polinucleótido está compuesto por una secuencia específica de cuatro bases de nucleótido: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) para timina cuando el polinucleótido es ARN. Por lo tanto, la expresión "secuencia de polinucleótido" es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Esta representación

65

alfabética puede introducirse en bases de datos en un ordenador que tiene una unidad central de procesamiento y usarse para aplicaciones bioinformáticas tales como genómica funcional y búsqueda de homología.

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

15 Que un polinucleótido o región de polinucleótido (o un polipéptido o región de polipéptido) tiene 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 están alineadas, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son los mismos al comparar las dos secuencias. Este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse usando programas software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en Ausubel y col. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology. Preferentemente, se usan parámetros por defecto para el alineamiento. Un programa de alineamiento es BLAST, usando parámetros por defecto. En particular, son programas BLASTN y BLASTP, usando los siguientes parámetros por defecto: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; límite = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificadas por = PUNTUACIÓN ELEVADA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Detalles de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, último acceso el 26 de noviembre de 2007. Polinucleótidos biológicamente equivalentes son aquellos que tienen el porcentaje de homología especificado y que codifican un polipéptido que tiene la misma o similar actividad biológica.

30 La expresión “un homólogo de un ácido nucleico” se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene 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 cierto grado de homología con él o con el complemento del mismo. En un aspecto, los homólogos de ácidos nucleicos son capaces de hibridar con el ácido nucleico o complemento del mismo.

35 Un “gen” se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco abierto de lectura (ORF) que es capaz de codificar un polipéptido o proteína particular después de haber sido transcrito y traducido. Cualquiera de las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos descritas en el presente documento puede usarse para identificar fragmentos más grandes o secuencias codificantes de longitud completa del gen con el que están asociados. Procedimientos de aislamiento de secuencias de fragmentos más grandes son conocidos por los expertos en la materia.

40 El término “expresar” se refiere a la producción de un producto génico.

45 Tal como se usa en el presente documento, “expresión” se refiere al proceso mediante el cual polinucleótidos se transcriben a mRNA y/o el proceso mediante el cual el mRNA transcrito está siendo posteriormente traducido en péptidos, polipéptidos, o proteínas. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir splicing del mRNA en una célula eucariota.

50 El término “codificar”, tal como se aplica a polinucleótidos, se refiere a un polinucleótido que se dice que “codifica” un polipéptido si, en su estado nativo o cuando se manipula mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, puede transcribirse y/o traducirse para producir el mRNA para el polipéptido y/o un fragmento del mismo. La cadena antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico, y la secuencia codificante puede deducirse a partir de ella.

55 Un “conjugado peptídico” se refiere a la asociación mediante unión por enlace 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 como resultado estabilidad o eficacia mejoradas del polipéptido para su propósito pretendido. En una realización, un péptido está conjugado a un transportador, donde el transportador es un liposoma, una micela, o un polímero farmacéuticamente aceptable.

60 Los “liposomas” son vesículas microscópicas que consisten en bicapas lipídicas concéntricas. Estructuralmente, los liposomas varían en tamaño y forma desde largos tubos a esferas, con dimensiones desde unos pocos cientos de Angstroms a fracciones de un milímetro. Los lípidos formadores de vesículas se seleccionan para conseguir un grado especificado de fluidez o rigidez del complejo final que proporciona la composición lipídica de la capa externa. 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 aunque sin limitarse a dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), con una longitud de cadena de hidrocarburo en el

intervalo de 14 a 22, y saturados o con uno o más enlaces dobles C = C. Los ejemplos de lípidos capaces de producir un liposoma estable, en solitario, o en combinación con otros componentes lipídicos son fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomiélin, cefalina, cardiolípin, ácido fosfatídico, cerebrosíidos, distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE) y dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1 carboxilato (DOPE-mal). Lípidos que no contienen fósforo adicionales que pueden ser incorporados en liposomas incluyen estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, miristato de isopropilo, lauril sulfato de trietanolamina, sulfato de alquilo-arilo, palmitato de acetilo, ricinoleato de glicerol, estearato de hexadecilo, polímeros acrílicos anfóteros, amidas de ácidos grasos polietoxilados, y los lípidos catiónicos mencionados anteriormente (DDAB, DODAC, DMRIE, DMTAP, DOGS, DOTAP (DOTMA), DOSPA, DPTAP, DSTAP, DC-Chol). Los lípidos cargados negativamente incluyen ácido fosfatídico (PA), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidilglicerol y (DOPG), dicetilfosfato que son capaces de formar vesículas. Normalmente, los liposomas pueden dividirse en tres categorías basadas en su tamaño global y la naturaleza de la estructura laminar. Las tres clasificaciones, según lo desarrollado por la New York Academy Sciences Meeting, "Liposomes and Their Use in Biology and Medicine", diciembre de 1977, son vesículas multilaminares (MLV), pequeñas vesículas unilaminares (SUV) y grandes vesículas unilaminares (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 disolvente circundante, secuestrando las regiones de cola hidrófobas en el centro de la micela. Este tipo de micela es conocido como una micela en fase normal (micela de aceite en agua). Las micelas inversas tienen los grupos de cabeza en el centro de las colas con las colas extendiéndose fuera (micela de agua en aceite). Las micelas pueden usarse para unir un polinucleótido, polipéptido, anticuerpo o composición descrita en el presente documento para facilitar el suministro eficiente de la célula o tejido diana.

La frase "polímero farmacéuticamente aceptable" se refiere al grupo de compuestos que pueden conjugarse 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, poliácridatos, polimetacrilatos, azúcares, polioles y mezclas de los mismos.

Un "vehículo de suministro de genes" se define como cualquier molécula que puede transportar polinucleótidos insertados a una célula huésped. Los ejemplos de vehículos de suministro de genes son liposomas, micelas, polímeros biocompatibles, incluyendo polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos; envueltas virales artificiales; partículas de metal; y bacterias, o virus, tales como baculovirus, adenovirus y retrovirus, bacteriófago, cósmido, plásmido, vectores fúngicos y otros vehículos recombinantes usados normalmente en la técnica que se han descrito para expresión en diversos huéspedes eucariotas y procariontes, y pueden usarse para terapia génica así como para simple expresión de proteínas.

Un polinucleótido de esta invención puede suministrarse a una célula o tejido usando un vehículo de suministro de genes. "Suministro de genes", "transferencia de genes", "transducción", y similares tal como se usan en el presente documento, son expresiones que se refieren a la introducción de un polinucleótido exógeno (algunas veces denominado como "transgén") en una célula huésped, independientemente del procedimiento usado para la introducción. Dichos procedimientos incluyen diversas técnicas bien conocidas tales como transferencia de genes mediada por vectores (mediante, por ejemplo, infección vírica/transfección, o diversos otros complejos de suministro de genes basados en proteínas o basados en lípidos) así como técnicas que facilitan el suministro de polinucleótidos "desnudos" (tales como electroporación, suministro con "pistola génica" y diversas otras técnicas usadas para la introducción de polinucleótidos). El polinucleótido introducido puede mantenerse de forma estable o transitoria en la célula huésped. El mantenimiento estable normalmente requiere que el polinucleótido introducido tenga 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 conocen una serie de vectores que son capaces de mediar la transferencia de genes a células de mamífero, tal como se conoce en la técnica y se describe en el presente documento.

Un "vector viral" se define como un virus o partícula viral producida de forma recombinante que comprende un polinucleótido a suministrar a una célula huésped, 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 el virus Semliki Forest y vectores basados en el virus Sindbis, también se han desarrollado para uso en terapia génica e inmunoterapia. Véase, Schlesinger y Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5: 434-439 y Ying, y col. (1999) Nat. Med. 5(7): 823-827. Donde la transferencia de genes 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. Tal como se usa en el presente documento, "transferencia de genes mediada retroviral" o "transducción retroviral" lleva el mismo significado y se refiere al proceso mediante el cual un gen o secuencias de ácido nucleico son transferidas de forma estable en 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 mediante su mecanismo de infección normal o modificarse de modo que se una a un receptor o ligando de la superficie de la célula huésped diferente para entrar en la célula. Tal 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.

5 Los retrovirus portan su información genética en forma de ARN; sin embargo, una vez que el virus infecta una célula, el ARN es transcrito de forma inversa en forma de ADN que se integra en el ADN genómico de la célula infectada. La forma de ADN integrado se denomina provirus.

10 Donde la transferencia de genes es 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 de virus homogéneo, relativamente bien caracterizado, que incluye más de 50 serotipos. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT internacional N.º WO 95/27071. Los Ad no requieren integración en el genoma de la célula huésped. Vectores derivados de Ad recombinante, particularmente
15 aquellos que reducen el potencial de recombinación y generación de virus de tipo silvestre, también han sido construidos. Véase, las solicitudes PCT internacional N.º WO 95/00655 y WO 95/11984. El AAV de tipo silvestre tiene alta infectividad y especificidad integrándose en el genoma de la célula huésped. Véase, Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 81: 6466-6470 y Lebkowski y col. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 3988-3996.

20 Los vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en el que un polinucleótido puede enlazarse de forma operativa se conocen bien en la técnica. Dichos vectores son capaces de transcribir ARN in vitro o in vivo, y están disponibles en el mercado de fuentes 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
25 partes no traducidas 5' y/o 3' de los clones para eliminar codones de iniciación extra, de potencial traducción alternativa inapropiada u otras secuencias que pueden interferir en o reducir la expresión, a nivel de la transcripción o la traducción. Como alternativa, sitios de unión al ribosoma consenso pueden insertarse inmediatamente 5' del codón de inicio para mejorar la expresión.

30 Los vehículos de suministro de genes también incluyen complejos de ADN/liposoma, micelas y complejos proteína-ADN dirigidos. Los liposomas que también comprenden un anticuerpo de dirección o fragmento del mismo pueden usarse en los procedimientos de esta divulgación. Para mejorar el suministro a una célula, el ácido nucleico o las proteínas de esta invención pueden conjugarse a anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que se unen a
35 antígenos de la superficie celular, por ejemplo, un marcador de la superficie celular descubierto en células madre o cardiomiocitos. Además del suministro 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 puede realizarse mediante la técnica no limitante de transfección de proteínas, como alternativa condiciones de cultivo que pueden mejorar la expresión y/o promover la actividad de las proteínas de esta invención son otras técnicas no limitantes.

40 La frase "soporte sólido" se refiere a superficies no acuosas tales como "placas de cultivo" "chips génicos" o "micromatrices" (microarrays). Dichos chips génicos o micromatrices pueden usarse para fines de diagnóstico y terapéuticos mediante una serie de técnicas conocidas por un experto en la materia. En una técnica, los oligonucleótidos se distribuyen sobre un chip génico para determinar la secuencia de ADN mediante la estrategia de
45 hibridación, tal como la perfilada en las patentes de Estados Unidos N.º 6.025.136 y 6.018.041. Los polinucleótidos de esta invención pueden modificarse a sondas, que, a su vez, pueden usarse para la detección de una secuencia genética. Dichas técnicas han sido descritas, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 5.968.740 y 5.858.659. Una sonda también puede fijarse a la superficie de un electrodo para la detección electroquímica de secuencias de ácido nucleico tales como las descritas por Kayem y col., patente de Estados Unidos N.º 5.952.172 y por Kelley y col. (1999) Nucleic Acids Res. 27: 4830-4837.

50 Diversos "chips génicos" o "micromatrices" y tecnologías similares son conocidas en la técnica. Los ejemplos de éstas incluyen, aunque sin limitarse a, LabCard (ACLARA Bio Sciences Inc.); GeneChip (Affymetric, Inc); LabChip (Caliper Technologies Corp); una matriz de baja densidad con detección electroquímica (Clinical Micro Sensors); LabCD System (Gamera Bioscience Corp.); Omni Grid (Gene Machines); Q Array (Genetix Ltd.); un sistema de espectrometría de masas automatizado de alto rendimiento con tecnología de expresión en fase líquida (Gene Trace
55 Systems, Inc.); un sistema de dispensado de gotas por chorro térmico (Hewlett Packard Company); Hyseq HyChip (Hyseq, Inc.); BeadArray (Illumina, Inc.); GEM (Incyte Microarray Systems); un sistema de formación de micromatrices de alto rendimiento que puede dispensar de 12 a 64 gotas sobre múltiples portaobjetos de vidrio (Intelligent Bio-Instruments); Molecular Biology Workstation y NanoChip (Nanogen, Inc.); un chip de vidrio microfluídico (Orchid biosciences, Inc.); BioChip Arrayer con cuatro puntas piezoeléctricas de goteo a voluntad 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.) tal como se identifican y describen en Heller (2002) Annu. Rev. Biomed. Eng. 4:129-153. Los ejemplos de "chips génicos" o una
60 "micromatriz" también se describen en las publicaciones de patente de Estados Unidos N.º: 2007-0111322, 2007-0099198, 2007-0084997, 2007-0059769 y 2007-0059765 y las patentes de Estados Unidos N.º: 7.138.506, 7.070.740 y 6.989.267.

En un aspecto, se preparan "chips génicos" 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 lleva a cabo extracción de ADN, ARN genómico, proteína o cualquier combinación de los mismos y se amplifica en caso necesario. La muestra se pone en contacto con el chip génico o panel de micromatriz en condiciones adecuadas para hibridación de los genes o productos génicos de interés con las sondas o cebadores contenidos en el chip génico o micromatriz. Las sondas o cebadores pueden estar etiquetadas de forma detectable identificando de este modo el uno o más genes de interés. Como alternativa, puede usarse una reacción química o biológica para identificar las sondas o cebadores que hibridaron con el ADN o ARN del uno o más genes) de interés. Los genotipos o el fenotipo del paciente se determinan a continuación con ayuda del aparato y los procedimientos mencionados anteriormente.

Otros ejemplos no limitantes de un soporte en fase sólida incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del transportador puede ser soluble en cierta medida o insoluble. El material de soporte puede tener virtualmente 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 interna de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Como alternativa, la superficie puede ser plana tal como una lámina, tira reactiva, etc., o, como alternativa, perlas de poliestireno. Los expertos en la materia conocerán muchos otros transportadores adecuados para unirse al anticuerpo o antígeno, o serán capaces de determinar los mismos mediante el uso de experimentación rutinaria.

Las "células eucariotas" comprenden todos los reinos de la vida, excepto monera. Se pueden distinguir fácilmente a través de un núcleo rodeado por una membrana. Animales, plantas, hongos y protistas son eucariotas u organismos cuyas células están organizadas en estructuras complejas por las membranas internas y un citoesqueleto. La estructura rodeada por una membrana más característica es el núcleo. Un huésped eucariota, incluyendo, por ejemplo, levadura, plantas superiores, insectos y células de mamíferos, o como alternativa a partir de una célula procarionta tal como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos no limitantes incluyen simio, bovino, porcino, murino, ratas, aviar, reptiliano y humano.

Las "células procariontas" que habitualmente carecen de un núcleo o cualesquiera otros orgánulos rodeados por una membrana y se dividen en dos dominios, bacterias y archaea. Además, en lugar de tener el ADN cromosómico, la información genética de estas células está en un bucle circular llamado un plásmido. Las células bacterianas son muy pequeñas, aproximadamente del tamaño de una mitocondria animal (aproximadamente 1-2 μm de diámetro y 10 μm de largo). Las células procariontas presentan tres formas principales: en forma de barra, esférica y en espiral. En vez de someterse a procesos de replicación elaborados como las eucariotas, las células bacterianas se dividen por fisión binaria. Los ejemplos incluyen aunque sin limitarse a bacterias bacillus, bacterias E. coli bacterias Salmonella.

La expresión "anticuerpo humano", tal 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 residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias marco humanas. Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente todas las partes de la proteína (por ejemplo, CDR, marco, dominios CL, CH (por ejemplo, CH1, CH2, Cm), bisagra, (VL, VH)) son sustancialmente no inmunógenas en seres humanos, con solamente cambios o variaciones de poca importancia en la secuencia. Del mismo modo, los anticuerpos designados de primate (mono, babuino, chimpancé, etc.), roedores (ratón, rata, conejo, cobaya, hámster, y similares) y otros mamíferos designan dichos anticuerpos específico de especie, subgénero, género, subfamilia, familia. Además, los anticuerpos quiméricos incluyen cualquier combinación de los anteriores. Dichos cambios o variaciones opcional y preferentemente retienen 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 una célula animal no humana o procarionta o eucariota que es capaz de expresar los genes de inmunoglobulina humana funcionalmente reordenados (por ejemplo, la cadena pesada y/o ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo monocatenario, puede comprender un péptido enlazador que no se encuentra en los anticuerpos humanos nativos. Por ejemplo, un Fv que puede comprender un péptido enlazador, tal como de dos a aproximadamente ocho residuos de glicina u otros aminoácidos, que une la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Se considera que dichos péptidos enlazadores son de origen humano.

Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano se "deriva de" una secuencia de línea germinal particular, si se obtiene el anticuerpo a partir de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo, mediante la inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana o cribando

una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humano que se “deriva de” una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede ser identificado 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 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de la línea germinal de inmunoglobulina humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como de ser humano, cuando se comparan 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 el 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntica en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular presentará no más de 10 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede presentar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la línea germinal de inmunoglobulina.

Un “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que presentan una sola especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. La expresión también pretende incluir anticuerpos humanos recombinantes. Procedimientos para fabricar estos anticuerpos se describen en el presente documento.

La expresión “anticuerpo humano recombinante”, tal 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 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, a partir de un transfectoma, anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implica splicing 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, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para 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. Procedimientos para fabricar estos anticuerpos se describen en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por genes de la región constante de cadena pesada.

Las expresiones “anticuerpo policlonal” o “composición de anticuerpo policlonal”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de anticuerpos que se derivan de diferentes líneas de células B. Son una mezcla de moléculas de inmunoglobulina secretadas contra un antígeno específico, que reconoce, cada una, un epítipo diferente.

Las expresiones “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad y afinidad de unión para un epítipo particular.

Tal como se usa en el presente documento, el término “etiqueta” pretende un compuesto o composición directa o indirectamente detectable que está conjugado directa o indirectamente a la composición a detectar, por ejemplo, polinucleótido o proteína tal como un anticuerpo para generar una composición “etiquetada”. El término también incluye secuencias conjugadas al polinucleótido que proporcionarán una señal en el momento de la expresión de las secuencias insertadas, tal como proteína verde fluorescente (GFP) y similares. La etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo etiquetas de radioisótopo o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable. Las etiquetas pueden ser adecuadas para detección a pequeña escala o más adecuadas para cribado de alto rendimiento. Por lo tanto, las etiquetas adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a, radioisótopos, fluoró cromos, compuestos quimioluminiscentes, tintes y proteínas, incluyendo enzimas. La etiqueta puede detectarse simplemente o puede cuantificarse. Una respuesta que es simplemente detectada en general comprende una respuesta cuya existencia meramente es confirmada, mientras que una respuesta que se cuantifica generalmente comprende una respuesta que tiene un valor cuantificable (por ejemplo, numéricamente notificable) tal como una intensidad, polarización, y/u otra propiedad. En ensayos de luminiscencia o fluorescencia, la respuesta detectable puede ser generada directamente a través de un luminóforo o fluoróforo asociado a un componente del ensayo implicado realmente en la unión, o indirectamente usando un luminóforo o fluoróforo asociado con otro componente (por ejemplo, informador o indicador).

Los ejemplos de etiquetas luminiscentes que producen señales incluyen, aunque sin limitarse a, bioluminiscencia y quimioluminiscencia. Una respuesta de luminiscencia detectable comprende generalmente un cambio en, o una aparición de, una señal de luminiscencia. Los procedimientos y luminóforos adecuados para los componentes de ensayo de etiquetado de forma 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, aunque sin limitarse a, aequorina y luciferasas.

Los ejemplos de etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde malaquita, estilbeno, Lucifer Yellow, 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, la etiqueta fluorescente se funcionaliza para facilitar unión covalente a un componente celular presente en o sobre la superficie de la célula o tejido tal como un marcador de la superficie celular. Grupos adecuados funcionales, incluyendo, aunque sin limitarse a, grupos isotiocianato, grupos amino, grupos haloacetilo, maleimidias, ésteres de succinimidilo, y haluros de sulfonilo, todos los cuales pueden ser utilizados para unir la etiqueta fluorescente a una segunda molécula. La elección del grupo funcional de la etiqueta fluorescente dependerá del sitio de unión ya sea a un enlazador, el agente, el marcador o el segundo agente de etiquetado.

II. Antídotos

Derivados de factor X y factor Xa

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

Se contempla que un antídoto para un inhibidor de fXa tiene actividad procoagulante reducida o ninguna pero es capaz de unirse con un inhibidor de fXa. Se contempla que dicha actividad limitada permita dosificar del antídoto a un nivel mayor que el fXa de tipo silvestre circulante. Ciertos derivados de fXa, tales como des-Gla fXa y FXa deficiente en Gla, son antídotos adecuados de esta divulgación. Además de tener actividad procoagulante reducida o disminuida, los antídotos de la presente invención deben ser también sustancialmente no inmunógenos para el sujeto. Un antídoto puede contener una combinación de dos o más de las anteriores mutaciones y/o modificaciones. Además, cualquiera de los anteriores derivados de fXa puede administrarse en solitario o en combinación con otro.

El factor Xa es una serina proteasa en la ruta de coagulación sanguínea responsable de convertir protrombina en trombina. Se produce a partir del factor X inactivo tras la activación por la Xasa intrínseca (complejo formado por el factor IXa con su cofactor, factor VIIIa) o la Xasa extrínseca (complejo formado por el factor VIIa con su cofactor, factor tisular). El fX activado (fXa) puede someterse a escisión autocatalítica adicional en el extremo C de su cadena pesada, que convierte fXa α en la subforma fXa β (Jesty, J y col. J. Biol. Chem. 1975, 250(12): 4497-4504). Tanto fXa α como fXa β son materiales adecuados para la presente invención. El propio fXa convierte la protrombina a una velocidad lenta que no es suficiente para apoyar la coagulación. Solamente cuando forma un complejo protrombinasa con cofactores Ca²⁺, fosfolípido, y factor Va, fXa puede activar la protrombina a una velocidad suficientemente rápida para apoyar la coagulación (Skogen, W.F., y col., J. Biol. Chem. 1984, 259(4): 2306-10). El complejo requiere unión entre el fosfolípido cargado negativamente y residuos de ácido γ -carboxiglutámico en el dominio Gla de fXa mediante establecimiento de puentes con Ca²⁺.

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 residuos de ácido γ -carboxiglutámico. Esto se demuestra mediante eliminación selectiva del dominio Gla de fXa mediante digestión con quimotripsina (véase la figura 7 y el ejemplo 1). Se realizaron ensayos de coagulación en fXa durante la evolución temporal de escisión del dominio Gla mediante digestión con quimotripsina. Se ha descrito (Skogen y col., J. Biol. Chem. 1984, 259(4): 2306-10) que un complejo protrombinasa reconstituido que comprende fXa sin dominio Gla, fVa, fosfolípidos e iones calcio produce trombina a una velocidad significativamente reducida (0,5% de producto generado en comparación con el complejo de control que contiene fXa nativo). Tal como se muestra en la figura 7, la actividad de fXa en la formación de coágulos se redujo parcialmente después de que fXa fue digerido mediante quimotripsina durante 15 minutos y la actividad se perdió completamente después de 30 minutos de digestión. Se ha descubierto, por lo tanto, que fXa no carboxilado o descarboxilado, que carecen de los residuos de ácido gamma-carboxiglutámico apropiados requeridos para unión a la membrana dependiente de calcio, son incapaces de ensamblaje del complejo de coagulación dependiente de membrana y no apoyan la coagulación sanguínea (Mann, KG y col., Blood, 1990, 76: 1-16).

Se ha establecido también que fXa deficiente en dominio Gla es capaz de unirse a inhibidores de fXa dirigidos al sitio activo. (Brandstetter, H y col., J. Bio. Chem., 1996, 271: 29988-29992). Ha habido informes de cristalografía de

inhibidor de fXa de molécula pequeña unido a des-Gla fXa humano, que proporcionaron descripción estructural del sitio activo escindido (Brandstetter, J. Bio. Chem., 1996, 271: 29988-29992 y Roehrig, J. Med. Chem. 2005, 48(19): 5900-8). La figura 8 muestra que un des-Gla anhidro-fXa mostraba una afinidad de unión de 0,319 nM con un inhibidor de fXa Betrixaban, comparable a la de un fXa nativo.

5 Se ha descubierto ahora que des-Gla fXa, y otros derivados de fXa que tienen actividad procoagulante reducida pero son capaces de unión al inhibidor de fXa, pueden usarse como un antídoto para un inhibidor de fXa. Tal como se muestra en la figura 9, el des-Gla anhidro-fXa mostraba inversión completa de actividad anticoagulante de Betrixaban a una concentración de 680 nM. Tal como se detalla en el ejemplo 2, la generación de trombina se inició
10 añadiendo reactivo que contenía TF (Innovin) y, por lo tanto, indicativa de función de factores de coagulación en la ruta 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.

15 Ensayos de prolongación de la coagulación con el reactivo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) (Actina FS) que determinan la función del factor de coagulación en la ruta de coagulación intrínseca también indican que el des-Gla anhidro-fXa posee actividad de antídoto. La figura 10 muestra el efecto de antídoto dependiente de la dosis de des-Gla anhidro-fXa contra 250 nM de Betrixaban, con inversión completa a 600 nM. La figura 11 muestra que des-Gla anhidro-fXa también fue capaz de invertir la actividad anticoagulante de otro inhibidor de fXa, enoxaparina. La figura 12 muestra que des-Gla anhidro-fXa no mostraba actividad de antídoto significativa contra un
20 inhibidor de trombina directo, argatroban. Por lo tanto, el des-Gla anhidro-fXa es un antídoto selectivo para inhibidor de fXa y es capaz de restaurar la actividad procoagulante de fXa iniciada por la ruta extrínseca o la intrínseca.

25 Además, la actividad de antídoto de des-Gla anhidro-fXa se demostró mediante los ensayos de prolongación del aPTT medido con un temporizador de coagulación tradicional. Tal como se muestra en la figura 13, el propio des-Gla anhidro-fXa no tiene ningún efecto sobre el aPTT de plasma de control a las concentraciones más altas ensayadas (2576 nM). 400 nM de Betrixaban prolongaban el aPTT más de dos veces. Este efecto anticoagulante de Betrixaban es invertido por des-Gla anhidro-fXa de manera sensible a la dosis, con retorno de aPTT a un nivel cercano al normal de plasma de control a concentraciones de antídoto mayores de 1610 nM.

30 Se contempla que truncamientos adicionales en la cadena ligera de fXa, por ejemplo, delección adicional del dominio EGF1, los dominios EGF1 más EGF2, o fragmentos de los mismos, y fXa inactivo con solamente la cadena pesada pueden ser antídotos útiles de esta divulgación. En una realización, el derivado comprende la supresión de sustancialmente todo el dominio EGF1, la supresión de sustancialmente la totalidad de un dominio EGF2, o ambos. En una realización, la supresión de sustancialmente todo el dominio EGF1 comprende al menos aproximadamente
35 el 50 % o al menos aproximadamente el 80 % de los restos de aminoácidos 46 a 84 de la SEQ ID NO. 3 o un equivalente del mismo. En otra realización, la supresión de sustancialmente todo el dominio EGF2 comprende al menos aproximadamente el 50 % o al menos aproximadamente el 80 % de los restos de aminoácidos 85-128 de la SEQ ID NO. 3.

40 FXa deficiente en dominio Gla no apoya coagulación normal por debajo de la concentración fisiológicamente relevante. Sin embargo, la proteína tiene la capacidad de escindir muchos sustratos y causar coagulación a concentraciones más elevadas. Por ejemplo, Skogen y col., (Skogen, W.F., y col., J. Biol. Chem. 1984, 259(4): 2306-10) mostraron que des-Gla fXa bovino tiene aproximadamente un 0,5-1,0% de actividad del complejo de protrombina con respecto al fXa de tipo silvestre. Por lo tanto, modificaciones que reducen adicionalmente o
45 eliminan completamente la actividad procoagulante de un derivado de fXa están contempladas por procedimientos de la invención. Dicha modificación puede ser, por ejemplo, en un dominio catalítico de fXa.

Varias maneras de modificar el dominio catalítico en la cadena pesada de fXa para reducir su actividad procoagulante están contempladas. El residuo del sitio activo S379 de fXa (tal como se muestra en la SEQ ID No. 7),
50 por ejemplo, puede sustituirse selectivamente por deshidroalanina (véase el ejemplo 1) o alanina (véase el ejemplo 6) para reducir o eliminar la actividad procoagulante. También se conoce que la formación de un complejo entre fXa y un reactivo dirigido al exosito de fXa puede bloquear la afinidad de unión macromolecular de fXa, reduciendo de este modo su actividad procoagulante mientras conserva afinidad de unión a molécula pequeña en el sitio activo. Este reactivo dirigido al exosito incluye, sin limitación, anticuerpos monoclonales dirigidos a una región eliminada del
55 sitio activo (Wilkins, M y Krishnaswamy, S, J. Bio. Chem., 2002, 277 (11), 9366-9374), o α -2-macroglobulina. Se ha conocido que el complejo α -2-macroglobulina-serina proteasa, tal como con tripsina, trombina o fXa, es capaz de unirse a sustrato de molécula pequeña (Kurolwa, K. y col., Clin. Chem. 1989, 35(11), 2169-2172).

60 También se conoce que un fXa inactivo con modificaciones únicamente en la cadena pesada, mientras mantiene su cadena ligera sin cambios, actuaría como un inhibidor de protrombina (Hollenbach, S. y col., Thromb. Haemost., 1994, 71(3), 357-62) dado que interfiere en la actividad procoagulante de fXa normal, tal como se muestra en la figura 6. Por lo tanto, en una realización, el derivado de fXa presenta modificaciones tanto en la cadena ligera como en la cadena pesada. Se ha descubierto que estas modificaciones reducen o eliminan las actividades tanto procoagulante como anticoagulante, mientras conservan la capacidad de unión a inhibidores del derivado de fXa.

65 Pueden usarse varios procedimientos para producir derivados de fXa deficiente en dominio Gla u otros derivados de

fXa descritos en el presente documento. Por ejemplo, el dominio Gla puede eliminarse completamente mediante escisión quimotriptica, produciendo fXa sin dominio Gla. Como alternativa, un fX sin dominio Gla puede producirse mediante escisión quimotriptica de fX nativo. El fX sin dominio Gla puede convertirse entonces en fXa sin dominio Gla mediante un activador de fX. fX puede aislarse de plasma de la misma o una especie diferente que el sujeto a tratar. fX bovino, por ejemplo, ha demostrado ser funcional en ensayos en plasma humano. Los ejemplos de un activador de fX incluyen, sin limitación, un veneno de serpiente, tal como veneno de víbora de Russell, y complejos de fVIIa/factor tisular o fIXa/fVIIIa. Dicho medio es conocido para un experto en la materia. Por ejemplo, Rudolph A.E. y col., describieron un fXa recombinante producido a partir de un factor X (fX) recombinante con una única 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 inmunógenos o sustancialmente no inmunógenos. El ejemplo 7 también proporciona un procedimiento de producción de un antídoto recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 12.

Los derivados de fXa también pueden purificarse a partir de plasma humano, o pueden producirse mediante un procedimiento de ADN recombinante donde un gen apropiado para el derivado de fXa se expresa en un organismo huésped adecuado. La expresión y purificación de fXa recombinante ha sido descrita por varios grupos, véase, por ejemplo, Larson, P.J., y col., Biochem., 1998, 37: 5029-5038, y Camire, R.M., y col., Biochem., 2000, 39, 14322-14329 para producir fX recombinante; Wolf, D.L. y col., J. Biol. Chem., 1991, 266(21): 13726-13730 para producir fXa recombinante. fXa modificado puede prepararse de acuerdo con estos procedimientos usando un cADN modificado genéricamente que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica el fXa mutante deseado. El ejemplo 6 da más detalles para expresión directa de un fXa sin dominio Gla-S379 mutante con actividad funcional como antídoto.

Está contemplado que fXa mutado o modificado en el sitio activo con dominio Gla deficiente, tal como fXa subcarboxilado, también pueda ser útil como antídoto de inhibidor de fXa. El fXa subcarboxilado puede prepararse mediante medios recombinantes reteniendo derivados de vitamina K durante la expresión de proteínas (los derivados de vitamina K son necesarios para modificación postraduccional para formar los residuos de Gla) o añadiendo antagonistas de vitamina K tales como warfarina durante el cultivo tisular. fXa descarboxilado puede prepararse calentando (Bajaj P., J. Biol. Chem., 1982, 257(7): 3726-3731) o mediante digestión proteolítica mediante quimotripsina (Morita T., y col., J. Biol. Chem., 1986, 261(9): 4015-4023). El antídoto también puede generarse en sistemas procariotas seguido por plegamiento o constitución in vitro del sitio de unión del inhibidor de fXa.

Los residuos de Gla también pueden modificarse químicamente para eliminar el grupo carboxilo responsable de unión a la membrana dependiente de iones calcio. Por ejemplo, los grupos carboxilo en los residuos de Gla pueden eliminarse selectivamente en condiciones de descarboxilación o pueden estar cubiertos, por ejemplo, mediante esterificación o aminación. Es deseable que dicha esterificación o aminación sea resistente a 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 esta invención. En una realización, esta invención abarca el uso de mutantes descritos en Peter J. Larson y col., Biochem., 1998, 37: 5029-5038 como antídotos de inhibidores de fXa.

Pueden hacerse modificaciones adicionales de la proteína fX para producir antídotos útiles para los inhibidores de fXa. Una modificación de este tipo incluye la supresión de todo o parte del péptido de activación en el extremo N-terminal de la cadena pesada. En una realización de la divulgación, esto incluye la supresión de todos los de la parte del péptido de activación o de los restos de aminoácidos 143-194 de la SEQ ID NO. 3 o un equivalente del mismo. Esto puede lograrse mediante procedimientos descritos en Sinha y col., *Protein Expression and Purification*, 3, 518-524 (1992) y Wolf y col., *J. Biol. Chem.* 266(21), 13726-13730 (1991). Se describen a continuación métodos adicionales.

En otra realización, una modificación de aminoácidos impide la escisión de un péptido β en el que el péptido β se refiere a una parte o a toda la cadena pesada. Esta modificación puede incluir la supresión, la sustitución o la inserción de un aminoácido. Dicha modificación incluye sustituciones de uno o más de Arg429 o Ser436. Por ejemplo, hay una sustitución Arg 429Gln y también puede incluir una sustitución Thr443Ala. La conversión de fXaa a fXap ha sido descrita por, por ejemplo, por Prydzial y Kessler (Prydzial LG y Kessler GE, *Journal of Biological Chemistry*, 271 (28), 16621-16626 (1996)). La patente de los EE.UU. 7.220.569 (B2) describe modificaciones en el péptido de activación fX y el péptido β .

En otra realización más, el derivado comprende una supresión de un péptido β . En una realización, la supresión del péptido β comprende una supresión de al menos los restos de aminoácidos 430-448 de la SEQ ID NO. 3 o un equivalente del mismo.

En otra realización, una secuencia de péptido señal del factor X nativo o una secuencia de péptido señal alternativa se usan para expresar los derivados. Por ejemplo, el péptido señal del factor X nativo (SEQ ID NO. 18) puede utilizarse como la secuencia señal para la SEQ ID NO. 12-15 y 19-25. El péptido señal puede seleccionarse entre un péptido señal del factor X (SEQ ID NO. 18), un péptido señal de la transferrina (restos de aminoácidos SP1-SP19 de la SEQ ID NO. 27) y un péptido señal de la protrombina (restos de aminoácidos SP1-SP24 de SEQ ID. NO 26). Se

contempla que el péptido señal del factor X pueda usarse en que el péptido señal de cualquiera de las secuencias descritas en este documento. El uso de un péptido señal de la protrombina en la sustitución del péptido señal nativo fX ha sido descrito por Guarna y col. (Guarna MM y col., *Protein Expression and Purification*, 20(2) 133-41 (2000)) y Camire y col. (Camire RM, y col., *Biochemistry*, 39, 14322-14329 (2000)). El uso de péptido señal de transferencia ha sido descrito por Rezaie y Esmon (Rezaie AR y Charles T. Esmon CT, *J. Biol. Chem.*, 267 (36), 26104-26109 (1992)).

En otra realización más de la invención, el polipéptido tiene un péptido precursor que es una cadena polipeptídica. En una realización, hay un enlazador RKR (SEQ ID NO. 40) a un C-terminal de una cadena ligera o un enlazador RKRRKR (SEQ ID NO. 41) en el extremo C-terminal de una cadena ligera. En otra realización, el derivado es un polipéptido de dos cadenas. La expresión de un fXa mutante adecuado como antídoto o precursor de antídoto de la invención con un enlazador RKRRKR se ha descrito con todo detalle en la publicación de patente de los Estados Unidos 2009/0098119A1. El uso del enlazador RKR (SEQ ID NO. 40) para conectar la cadena ligera fXa y el péptido de activación se ha analizado en la patente de los EE.UU. 5.990.079.

En otra realización, esta invención abarca el uso de mutantes de fXa catalíticamente inactivos para preparar antídotos de inhibidores de fXa. Por ejemplo, mutantes descritos en Sinha, U., y col., *Protein Expression and Purif.* 1992, 3: 518-524 rXai, mutantes con modificaciones químicas, tales como deshidroalanina (anhidro fXa), tal como se describe en Nogami, y col., *J. Biol. Chem.* 1999, 274(43): 31000-7. FXa con serina en el sitio activo (Ser379 en numeración de fX tal como se muestra en la SEQ ID NO. 7, y Ser195 en numeración de quimotripsina) sustituida por alanina (fXa-S379A en numeración de fX, o fXa-S195A en numeración de quimotripsina), donde la actividad procoagulante se eliminó, también pueden usarse como antídotos de inhibidores de fXa. La invención también prevé derivados de fXa con el residuo serina del sitio activo acilado de forma irreversible que aún es capaz de unirse a inhibidores de molécula pequeña. FXa con la serina del sitio activo acilada de forma reversible ha sido descrita por Wolf, y col., *Blood*, 1995, 86(11): 4153-7. Dicha acilación reversible, sin embargo, es capaz de producción dependiente del tiempo de fXa activo y puede conducir a un exceso de fXa activo durante un periodo de tiempo. La velocidad de desacilación puede reducirse mediante estrategias similares a las descritas en Lin P.H. y col., *Thrombosis Res.*, 1997, 88(4), 365-372. Por ejemplo, moléculas de fXa con Ser379 (Ser195 en numeración de quimotripsina) acilada mediante 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 refiere al uso de derivados de fXa con mutaciones en residuos de fXa que se sabe que son importantes para interacción de fXa con el cofactor fV/fVa. Dichos residuos incluyen, sin limitación, Arg306, Glu310, Arg347, Lys351 o Lys414 (SEQ ID NO. 3 y 7, estos aminoácidos corresponden a Arg125, Glu129, Arg165, Lys169, Lys230 en la numeración de quimotripsina). Los ejemplos de dichos mutantes se describen en Rudolph, A.E. y col., *J. Bio. Chem.*, 2001, 276: 5123-5128. Además, mutaciones en residuos de fXa que se sabe que son importante para la interacción fVIII/fVIIIa, tales como Arg424 en la SEQ ID NO. 3 y 7 (Arg240 en numeración de quimotripsina), también pueden usarse como antídotos de inhibidores de fXa. Los ejemplos de dichos mutantes se describen en Nogami, K. y col., *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(32): 33104-33113.

Otra modificación de residuos del sitio activo de fXa o residuos que se sabe que son importantes para interacciones con serina proteasa también pueden conducir a antídotos útiles de esta invención, por ejemplo, sustitución de Glu216, Glu218, y Arg332 en la SEQ ID NO. 3 y 7 (Glu37, Glu39 y Arg150 en numeración de quimotripsina, respectivamente) con otros residuos de aminoácido.

Una realización se refiere a mutaciones en el bucle de autólisis de la cadena pesada de FXa para eliminar la degradación potencial. FXa, como otras serina proteasas de la familia, tiene un bucle de superficie expuesto (bucle de autólisis) que es susceptible a la escisión por diversas proteasas. Este bucle, incluyendo los aminoácidos RTHEKGRQSTR (SEQ ID NO. 39), que son los aminoácidos 366 a 376 de la SEQ ID NO. 1, contiene varios restos cargados positivamente (Arg366, Lys370, Arg372, Arg376) con Arg372 como el sitio potencial de reconocimiento para la escisión (Brandstetter H., et. al., *J. Biol. Chem.*, 271 (1996), 29988-29992). Se completa que estos restos cargados están mutados a Gln (Q) o Ala (A) para prohibir la posible escisión. En un aspecto, la mutación es Arg366Q/A. En otro aspecto, la mutación es Lys370Q/A. En otro aspecto más, la mutación es Arg372Q/A. En otro aspecto más, la mutación es Arg376Q/A. En algunas realizaciones, un derivado de fXa tiene una o más de dichas mutaciones.

Una realización de la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene al menos un 95 % de homología a las SEQ ID NO. 12 o 13 que comprende además una o más mutaciones seleccionadas entre el grupo que consiste en Arg366Q/A, Lys370Q/A, Arg372Q/A, Arg376Q/A y sus combinaciones. Los polipéptidos incluidos en la invención incluyen tanto el polipéptido de cadena única (es decir, antes de que el polipéptido se excrete de la célula), así como el polipéptido de dos cadenas (es decir, después de la escisión en el enlazador después de que se secreta de la célula).

En una realización, la actividad procoagulante residual de un antídoto, según lo evaluado mediante ensayo de escisión de sustrato amidolítico, es < 1%, preferentemente < 0,1%, más preferentemente < 0,05 % de fXa nativo derivado de plasma humano. Por ejemplo, no hay ninguna actividad procoagulante medible para fXa-S379A

recombinante cuando el sitio activo Ser379 (S195 en numeración de quimotripsina) es sustituido por un residuo de alanina según lo medido mediante ensayos de coagulación.

La invención se refiere además a secuencias de ácido nucleico, en particular secuencias de ADN, que codifican los derivados de fXa descritos anteriormente. Éstas pueden determinarse fácilmente traduciendo la secuencia polipeptídica de vuelta a la secuencia de ADN correspondiente de acuerdo con el código genético. Los codones usados preferentemente son aquellos que causan la expresión correcta en el organismo huésped requerido. Las secuencias de ácido nucleico pueden prepararse mediante mutagénesis específica de sitio comenzando a partir de la secuencia génica de fXa natural o incluso mediante síntesis de ADN completo.

Polipéptidos de la invención

En ciertos aspectos, la invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende

(A)

(i) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 12 o 13 que comprende adicionalmente una modificación en el bucle de autólisis de la cadena pesada de la SEQ ID NO. 12 o 13 o

(ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 12 o 13, y que comprende adicionalmente una o más mutaciones seleccionadas entre el grupo que consiste en Arg366Q/A, Lys370Q/A, Arg372Q/A, Arg376Q/A, y combinaciones de los mismos; en el que el bucle de autólisis corresponde a los restos de aminoácidos 366-376 de la SEQ ID NO. 1;

(B) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 20 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 20, en la que el polipéptido no contiene el extremo C-terminal del factor Xa de tipo silvestre después del resto de aminoácido que corresponde a Arg429 de la SEQ ID NO. 3;

(C) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 21 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 21, en la que el polipéptido tiene Gln en el resto de aminoácido correspondiente a Arg429 de la SEQ ID NO. 3; o

(D) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 22 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 22, en la que el polipéptido tiene Gln en el resto de aminoácido que corresponde a Arg429 de la SEQ ID NO. 3, y

tiene Ala en el resto de aminoácido que corresponde a Thr443 de la SEQ ID NO. 3, en el que el polipéptido (a) tiene una actividad procoagulante reducida en comparación con el factor Xa de tipo silvestre, (b) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa, y (c) no se ensambla en un complejo de protrombinasa.

Los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de la invención pueden prepararse expresando polinucleótidos que codifican las secuencias polipeptídicas de esta invención en una célula huésped apropiada. Esto puede conseguirse mediante procedimientos de tecnología de ADN recombinante conocidos por los expertos en la materia. Por consiguiente, esta invención también proporciona procedimientos para producir de forma recombinante los polipéptidos de esta invención en una célula huésped eucariota o procariota. Las proteínas y polipéptidos de esta invención también pueden obtenerse 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 polipéptido sintetizado pueden precipitarse y purificarse adicionalmente, por ejemplo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Por consiguiente, esta divulgación también proporciona un proceso para sintetizar químicamente las proteínas de esta invención proporcionando la secuencia de la proteína y reactivos, tales como aminoácidos y enzimas y uniendo entre sí los aminoácidos en la orientación y la secuencia lineal apropiadas.

Es conocido para los expertos en la materia que pueden realizarse modificaciones a cualquier péptido para proporcionarle propiedades alteradas. Los polipéptidos de la invención pueden modificarse para incluir 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, β -metil aminoácidos, C- α -metil aminoácidos, y N- α -metil aminoácidos, etc.) para llevar propiedades especiales a péptidos. Adicionalmente, asignando aminoácidos específicos en etapas de acoplamiento específicas, pueden generarse péptidos con hélices α , giros β , láminas β , giros α , y péptidos cíclicos. Generalmente, se cree que se prefiere estructura secundaria α -helicoidal o estructura secundaria aleatoria.

En una realización adicional, se seleccionarán subunidades de polipéptidos que otorgan propiedades químicas y estructurales útiles. Por ejemplo, péptidos que comprenden D-aminoácidos pueden ser resistentes a proteasas específicas de L-aminoácidos in vivo. Compuestos modificados con D-aminoácidos pueden sintetizarse con los aminoácidos alineados en orden inverso para producir los péptidos de la invención como péptidos retro-inversos. Además, la presente invención prevé preparar péptidos que tienen propiedades estructurales mejor definidas, y el uso de peptidomiméticos, y enlaces peptidomiméticos, tales como enlaces éster, para preparar péptidos con propiedades novedosas. En otra realización, puede generarse un péptido que incorpore un enlace peptídico

reducido, es decir, R1-CH₂NH-R2, donde R1, y R2 son residuos o secuencias de aminoácido. Un enlace peptídico reducido puede introducirse como una subunidad dipéptido. Dicha molécula sería resistente a hidrólisis de enlaces peptídicos, por ejemplo, actividad proteasa. Dichas moléculas proporcionarían ligandos con función y actividad únicas, tales como semividas prolongadas in vivo debido a resistencia a descomposición metabólica, o actividad proteasa. Además, es bien conocido que, en ciertos sistemas, péptidos constreñidos muestran actividad funcional mejorada (Hruby (1982) *Life Sciences* 31: 189-199 y Hruby y col., (1990) *Biochem J.* 268: 249-262); la presente invención proporciona un procedimiento para producir un péptido constreñido que incorpora secuencias aleatorias en todas las demás posiciones.

Los siguientes aminoácidos no convencionales pueden incorporarse en los péptidos de la invención para introducir motivos conformacionales particulares: 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato (Kazmierski y col., (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-aminotetrahidronaftaleno-2-carboxílico (Landis (1989) Tesis Doctoral, Universidad de Arizona); hidroxí-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato (Miyake y col., (1989) *J. Takeda Res Labs.* 43:53-76) ácido carboxílico de histidina e isoquinolina (Zechel y col., (1991) *Int. J. Pep Protein Res* 38 (2): 131-138); e HIC (histidina urea cíclica), (Dharanipragada y col., (1993) *Int. J. Pep. Protein Res* 42 (1): 68-77) y (Dharanipragada y col., (1992) *Acta Crystallogr. C.* 48: 1239-1241).

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

Es conocido por los expertos en la materia que pueden realizarse modificaciones a cualquier péptido sustituyendo uno o más aminoácidos con uno o más aminoácidos funcionalmente equivalentes que no alteran la función biológica del péptido. En un aspecto, el aminoácido que es sustituido por un aminoácido que posee propiedades intrínsecas similares incluyendo, aunque sin limitación, hidrofobicidad, tamaño o carga. Procedimientos usados para determinar el aminoácido apropiado a sustituir y por qué aminoácido, son conocidos para un experto en la materia. Los ejemplos no limitantes incluyen modelos de sustitución empíricos tal como se describe por Dahoff y col., (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure Vol. 5 supl. 2* (ed. M.O. Dayhoff), págs. 345-352. National Biomedical Research Foundation, Washington DC; Matrices PAM incluyendo matrices de Dayhoff (Dahoff y col., (1978), supra, o matrices JTT tal como se describe por Jones y col., (1992) *Comput. Appl. Biosci.* 8: 275-282 y Gonnet y col., (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) según lo descrito por Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 89:109; modelos de Poisson según lo descrito por Nei (1987) *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press, New York.; y el procedimiento de la Máxima Probabilidad (ML) según lo descrito por Muller y col., (2002) *Mol. Biol. Evol.* 19: 8-13.

Conjugados polipeptídicos

Los polipéptidos y complejos polipeptídicos de la invención pueden usarse en diversas formulaciones, que pueden variar dependiendo del uso pretendido. Por ejemplo, uno o más pueden estar enlazados (complejados) de forma covalente o no covalente a diversas otras moléculas, cuya naturaleza puede variar dependiendo del fin particular. Por ejemplo, un péptido de la invención puede complejarse de forma covalente o no covalente con un transportador macromolecular, incluyendo, aunque sin limitación, polímeros, proteínas, polisacáridos, polipéptidos (aminoácidos), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, y lípidos naturales y sintéticos. Un péptido puede estar conjugado a un ácido graso, para introducción en un liposoma, véase la patente de Estados Unidos N.º 5.837.249. Un péptido de la invención puede complejarse de forma covalente o no covalente con un soporte sólido, de los cuales se conoce una variedad en la técnica y se describen en el presente documento. Un epítipo de péptido antigénico de la invención puede estar asociado con una matriz de presentación de antígenos tal como un complejo MHC con o sin moléculas coestimuladoras.

Los ejemplos de transportadores de proteína incluyen, aunque sin limitarse a, superantígenos, albúmina de suero, toxoide tetánico, ovoalbúmina, tiroglobulina, mioglobulina e inmunoglobulina.

Polímeros transportadores de péptido-proteína pueden formarse usando agentes de reticulación convencionales

tales como carbodiimidias. Son ejemplos de carbodiimidias 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida (CMC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y 1-etil-3-(4-azonia-44-dimetilpentil) carbodiimida.

5 Son ejemplos de otros agentes de reticulación adecuados bromuro de cianógeno, glutaraldehído y anhídrido succínico. En general, 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 haluro de alquilo homobifuncional, un disulfuro de piridilo homobifuncional, un haluro de arilo homobifuncional, una hidrazida homobifuncional, un derivado de diazonio homobifuncional y un compuesto fotorreactivo homobifuncional pueden utilizarse. También se incluyen compuestos
10 heterobifuncionales, por ejemplo, compuestos que tienen un amina-reactivo y un grupo sulfhidrilo-reactivo, compuestos con un amina-reactivo y un grupo fotorreactivo y compuestos con un carbonilo-reactivo y un grupo sulfhidrilo-reactivo.

15 Ejemplos específicos de dichos agentes de reticulación homobifuncionales incluyen los ditiobis N-hidroxisuccinimida ésteres (succinimidilpropionato) bifuncionales, suberato de disuccinimidilo, y tartrato de disuccinimidilo; los imido-ésteres de adipimidato de dimetilo bifuncionales, pimelimidato de dimetilo, y suberimidato de dimetilo; los agentes de reticulación sulfhidrilo-reactivo bifuncionales 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)propionamido]butano, bismaleimidohexano, y bis-N-maleimido-1,8-octano; los haluros de arilo bifuncionales 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno y 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenulsulfona; agentes fotorreactivos bifuncionales tales como bis-[b-(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro; los
20 aldehídos bifuncionales formaldehído, malondialdehído, succinaldehído, glutaraldehído y adipaldehído; un epóxido bifuncional tal como 1,4-butanodiol diglicidil éter; la hidrazidas bifuncionales dihidrazida de ácido adipico, carbhidrazida y dihidrazida de ácido succínico; los diazonios bifuncionales o-tolidina, diazotan y bencidina bis-diazotan; los haluros de alquilo bifuncionales N1N'-etilen-bis(yodoacetamida), N1N'-hexametilen-bis(yodoacetamida), N1N'-undecametileno-bis(yodoacetamida), así como haluros de bencilo y halomostazas, como
25 ácido ala'-diyodo-p-xileno sulfónico y tri(2-cloroetil)amina, respectivamente.

Los ejemplos de agentes de reticulación heterobifuncionales comunes que pueden usarse para efectuar la conjugación de proteínas a péptidos incluyen, aunque sin limitarse a, SMCC (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato), MBS (m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster), SIAB (N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato), SMPB (succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato), GMBS (N-(γ -maleimidobutiriloxi)succinimida éster), MPBH hidrazida de ácido (4-(4-N-maleimidofenil) butírico), M2C2H (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilo-hidrazida), SMPT (succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno), y SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo).

30 La reticulación puede conseguirse acoplado un grupo carbonilo a un grupo amino o un grupo hidrazida mediante aminación reductora.

Los péptidos de la invención también se pueden formular como unión no covalente de monómeros a través de interacciones iónicas, de adsorción o bioespecíficas. Los complejos de péptidos con moléculas altamente cargadas
40 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. Pueden crearse complejos grandes usando polímeros cargados tales como ácido poli-(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 a otros polímeros hidrófobos, formando complejos de péptido-superantígeno asociados no covalentemente que imitan de manera efectiva la proteína reticulada o polimerizada químicamente. Finalmente, los
45 péptidos pueden estar enlazados no covalentemente a través del uso de interacciones bioespecíficas entre otras moléculas. Por ejemplo, la utilización de la fuerte afinidad de la biotina por proteínas tales como avidina o estreptavidina o sus derivados se podría utilizar para formar complejos peptídicos. Estas proteínas de unión a biotina contienen cuatro sitios de unión que pueden interactuar con biotina en solución o unirse covalentemente a otra
50 molécula. (Véase Wilchek (1988) Anal Biochem 171: 1-32). Los péptidos pueden ser modificados para poseer grupos biotina usando reactivos de biotilación comunes tales como el éster de N-hidroxisuccinimidilo de D-biotina (NHS-biotina) que reacciona con los grupos amino disponibles de la proteína. Péptidos biotinilados pueden ser incubados a continuación con avidina o estreptavidina para crear complejos grandes. La masa molecular de dichos polímeros puede ser regulada a través de un control cuidadoso de la relación molar del péptido biotinilado con
55 respecto a la avidina o estreptavidina.

También se proporcionan mediante esta solicitud los péptidos y polipéptidos descritos en el presente documento conjugados a una etiqueta, por ejemplo, una etiqueta fluorescente o bioluminiscente, para uso en los procedimientos de diagnóstico. Por ejemplo, péptidos y polipéptidos etiquetados de forma detectable pueden estar unidos a una
60 columna y usarse para la detección y purificación de anticuerpos. Las etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde Malaquita, estilbeno, Lucifer Yellow, Cascade Blue TM, y Rojo Texas. Otros colorantes ópticos adecuados se describen en Haugland, Richard P. (1996) Molecular Probes Handbook.

65 Los polipéptidos de esta invención también pueden combinarse con diversos transportadores en fase líquida, tales como soluciones estériles o acuosas, transportadores farmacéuticamente aceptables, suspensiones y emulsiones.

Los ejemplos de disolventes no acuosos incluyen propilenglicol, polietilenglicol y aceites vegetales. Cuando se usan para preparar anticuerpos, los transportadores también pueden incluir un adyuvante que es útil para aumentar inespecíficamente una respuesta inmunitaria específica. Un experto en la materia puede determinar fácilmente si se requiere un adyuvante y seleccionar uno. Sin embargo, para fin de ilustración solamente, los adyuvantes adecuados incluyen, aunque sin limitarse a, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund y sales minerales.

Células huésped

También son proporcionadas células huésped que comprenden uno o más de los polipéptidos de esta invención. En un aspecto, los polipéptidos se expresan y presentan en la superficie celular (de forma extracelular). Células adecuadas que contienen los polipéptidos de la invención incluyen células procariotas y eucariotas, que incluyen, aunque sin limitarse a, 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 pueden adquirirse de un proveedor comercial tales como la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville Maryland, EE. UU.) o cultivarse a partir de un aislado usando procedimientos conocidos en la técnica. Los ejemplos de células eucariotas adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a, células 293T HEK, así como la línea celular de hámster CHO, BHK-21; las líneas celulares murinas designadas NIH3T3, NS0, C127, las líneas celulares de simio COS, Vero; y las líneas celulares humanas HeLa, PER.C6 (disponible en el mercado de Crucell) U-937 y Hep G2. Un ejemplo no limitante de células de insecto incluyen *Spodoptera frugiperda*. Los ejemplos de levaduras útiles para la expresión incluyen, aunque sin limitarse a *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*, *Yarrowia* o *Pichia*. Véase por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 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 especificidad de especie, las células pueden ser de cualquier tipo de tejido particular tal como neuronal o como alternativa una célula madre somática o embrionaria tal como una célula madre que puede o no puede diferenciarse en una célula neuronal, por ejemplo, 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

Esta invención también proporciona los polinucleótidos complementarios a las secuencias identificadas anteriormente o sus complementos. La complementariedad puede determinarse usando hibridación tradicional en condiciones de astringencia moderada o alta. Tal como se usa en el presente documento, el término polinucleótido pretende ADN y ARN así como nucleótidos modificados. Por ejemplo, esta invención también proporciona la cadena de polinucleótido antisentido, por ejemplo ARN antisentido a estas secuencias o sus complementos.

También son proporcionados por la divulgación polinucleótidos que codifican polipéptidos sustancialmente homólogos y biológicamente equivalentes a los polipéptidos y complejos polipeptídicos de la invención. Sustancialmente homólogos y biológicamente equivalentes pretende incluir aquellos que tienen grados de homología variables, tales como al menos el 65%, o como alternativa, al menos el 70%, o como alternativa, al menos el 75%, o como alternativa al menos el 80%, o como alternativa, al menos el 85%, o como alternativa al menos el 90%, o como alternativa, al menos el 95%, o como alternativa al menos el 97% homólogos, tal como se ha definido anteriormente, y que codifican polipéptidos que tienen la actividad biológica para unirse a inhibidores del factor Xa y no se ensamblan en el complejo de protrombina, tal como se describe en el presente documento. Debe entenderse, aunque no siempre se afirma explícitamente, que realizaciones para polipéptidos y polinucleótidos sustancialmente homólogos están destinadas para cada aspecto de esta invención, por ejemplo, polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos.

Los polinucleótidos de esta invención pueden replicarse usando técnicas recombinantes convencionales. Como alternativa, los polinucleótidos pueden replicarse usando tecnología de PCR. La PCR es el asunto de las patentes de Estados Unidos 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 y col., eds, Birkhauser Press, Boston (1994)) y referencias citadas en ese documento. Es 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, esta divulgación también proporciona un proceso para obtener los polinucleótidos de esta invención proporcionando la secuencia lineal del polinucleótido, moléculas de cebador apropiadas, productos químicos tales como enzimas e instrucciones para su replicación y replicar o enlazar químicamente los nucleótidos en la orientación apropiada para obtener los polinucleótidos. En una realización diferente, estos polinucleótidos se aíslan adicionalmente. Es más, un experto en la materia puede enlazar de forma operativa 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 replicación y amplificación. El ADN amplificado de este modo puede aislarse de la célula mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Un proceso para obtener polinucleótidos mediante este procedimiento se proporciona adicionalmente en el presente documento así como los polinucleótidos obtenidos de este modo.

- Puede obtenerse ARN insertando en primer lugar un polinucleótido de ADN en una célula huésped procariota o eucariota adecuada. El ADN puede insertarse mediante cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, mediante el uso de un vehículo de suministro de genes apropiado (por ejemplo, liposoma, plásmido o vector) o mediante electroporación. Cuando la célula se replica y el ADN es transcrito a ARN; el ARN puede aislarse a continuación usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, tal como se describe en Sambrook y Russell (2001) *in vitro*. Por ejemplo, puede aislarse mARN usando diversas enzimas líticas o soluciones químicas de acuerdo con los procedimientos descritos en Sambrook y Russell (2001) *supra* o extraerse mediante resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones adjuntas proporcionadas por los fabricantes.
- En un aspecto, el ARN es ARN interferente pequeño, también conocido como siARN. Los procedimientos para preparar y cribar ARN interferente y seleccionarlo por la capacidad de bloquear la expresión de polinucleótidos se conocen en la técnica y ejemplos no limitantes de los mismos se muestran a continuación. Estos ARN interferentes son proporcionados por esta divulgación.
- Las secuencias de siARN pueden diseñarse obteniendo la secuencia de mARN diana y determinando una secuencia complementaria de siARN apropiada. Los siARN de la invención están diseñados para interactuar con una secuencia diana, lo que significa que complementan una secuencia diana suficientemente para hibridar con esa secuencia. Un siARN puede ser el 100% idéntico a la secuencia diana. Sin embargo, la homología de la secuencia de siARN con la secuencia diana puede ser menor del 100% siempre que el siARN pueda hibridar con la secuencia diana. Por lo tanto, por ejemplo, la molécula de siARN puede ser al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia diana o el complemento de la secuencia diana. Por lo tanto, también pueden usarse moléculas de siARN con inserciones, deleciones o mutaciones puntuales individuales con respecto a una diana. La generación de varias secuencias de siARN diferentes por mARN diana se recomienda para permitir el cribado para la secuencia diana óptima. Una búsqueda de homología, tal como una búsqueda BLAST, debe realizarse para garantizar que la secuencia de siARN no contiene homología a ningún gen de mamífero conocido.

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

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

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

El término siARN incluye ARN de horquilla corto (shARN). Los shARN comprenden una única cadena de ARN que forma una estructura tallo-bucle, donde el tallo consiste en las cadenas sentido y antisentido complementarias que comprenden un siARN bicatenario, y el bucle es un enlazador de tamaño variable. La estructura del tallo de los shARN generalmente es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de largo. Por ejemplo, el tallo puede ser de 10-30 nucleótidos de largo, 12-28 nucleótidos de largo, 15-25 nucleótidos de largo, 19-23 nucleótidos de largo o 21-23 nucleótidos de largo.

Herramientas para ayudar al diseño de siARN están fácilmente disponibles para el público. Por ejemplo, una herramienta de diseño de siARN basado en ordenador está disponible en internet en www.dharmacon.com, último acceso el 26 de noviembre de 2007.

Síntesis de dsARN y siARN

dsARN y siARN pueden sintetizarse química o enzimáticamente *in vitro* tal 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 puede realizarse mediante procedimientos manuales o automatizados, ambos de los cuales se conocen bien en la técnica, tal como se describe en Micura (2002), *supra*. El siARN también puede expresarse de forma endógena dentro de las células en forma de shARN tal como se describe en Yu y col., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 99: 6047-6052; y McManus y col., (2002) *RNA* 8: 842-850. La expresión endógena se ha conseguido usando sistemas de expresión basados en plásmido usando pequeños promotores de ARN nuclear, tales como ARN polimerasa III U6 o H1, o ARN polimerasa II U1 tal como se describe en Brummelkamp y col., (2002) *Science* 296: 550-553 (2002); y Novarino y col., (2004) *J. Neurosci.* 24: 5322-5330.

La síntesis enzimática in vitro de dsARN y siARN puede realizarse usando un proceso mediado por ARN polimerasa para producir cadenas sentido y antisentido individuales que se hibridan in vitro antes del suministro al interior de las células elegidas, tal como se describe en Fire y col., (1998) *Nature* 391: 806-811; Donze y Picard (2002) *Nucl. Acids Res.* 30(10): e46; Yu y col., (2002); y Shim y col., (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 30413-30416. Varios fabricantes (Promega, Ambion, New England Biolabs, y Stragene) producen kits de transcripción útiles para realizar la síntesis in vitro.

La síntesis in vitro de siARN puede conseguirse, por ejemplo, usando un par de oligonucleótidos dobles cortos que contienen promotores de T7 ARN polimerasa cadena arriba de las secuencias de ARN sentido y antisentido como plantilla de ADN. Cada oligonucleótido del dúplex es una plantilla diferente para la síntesis de una cadena del siARN. Las cadenas de ARN cortas diferentes que se sintetizan se hibridan a continuación para formar siARN tal como se describe en *Protocols and Applications, Chapter 2: RNA interference, Promega Corporation, (2005).*

La síntesis in vitro de dsARN puede conseguirse, por ejemplo, usando un promotor de T7 ARN polimerasa en los extremos 5' de ambas cadenas de la secuencia diana de ADN. Esto se consigue usando plantillas de ADN diferentes, que contienen, cada una, la secuencia diana en una orientación diferente con respecto al promotor T7, transcritas en dos reacciones diferentes. Los transcritos resultantes se mezclan e hibridan de forma posttranscripcional. Plantillas de ADN usadas en esta reacción pueden crearse mediante PCR o usando dos plantillas de plásmido linealizadas, que contienen, cada una, el promotor de T7 polimerasa en un extremo diferente de la secuencia diana. *Protocols and Applications, Chapter 2: RNA interference, Promega Corporation, (2005).*

Para expresar las proteínas descritas en el presente documento, el suministro de secuencias de ácido nucleico que codifican el gen de interés pueden suministrarse mediante varias técnicas. Ejemplos de los cuales 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 ADN/liposoma, micelas y complejos de proteína-ADN viral dirigidos) tal 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 α) o promotores específicos de tejido (por ejemplo el promotor de calcio calmodulina quinasa 2 (CaMKI), promotor NSE y promotor Thy-1 humano). Como alternativa, los niveles de expresión pueden controlarse mediante el uso de un sistema promotor inducible (por ejemplo promotor Tet on/off) tal como se describe en Wiznerowicz y col., (2005) *Stem Cells* 77: 8957-8961.

Los ejemplos no limitantes de promotores incluyen, aunque sin limitarse a, el promotor de citomegalovirus (CMV) (Kaplit y col., (1994) *Nat. Genet.* 8: 148-154), promotor CMV/humano β 3-globina (Mandel y col., (1998) *J. Neurosci.* 18: 4271-4284), promotor NCX1, promotor α MHC, promotor MLC2v, promotor GFAP (Xu y col., (2001) *Gene Ther.*, 8: 1323-1332), el promotor de enolasa específica de neuronas de 1,8-kb (NSE) (Klein y col., (1998) *Exp. Neurol.* 150: 183-194), el promotor de beta actina de pollo (CBA) (Miyazaki (1989) *Gene* 79: 269-277) y el promotor de β -glucuronidasa (GUSB) (Shiple y col., (1991) *Genetics* 10: 1009-1018), el promotor de albúmina de suero humano, el promotor de alfa-1-antitripsina. Para mejorar la expresión, otros elementos reguladores pueden unirse adicionalmente de forma operativa al transgén, tales como, por ejemplo, el elemento post-regulador del virus de la Hepatitis de marmota (WPRE) (Donello y col., (1998) *J. Virol.* 72: 5085-5092) o el sitio de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina (BGH).

También se desvela en el presente documento una sonda o cebador de polinucleótidos que comprende 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. Sondas y cebadores adecuados se han descrito supra. En la técnica se conoce que una sonda "perfectamente emparejada" no es necesaria para una hibridación específica. Cambios secundarios en la secuencia de la sonda conseguidos mediante sustitución, delección o inserción de un pequeño número de bases no afectan a la especificidad de hibridación. En general, puede tolerarse hasta el 20% de emparejamiento erróneo de pares de bases (cuando están alineadas de forma óptima). Una sonda útil para detectar el mARN mencionado anteriormente es al menos aproximadamente el 80% idéntica a la región homóloga de tamaño comparable contenida en las secuencias identificadas previamente (identificadas anteriormente) que corresponden a polinucleótidos caracterizados previamente de esta invención. Como alternativa, la sonda es el 85% idéntica a la secuencia génica correspondiente después del alineamiento de la segunda homóloga; y es más, muestra un 90% de identidad, o aún más, al menos el 95% idéntica.

Estas sondas pueden usarse en radioensayos (por ejemplo análisis por transferencia de Southern y Northern) para detectar o monitorizar la expresión de los polinucleótidos o polipéptidos de esta invención. Las sondas también pueden unirse a un soporte sólido o una matriz tal como un chip para uso en ensayos de cribado de alto rendimiento para la detección de la expresión del gen correspondiente a uno o más polinucleótidos de esta invención.

Los polinucleótidos y fragmentos de los polinucleótidos de la presente invención también pueden servir como cebadores para la detección de genes o transcritos de genes que se expresan en células neuronales, por ejemplo, para confirmar la transducción de los polinucleótidos en células huésped. En este contexto, amplificación significa

cualquier procedimiento que emplea una polimerasa dependiente de cebador capaz de replicar una secuencia diana con fidelidad razonable. La amplificación puede llevarse a cabo mediante ADN polimerasas naturales o recombinantes tales como T7 ADN polimerasa, fragmento de Klenow de ADN polimerasa de *E. coli*, y transcriptasa inversa. La longitud del cebador es la misma que la identificada para sondas, anteriormente.

5 La invención proporciona además los polinucleótidos aislados de la presente invención, enlazados de forma operativa a un promotor de la transcripción de ARN, así como otras secuencias reguladoras para replicación y/o expresión transitoria o estable del ADN o ARN. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "enlazado de forma operativa" significa posicionado de tal manera que el promotor dirigirá la transcripción de ARN de la molécula de ADN. Los ejemplos de dichos promotores son SP6, T4 y T7. En ciertas realizaciones, se usan promotores específicos de células para expresión específica de células del polinucleótido insertado. Vectores que contienen un promotor o un promotor/potenciador, con codones de terminación y secuencias marcadoras seleccionables, así como un sitio de clonación en el que un trozo insertado de ADN puede estar enlazado de forma operativa a ese promotor, se conocen bien en la técnica y están disponibles en el mercado. Para estrategias de metodología y clonación generales, véase Gene Expression Technology (Goeddel ed., Academic Press, Inc. (1991)) y referencias citadas en ese documento 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 entrada de GenEMBL para diversos vectores adecuados. Preferentemente, estos vectores son capaces de transcribir ARN in vitro o in vivo.

20 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 ya sea como episomas o como una parte integrante 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 introducir genes en los tejidos in vivo debido a sus altos niveles de expresión y la transformación eficiente de 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 eucariota y la célula huésped se replica, la proteína puede producirse de forma recombinante. Las células huésped adecuadas dependerán del vector y pueden incluir células de mamífero, células animales, células humanas, células de simio, células de insecto, células de levadura y células bacterianas, tal como se ha descrito anteriormente y construirse usando procedimientos bien conocidos. Véase Sambrook y Russell (2001), supra. Además del uso de un vector viral para la inserción de un ácido nucleico exógeno en las células, el ácido nucleico se puede insertar en la célula huésped mediante procedimientos bien conocidos en la técnica tales como la transformación de células bacterianas; transfección usando precipitación con fosfato cálcico para células de mamífero; DEAE-dextrano; electroporación; o microinyección. Véase Sambrook y Russell (2001), supra para esta metodología.

35 La presente divulgación también proporciona vehículos de suministro adecuados para el suministro de un polinucleótido de la invención al interior de células (ya sea in vivo, ex vivo o in vitro). Un polinucleótido de la invención puede estar contenido dentro de un vehículo de suministro de genes, un vector de clonación o un vector de expresión. Estos vectores (especialmente vectores de expresión) pueden ser manipulados, a su vez, para asumir cualquiera de una serie de formas que pueden, por ejemplo, facilitar el suministro a y/o la entrada en una célula.

40 Estas células huésped aisladas que contienen los polinucleótidos de esta invención son útiles para la replicación recombinante de los polinucleótidos y para la producción recombinante de péptidos y para cribado de alto rendimiento.

45 Los polinucleótidos de esta invención pueden conjugarse a una etiqueta detectable o combinarse con un transportador tal como un soporte sólido o transportador farmacéuticamente aceptable. Los soportes sólidos adecuados se han descrito anteriormente al igual que las etiquetas adecuadas. Procedimientos para unir una etiqueta a un polinucleótido son conocidos por los expertos en la materia. Véase Sambrook y Russell (2001), supra.

Composiciones de anticuerpos terapéuticas

55 Esta divulgación también proporciona un anticuerpo capaz de formar específicamente un complejo con una proteína o polipéptido de esta divulgación, que son útiles en los procedimientos terapéuticos de la presente invención. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, así como derivados de los mismos (descritos anteriormente). Los anticuerpos incluyen, aunque no se limitan a, anticuerpos de ratón, rata, y conejo o humanos. Los anticuerpos pueden ser producidos en cultivo celular, en un fago, o en diversos animales, incluyendo aunque sin limitarse a, 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.

60 Esta divulgación también proporciona un complejo anticuerpo-péptido que comprende los anticuerpos descritos anteriormente y un polipéptido que se une específicamente al anticuerpo. En un aspecto, el polipéptido es el polipéptido contra el cual se generó el anticuerpo. En un aspecto, el complejo anticuerpo-péptido es un complejo

aislado. En un aspecto adicional, el anticuerpo del complejo es, aunque sin limitarse a, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un derivado de anticuerpo descritos en el presente documento. Cualquiera o ambos del anticuerpo o el péptido del complejo anticuerpo-péptido puede ser etiquetado de forma detectable. En un aspecto, el complejo anticuerpo-péptido de la divulgación se puede usar como una muestra de control o de referencia en los ensayos de diagnóstico o cribado.

Los anticuerpos policlonales de la divulgación se pueden generar usando técnicas convencionales conocidas en la técnica y que están bien descritas en la literatura. Existen varias metodologías para la producción de anticuerpos policlonales. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales se producen normalmente mediante inmunización de un mamífero adecuado, tal como, aunque sin limitarse a, pollos, cabras, cobayas, hámsteres, caballos, ratones, ratas y conejos. Un antígeno se inyecta en el mamífero, que induce a los linfocitos B a producir inmunoglobulinas IgG específicas para el antígeno. Esta IgG se purifica a partir del suero de mamíferos. Las variaciones de esta metodología incluyen la modificación de adyuvantes, vías y punto de administración, los volúmenes de inyección por sitio y el número de sitios 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 inmunitaria a los antígenos. La mayoría de los adyuvantes posibilitan un depósito de antígeno en el sitio de inyección, lo que permite una liberación lenta del antígeno en ganglios linfáticos de drenaje. Otros adyuvantes incluyen tensioactivos que promueven la concentración de moléculas de antígeno de proteína sobre una gran área superficial y moléculas inmunoestimulantes. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes para la generación de anticuerpos policlonales incluyen adyuvantes de Freund, sistema adyuvante de Ribí, y Titermax. Los anticuerpos policlonales se pueden generar utilizando procedimientos descritos en las patentes de Estados Unidos 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.

Los anticuerpos monoclonales de la divulgación pueden generarse usando técnicas de hibridoma convencionales conocidas en la técnica y bien descritas en la literatura. Por ejemplo, un hibridoma se produce fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, aunque 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 similar, o heteromiomas, productos de fusión de los mismos, o cualquier célula o célula de fusión derivada de ellos, o cualquier otra línea celular adecuada tal como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, www.atcc.org, www.lifetech.com, último acceso el 26 de noviembre de 2007, y similares), con células productoras de anticuerpos, tales como, aunque sin limitarse a, células de bazo aisladas o clonadas, sangre periférica, linfa, amígdala, u otras células inmunitarias o que contienen células B, o cualquier otro tipo de células que expresan secuencias constante o variable o marco o CDR de cadena pesada o ligera, ya sea como ácido nucleico endógeno o heterólogo, como recombinante o endógeno, viral, bacteriano, de algas, procarionta, anfibio, insecto, reptil, pez, de mamífero, roedor, equina, ovina, cabra, oveja, ADN de primate, eucariota, genómico, cADN, rADN, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN de cloroplasto, hnARN, mARN, tARN, de cadena sencilla, doble o triple, hibridada, y similares, o cualquier combinación de los mismos. Células productoras de anticuerpos también pueden obtenerse a partir de sangre periférica o, preferentemente del bazo o los ganglios linfáticos, de seres humanos u otros animales adecuados que han sido inmunizados con el antígeno de interés. Cualquier otra célula huésped adecuada también puede usarse para expresar el ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifica un anticuerpo, fragmento especificado o variante del mismo, de la presente divulgación. Las células fusionadas (hibridomas) o células recombinantes se pueden aislar usando condiciones de cultivo selectivas u otros procedimientos conocidos adecuados, y se clonaron por dilución limitante o la clasificación de células, u otros procedimientos conocidos.

En una realización, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser generados utilizando un sistema de péptido antigénico múltiple (MAP). El sistema de MAP utiliza un núcleo de peptidilo de tres o siete residuos de lisina ramificados radialmente, sobre el que los péptidos antigénicos de interés pueden construirse usando química en fase sólida estándar. El núcleo de lisina produce el MAP que porta alrededor de 4 a 8 copias del epítipo peptídico dependiendo del núcleo interno que generalmente representa menos de 10% del peso molecular total. El sistema MAP no requiere una proteína portadora para conjugación. Se ha demostrado que la alta relación molar y denso empaquetamiento de múltiples copias del epítipo antigénico en un MAP producen una fuerte respuesta inmunógena. Este procedimiento se describe en la patente de Estados Unidos N.º 5.229.490.

Pueden usarse otros procedimientos adecuados de producción o aislamiento de anticuerpos de la especificidad requerida, incluyendo, aunque sin limitación, procedimientos que seleccionan un anticuerpo recombinante a partir de una biblioteca de péptidos o proteínas (por ejemplo, aunque sin limitación, un bacteriófago, ribosoma, oligonucleótido, ARN, cADN, so similares, biblioteca de presentación; por ejemplo, como están disponibles de diversos proveedores comerciales tales como Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, RU), MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), Biovation (Aberdeen, Scotland, RU) BioInvent (Lund, Suecia), usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase las patentes de Estados Unidos N.º 4.704.692; 5.723.323; 5.763.192; 5.814.476; 5.817.483; 5.824.514; 5.976.862. Procedimientos alternativos dependen de la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen y col., (1977) *Microbiol. Immunol.* 41: 901-907 (1997); Sandhu y col., (1996) *Crit. Rev. Biotechnol.* 16: 95-118; Eren y col., (1998) *Immunol.* 93: 154-161 que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, tal como se conoce en la técnica y/o tal como se describe en el presente documento. Dichas técnicas, incluyen, aunque sin limitarse a, presentación en ribosomas (Hanes y col., (1997) *Proc.*

Natl. Acad. Sci. EE. UU., 94: 4937-4942; Hanes y col., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 95: 14130-14135); tecnologías que producen anticuerpos de una sola célula (por ejemplo, el procedimiento de anticuerpo de linfocito seleccionado ("SLAM") (patente de Estados Unidos N.º 5.627.052, Wen y col., (1987) J. Immunol. 17: 887-892; Babcock y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. (1996) 93: 7843-7848); microgota de gel y citometría de flujo (Powell y col., (1990) Biotechnol.; One Cell Systems, (Cambridge, Mass); Gray y col., (1995) J. Imm. Meth. 182: 155-163; y Kenny y col., (1995) Bio. Technol. 13: 787-790); selección de células B (Steenbakkers y col., (1994) Molec. Biol. Reports 19: 125-134.

Derivados de anticuerpos de la presente divulgación también pueden prepararse suministrando un polinucleótido que codifica un anticuerpo de esta invención a un huésped adecuado para proporcionar animales transgénicos o mamíferos, tales como cabras, vacas, caballos, ovejas, y similares, que producen dichos anticuerpos en su leche. Estos procedimientos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 5.827.690; 5.849.992; 4.873.316; 5.849.992; 5.994.616; 5.565.362; y 5.304.489.

La expresión "derivado de anticuerpo" incluye modificación posttraduccional a la secuencia polipeptídica lineal del anticuerpo o fragmento. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.602.684 B1 describe un procedimiento para la generación de formas modificadas con glicol de anticuerpos, incluyendo moléculas de anticuerpo completas, fragmentos de anticuerpo, o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, que tiene toxicidad celular mediada por Fc mejorada, y glucoproteínas generadas de este modo.

También pueden prepararse derivados de anticuerpos mediante suministrando un polinucleótido de esta invención para proporcionar plantas transgénicas y células vegetales cultivadas (por ejemplo, aunque sin limitarse a tabaco, maíz, y lenteja de agua) que producen dichos anticuerpos, partes o variantes especificadas en las partes de la planta o en células cultivadas de las mismas. Por ejemplo, Cramer y col., (1999) Curr. Top. Microbol. Immunol. 240: 95-118 y las referencias citadas en ese documento, 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 han 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 y col., (1999) Adv. Exp. Med. Biol. 464: 127-147 y las referencias citadas en ese documento. 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 de semillas de tabaco y tubérculos de patata. Véase, por ejemplo, Conrad y col., (1998) Plant Mol. Biol. 38: 101-109 y referencia citadas en este documento. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden producir usando plantas transgénicas, de acuerdo con procedimientos conocidos.

Los derivados de anticuerpos también pueden producirse, por ejemplo, añadiendo secuencias exógenas para modificar la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, tasa de asociación, tasa de disociación, avidéz, especificidad, semivida, o cualquier otra característica adecuada. Generalmente parte o la totalidad de las secuencias de 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.

En general, los residuos de CDR están directamente y de la manera sustancial implicados en influir en la unión al antígeno. La humanización o genomaniplación de anticuerpos de la presente invención puede realizarse usando cualquier procedimiento conocido tal como, aunque sin limitación, los descritos en las patentes de Estados Unidos 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.

Las técnicas para fabricar anticuerpos de parcial a completamente humanos son conocidas en la técnica y puede usarse cualquiera de dichas técnicas. De acuerdo con una realización, las secuencias de anticuerpos humanos completos se fabrican en un ratón transgénico que ha sido diseñado para expresar genes de anticuerpo de cadena pesada y ligera humanos. Se han preparado múltiples estirpes de dichos ratones transgénicos que puede producir diferentes clases de anticuerpos. Células B de ratones transgénicos que producen un anticuerpo deseable se pueden fusionar para preparar líneas celulares de hibridoma para la producción continua del anticuerpo deseado. (Véase por ejemplo, Russel y col., (2000) Infection and Immunity abril de 2000: 1820-1826; Gallo y col., (2000) European J. of Immun. 30: 534-540; Green (1999) J. of Immun. Methods 231: 11-23; Yang y col., (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 y col., (1997) Genomics 42: 413-421; Sherman-Gold (1997) Genetic Engineering News 17(14); Mendez y col., (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 y col., (1995) Genomics 26: 294-307; Jakobovits (1994) Current Biology 4(8): 761-763; Arbones y col., (1994) Immunity 1(4): 247-260; Jakobovits (1993) Nature 362(6417): 255-258; Jakobovits; y la patente de Estados Unidos N.º 6.075.181.)

Los anticuerpos de esta divulgación también pueden modificarse 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 Estados Unidos N.º 4.816.567.

Como alternativa, los anticuerpos de esta divulgación también se pueden modificar para crear anticuerpos remodelados en superficie. Los anticuerpos remodelados en superficie son aquellos en los que los residuos de aminoácidos exteriores del anticuerpo de una especie se sustituyen juiciosamente o “remodelan” con los de una segunda especie de manera que los anticuerpos de la primera especie no serán inmunógenos en la segunda 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 podría reducirse mediante la sustitución de los residuos expuestos que difieren de las que normalmente se encuentran en otros anticuerpos de especies de mamíferos. Esta sustitución juiciosa de residuos exteriores debe tener poco o ningún efecto sobre los dominios interiores, o sobre los contactos entre dominios. Por lo tanto, las propiedades de unión a ligando no deben modificarse como consecuencia de alteraciones que se limitan a los residuos marco de región variable. El proceso se conoce como “remodelación en superficie”, ya que se altera solo la superficie exterior o “piel” del anticuerpo, los residuos de soporte permanecen inalterados.

El procedimiento de “remodelación en superficie” hace uso de los datos de secuencia disponibles para dominios variables de anticuerpos humanos compilados por Kabat y col., (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4ª ed., Bethesda, Md., National Institutes of Health, actualizaciones de esta base de datos, y otras bases de datos accesibles estadounidenses y extranjeras (tanto de ácidos nucleicos y proteínas). Los ejemplos de los procedimientos utilizados para generar anticuerpos remodelados en superficie incluyen EP 519596; patente de Estados Unidos N.º 6.797.492; y se describen en Padlan y col., (1991) *Mol. Immunol.* 28(4-5): 489-498.

La expresión “derivado de anticuerpo” también incluye “diacuerpos”, que son pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, donde los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica. (Véase por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y col., (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 en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. (Véase también, la patente de Estados Unidos N.º 6.632.926 de Chen y col., que describe variantes de anticuerpo que tienen uno o más aminoácidos insertados en una región hipervariable del anticuerpo parental y una afinidad de unión para un antígeno diana que es al menos aproximadamente dos veces más potente que la afinidad de unión del anticuerpo parental por el antígeno).

La expresión “derivado de anticuerpo” incluye, además, “anticuerpos lineales”. El procedimiento para la fabricación de anticuerpos lineales se conoce en la técnica y se describe en Zapata y col., (1995) *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062. En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos de esta divulgación se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos conocidos que incluyen, aunque sin limitarse a, purificación de la proteína A, precipitación con 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. También puede usarse cromatografía líquida de alta resolución (“HPLC”) para la purificación.

Los anticuerpos de la presente divulgación productos purificados, productos de procedimientos sintéticos químicos, y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped eucariota, incluyendo, por ejemplo, levaduras, plantas superiores, células de insecto y de mamífero, o como alternativa a partir de una célula procariota tal como se ha descrito anteriormente.

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

El término “anticuerpo” también pretende incluir anticuerpos de todos los isotipos. Isotipos particulares de un anticuerpo monoclonal se pueden preparar ya sea directamente mediante la selección de la fusión inicial, o se

pueden preparar de forma secundaria, a partir de un hibridoma parental que secreta un anticuerpo monoclonal de diferente isotipo utilizando la técnica de selección sib para aislar variantes de cambio de clase usando el procedimiento descrito en Steplewski, y col., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 82: 8653 o Spira, y col., (1984) J. Immunol. Methods 74: 307.

5 El aislamiento de otros hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales con la especificidad de los anticuerpos monoclonales de la invención también se puede conseguir por un experto en la materia mediante la producción de anticuerpos antiidiotípicos. Herlyn, y col., (1986) Science 232: 100. Un anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos presentes en el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma de interés.

10 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, usando anticuerpos para los determinantes epitópicos en un anticuerpo monoclonal, es posible identificar otros hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales de la misma especificidad epitópica.

15 También es posible usar tecnología de anti-idiotipo para producir anticuerpos monoclonales que imitan un epítipo. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal antiidiotípico preparado para un primer anticuerpo monoclonal tendrá un dominio de unión en la región hipervariable que es la imagen especular del epítipo al que se une el primer anticuerpo monoclonal. De este modo, en este ejemplo, el anticuerpo monoclonal antiidiotípico podría usarse para
20 inmunización para la producción de estos anticuerpos.

En algunos aspectos de esta divulgación, será útil etiquetar de forma detectable o terapéutica el anticuerpo. Las etiquetas adecuadas se han descrito supra. Los procedimientos para conjugar anticuerpos a estos agentes son conocidos en la técnica. Para propósito de ilustración solamente, los anticuerpos se pueden etiquetar con un resto
25 detectable tal como un átomo radioactivo, un cromóforo, un fluoróforo, o similares. Dichos anticuerpos etiquetados se pueden usar para técnicas de diagnóstico, ya sea in vivo, o en una muestra de ensayo aislada.

El acoplamiento de anticuerpos a haptenos de bajo peso molecular puede aumentar la sensibilidad del anticuerpo en un ensayo. Los haptenos pueden detectarse a continuación específicamente por medio de una segunda reacción.
30 Por ejemplo, es habitual usar haptenos tales como biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenol, piridoxal y fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos antihapteno específicos. Véase, Harlow y Lane (1988) supra.

Los anticuerpos pueden etiquetarse con un resto detectable tal como un átomo radioactivo, un cromóforo, un fluoróforo, o similares. Dichos anticuerpos etiquetados pueden usarse para técnicas de diagnóstico, ya sea in vivo, o
35 en una muestra de ensayo aislada. Los anticuerpos también pueden conjugarse, por ejemplo, a un agente farmacéutico, tal como fármaco quimioterapéutico o una toxina. Estos se pueden enlazar a una citoquina, a un ligando, a otro anticuerpo. Los agentes adecuados para el acoplamiento a anticuerpos para conseguir un efecto anti-tumoral incluyen citoquinas, tales como interleuquina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral (TNF); fotosensibilizadores, para uso en terapia fotodinámica, incluyendo ftalocianina tetrasulfonato de aluminio (III), hematoporfirina, y ftalocianina; radionucleidos, tales como yodo-131 (131I), itrio-90 (90Y), bismuto-212 (212Bi), bismuto-213 (213Bi), tecnecio-99m (99mTc), renio-186 (186Re), y renio-188 (188Re); antibióticos, tales como doxorubicina, adriamicina, daunorrubicina, metotrexato, daunomicina, neocarzinostatina, y carboplatino; toxinas bacterianas, vegetales, y otras, tales como toxina de la difteria, exotoxina de pseudomonas A, enterotoxina A estafilocócica, toxina abrina-A, ricina A (ricina A desglucosilada y ricina natural A), toxina TGF-alfa, citotoxina de
45 cobra China (naja naja atra), y gelonina (una toxina vegetal); proteínas inactivadoras del ribosoma de plantas, bacterias y hongos, tales como restrictocina (una proteína inactivadora del ribosoma producida por *Aspergillus restrictus*), saporina (una proteínas inactivadora del ribosoma de *Saponaria officinalis*), y RNasa; inhibidores de la tirosina quinasa; ly207702 (un nucleósido de purina difluorado); liposomas que contienen agentes anti-quísticos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, plásmidos que codifican toxinas, metotrexato, etc.); y otros anticuerpos o
50 fragmentos de anticuerpos, tales como F(ab).

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

60 III. Métodos de la invención

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de prevenir o reducir una hemorragia en un sujeto sometido a terapia anticoagulante administrando al sujeto una cantidad efectiva de un derivado proteico de factor Xa. El derivado tiene un sitio activo modificado y un dominio Gla modificado, teniendo de este modo actividad procoagulante reducida o ninguna. El derivado actúa como antídoto y sustancialmente neutraliza la actividad anticoagulante del inhibidor. El derivado es deficiente en Gla. El sujeto puede ser un mamífero o, más
65

particularmente, un ser humano.

En otra realización, la divulgación se refiere a un derivado de fXa de la invención para uso en un procedimiento para unirse a e inhibir selectivamente un inhibidor del factor Xa administrado de forma exógena en un sujeto. El procedimiento comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un derivado de un derivado de factor Xa tal como se ha descrito anteriormente. El sujeto puede ser una célula o un mamífero, tal como un ser humano.

Los pacientes adecuados para esta terapia se han sometido a terapia anticoagulante anterior, por ejemplo, se les ha administrado uno o más de un anticoagulante, tal como un inhibidor de factor Xa. Los ejemplos de anticoagulantes que son inhibidores del factor Xa, incluyen aunque sin limitarse a, fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmina, NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la ruta del factor tisular, DX-9065a, YM-60828, YM-150, apixaban, rivaroxaban, PD-348292, otamixaban, edoxabán, LY517717, GSK913893, heparina de bajo peso molecular y Betrixaban, o cualquier combinación de los mismos. La fuente de diversos anticoagulantes se encuentra en toda la descripción.

El derivado tiene un sitio activo modificado y un dominio Gla eliminado. En un aspecto de la divulgación, el derivado del factor Xa no tiene o muestra ninguna actividad procoagulante. Es este aspecto de la divulgación, el derivado comprende al menos los residuos de aminoácido 40 a 448, 45 a 448, o 46 a 448 de la SEQ ID NO. 3 o equivalentes de la misma. En otro aspecto de la divulgación, el derivado comprende al menos los residuos de aminoácido 45 a 139 y 195 a 448 o 46 a 139 y 195-448 de la SEQ ID NO. 3 o equivalentes de la misma.

El derivado de fXa conserva la estructura tridimensional del sitio activo de la proteína fXa. Información respecto a la estructura tridimensional del des-Gla fXa puede encontrarse en Brandstetter, H y col. J. Bio. Chem., 1996, 271: 29988-29992.

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 completamente de 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 suficiente similitud estructural con el dominio catalítico fXa y son, por lo tanto, capaces de unirse a inhibidores de fXa de molécula pequeña. Los ejemplos de serina proteasas relacionadas incluyen, aunque sin limitarse a, proteasas de mamífero tales como calicreína plasmática, trombina y tripsina o la proteasa bacteriana subtilisina. Estos derivados incluyen además modificaciones en los residuos de aminoácidos equivalentes a residuos serina (SER379) o ácido aspártico (ASP282) del sitio activo, descritos en el presente documento.

La proteína del factor Xa con actividad procoagulante reducida comprende una cadena ligera modificada, donde la modificación es delección del dominio Gla para reducir la unión a la membrana fosfolipídica de fXa. En algunas realizaciones de la divulgación, la secuencia de aminoácidos principal de fXa no ha cambiado, pero la cadena lateral de ciertos aminoácidos se ha cambiado. Los ejemplos del dominio Gla modificado que reduce la unión a la membrana fosfolipídica de fXa comprenden polipéptidos o proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos primaria de la SEQ ID NO. 3 o un equivalente de la misma, con al menos una sustitución, adición o delección de aminoácidos 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 es sustituido o delecionado es un ácido γ -carboxiglutámico (Gla). Los residuos de Gla se muestran en la SEQ ID NO. 3 en las posiciones de aminoácidos 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 32 y 39. En algunas realizaciones de la divulgación, la secuencia de aminoácidos primaria del antídoto es idéntica a la SEQ ID NO. 3 o equivalente de la misma, pero es una proteína de factor Xa no carboxilada, subcarboxilada o descarboxilada. En algunas realizaciones de la divulgación, el antídoto es un des-Gla anhidro-fXa o des-Gla fX-S379A. En algunas realizaciones de la divulgación, la proteína del factor Xa con unión a la membrana fosfolipídica reducida comprende, además, modificación o delección de los EGF1 y/o EGF2 (mostrados 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, toda la cadena ligera o sustancialmente toda la cadena ligera se modifica o elimina. Por ejemplo, la proteína de fXa modificada con unión a la membrana fosfolipídica reducida puede contener solamente la cadena pesada o el fXa modificado puede contener la cadena pesada y un fragmento de la cadena ligera que contiene Cys132, el residuo de aminoácido que forma el único puente disulfuro con Cys302 de la cadena pesada en la SEQ ID NO. 3. En algunas realizaciones de la divulgación, el derivado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 12. En algunas realizaciones de la divulgación, el derivado es el polipéptido bicatenario que comprende la SEQ ID NO. 13. En otras realizaciones de la divulgación, el derivado es el polipéptido de la SEQ ID NO. 15. En otras realizaciones, el derivado es el polipéptido de las SEQ ID NO. 20, 21 o 22.

En algunas realizaciones, el derivado de la proteína del factor Xa comprende una cadena pesada modificada que contiene el dominio catalítico de dicha proteína del factor Xa. En algunas realizaciones, al menos una sustitución de aminoácidos está presente en una o más posiciones de aminoácido de fXa seleccionadas de entre el grupo que consiste en Glu216, Glu218, Arg332, Arg347, Lys351 y Ser379 en la SEQ ID NO. 3 y 7 (Glu37, Glu39, Arg150, Arg165, Lys169 y Ser195 en numeración de quimotripsina, respectivamente). En algunas realizaciones, el antídoto es una proteína del factor Xa con residuo serina (Ser379 en la SEQ ID NO. 3 y 7, Ser195 en numeración de quimotripsina) en el sitio activo modificado a alanina. Dichas modificaciones pueden realizarse a proteína fXa de tipo

silvestre o a cualquiera de las proteínas de fXa modificadas o fragmentos descritos anteriormente. Por ejemplo, el des-Gla anhidro-fXa con residuos serina en el sitio activo sustituidos por deshidroalanina descrito en el ejemplo 1 ha mostrado actividad de antídoto.

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

10 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 puede imitar la capacidad de unión al inhibidor de la cadena pesada de fXa. Dichas proteínas pueden incluir proteasas de mamífero tales como caliceína plasmática, trombina, tripsina (o su homólogo bacteriano subtilisina) que han sido modificadas de forma recombinante para carecer de actividad serina proteasa capaz de escindir sustratos de proteína pero aún posee las características estructurales del sitio activo escindido.

15 También son proporcionadas por esta invención composiciones farmacéuticas que contienen uno o más de los derivados del factor Xa modificados y un transportador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones se administran a un sujeto que lo necesita en una cantidad que proporcionará el beneficio deseado, una reducción o detención de hemorragia. Las composiciones pueden coadministrarse con cualquier agente o terapia adecuada que complementa o mejora la actividad del derivado del factor Xa. Un ejemplo de estos es un segundo agente capaz de prolongar la semivida en plasma del antídoto. Los ejemplos de segundos agentes adecuados incluyen, aunque sin limitarse a, un anticuerpo anti-fXa que reconoce en exosito de la cadena pesada de fXa o un derivado de fXa unido alfa-2-macroglobulina. La formación del complejo entre el derivado de fXa y un segundo agente (anticuerpo de exosito o alfa-2-macroglobulina) bloquearía interacciones macromoleculares pero conserva la capacidad de active uniones al inhibidor dependientes del sitio. Los ejemplos de anticuerpos anti-fXa adecuados para coadministración incluyen, aunque sin limitarse a, los descritos en Yang Y.H., y col., J. Immunol. 2006, 1; 177(11): 8219-25, Wilkens, M y Krishnaswamy, S., J. Bio. Chem., 2002, 277 (11), 9366-9374, y Church WR, y col., Blood, 1988, 72(6), 1911-1921.

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

25 Los sujetos que se beneficiarán de la administración de las composiciones descritas en el presente documento y los procedimientos adjuntos incluyen aquellos que están experimentando, o predispuestos a un evento de hemorragia clínica grave o un evento de hemorragia no grave clínicamente significativa. Los ejemplos de eventos de hemorragia clínica grave se seleccionan de entre el grupo que consiste en hemorragia, hemorragia en órganos vitales, hemorragia que requiere reintervención o un nuevo procedimiento terapéutico, y un índice de hemorragia de $\geq 2,0$ con una hemorragia manifiesta asociada. (Turpie AGG, y col., NEJM, 2001, 344: 619-625.) Adicionalmente, el sujeto puede estar experimentando o predispuesto a un evento de hemorragia no grave seleccionado de entre el grupo que consiste en epistaxis que es persistente o recurrente y en cantidad sustancial o no se detendrá sin intervención, hemorragia rectal o del tracto urinario que no se alzan hasta un nivel que requiere un procedimiento terapéutico, hematomas sustanciales en sitios de inyección o en cualquier otro lugar que son espontáneos o se producen con traumatismo trivial, pérdida de sangre sustancial más de habitualmente asociada con un procedimiento quirúrgico que no requiere drenaje, y hemorragia que requiere transfusión no planificada.

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

35 En cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, debe entenderse, incluso aunque no siempre se afirme explícitamente, que una cantidad efectiva del derivado se administra al sujeto. La cantidad puede ser determinada empíricamente por el facultativo encargado del tratamiento y variará con la edad, el género, el peso y la salud del sujeto. Factores adicionales a considerar por el facultativo encargado del tratamiento incluyen, aunque sin limitarse a, la identidad y/o cantidad de inhibidor del factor Xa, que puede haber sido administrado, la vía o el modo en que el antídoto será administrado al sujeto, la formulación del antídoto, y el criterio de valoración terapéutico para el paciente. Con estas variables en mente, un experto en la materia administrará una cantidad terapéuticamente efectiva al sujeto a tratar. Se contempla que una cantidad terapéuticamente efectiva de los

antídotos descritos en el presente documento suficiente para contrarrestar, o sustancialmente neutralizar, un anticoagulante en un sujeto puede contener de aproximadamente 0,01 miligramos de antídoto por kilogramo de peso corporal de un sujeto a 1 gramo de antídoto por kilogramo de peso corporal de un sujeto de antídoto. Se contempla, además, que el antídoto puede proporcionarse al sujeto en un intervalo de concentración de aproximadamente 10 nanomolar a aproximadamente 100 micromolar, o de aproximadamente 10 nanomolar a aproximadamente 5 micromolar, o de aproximadamente 100 nanomolar a aproximadamente 2,5 micromolar.

Las composiciones pueden administrarse en cantidades que son eficaces para que el antídoto reconozca selectivamente y se una, directa o indirectamente, al inhibidor del factor Xa en el sujeto. También pueden administrarse en cantidades para inhibir sustancialmente o sustancialmente neutralizar los inhibidores del factor Xa administrados de forma exógena en un sujeto.

En otro aspecto más, 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 efectiva de un antídoto al inhibidor del factor Xa y un transportador farmacéuticamente aceptable, a condición de que el antídoto no sea factor VIIa derivado de plasma, factor VIIa recombinante, plasma fresco congelado, concentrados del complejo de protrombina y sangre completa.

En algunas realizaciones, el antídoto es uno cualquiera de los antídotos de la invención. En algunas realizaciones, el antídoto está conjugado con un resto capaz de prolongar la semivida en circulación del antídoto. En algunas realizaciones, el resto se selecciona de entre el grupo que consiste en polietilenglicol, un grupo acilo, un liposoma, una proteína transportadora, una membrana fosfolipídica artificial, y una nanopartícula. Por ejemplo, un residuo lisina o cisteína no en el sitio activo de un derivado de fXa descrito en el presente documento puede modificarse químicamente para unirse a una molécula de polietilenglicol. Otros procedimientos 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 esta invención.

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

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un agente capaz de prolongar la semivida plasmática del antídoto. En otro aspecto, la composición farmacéutica ha sido coformulada con un agente capaz de prolongar la semivida plasmática del antídoto. En algunas realizaciones, el agente coadministrado o coformulado es un anticuerpo anti-fXa que reconoce el exosítio de fXa o un derivado de fXa unido a alfa-2-macroglobulina.

IV. Terapias

La presente divulgación se refiere a un procedimiento terapéutico de prevención o reducción de hemorragias 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 usarlos en situaciones de elección o de emergencia que pueden neutralizar de forma segura y específica propiedades anticoagulantes convencionales de un inhibidor de fXa sin causar efectos secundarios o hemodinámicos perjudiciales o exacerbación de la respuesta vascular proliferativa a la lesión.

En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva de un antídoto muestra un índice terapéutico elevado. El índice terapéutico es la relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos que pueden expresarse como la relación entre DL50 y DE50. La DL50 es la dosis letal para el 50% de la población y la DE50 es la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población. La DL50 y la DE50 se determinan mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares animales o animales experimentales. Los antídotos o derivados de esta invención pueden administrarse una o varias veces cuando se necesitan para neutralizar el efecto de un inhibidor de fXa presente en el plasma de un sujeto. Preferentemente, los antídotos de esta invención son suficientes cuando se administran en una única dosis.

Se contempla que una dosis típica de los antídotos de la invención dependerá del entorno clínico real y de la concentración del inhibidor en el plasma. En ensayos in vitro, tales como generación de trombina, ensayos clínicos de coagulación tales como aPTT, PT y ACT, se espera que una cantidad terapéuticamente efectiva 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 plasmática máxima para antídoto esté en el intervalo micromolar, probablemente entre 10 micromolar o por debajo.

En un entorno clínico, uno de los criterios en la determinación de la eficacia de un antídoto es que produzca

5 cualquier cambio de las medidas reales de hemorragia. En los ensayos clínicos, las categorías de hemorragias graves son la hemorragia fatal, las hemorragias en órganos vitales (intracraneal, intraocular, retroperitoneal, medular, pericárdica), cualquier hemorragia que requiere reintervención o un nuevo procedimiento terapéutico (por ejemplo, aspiración de una rodilla operada, inserción de un tubo de toracotomía para hemotórax, electrocoagulación endoscópica, etc.) o un índice de hemorragia de ≥ 2.0 si se asocia con una hemorragia manifiesta. El índice de hemorragia se define como el número de unidades de glóbulos rojos empaquetados o sangre completa transfundida, además de los valores de hemoglobina antes del episodio de hemorragia menos los valores de hemoglobina después de que la hemorragia se ha estabilizado (en gramos por decilitro).

10 Otro criterio para la eficacia de antídoto en un entorno clínico es que reduzca hemorragia no grave clínicamente significativa. Esta categoría de hemorragias incluyen hemorragia que no es importante, pero es mayor de lo habitual y justifica la atención clínica, incluyendo epistaxis que es persistente o recurrente y en cantidad sustancial o no se detendrá sin la intervención; hemorragia rectal o del tracto urinario que no llega a un nivel que requiere un procedimiento terapéutico (por ejemplo, la nueva inserción de un catéter Foley o inspección cistoscopia),
15 hematomas sustancial en los sitios de inyección o en otros lugares que son espontáneos o se producen con traumatismo trivial; pérdida considerable de sangre; hemorragia que requiere transfusión no planificada. Tal como se usa en el presente documento, "pérdida de sangre sustancial" se refiere a la cantidad de pérdida de sangre que es mayor de esa cantidad por lo general asociada con el procedimiento quirúrgico. Pérdida de sangre sustancial conduce a la hinchazón que se gestiona de forma conservadora, ya que se queda corta para requerir drenaje.

20 En una realización, los derivados de esta invención tienen suficiente semivida en plasma circulante para neutralizar sustancialmente el inhibidor de fXa presente en el plasma. El fXa activado esencialmente no tiene semivida en circulación en seres humanos, ya que es inhibido eficazmente por ATIII, TFPI y otros inhibidores de plasma (Fuchs, H.E. y Pizzo, S.V., J. Clin. Invest., 1983, 72: 2041-2049). Se ha demostrado que el fXa inactivo tiene una semivida en circulación de 2-3 horas en seres humanos. En un modelo de babuino, la semivida de un fXa bloqueado en el sitio activo por DEGR ([5-(dimetilamino)1-naftalenosulfonilo]-glutamilglicilarginil clorometil cetona) fue de aproximadamente 10 horas o 2 horas, tal como se determina mediante ensayos isotópicos o inmunoabsorbentes ligados a enzima, respectivamente (Taylor, F.B. y col., Blood, 1991, 78(2): 364-368).

30 Puede ser deseable prolongar la semivida de un derivado de antídoto fXa a 24-48 horas. Se contempla que la conjugación o adición de uno o más de los siguientes restos incrementará la semivida en plasma de un antídoto:

- a) polietilenglicol;
- b) un grupo acilo;
- 35 c) liposomas y agentes de encapsulación;
- d) proteínas transportadoras;
- e) membrana fosfolipídica artificial;
- f) inmunoglobulina; y
- 40 g) nanopartícula.

El sitio de conjugación puede no estar limitado a la cadena o residuo especial, siempre que la conjugación no enmascare el sitio o sitios de unión al 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.

45 En general, los anticuerpos administrados tienen una semivida mucho más larga que las proteínas circulantes de coagulación sanguínea. Es posible usar un complejo que consiste en fXa deficiente en dominio Gla y un anticuerpo unido al exosito de fXa como antídoto de semivida en circulación prolongada. La formación de un complejo entre fXa y el anticuerpo dirigido el exosito puede reducir la interacción de un fXa deficiente en dominio Gla con sustratos e inhibidores macromoleculares, tales como protrombina y la antitrombina III, mientras que deja el sitio activo escindido inalterado, de modo que el complejo puede actuar como un antídoto para unirse al inhibidor de molécula pequeña dirigido al sitio activo. La formación de complejo de α -2-macroglobulina-fXa también puede ser de utilidad como antídoto para los inhibidores de molécula pequeña de fXa.

55 La eficacia de los antídotos en la inversión de la actividad anticoagulante de los inhibidores de fXa, así como su actividad procoagulante puede determinarse mediante ensayos in vitro y modelos animales por los expertos en la materia. Son ejemplos de ensayos in vitro la generación de trombina, los ensayos clínicos de coagulación tales como aPTT, PT y ACT. Se contempla que un antídoto de esta invención sea capaz de producir el 10% o más de corrección de la actividad de coagulación ex vivo. Varios modelos animales in vivo de tiempo de hemorragia y/o pérdida de sangre en, por ejemplo, roedores, tales como ratones, perros y primates, tales como monos, se pueden usar para medir la eficacia.

V. Composiciones farmacéuticas

65 La presente invención proporciona, además, composiciones que comprenden un derivado de fXa y un transportador farmacéuticamente aceptable.

“Transportadores farmacéuticamente aceptables” se refiere a cualesquiera diluyentes, excipientes o transportadores que pueden usarse en las composiciones de la invención. Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tamponantes, 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, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, copolímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Los transportadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, un texto de referencia estándar en este campo. Se seleccionan preferentemente con respecto a la forma pretendida de administración, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes y similares, y consecuentes con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden fabricarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica tales como procesos de granulación convencional, mezcla, disolución, encapsulación, liofilización, emulsión, entre otros. Las composiciones pueden producirse de diversas formas, incluyendo gránulos, precipitados o partículas, polvos, incluyendo secado por congelación, secado rotatorio o polvos secados por pulverización, polvos amorfos, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o soluciones. Las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizantes, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de éstos.

Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse como suspensiones o soluciones líquidas usando un líquido estéril, tal como aceite, agua, alcohol, y combinaciones de los mismos. Tensioactivos, agentes de suspensión o agentes emulsionantes farmacéuticamente adecuados, se pueden añadir para 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. La preparación 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. Éteres, tales como poli(etilenglicol), hidrocarburos de petróleo, tales como aceite mineral y vaselina, y agua también se pueden usar en formulaciones en suspensión.

Las composiciones de esta invención están formadas para administración farmacéutica a un mamífero, preferentemente un ser humano. Dichas composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse de diversas maneras, preferentemente por vía parenteral.

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, el antídoto de esta invención puede o pueda ser administrado a la circulación sistémica mediante administración parenteral. El término “parenteral”, tal como se usa en el presente documento, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasnovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Sin embargo, en casos en que el inhibidor de fXa que está siendo neutralizado tiene una larga semivida en plasma, una infusión continua o una formulación de liberación sostenida puede ser necesaria para unirse al inhibidor de fXa y de este modo liberar el fXa activo antes de la eliminación del inhibidor de fXa del cuerpo.

Las formas inyectables estériles de las composiciones de esta invención pueden ser suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o 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. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo suave incluyendo mono- o diglicéridos 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 aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones en aceite también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico 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 sólidas, líquida, u farmacéuticamente aceptables también pueden usarse para fines de formulación. Los compuestos pueden formularse para administración parenteral por inyección tal como por inyección en embolada o infusión continua. Una forma de dosificación unitaria para inyección puede ser en ampollas o en recipientes de múltiples dosis.

Además de las formas de dosificación descritas anteriormente, excipientes y transportadores y formas de dosificación farmacéuticamente aceptables son conocidos generalmente por los expertos en la materia y están incluidos en la invención. Debe entenderse que un régimen de dosificación y tratamiento específico para cualquier

paciente particular dependerá de diversos factores, incluyendo la actividad del antídoto específico empleado, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta, la función renal y hepática del paciente, y el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, criterio del facultativo o el veterinario a cargo del tratamiento y la gravedad de la enfermedad particular que está siendo tratada.

5

VI. Kits

La invención proporciona además kits o paquetes. 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 esta invención para usarlo en los casos en hay una sobredosis del inhibidor de fXa en (a) o cuando la hemostasia normal necesita ser restaurada para detener o prevenir la hemorragia. En otras realizaciones, el kit comprende además una etiqueta que explica cuándo deben usarse estos dos agentes en (a) y (b).

El primer y segundo recipiente puede ser un frasco, tarro, vial, matraz, jeringa, tubo, bolsa, o cualquier otro recipiente usado en la fabricación, el almacenamiento o la distribución de un producto farmacéutico. El prospecto puede ser una etiqueta, marca, marcador, o similares, que recita información relativa a la composición farmacéutica del kit. La información recitada por lo general es determinada por la agencia reguladora que regula la zona en la que se va a comercializar la composición farmacéutica, tal como la Food and Drug Administration. Preferiblemente, en el prospecto recita específicamente las indicaciones para las que la composición farmacéutica se ha aprobado. El prospecto puede estar hecho de cualquier material sobre el que una persona pueda leer la información contenida en el mismo o sobre el mismo. Preferiblemente, el prospecto es un material imprimible, tal como papel, cartón con reverso adhesivo, papel de aluminio, o plástico, y similares, en el que se ha impreso o aplicado la información deseada.

25

Ejemplos

La invención se entenderá adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que pretenden ser puramente ejemplares de la invención. La presente invención no está limitada en alcance por las realizaciones ejemplificadas, que pretenden ser ilustraciones de aspectos individuales de la invención solamente. Cualesquiera procedimiento que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Dichas modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

35

A menos que se indique otra cosa, todas las temperaturas están en grados Celsius. Además, en estos ejemplos y en cualquier otra parte, las abreviaturas tienen los siguientes significados:

aa = aminoácido
 ab = anticuerpo
 ACT = Tiempo de coagulación activado
 aPTT= tiempo de tromboplastina parcial activada
 célula CHO = célula de ovario de hámster chino
 células CHO dhfr (-)= células CHO que carecen de gen dhfr
 hr= hora
 INR= Relación normalizada internacional
 IV = intravenosa
 kg = kilogramo
 M = molar
 mg = miligramo
 mg / kg = Miligramo/kilogramo
 mg/ml= Miligramo/mililitro
 min = minuto
 ml = mililitro
 mM = milimolar
 nm = nanómetros
 nM = nanomolar
 PO= oral
 PRP= Plasma rico en plaquetas
 PT = Tiempo de protrombina
 RFU = Unidad de fluorescencia relativa
 s = segundo
 TF = Factor tisular
 U/ml= Unidades/mililitro
 µl o Ul= microlitro
 µM= micromol

65

µg= microgramo

Ejemplo 1. Preparación de des-Gla anhidro-fXa mediante digestión con quimotripsina

Se preparó des-Gla anhidro-fXa de acuerdo con el procedimiento de Morita, T. y col., J. Bio. Chem., 1986, 261(9): 4015-4023 mediante la incubación de anhidro-fXa, en el que deshidroalanina sustituye 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 de experimento típico, 0,5 miligramos/mililitro (mg/ml) de anhidro-fXa se incubaron con perlas de 5 unidades/mililitro (U/ml) de α -quimotripsina-agarosa con agitación suave. Al final de la reacción, las perlas de α -quimotripsina-agarosa se eliminaron por centrifugación o filtración. A esto le siguió incubación con cantidad en exceso de inhibidores fluoruro de 4-amidino-fenil-metanosulfonilo (APMSF), tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), y tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) para inactivar la actividad fXa residual o cualquier actividad de la quimotripsina posiblemente lixiviada a partir de las perlas. El fragmento de dominio Gla y los inhibidores se eliminaron del producto final, des-Gla anhidro-fXa, por un dispositivo de filtro Amicon Ultra Centrifugal (membrana YM10) o mediante diálisis convencional. La concentración o el intercambio de tampón, en caso necesario, también se logró al mismo tiempo.

El anhidro-fXa que contiene dominio Gla se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito por Nogami, y col., J. Biol. Chem. 1999, 274 (43): 31000-7. Como se muestra en la Figura 5, el anhidro-fXa que contenía Gla tiene una actividad enzimática disminuida pero es capaz de unirse a inhibidores de fZa tales como Betrixaban. Esto se describe en detalle en el Ejemplo 4.

La digestión con quimotripsina de fXa activo puede llevarse a cabo de acuerdo con el procedimiento anterior sin usar APMSF. La actividad de coagulación de fXa activo se determinó antes de la digestión con quimotripsina, y después de 15, 30 y 60 minutos de la digestión con quimotripsina de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 3 a continuación. La figura 7 muestra una pérdida completa de la actividad de coagulación después de 30 minutos de digestión con quimotripsina. El tiempo de incubación se prolongó a 60 minutos para asegurar la eliminación completa del dominio Gla.

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

En este ejemplo, las muestras de plasma rico en plaquetas o pobre en plaquetas humanas se prepararon a partir de sangre de donantes sanos extraída en el 0,32% de citrato. PRP y PPP se prepararon centrifugando la sangre anticoagulada a ~100 gravedades o 1000 gravedades durante 20 minutos, respectivamente, a temperatura ambiente. 75-100 microlitros de plasma (µl) se mezclaron con CaCl₂ y Z-Gly-Gly-Arg-aminometilcumarina (Z-GGR-AMC, un sustrato fluorógeno 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 Ca²⁺ 15 milimolar (mM), Z-GGR-AMC 100 micromolar (µM), y el factor tisular (TF) (Innovin) 0,1 nanomolar (nM). La formación de trombina se monitorizó de forma continua a 37°C mediante un lector de placas fluorométrico (Molecular Devices) midiendo las unidades de fluorescencia relativa (RFU). Inhibidor y antídoto, cuando están presentes, se preincubaron con plasma durante 20 minutos a temperatura ambiente antes del inicio de la generación de trombina.

Los resultados de diversos experimentos usando este ensayo pueden encontrarse en las figuras 4, 6 y 9.

Ejemplo 3. Ensayos de prolongación de la coagulación

Se usaron dos formatos de ensayo de coagulación para poner a prueba 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 aPTT con un instrumento de coagulación convencional (temporizador de coagulación automático MLA Electra 800).

En el procedimiento de formato de placa de 96 pocillos, plasma pobre en plaquetas o plasma rico en plaquetas humano se preparó de manera similar a los procedimientos en el ejemplo 2. De 75 a 100 µl de plasma se recalcificaron con CaCl₂, se incubaron a 37°C durante 3 minutos y la formación de coágulos se inició añadiendo factor tisular (Innovin, Dade Behring) o un reactivo de aPTT (Actin FS, Dade Behring). El cambio de DO405 se monitorizó continuamente mediante un lector de placas (Molecular Devices). El tiempo de coagulación se definió como el tiempo (segundos) cuando se alcanzó la mitad del valor máximo de cambio de absorbancia (DO405nm). El inhibidor del Factor Xa y el antídoto, cuando estaban presentes, se preincubaron con plasma a temperatura ambiente durante 20 minutos antes del inicio de la reacción.

Cuando un fXa activo se ensayó para su actividad de coagulación tal como se muestra en la figura 7, 75-100 µl de plasma deficiente en fX (George King Bio-Medical, Inc.) se recalcificaron con CaCl₂, se incubaron a 37°C durante 3 minutos y productos de fXa después de la digestión con quimotripsina se añadieron al plasma para iniciar la formación de coágulos. El cambio de DO405 se monitorizó continuamente mediante un lector de placas, tal como se ha descrito anteriormente.

En la figura 13, el efecto de Betrixaban 400 nM sobre la prolongación del aPTT de plasma humano normal y la inversión del efecto inhibitor de Betrixaban por antídoto des-Gla anhidro-fXa se midió con un temporizador de coagulación automático MLA Electra 800. 100 µl de plasma humano combinado se mezclaron con Betrixaban 400 nM y diferentes concentraciones de antídoto. Se añadieron reactivo de aPTT (Actin FS, Dade Behring) y CaCl₂ según las instrucciones del fabricante para la medición de los tiempos de coagulación.

Los resultados de experimentos adicionales usando este ensayo pueden encontrarse en la figuras 10 y 11.

Ejemplo 4. Inversión de la inhibición de fXa por Betrixaban mediante des-Gla anhidro-fXa

Para medir la inhibición de la actividad fXa por Betrixaban y la inversión de su efecto inhibitor, se purificó fXa activo, diferentes concentraciones de Betrixaban y fXa anhidro o des-Gla anhidro-fXa se añadieron a Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Ca²⁺ 5 mM, y albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1%. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos, se añadieron 100 µM de Spectrozyme FXa (un sustrato cromógeno del factor Xa, American Diagnostica) a la mezcla y la velocidad de escisión de sustrato se monitorizó continuamente durante 5 minutos a 405 nanómetros (nm) mediante un lector de placas. En la figura 5, la actividad cromógena se normalizó respecto a fXa activo en ausencia de cualquier inhibidor. La velocidad inicial de formación de producto en función de la concentración de inhibidor y antídoto se analizó por regresión no lineal para estimar la afinidad de Betrixaban por el antídoto (figura 8).

El efecto del antídoto des-Gla anhidro-fXa sobre la actividad de trombina hacia un sustrato cromógeno S2288 (200 mM) se midió de manera similar como anteriormente, con o sin Argatroban, un inhibidor de IIa de molécula pequeña específico. Como se esperaba, el antídoto (538 nM) no afecta a la actividad amidolítica de IIa (5 nM) o su inhibición por Argatroban 50 nM.

Ejemplo 5. Preparación de fXa con residuos de ácido γ-carboxiglutámico descarboxilados

Un derivado de fXa con residuos de ácido γ-carboxiglutámico descarboxilados puede prepararse tratando proteína fXa, por ejemplo, basándose en el procedimiento descrito por Bajaj, y col., J. Biol. Chem., 1982, 257(7): 3726-3731. 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 liofilizan. El polvo resultante se selló a un vacío de menos de 20 µM y se calentó a 110°C durante diversos periodos de tiempo para obtener fXa descarboxilado.

Ejemplo 6. Preparación de des-Gla fXa-S379A recombinante

Los derivados de fXa pueden producirse mediante procedimiento de ADN recombinante con uno de los siguientes procedimientos basados en cADN de fX (SEQ ID NO. 2) para expresar 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 procedimientos generales de mutagénesis y biología molecular.

fX recombinante y derivados de fX pueden expresarse en, por ejemplo, células de riñón embrionario humano HEK293 basándose en procedimientos descritos en Larson, P.J., y col., Biochem., 1998, 37: 5029-5038, y Camire, R.M., y col., Biochem., 2000, 39, 14322-14329. fX recombinante puede activarse a fXa mediante el activador del factor X veneno de víbora de Russell (RVV). fXa puede procesarse adicionalmente a des-Gla anhidro-fXa basándose en procedimientos descritos en el ejemplo 1.

fX-S379A recombinante (S195A en numeración de quimotripsina) con el residuo serina del sitio activo siendo sustituido por alanina, y preferentemente el mutante de fXa activado, fXa-S379A, puede expresarse, por ejemplo, en células de ovario de hámster chino (CHO) basándose en procedimiento descritos por Sinha y col., Protein Expression and Purif. 1992, 3: 518-524; Wolf, D.L. y col., J. Biol. Chem., 1991, 266(21): 13726-13730.

Des-Gla fXa-S379A puede prepararse mediante digestión con quimotripsina de fXa-S379A de acuerdo con procedimiento descritos en el ejemplo 1.

Más preferentemente, Des-Gla fXa-S379A puede expresarse directamente de acuerdo con procedimiento previos con delección del fragmento del dominio Gla mediante procedimientos de mutagénesis. Por ejemplo, puede usarse expresión de proteínas recombinantes para expresar: des-Gla(1-39)-fXa-S379A, después de la eliminación del fragmento de dominio Gla 1-39 de la SEQ ID NO. 3; des-Gla(1-44)-fXa-S379A, equivalente a la SEQ ID NO. 10 con deshidroalanina siendo sustituida por alanina; y des-Gla(1-45)-fXa-S379A con todo el dominio Gla siendo eliminado (SEQ ID NO. 11).

También pueden realizarse truncamientos adicionales en el dominio EGF1 o EGF1 más EGF2 (figura 2) para expresar derivados des(1-84)-fXa-S379A o des(1-128)-fXa-S379A.

Ejemplo 7. Expresión de mutante de fXa recombinante en células CHO

Este 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 las etapas de activación o modificación química necesarias para producir el pd-antídoto y tiene una afinidad comparable a la proteína derivada de plasma en los ensayos in vitro descritos en el presente documento.

En este ejemplo, un mutante de fXa (SEQ ID NO. 13, tabla 13) se expresó directamente en una célula CHO (véase la figura 14 para vector de expresión) y la proteína funcional se purificó a partir de medio acondicionado como se describe a continuación. La actividad funcional del antídoto recombinante (r-antídoto) se ensayó in vitro y en un modelo animal (ejemplo 8).

Se usó PCR para mutar la secuencia de cADN de fX (SEQ ID NO. 2) en tres regiones. La primera mutación fue la deleción de 6 a 39 aa en el dominio Gla de FX (SEQ ID NO. 3, figura 3). La segunda mutación fue sustituir la secuencia del péptido de activación de 143-194 aa con -RKR-. Esto produjo un enlazador -RKRRKR- que conecta la cadena ligera y la cadena pesada. Tras la secreción, este enlazador se elimina en CHO dando como resultado una molécula de fXa bicatenaria. La tercera mutación es la mutación del residuo del sitio activo S379 a un residuo de Ala.

El polipéptido producido mediante el cADN (SEQ ID NO. 16) que se acaba de describir, se describe en la tabla 12 (SEQ ID NO. 12). El alineamiento del cADN con el polipéptido se muestra en la tabla 17. La molécula de fXa bicatenaria producida después de la secreción es un fragmento de cadena ligera descrito en la tabla 14 (SEQ ID NO. 14) y un fragmento de cadena pesada descrito en la tabla 15 (SEQ ID NO. 15).

Los primeros 1-5 aa en la secuencia de fX se reservaron y se usaron para conectar el polipéptido de mutante de fXa con el prepropéptido de fX (SEQ ID NO. 1, figura 1), garantizando el apropiado procesamiento del prepropéptido en el mutante de fXa.

La secuencia de ADN que codifica el polipéptido de mutante de fXa descrito anteriormente se secuenció y se insertó en el vector de expresión mostrado en la Figura 14. El polinucleótido del vector de expresión se muestra en la SEQ ID NO. 17. El ADN del plásmido se linealizó y se transfeció a células CHO dhfr(-). Las células se seleccionaron usando medios deficientes en tetrahidrofolato (HT) más metotrexato (MTX). Se cribaron clones estables para expresión elevada de proteínas usando un kit de ELISA de fX (Enzyme Research Laboratories, número de catálogo FX-EIA). La proteína mutante de fXa se expresó en medio libre de suero y el medio acondicionado se recogió y se procesó para purificación.

La proteína diana en el medio acondicionado se puede aislar mediante cromatografía de intercambio iónico y purificarse posteriormente mediante cromatografía de afinidad de etapa única (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 por tamaño. Las purificaciones por afinidad pueden incluir material cromatográfico que se une selectivamente al sitio activo escindido de fXa, tal como benzamidina-sefarosa o inhibidor de tripsina de soja-agarosa (STI-agarosa).

La figura 15 muestra las transferencias de Western de mutante de fXa purificado por afinidad (STI-Agarosa, nº de catálogo de Sigma T0637) usando anticuerpos monoclonales (Enzyme Research Laboratories, FX-EIA) que reconoce la cadena pesada y ligera de fX, respectivamente. Tras la reducción del puente disulfuro que conecta la cadena ligera y pesada, el r-Antídoto muestra la banda de cadena pesada de movilidad esperada (similar a fXa derivado de plasma₉ en la transferencia de Western. La deleción de los restos de aminoácidos 6-39 en el dominio Gla del mutante de fXa da como resultado una banda de peso molecular más bajo para la cadena ligera de r-Antídoto en comparación con fXa derivado del plasma. Las marcas de peso molecular también pueden verse en la transferencia.

Las Figuras B y 15C muestran un SDS-PAGE y una transferencia de Western de r-Antídoto purificado mediante intercambio iónico y purificación por afinidad seguidos de cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, n.º del catálogo 17-5174-01).

Ejemplo 8. Modelo en ratón in vivo

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

A las 1,5, 2,0, y 4,0 horas después de la administración oral de Betrixaban, los ratones fueron anestesiados con un

cóctel de ketamina (SC) y se desangraron por punción cardiaca. Se obtuvieron muestras de sangre (0,5 ml) en 50 µl de citrato trisódico. La INR de sangre total se midió usando cartuchos de HEMOCHRON Jr. (International Technidyne Corporation) según las instrucciones del fabricante. Se preparó plasma pobre en plaquetas de ratón por centrifugación para determinaciones de la concentración plasmática de Betrixaban y antídoto (ELISA).

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

Tal como se muestra en la figuras 16 y 17 y las tablas 13A y 14A, una única inyección (300 µg, IV) de antídoto derivado de plasma (pd-antídoto) o mutante de fXa recombinante (r-antídoto) a ratones después de la administración de Betrixaban (15 mg/kg, PO) capturaba eficazmente el inhibidor in vivo. La correlación PK-PD de INR de sangre completa y la concentración plasmática de antídoto (tablas A y B) indicaba una reducción >50% de Betrixaban funcional basándose en mediciones de INR, y justificaron la neutralización eficaz de inhibidores de fXa mediante el antídoto mediante múltiples inyecciones u otros regímenes. Se contempla que estos resultados demuestran que los derivados de fXa de esta invención tienen potencial para actuar como antídotos universales para invertir el efecto anticoagulante de inhibidores de fXa en pacientes con hemorragia u otras urgencias médicas.

Tabla A - correlación PK-PD en ratones tratados con pd-antídoto a 1,5 h después de la administración oral de 15 mg/kg de Betrixaban (5 min después de la inyección del antídoto)

Animal tratado con pd-Antídoto	1	2	3	4	5	6	7	media
Betrixaban (ng/ml)	673	793	1170	415	217	664	879	687
INR esperada	4,2	4,5	5,2	3,3	2,3	4,1	4,7	4,0
INR medida	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 B-correlación PK-PD en ratones tratados con r-Antídoto a 1,5 h después de la administración oral de 15 mg/kg de Betrixaban (5 min después de la inyección del antídoto)

Animal tratado con r-Antídoto	1	2	3	4	Media
Betrixaban (ng/ml)	434	262	335	494	381
INR esperada	3,2	2,5	2,8	3,5	3,0
INR medida	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 un experimento en ratón con una sola inyección IV (1 inyección) o dos inyecciones (2 inyecciones) del r-antídoto (n = 5 por grupo, 312 µg/200 µl de r-antídoto) después de la administración oral de Betrixaban (15 mg/kg). Para el grupo de inyección única, se tomaron muestras de sangre de ratón a 1 h después de la administración oral de Betrixaban. Vehículo (control_1) o r-Antídoto (1 inyección) se administró 5 min antes del punto temporal de 1 h. Para el grupo de doble inyección, se inyectó vehículo o r-antídoto a los 55 min y se repitieron al 115 min después de la administración oral de Betrixaban. Se tomaron muestras de sangre de ratón a las 2 h para los ratones tratados con vehículo (control_2) y r-antídoto (2 inyecciones). La INR se midió en función de la relación de antídoto/Betrixaban en plasma de ratón después de las inyecciones individuales o dobles del antídoto, tal como se muestra en la figura 22B.

Ejemplo 9. Inversión in vitro de rivaroxaban y apixaban mediante antídoto

Como se esperaba, los antídotos contemplados por esta invención también fueron capaces de unirse a y neutralizar otros inhibidores de fXa dirigidos al sitio activo. Las tablas 15 y 16 muestran corrección in vitro de la inhibición por Betrixaban, rivaroxaban y apixaban mediante pd-antídoto y r-antídoto. FXa purificado (3,0 nM), inhibidor (7,5 nM), y diferentes concentraciones de antídoto se incubaron durante 10 min a 22°C en un tampón con Tris 20 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,1%, pH 7,4. La actividad de fXa se ensayó similar al ejemplo 4.

Tabla C-% de corrección de inhibición mediante inhibidores de fXa

pd-Antídoto (nM)	Betrixaban	Rivaroxaban	Apixaban
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 D-% de corrección de inhibición mediante inhibidores de fXa

r-Antídoto (nM)	Betrixaban	Rivaroxaban	Apixaban
0	0	0	0
9,3	21,5	23,2	13,3
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

5 Tal como se muestra en la tabla C, pd-antídoto 204 nM produce al menos el 60% de corrección de los efectos inhibidores de inhibidores de la prueba, mientras que, en la tabla D se consigue >95% de corrección de inhibición mediante el r-antídoto (186 nM) para Betrixaban y rivaroxaban y > 70% inversión de apixaban.

Ejemplo 10. Inversión in vitro de Betrixaban mediante r-antídoto

10 En la tabla E, se ensayó el efecto de la proteína antídoto recombinante sobre la inversión de la anticoagulación por Betrixaban en un ensayo de coagulación en plasma humano. El efecto de Betrixaban 300 nM y 400 nM sobre una prolongación del aPTT de plasma y la inversión del efecto inhibitor se midió mediante un temporizador de coagulación automático MLA Electra 800. 100 µL de plasma humano anticoagulado combinado se mezclaron con Betrixaban 300 nM o 400 nM y diferentes concentraciones de antídoto. Se añadieron reactivo de aPTT (Actin FS, Dade Behring) y CaCl₂ según las instrucciones del fabricante.

15

Tabla E - inversión con r-antídoto de la actividad anticoagulante de Betrixaban

	aPTT (s)	Veces de cambio	% de corrección de anticoagulación
Plasma humano de control	35,2	1,00	-
Betrixaban 300 nM	61,8	1,76	-
Betrixaban 300 nM + r-antídoto 570 nM	38,3	1,09	88
Betrixaban 300 nM + r-antídoto 760 nM	38,2	1,09	88
Betrixaban 300 nM + r-antídoto 1140 nM	38,1	1,08	90
Betrixaban 400 nM	66,3	1,88	-
Betrixaban 400 nM + r-antídoto 380 nM	47,1	1,34	61
Betrixaban 400 nM + r-antídoto 570 nM	39,9	1,13	85
Betrixaban 400 nM + r-antídoto 760 nM	39,9	1,13	85
Betrixaban 400 nM + r-antídoto 1140 nM	37,8	1,07	92
Betrixaban 400 nM + r-antídoto 1520 nM	39,4	1,12	86
r-antídoto 1140 nM	38,9	1,11	-
r-antídoto 1520 nM	38,8	1,10	-

Ejemplo 11. Inversión in vitro de heparina de bajo peso molecular ("LMWH") mediante r-antídoto

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

25

30 En la figura 19, se ensayó el efecto de r-antídoto sobre la inversión de anticoagulación mediante una heparina de bajo peso molecular (LMWH enoxaparina, Sanofi-Aventis) en un ensayo de coagulación en plasma humano. El efecto de 1 unidad de antiXa/ml de LMWH sobre una prolongación del aPTT de plasma y la inversión del efecto inhibitor se midió mediante un temporizador de coagulación automático MLA Electra 800. 100 µl de plasma humano anticoagulado con citrato combinado se mezclaron con enoxaparina y diferentes concentraciones de antídoto. Antes de la medición del tiempo de coagulación, se añadieron reactivo de aPTT (Actin FS, Dade Behring) y CaCl₂ según las instrucciones del fabricante. La adición de antídoto recombinante 1,14 µM producía una corrección del 52% de anticoagulación producida por 1 unidad/ml de enoxaparina.

35 Ejemplo 12. Inversión in vitro de rivaroxaban mediante r-antídoto

En la figura 20, se ensayó el efecto de proteína de antídoto recombinante sobre la inversión de anticoagulación mediante un inhibidor del factor Xa de molécula pequeña (rivaroxaban, Bay 59-7939) en un ensayo de coagulación

en plasma humano. Según lo descrito por Perzborn y col., J. Thromb. Haemost. 3: 514-521, 2005; las mediciones del tiempo de protrombina son un procedimiento preciso para evaluar el efecto anticoagulante de rivaroxaban. El efecto de rivaroxaban 1 μM sobre la prolongación del tiempo de protrombina (PT) de plasma humano combinado y la inversión del efecto inhibitor se midió mediante un temporizador de coagulación automático MLA Electra 800. 100 μl de plasma humano anticoagulado con citrato combinado se mezclaron con rivaroxaban y diferentes concentraciones de antídoto. Antes de la medición del tiempo de coagulación, se añadió reactivo Thromboplastin C Plus de cerebro de conejo (Dade Behring) a muestras de plasma según las instrucciones del fabricante. La adición de anticuerpo recombinante 1,9 μM produjo una corrección del 100% de la anticoagulación producida por rivaroxaban 1 μM .

10 Ejemplo 13. Inversión in vitro de apixaban mediante r-antídoto

En la tabla F, se ensayó el efecto de proteína de antídoto recombinante sobre la inversión de anticoagulación mediante apixaban en un ensayo de coagulación en plasma humano. Según lo descrito por Pinto y col., J. Med. Chem. 55(22): 5339-5356, 2007; las mediciones del tiempo protrombina (PT) son un procedimiento preciso de evaluar los efectos anticoagulantes ex vivo de apixaban. El efecto de apixaban 1 μM y 1,5 μM sobre la prolongación del tiempo de protrombina (PT) de plasma humano combinado y la inversión del efecto inhibitor se midió mediante un temporizador de coagulación automático MLA Electra 800. 100 μl de plasma humano anticoagulado con citrato combinado se mezclaron con apixaban y diferentes concentraciones de antídoto. Antes de la medición del tiempo de coagulación, se añadió reactivo Thromboplastin C Plus de cerebro de conejo (Dade Behring) a muestras de plasma según las instrucciones del fabricante. La adición de antídoto recombinante 1,9 μM produjo una corrección del 97% de la anticoagulación producida por apixaban 1,5 μM .

Tabla F - inversión con r-antídoto de la actividad anticoagulante de Apixaban

	PT (s)	Veces de cambio
Plasma humano de control	14,1	-
1 μM de apixaban	16,4	1,16
1 μM de apixaban + r-antídoto 380 nM	15,3	1,09
1 μM de apixaban + r-antídoto 760 nM	14,9	1,06
1 μM de apixaban + 1,14 μM de r-antídoto	14,2	1,01
1 μM de apixaban + 1,52 μM de r-antídoto	14,2	1,01
1,5 μM de apixaban	18,4	1,31
1,5 μM de apixaban + 1,52 μM de r-antídoto	14,6	1,04
1,5 μM de apixaban + 1,90 μM de r-antídoto	14,3	1,01
1,52 μM de r-antídoto	14	-
1,90 μM de r-antídoto	14,2	-

25 Ejemplo 14. Inhibición in vitro de argatroban mediante des-Gla anhidro-fXa

Para medir la inhibición de la actividad de trombina mediante argatroban y la inversión de su efecto inhibitor, se añadieron trombina humana purificada (5 nM), argatroban (50 nM) y diferentes concentraciones de antídoto des-Gla anhidro fXa a un tampón que contenía Tris 20 mM, NaCl 0,15 M, cloruro cálcico 5 mM, albúmina de suero bovino al 0,1%, pH 7,4. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 20 min, se añadió un sustrato amidolítico S2288 (200 μM) a la mezcla y la velocidad de escisión de sustrato de p-nitroanilida se monitorizó mediante absorbancia a 405 nm. Los resultados se presentan en la figura 12.

35 Ejemplo 15. Métodos para extender la semivida plasmática de la circulación de antídoto después de la dosificación en seres humanos

Los datos farmacocinéticos recientes en animales han demostrado que el antídoto recombinante expresado en células CHO DuxB1 tiene una semivida plasmática de aclaramiento ($T_{1/2}$) de 19 minutos en ratas SD y de 30 minutos en macacos de la Indica. Una semivida de aclaramiento más larga puede ser deseable para el uso humano. La extensión de la $T_{1/2}$ en los seres humanos puede requerir la modificación de la proteína por un resto conjugado capaz de extender la semivida circulante del derivado de fXa. El resto conjugado tal como un anticuerpo puede incluir anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno o una cadena sencilla de los mismos. Por tanteo, el término "anticuerpo" incluye cualquier molécula que contenga una proteína o un péptido que comprenda al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina. Los ejemplos del mismo incluyen, pero no se limitan a una región determinante de la complementariedad (RDC) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión del ligando del mismo, una cadena pesada o cadena ligera de la región variable, una cadena de región constante de cadena pesada o ligera, una región marco conservada (RMC), o cualquier parte del mismo, o al menos una porción de una proteína de unión. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales y pueden aislarse de cualquier fuente biológica adecuada, por ejemplo, murinos, de rata, ovinos y caninos. Un resto de conjugado también puede seleccionarse entre un grupo que consiste en polietilenglicol, un grupo acilo, un liposoma, un agente de encapsulación, una proteína transportadora, una membrana fosfolipídica artificial, una nanopartícula y combinaciones de los mismos.

Farmacocinética del Antídoto en rata

5 Se administró un miligramo de antídoto en forma de una 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 utilizando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los perfiles de concentración plasmática-tiempo del antídoto pueden describirse mediante un modelo de dos compartimentos. El aclaramiento sistémico del antídoto era bajo (1,65 ml/min/kg) y el volumen de distribución era pequeña (0,27 l/kg). La semivida de distribución fue de 19 minutos, seguida de una semivida terminal mucho más larga de 10 horas. Debido a la necesidad de mantener de inmediato la concentración plasmática del antídoto por encima de la de un inhibidor del factor Xa (anticoagulante), se espera que la semivida de distribución tenga un impacto mucho mayor que la semivida terminal en la selección de la dosis durante un tratamiento de sobredosis. Los datos se presentan en la Figura 23.

Farmacocinética del antídoto en macaco de la Indica

15 Se dosificaron dos animales cada uno con 10 mg de antídoto por dosificación intravenosa durante un período de diez minutos. Las muestras de plasma para la determinación de la $T_{1/2}$ se obtuvieron de una manera similar a la del estudio en ratas. La semivida plasmática de eliminación ($T_{1/2}$) fue de aproximadamente 30 minutos. Los datos se presentan en la Figura 24.

20 Debe entenderse que, aunque la invención se ha descrito junto con las realizaciones anteriores, la descripción y los ejemplos anteriores pretenden ilustrar y no limitar el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

25 **Tabla 1- Secuencia ID NO. 1 – Secuencia polipeptídica de Factor X Humano**

1	MGRPLHLVLL	SASLAGLLLL	GESLFIRREQ	ANNILARVTR	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE
61	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQGK	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN
121	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC	CARGYTLADN	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR
181	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE
241	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE
301	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLKT	PITFRMNVAP	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI
361	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVPIVDRNSC	KLSSSFIIITQ	NMFCAGYDTK	QEDACQGDG
421	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE
481	VITSSPLK					

Tabla 2 – Secuencia ID NO. 2 – Una secuencia polinucleotídica que codifica para el Factor X

1	gactttgctc	cagcagcctg	tcccagtgag	gacagggaca	cagtactcgg	ccacaccatg
61	gggcgcccac	tgcacctcgt	cctgctcagt	gcctccctgg	ctggcctcct	getgctcggg
121	gaaagtctgt	tcatccgcag	ggagcaggcc	acaacatcc	tggcgagggt	cacgagggcc
181	aattcctttc	ttgaagagat	gaagaaagga	cacctcgaaa	gagagtgcac	ggaagagacc
241	tgctcatatc	aagaggcccg	cgaggctttt	gaggacagcg	acaagacgaa	tgaattctgg
301	aataaatata	aagatggcga	ccagtgtag	accagtcctt	gccagaacca	gggcaaagt
361	aaagacggcc	tcggggaata	cacctgcacc	tgtttagaag	gattcgaagg	caaaaactgt
421	gaattattca	cacggaagct	ctgcagcctg	gacaacgggg	actgtgacca	gttctgccac
481	gaggaacaga	actctgtggt	gtgctcctg	gcccgcgggt	acaccctgga	tgacaacggc
541	aaggcctgca	ttcccacagg	gccctacccc	tgtgggaaac	agaccctgga	agcaggaag
601	aggtcagtg	cccaggccac	cagcagcagc	ggggaggccc	ctgacagcat	cacatggaag
661	ccatatgatg	cagccgacct	ggaccccacc	gagaacccct	tcgacctgct	tgacttcaac
721	cagacgcagc	ctgagagggg	cgacaacaac	ctcaccagga	tcgtgggagg	ccaggaatgc
781	aaggacgggg	agtgtccctg	gcaggccctg	ctcatcaatg	aggaaaacga	gggtttctgt
841	ggtggaacca	ttctgagcga	gttctacatc	ctaaccgag	cccactgtct	ctaccaagcc
901	aagagattca	aggtgagggt	aggggaccgg	aacacggagc	aggaggagg	cggtgaggcg
961	gtgcacgagg	tggaggtggt	catcaagcac	aaccggttca	caaaggagac	ctatgacttc
1021	gacatcgccg	tgctccggct	caagaccccc	atcaccttcc	gcatgaacgt	ggcgctgcc
1081	tgctcccccg	agcgtgactg	ggccgagtc	acgctgatga	cgcagaagac	ggggattgtg
1141	agcggcttcg	ggcgcaccca	cgagaagggc	cggcagtcga	ccaggctcaa	gatgctggag
1201	gtgccctacg	tggaccgcaa	cagctgcaag	ctgtccagca	gcttcatcat	caccagaac
1261	atgttctgtg	ccggctacga	caccaagcag	gaggatgcct	gccaggggga	cagcgggggc
1321	ccgcacgtca	cccgttcaa	ggacacctac	ttcgtgacag	gcatcgtcag	ctggggagag
1381	ggctgtgccc	gtaaggggaa	gtacgggatc	tacaccaagg	tcaccgctt	cctcaagtgg
1441	atcgacaggt	ccatgaaaac	caggggcttg	cccaaggcca	agagccatgc	cccggaggtc
1501	ataacgtcct	ctccattaa	gtgagatccc	actcaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa

5

Tabla 3 – Secuencia ID NO. 3 – Secuencia polipeptídica de Factor X maduro humano

1	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF
181	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRRLKT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVPIVDRNSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

Tabla 4 – Secuencia ID NO. 4 – Secuencia polipeptídica de Factor Xa sin dominio Gla que carece de los restos de aminoácidos 1 a 44

Cadena ligera						
1					KDGDQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				
Cadena pesada						
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRRLKT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVPIVDRNSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

10

Tabla 5 – Secuencia ID NO. 5 – Secuencia polipeptídica de Factor Xa sin dominio Gla que carece de los restos de aminoácidos 1 a 45

Cadena ligera						
1					DGDQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				
Cadena pesada						
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFKETYD	FDIAVLRRLKT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVPIVDRNSC	KLSSSFITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

5

Tabla 6 – Secuencia ID NO. 6 – Secuencia polipeptídica de Factor Xa activado humano antes de la postraducción de ácido glutámico a ácido γ -carboxiglutámico

Cadena ligera						
1	ANSFLEEMKK	GHLEECMEE	TCSYEEAREV	FEDSKTNEF	WNKYKDGDDC	ETSPCQNQGG
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVWCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				
Cadena pesada						
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLLK	PITFRMNVAP
301	ACLPERDVAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVPYVDRNSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

Tabla 7 – Secuencia polipeptídica de Factor Xa activado humano con postraduccion de ácido glutámico a ácido γ -carboxiglutámico (y representa un residuo de ácido carboxiglutámico)

Cadena ligera						
1	ANSFLYMKK	GHLYRYCMYV	TCSYVARW	FVSDKTNVF	WNKYKGDGQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSWCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				
Cadena pesada						
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKRVVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVIK	HNRFTKETVD	FDIAVLRLLK	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLKML	EVYVDRNSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDGSG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK			

Tabla 8 - Secuencia ID NO. 8 – Secuencia polipeptídica de Factor Xa activado humano de cadena ligera con postraduccion de ácido glutámico a ácido γ -carboxiglutámico

Cadena ligera								
1	ANSFLYMKK	GHLYRYCMYY	TCSYWARW	FYDSDKTNVF	WNKYKGDQQC	ETSPCQNGQK		
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC	CARGYTLADN		
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER						

Tabla 9 – Secuencia ID NO. 9 – Secuencia polipeptídica de Factor Xa activado humano de cadena pesada

181	IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	FDIAVLRLLKT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLLKML	EVPIVDRNSC
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		

Tabla 10 - Secuencia ID NO. 10 – Secuencia polipeptídica de Factor Xa anhidro des-Gla (A representa deshidroalanina)

Cadena ligera					
1				KDGDQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVCS
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER			
Cadena pesada					
181	IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	FDIAVLRLLKT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLLKML	EVPIVDRNSC
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		

Tabla 11 - Secuencia ID NO. 11 – Secuencia polipeptídica de fXa-S379A des-Gla

Cadena ligera					
1				DGDQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVCS
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER			
Cadena pesada					
181	IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	FDIAVLRLLKT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLLKML	EVPIVDRNSC
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		

Tabla 12 - Secuencia ID NO. 12 – Secuencia polipeptídica de un Factor Xa humano triple mutante antes de la supresión del enlazador RKRRKR

Cadena ligera					
1	ANSFL		F	WNKYKDGDDQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	LDNGDCDQFC	HEEQNSVWCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGYPY	PCGKQTLER			
Enlazador					
	RKRRKR				
Cadena pesada					
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLLKML	EVPPYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		

Tabla 13 - Secuencia ID NO. 13 – Secuencia polipeptídica de un Factor Xa humano triple mutante después de la supresión del enlazador RKRRKR

Cadena ligera					
1	ANSFL		F	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSWCS
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER			CARGYTLADN
Cadena pesada					
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVIK	HNRFKETYD	FDIAVLRKLT
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVYVDRNSC
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		IYTKVTAFLK

Tabla 14 - Secuencia ID NO. 14 – Secuencia polipeptídica de un fragmento de cadena ligera de Factor Xa humano triple mutante después de la secreción

1	ANSFL	F	WNKYKDGDDQC	ETSPCQNQGK		
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRK LCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				

Tabla 15 - Secuencia ID NO. 15 – Secuencia polipeptídica de un fragmento de cadena pesada de Factor Xa humano triple mutante después de la secreción

Cadena pesada					
181	IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLLKT
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLKML	EVPYVDRNSC
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		IYTKVTAFLK

Tabla 16 - Secuencia ID NO. 16 – Una secuencia polipeptídica que codifica para r-Antidoto (un Factor Xa humano triple mutante)

```

1  ATGGGGGCC  CACTGCACCT  CGTCTGCTC  AGTGCCTCCC  TGGCTGGCCT  GGGAAAGTC  TGTTATCCG  CAGGGAGCAG  GCCAACAAACA
101  TCCTGGCGAG  GGTACAGAGG  GCCAATTCCT  TCTTTTCTG  GAATAAATAC  AACAGTGGC  ACCAGTGTGA  GACCAGTCC  TGCCAGAACC  AGGGCAAATG
201  TAAAGACGGC  CTCGGGGAAT  ACACCTGCAC  CTGTTTAGAA  GGATTCGAAG  GCAAAAAC  TGAATTATTC  ACACGGAAAG  TCTGCAGCCT  GGACAACGGG
301  GACTGTGACC  AGTTCTGCCA  CGAGGAACAG  AACTCTGTGG  TGTGCTCCTG  CGCCCGCGGG  TACACCTTGG  CTGACAACGG  CAAAGGCTGC  ATTCCCACAG
401  GGCCCTACCC  CTGTGGGAAA  CAGACCCTGG  AACGCAGGAA  GAGGAGGAAG  AGGATCTGG  GAGGCCAGGA  ATGCAAGGAC  GGGAGTGT  CCTGGCAGGC
501  CCTGCTCATC  AATGAGGAAA  ACGAGGGTIT  CTGTGGTGA  ACCATTCTGA  GCGAGTTCTA  CATCCTAACG  GCAGCCACT  GTCTTACCA  AGCCAAGAGA
601  TTCAAGGTGA  GGTAGGGGA  CCGGAACACG  GAGCAGGAG  AGGGCGGTGA  GCGGTGAC  GAGGTGGAG  TGGTCATCAA  GCACAACCGG  TTCACAAAGG
701  AGACCTATGA  CTTGCACATC  GCCGTGCTCC  GGCTCAAGAC  CCCATCAC  TTCCGCATGA  ACGTGGCGCC  TGCCTGCC  CCCGAGCGTG  ACTGGGCCGA
801  GTCACGGCTG  ATGACGCAGA  AGACGGGGAT  TGTAGCGGC  TTCGGCGCA  CCCACCGCAG  TCCACCGCC  TCAAGATGCT  GGAGGTGCC
901  TACGTGGACC  GCAACAGCTG  CAAGCTGTCC  AGCAGCTTCA  TCATCACCCA  GAACATGTT  TGTGCCGGCT  ACGACACCAA  GCAGGAGGAT  GCCTGCCAGG
1001  GGGACGCAGG  GGGCCCCGAC  GTCACCCGCT  TCAAGGACAC  CTACTTCGTG  ACAGGCATC  TCAGCTGGGG  AGAGGGCTGT  GCCCGTAAGG  GGAAGTACGG
1101  GATCTACACC  AAGGTCACCG  CCTTCCTCAA  GTGGATCGAC  AGGTCCATGA  AAACCAGGGG  CTTGCCCAAG  GCCAAGAGCC  ATGCCCCGGA  GGTCATAAAG
1201  TCCTCTCCAI  TAAAGTGA

```

Tabla 17 - Secuencia ID NO. 17 - Secuencia polipeptídica del vector de expresión del r-Antidoto

1 TCTAGACACA GTACTCGGCC ACACATGGG GCGCCACTG CACTCGTCC TGCTCAGTGC CTCCTGGCT GGCTTCCTG TGCTCGGGG AAGTCTGTT
 101 ATCCGAGGG AGCAGGCCAA CAACATCCTG GCGAGGTCA CGAGGCCAA TTCCTTTCTT TTTCTGGAATA AATACAAAGA TGGCGACCAG TGTGAGACCA
 201 GTCTTGCCA GAACAGGGC AATGTAAAG ACGGCTCGG GGAATACACC TGCACTGTI TAGAAGGAI CGAAGGCCAA AACTGTGAAT TAITCACACG
 301 GAAGTCTGC AGCTTGACA ACGGGACTG TGACAGTTC TGCCAGAGG AACAGAACTC TGTGTTGTG TCTTGGCCC GCGGTACAC CTTGGCTGAC
 401 AACGCAAG CTTGATCC CACAGGCC CACAGGCC TACCCTGTG GGAACAGAC CTTGAAACGC CTTGAAACGC GGAAGAGGAT CGTGGGAGG CAGAAATGCA
 501 AGGACGGGA GTGTCCCTGG CAGGCCCTGC TCATCAATGA GGAACACGAG GGTTCCTGTG GTGAACCAI TCTGAGCGAG TTCTACATCC TAAACGGCAGC
 601 CCATGTCTC TACCAAGCCA AGAATCAA GGTGAGGTA GGGACCGGA ACACGGAGCA GGAAGAGGC GTGAGCGG TGCACGAGG GGAGGTGGT
 701 ATCAAGACA ACCGGTTCAC AAGAGACC TATGACTGC ACATCGCCGT GCTCCGGCTC AAGACCCCA TCACCTTCCG CATGAACGTG GCGCTGCC
 801 GCTCCCCCA CCGTACTGG CCGAGTCCA GCGTATGAC SCAGAGAGC GGGATTGTA GGGCTTCG GCGCACCC CAGAAAGGCC GSCAGTCCAC
 901 CAGGCTCAAG ATGCTGGAG TGCCCTACGT GGACCGAAC AGTGCAGC TGTCAGCAG CTTTCATCAT ACCCAGAACA TGTCTGTG CCGCTACGAC
 1001 ACCAAGCAGG AGGATGCCCTG CAGGGGAC GCAGGGGC CGACGTAC CCGTTCAG GACACTACT TCGTGACAG CATCGTACG TGGGGAGAGG
 1101 GCTGTGCCC TAAGGGAG TACGGATCT ACACCAAGT CACCGCTTC CTCAAAGTGA TCGACAGGC CATGAARACC AGGGCTTGC CCAAGGCCAA
 1201 GAGCCATGCC CCGGAGTCA TAACGTCTC TCCATTAAAG TGAGATCCA CTCGGATCCC TATTCTATAG TGTACCTAA ATGCTAGAG TCGCTGATCA
 1301 GCCTGACTG TGCCCTTAG TGGCAGCCA TCTGTGTTI GCGCTCCC CCGTCTCC TGACCTTCC AAGTGCAC TCCCAGTGC CTTTCCTAAI
 1401 AATATGAGGA AATGCAATG CAITGCTGA TTAGTGTGA TTTTATCTG GGGGTGGG CAGCAAGGG GAGGATGGG GAGGATGGG AAGACAAATG
 1501 CAGGATGCT GGGATGCGG TGGCTCTAT GGGCTCTAT GGGCTCTAT GGGCTCTAT TTTTATCTG GGGGTGGG CTCGAGCGG CCGCCCTTC GACCCAGTGC
 1601 TGGATGTGT GTCAGTTAG GTGTGGAAG TCCCGAGGT CCGCAGCAG CAGAAGTATG CAAAGCAATG ATCTCAAITA GTCAGCAACC AAGTGTGAA
 1701 AGTCCCGAG CTCGCCAGCA GGCAGAAATG TGAAGAAAT GCATCTCAI TAGTCAGCA CCAATAGTCC GCGCTTACT CCGCCATCC CCGCCCTAAC
 1801 TCCGCCCAGT TCCGCCAT TCCGCCAT TCCGCCAT TCCGCCAT TCCGCCAT TTTTATCTG TTTATGAGA GCGCGAGGC GCTCGGCC TCGAGCTATT CCAGAATAG
 1901 TGAGGAGGT TTTTGGAG CTTAGGCTT TGCAAAAAG CTAGCTTCC CTTGCCATCA TGGTTCGACC ATTGAATGC ATCGTCGCG TGTCCCAAAA
 2001 TATGGGAT GGCAGAAGC GAGACTTAC CTGGCTCCG CTCAGGAAC AGTCAAGTA CTTCCAAAGA ATGACCAACA CCTTTCAGT GGAAGGTAAA
 2101 CAGAACTGG TGATATGGG TAGAAAACC TGGTCTCCA TTTCTGAGAA GAATCGACT TTAAGGACA GAATTAATAT AGTTCTCAGT AGAAACTCA
 2201 AAGAACACC ACGAGGAGCT CATTTCTTG CCAAAAGTTT GGATGATCC TTAAGACTTA TTAAGACTTA TTAAGACTTA TTAAGACTTA TTAAGACTTA
 2301 GATAGTCCAG GGCAGTCTG TTTACAGGA AGCCATGAT CAACAGGCC ACCTTAGACT CTTTGTGACA AGGATCAIGC AGGAATTTGA AAGTGACACG
 2401 TTTTCCAG AATTTGAT TGGGAAATAT AACTTCTCC CAGAAATACC AGGCTCCTC TCTGAGGTC AGGAGGAAA AGGCATCAAG TATAAGTTG
 2501 AAGTACAGA GAAGAAAGC TACAGGAAG ATGTTTCAA GTTCTGTGT GATGTTTGA CAAACCAACA TTGATGCAI TTTTATAAGA CCAATGGACT TTTGCTGGCT
 2601 TTAGATCCC CCGGATCCA GACATGATA GACATGATA AAGTGCAT AACAAGTTA AACAACAA ACAACAAACA TTGCATTCAT TTTATGTTT AGGTTACAGG GAGGTTGTTG
 2701 TGATGTATT GCTTTATTG TAAACATTAT AAGTGCAT AACAAGTTA AACAAGTTA AACAACAA ACAACAAACA TTGCATTCAT TTTATGTTT AGGTTACAGG GAGGTTGTTG
 2801 GAGTTTTT AAAGCAAGTA AACTCTAC AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA
 2901 TATCATGGT CATAGCTGT TCCGTGTGA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA AATGTGTA
 3001 AATGATGAG CTAACTACA TTAATTGCGT TGGGCTTCC TCCGCTTCC TCCGCTTCC TCCGCTTCC TCCGCTTCC TCCGCTTCC TCCGCTTCC TCCGCTTCC
 3101 GGGAGAGGC GGTITGCGTA TTGGGCGTC TCCGCTTCC TCCGCTTCC TCCGCTTCC TCCGCTTCC TCCGCTTCC TCCGCTTCC TCCGCTTCC TCCGCTTCC
 3201 AAGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAAATCA GGGATAACG CAGAAAGAA CATGTGAGCA ARAAGCCAG AAAAGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCT
 3301 TGTGCGGTT TTTCCATAG CTCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAT CGACGCTCAA GTACAGAGTG GCAAAACCCG ACAGACTAT AAAGATACCA
 3401 GCGGTTTCC CCTGGAAGCT CCTCCTGTI CCGACCTTCC CCGTACCCG AATACCTGTC GCTTTCCTC CTTCCGGAG CTTCCGGCTT
 3501 TCTCAIAGCT CACGCTGAG GATCTCAGI TCGTGTAGG TCGTGTAGG TCGTGTAGG TCGTGTAGG TCGTGTAGG TCGTGTAGG TCGTGTAGG TCGTGTAGG
 3601 TATCCGGTAA CTATCGTCTT GATCCCAAC CCGTAAAGCA CCACTTATCG CCACTGAGC AGCCACTGG TAACAGGAT TAACAGAGCGA GGTATGTAGG
 3701 CCGTCTACA GAGTCTTGA AGTGGTGGC TAACTACGG TAACTACGG TAACTACGG TAACTACGG TAACTACGG TAACTACGG TAACTACGG TAACTACGG
 3801 AAGATTGGTA GCCTTGTATC CCGSAAACAA ACCACCGCTG GTACGGTGG TTTTITTTGT TGGAAAGCAG GATTACGGC CAGAAAAAAA GGATCTCAAG

3901 AAGATCCCTT GATCTTTCT ACGGGTCTG ACGTCTAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCCTCACCTA
4001 GATCCITTTA AATTAAAAI GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAACTTG AGTAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC
4101 TCAGCGATCT GTCTATTTTC TTCAATCCATA GTTGCCTGAC TCCCGTCTG GTAGATAACT ACAGTACGGG AGGCTTACC AGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCIGCAA
4201 TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA TTTGCGCAAC GTTGTGCCA TTGTACAGG CATCGIGGTG
4301 CTCCATCCAG TCTATTAAT GTTGCCGGGA AGTACAGTA AGTAGTTCG CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTGCCA TTGTACAGG CATCGIGGTG
4401 TCACGGTCTG CGTTGGTAT GGTTCATTC AGTCCGGTT CCCACGATC AAGCGAGTT ACATGATCC CCAATGTTG CAAAAAAGCG GTTAGTCTCT
4501 TCGGTCTCC GATCGTTGC AGAAGTAGT TGGCCGAGT GTTACACTC ATGTTAAG CAGCACTGCA TAATTTCTT ACITCATGC CATCCGTAAG
4601 ATGCTTTTCT GTGACTGGT AGTACTCAAC CAACTCATC CAACTCATC TGAGAAATG GTATGCGGG ACCGAGTTG TCTTGCCCCG CGTCAATACG GGATAATACC
4701 GCGCCACATA GCAGAACITTT AAAAGTCTC ATCAITGGAA AACGTTCTT GGGCGGAAA CTCCTAAGGA TCTTACCCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT
4801 AACCCACTCG TGCAACCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCCACAGC ATTTAAGCAT TTATCAGGT TTATCAGGT TAATGCTCA TGAGCGGATA CAATTTGAA
4901 AAGGGGACA CGAAATGTT GAATACTCAT ACTTTTCTT TTTCCCGAAA AGTCCACCTI GGAATTTGT AAACGTTAA ATTTTGTAA AATTCGGTT
5001 TGTATTTTGA AAAATAACA AATAGGGTT CCAATAGGCC GAAATCGCA AAATCCCTTA TAAATCAAAA GAATAGACCG AGATAGGTT GAGTGTGTT
5101 AAATTTTGT TAAATCAGCT CATTTTTAA ACTATTAAAG AACCTGACT CCAACGTCAA AGGGGAAA ACCGTCTATC AGGCGATGG CCCACTACGT GAACCATCAC
5201 CCAGTTTGA ACAAGATCC ACTATTAAAG AACCTGACT CCAACGTCAA AGGGGAAA ACCGTCTATC AGGCGATGG CCCACTACGT GAACCATCAC
5301 CTAATCAAG TTTTGGGG TCGAGTGC GTAAAGCACT AAATCGAAC CTTAAAGGA GCCCCGATTT TAGAGCTTGA CGGGAAAAGC CGGCGAACGT
5401 GCGAGRAAG GAAGGAAGA AAGCGAAGG AGCGGCGCT AGGGCTGG CAAGTGTAG GGTACGCTG CCGTAAACCA CCACACCCCG CGCGCTTAAI
5501 GCGCCGCTAC AAGGGCGCT TGCTGCAAG CGATTAAGTT GGTAAACGCC AGGTTTTC CAGTACGAC GTTGTAAAAC GACGCGCAGT GAGCGCGCT AATACGACTC
5601 AAGGGGATG TGCTGCAAG CGATTAAGTT GGTAAACGCC AGGTTTTC CAGTACGAC GTTGTAAAAC GACGCGCAGT GAGCGCGCT AATACGACTC
5701 ACTATAGGC GAATTTGAAI TAATTCGCTG GGTGAGACC CGCAGAGAA GACGCTTAG GATTTTGTCC CGGACTAGCG AGATGGCAAG GCTGAGGACG
5801 GGAGGCTGAI TGAGAGCGA AGGTACACC TAACTCAAT ACAACCTTG GAGCTAAGC AGCAATGGTA GAGGAAAGAT TCTGACAGTC CCTTCCAGC
5901 GGCCTCCCG TCACCACCCA CCCCACCCG CCCCAGCCG AGCTGAGAT AATTCATACA AAAGACTCG CCCCTGCCIT GGGGAATCCC AGGGACCGTC
6001 GTTAACTCC CACTAACGTA GAACCCAGAG ATCGTGCCT TCCCGCCCC TCACCCGCC GCTCTGCTCA TCACTGAGGT GGAGAAGAGC ATGCGTGAGG
6101 CTCGGTGGC CGTCAGTGG CAGAGCGCAC ATCGCCACA GTCCCGAGA AGTTGGGGG AGGGTCCGG AATTGAACCG GTGCCTAGAG AAGGTGGCG
6201 GGGTAACT GGAAGTGA TGTCGTGAT TGGTCCGCC TTTTCCCGA GGTGGGGGA GAACGTAATA TAAGTGCAGT AGTCGCCGTG AACGTTCTT
6301 TTCGCACCG GTTTGCCCGC AGAACACAGG TAAGTGCCTG GTGTTGTTCC CGCGGCCCTG GCCTCTTAC GGGTTATGG CCTTCCGTG CTTGAATAC
6401 TTCCACGCC CTGGCTGCAG TACGTGATC TTGATCCCGA GCTTCGGGT GAAAGTGGT GGGAGATTC GAGGCCCTG GCITTAAGGAG CCCCTTCCG
6501 TCGTGTGA GTTGGGCTT GGTGGGCTT GGTGGGCTT GGTGGGCTT GGTGGGCTT GGTGGGCTT GGTGGGCTT GGTGGGCTT GGTGGGCTT GGTGGGCTT
6601 ATTTAAAT TTTGATGAC TGCTGCGAC CTTTTTCTT GGCAGATAG TCTTGTAAI GCGGCCAAG ATCTGCACAC TGGTATTTG GTTTTGGGG
6701 CCGGGGCGG CGACGGGCG CGTGCCTCC AGCCACATG TTCGGCAGG CCGGCCCTG CAGCCGCGC ACCGAGAATC GGACGGGGT AGTCTCAGC
6801 TGGCCGCTT GCTCTGTTG CTGGCTCGC GCGCCCTGT ATCGCCCGC CTTGGCGCG CAGTTCGCTG CAGTTCGCTG AGCGGAAGA
6901 TGGCCGCTT CCGCCCTTC CCGCCCTTC TGCAGGAGC TCAAAAATGGA GGACGGGCG CTCGGGAGG CCGGCCGCTG AGTCAACCCAC ACAAAGGAAA AGGGCTTTC
7001 CGTCCCTCAG CGTGCCTCA TGTACTCCA CGGAGTACC GCGCCCTTC AGGACCTCG ATTAGTCTC GAGCTTTGG AGTACGCTGT CTTTAGGTTG
7101 GGGGAGGGG TTTTATGCGA TGGAGTTTC CCACACTGAG TGGGTGGAGA CTGAAGTTAG GCCAGCTGG CACTTGTATG AATCTCTCTT GGAATTTGCC
7201 CTTTTTGTG TTGATCTTG GTTCATCTC AAGCTCAGA CAGTGGTTCA AAGTTTTTTT CTTCCATTTT CTTCCATTTT AAGTGTCTG AACTACCC CTAAGAAGCA
7301 AAT

Tabla 18 – Secuencia ID NO. 18 – Secuencia de señal para las SEQ ID NO. 12-15 y 19-25

Secuencia de señal				
SP1	MGRPLHLVLL	SASLAGLLL	GESLFIRREQ	ANNILARVTR

Tabla 19 – Secuencia ID NO. 19 – Xi DesGla (con péptido de activación) con 2 enlazadores RKR

Cadena ligera					
1		F	WNKYKDGDQC	ETSPCQNQQK	
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFRKLCSC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVCSC
121	GKACIPTGPI	PCGKQTLER			
Enlazador	RKRKR				
Cadena pesada					
121		SVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF
181	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVWIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLLKLT
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLLKML	EVPYVDRNSC
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		IYTKVTAFLK

Tabla 20 – Secuencia ID NO. 20 – Forma Xai-beta DesGla truncada solo en R

Cadena ligera									
1	ANSFL		F		WNKYKDGQDC				ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVCS				CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER							
Enlazador	RKRRKR								
Cadena pesada									
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY				ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEWIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLLKT				PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLLKML	EVVYVDRNSC				KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG				IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTR								

Tabla 21 - Secuencia ID NO. 21 – Forma DesGlaXai alfa solamente

Cadena ligera	1	ANSFL F WNKYKGDGQC ETSPCQNQGK
	61	CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVCS CARGYTLADN
Enlazador	121	GKACIPTGPY PCGKQTLER RKRRKR
Cadena pesada	181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
	241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETD FDIAVLRRLKT PITFRMNVAP
	301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ
	361	NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
	421	WIDRSMKTQG LPKAKSHAPE VITSSPLK

Tabla 22 - Secuencia ID NO. 22 – Forma DesGla Xai alfa con sitio de glucosilación suprimido

Cadena ligera						
1	ANSFL			F	WNKYKDGDDQC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRK LCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVWCS	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				
Enlazador						
	RKRRKR					
Cadena pesada						
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLKT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVYVDRNSC	KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTQG	LPKAKSHAPE	VIASSPLK			

Tabla 23 – Secuencia ID NO. 23 – δEGF1 Xai DesGla

Cadena ligera	
1	ANSFL
61	TRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVCS CARGYTLADN
121	GKACIPTGPYPCGKQTLER
Enlazador	
	RKRRKR
Cadena pesada	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK

Tabla 24 – Secuencia ID NO. 24 – Forma Xi-RKR-alfa DesGla solamente

Cadena ligera									
1	ANSFL		F	WNKYKDGQQC	ETSPCQNGGK				
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVCS	CARGYTLADN			
121	GKACIPTGPI	PCGKQTLER							
Enlazador									
	RKR								
Cadena pesada									
121		SVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF				
181	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ			
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLLK	PITFRMNVAP			
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVYVDRNSC	KLSSSFIITQ			
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK			
421	WIDRSMKTQG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK						

Tabla 25 – Secuencia ID NO. 25 – Construcción de Factor Xa triple mutante con un solo enlazador RKR

Cadena ligera									
1	ANSFL		F	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQGK				
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVWCS	CARGYTLADN			
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER							
Enlazador RKR									
Cadena pesada									
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCPLYQ			
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRLLKT	PITFRMNVAP			
301	ACLPERDWA	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLKML	EVYVDRNSC	KLSSSFIITQ			
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK			
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK						

Tabla 26 – Secuencia ID NO. 26 – Xai Des Gla con el prepropeptido de protrombina humana fusionada a ANSFL

Secuencia de señal					
SP1	MAHVRGLQLP	GCLALALCS	LVHS		
Cadena ligera					
1	ANSFL			F	WNKYKDGQDC ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC
121	GKACIPTGPI	PCGKQTLR			CARGYTLADN
Enlazador					
	RKRRKR				
Cadena pesada					
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRKLT PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVYVDRNSC KLSSSFIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		

Tabla 27 – Secuencia ID NO. 27 – Secuencias de señal alternativas, Xai Des Gla con péptido señal de transferrina reemplazando el péptido señal de Xa nativo

Secuencia de señal					
SP1	MRLAVGALLY	CAVLGLCLA			
Cadena ligera					
1	ANSFL		F	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVCS
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER			CARGYTLADN
Enlazador					
	RKRRKR				
Cadena pesada					
181		IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLRKLT
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRLKML	EVYVDRNSC
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE		VITSSPLK	IYTKVTAFLK

Tabla 28 – Cebadores oligonucleotídicos utilizados para construir el polinucleótido que codifica para el r-Antídoto triple mutante

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
1. FXF1	AGTCTCTAGACACAGTACTCGGCCACACCATGGGG	28
2. FXR1	AGCTGGATCCGAGTGGGATCTCACTTTAATGGAGAGG	29
3. FXF2	GAGGCCAGGAATGCAAGGACGG	30
4. FXR2	CCGTCCTTGCATTCTGTCCTC	31
5. FXR3	TCATCAGCGTGGACTCGGCCAGT	32
6. GLAF	CCAATTCTTTCTTTTCTGGAATAAATACAAAGATGGCGACC	33
7. GLAR	TTCCAGAAAAGAAAGGAATTGGCCCTCGTGACCC	34
8. FXAF	GGAAGAGGAGGAAGAGGATCGTGGGAGGCCAGGAA	35
9. FXAR	CACGATCCTCTCCTCCTCCTCCTGCGTTCCAGGG	36
10. ALA419 F	AGGGGGACGCAGGGGGCCCGCACGTCACCC	37
11. ALA419 R	GGGTGACGTGCGGGCCCTGCTTCCCCT	38

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende

5 (A)

(i) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 12 o 13 que comprende adicionalmente una modificación en el bucle de autólisis de la cadena pesada de la SEQ ID NO. 12 o 13 o

10 (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 12 o 13, y que comprende adicionalmente una o más mutaciones seleccionadas entre el grupo que consiste en Arg366Q/A, Lys370Q/A, Arg372Q/A, Arg376Q/A, y combinaciones de los mismos; en el que el bucle de autólisis corresponde a los restos de aminoácidos 366-376 de la SEQ ID NO. 1;

15 (B) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 20 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 20, en la que el polipéptido no contiene el extremo C-terminal del factor Xa de tipo silvestre después del resto de aminoácido que corresponde a Arg429 de la SEQ ID NO. 3;

(C) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 21 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 21, en la que el polipéptido tiene Gln en el resto de aminoácido correspondiente a Arg429 de la SEQ ID NO. 3; o

20 (D) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 22 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 22, en la que el polipéptido tiene Gln en el resto de aminoácido que corresponde a Arg429 de la SEQ ID NO. 3, y tiene Ala en el resto de aminoácido que corresponde a Thr443 de la SEQ ID NO. 3,

25 en el que el polipéptido (a) tiene una actividad procoagulante reducida en comparación con el factor Xa de tipo silvestre, (b) es capaz de unirse a un inhibidor del factor Xa, y (c) no se ensambla en un complejo de protrombinasa

2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO. 20, 21 o 22.

30 3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que la modificación en el bucle de autólisis comprende la sustitución de al menos un resto de aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Arg366, Lys370, Arg372 y Arg376 a Gln (Q) o Ala (A).

35 4. Un conjugado peptídico que comprende un vehículo unido covalentemente o no covalentemente al polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

5. El conjugado peptídico de la reivindicación 4, en el que el vehículo es un liposoma, una micela, un polímero farmacéuticamente aceptable o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 6. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

7. Un método para preparar el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende expresar un polinucleótido que codifica el polipéptido en una célula hospedadora procarionota o eucariota.

45 8. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo y el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, para su uso en un método de neutralización o inversión de la anticoagulación en un sujeto sometido a tratamiento anticoagulante con un inhibidor del factor Xa que necesita el cese de la anticoagulación o que padece sangrado.

50 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, para su uso en un método de unión e inhibición selectivamente a un inhibidor del factor Xa administrado de forma exógena en un sujeto.

55 11. La composición de la reivindicación 9 o 10 para su uso como se define en dichas reivindicaciones, en la que el inhibidor del factor Xa se selecciona entre el grupo que consiste en fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotilado, enoxaparina, fragmin, NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la vía del factor tisular, DX-9065A, YM-60828, YM-150, apixaban, rivaroxabán, PD-348292, otamixabán, edoxabán, LY517717, GSK913893, razaxabán, heparina de bajo peso molecular, betrixabán o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y combinaciones de los mismos.

60 12. La composición de la reivindicación 9 o 10 para su uso como se define en dichas reivindicaciones, en la que el sujeto está experimentando un acontecimiento clínico grave de sangrado seleccionado entre el grupo que consiste en una hemorragia, el sangrado en órganos vitales, el sangrado que requiere volver a operar o un nuevo procedimiento terapéutico, y un índice de sangrado de igual o más de 2,0 con un sangrado manifiesto asociado.

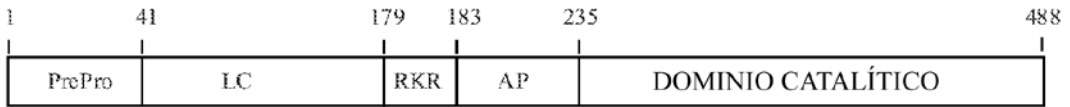


FIG. 1

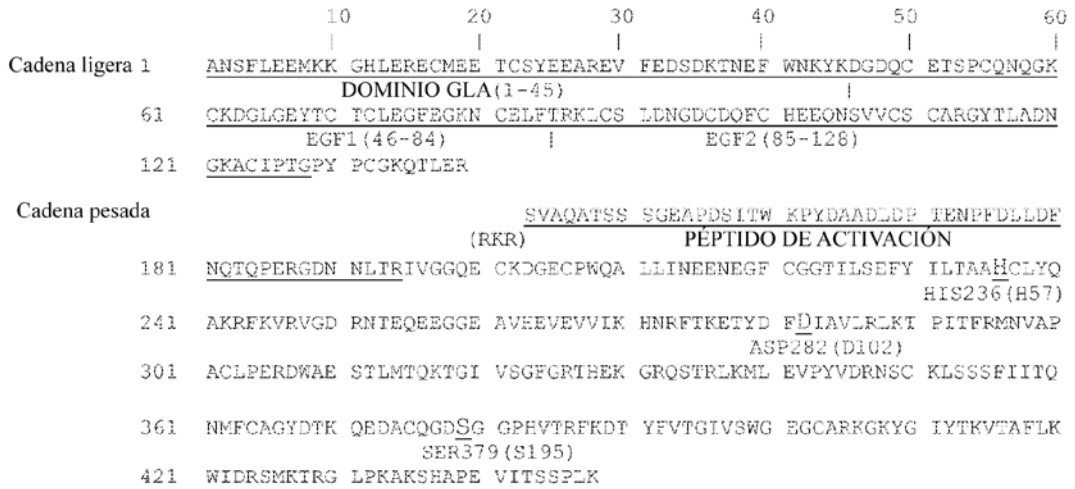


FIG. 2

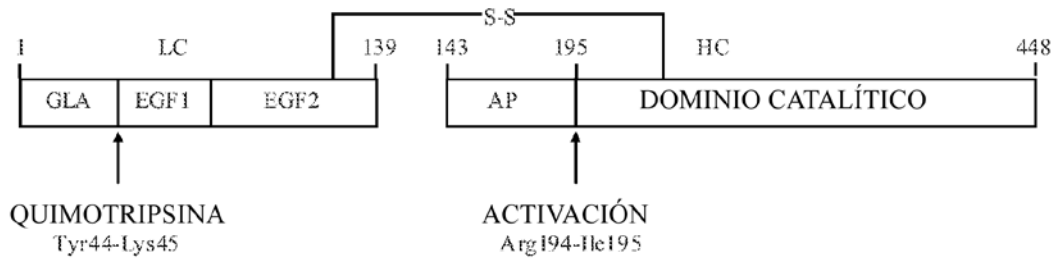


FIG. 3

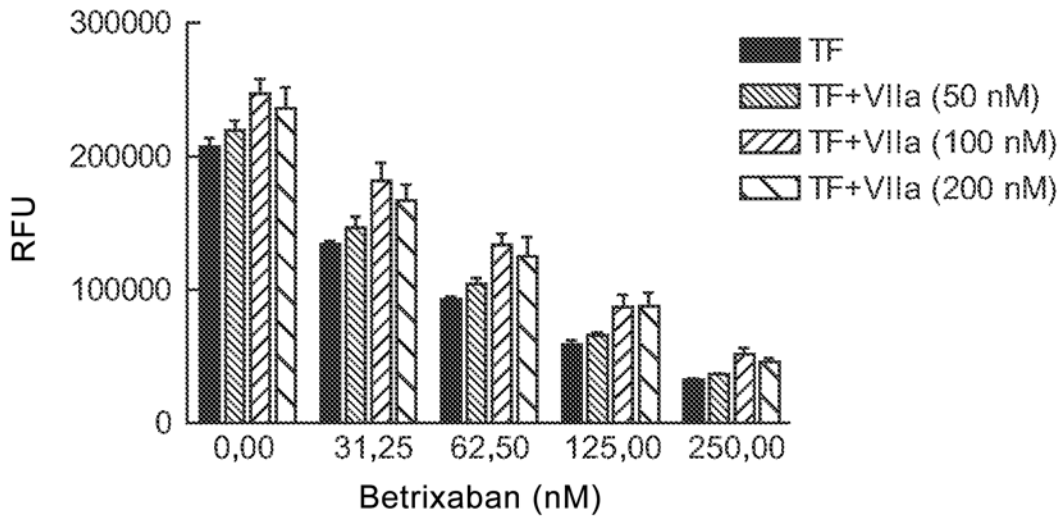


FIG. 4

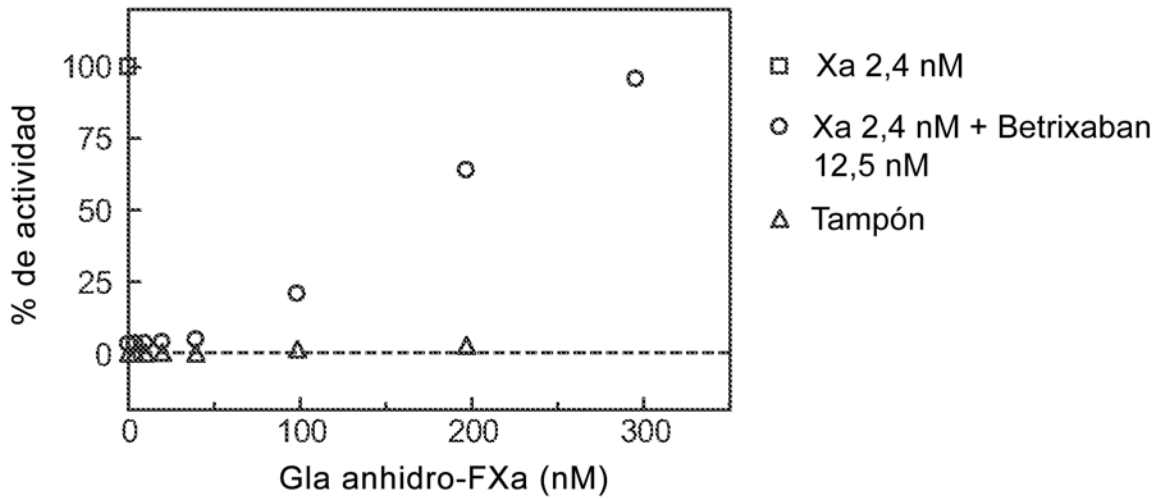


FIG. 5

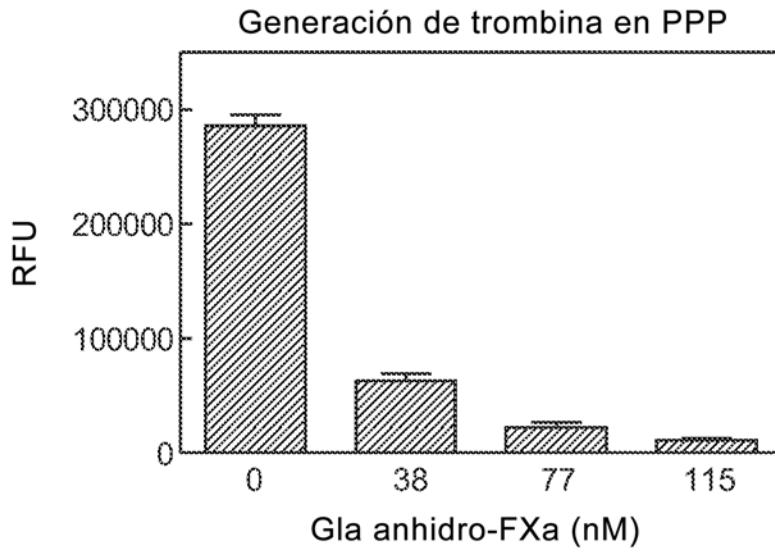


FIG. 6

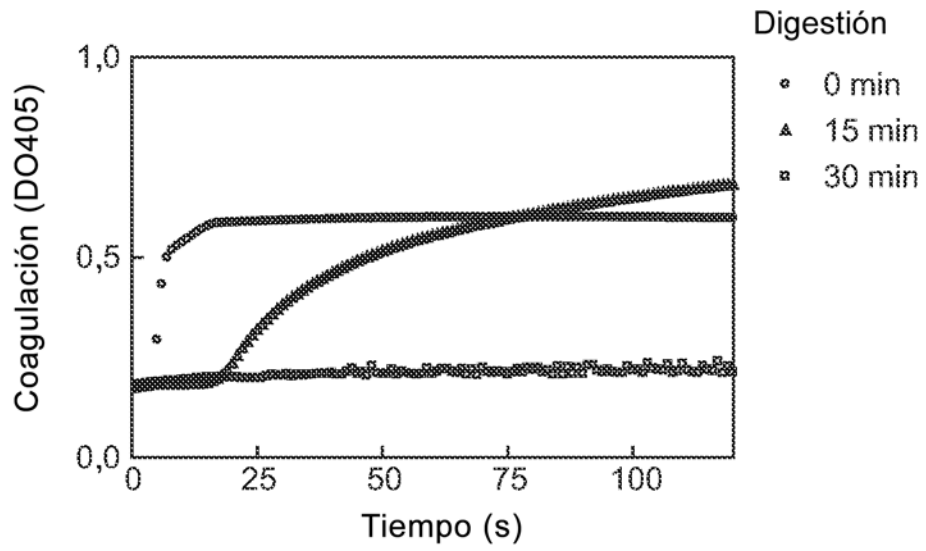


FIG. 7

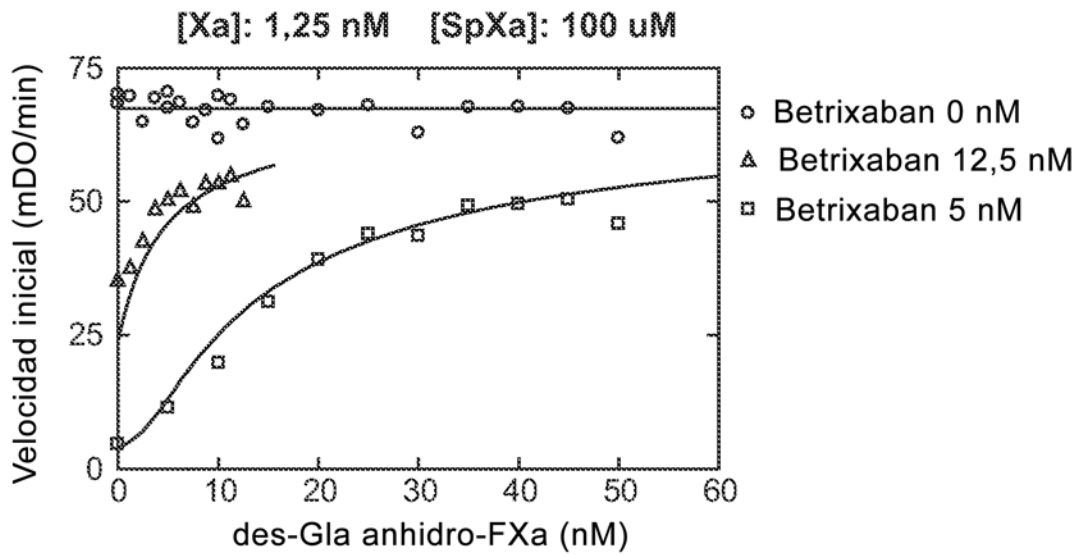


FIG. 8

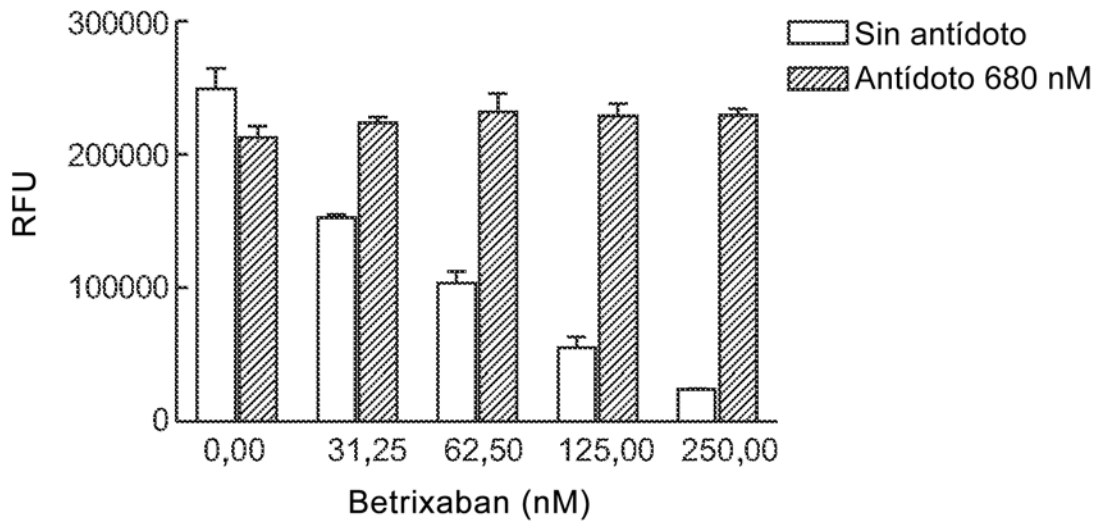


FIG. 9

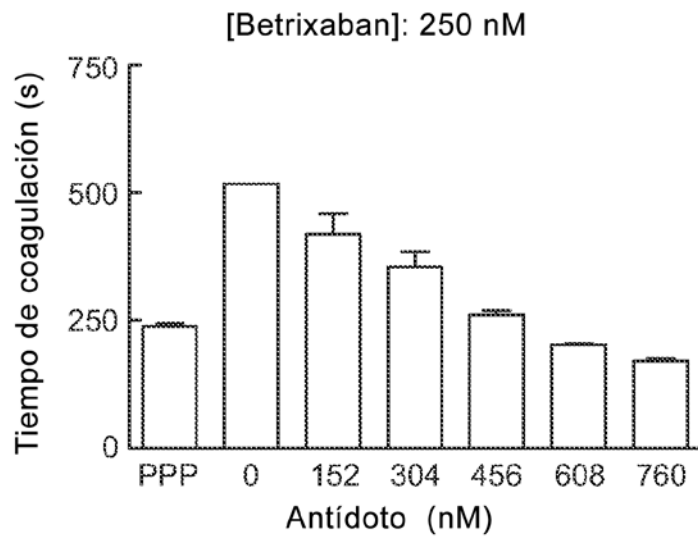


FIG. 10

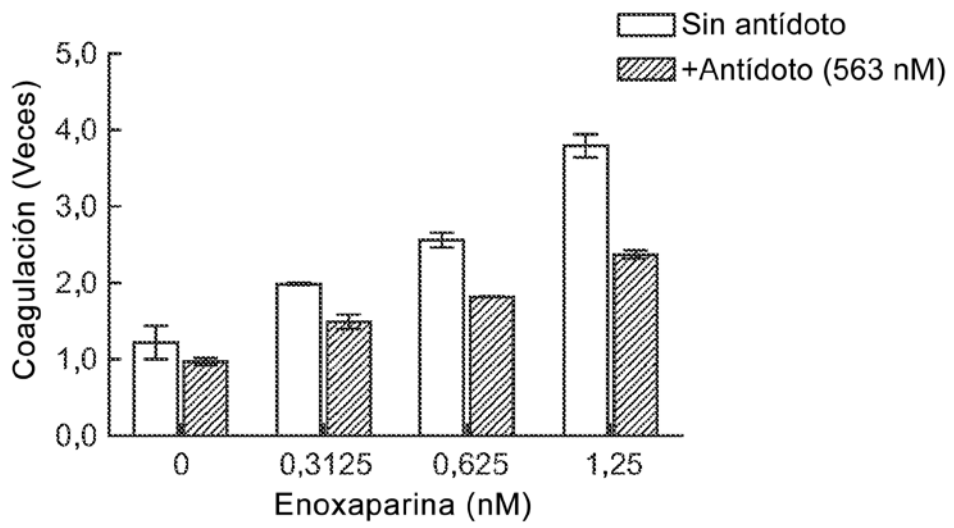


FIG. 11

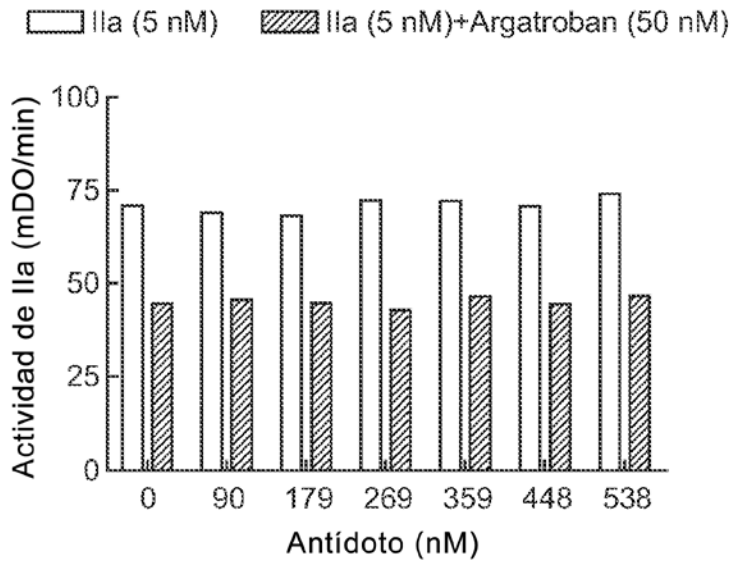


FIG. 12

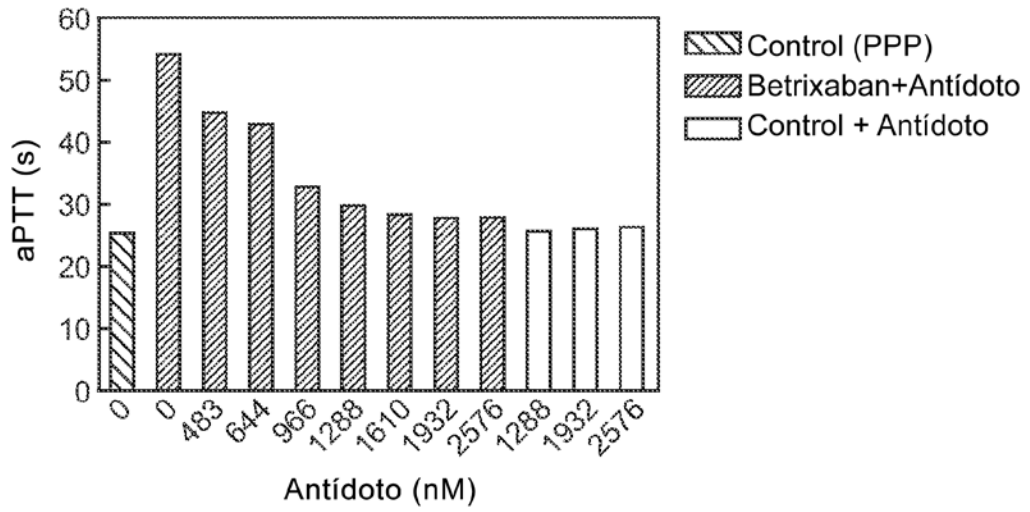


FIG. 13

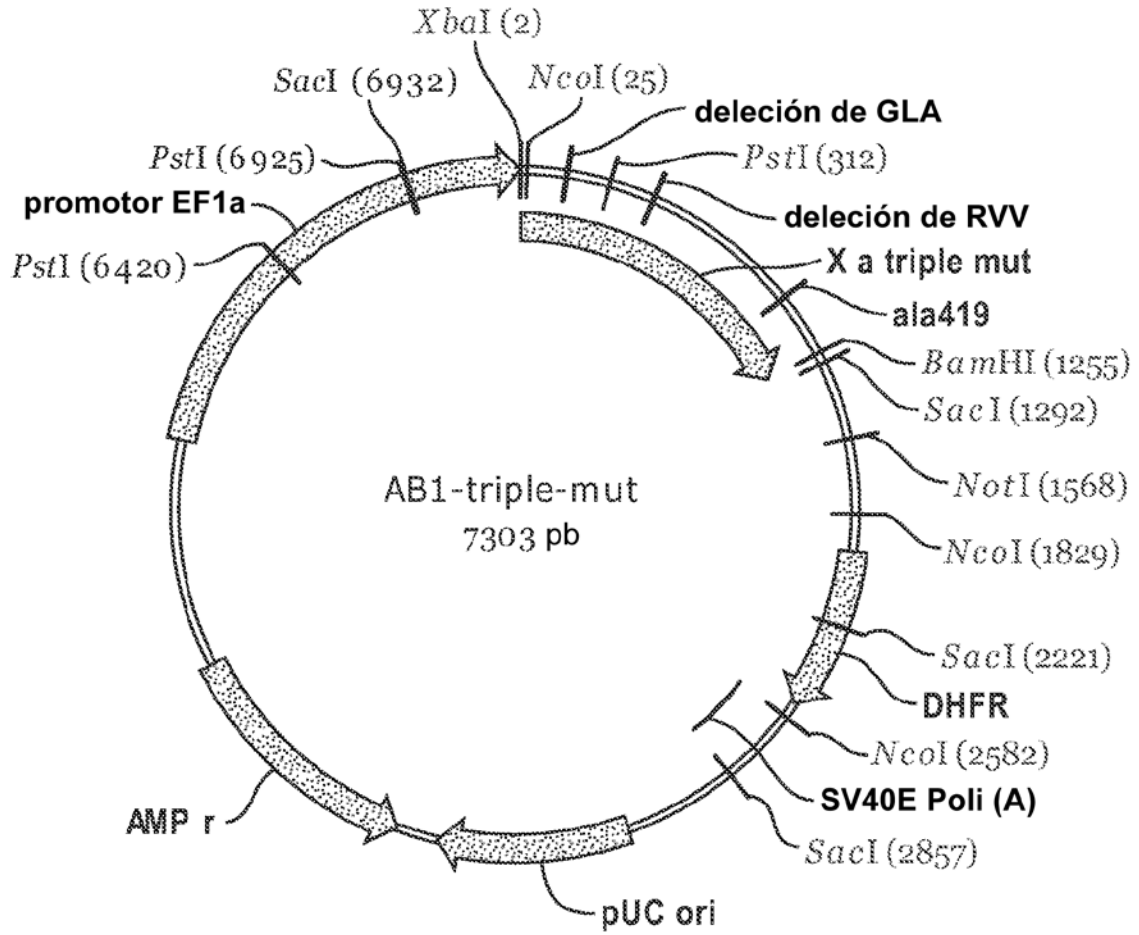


FIG. 14

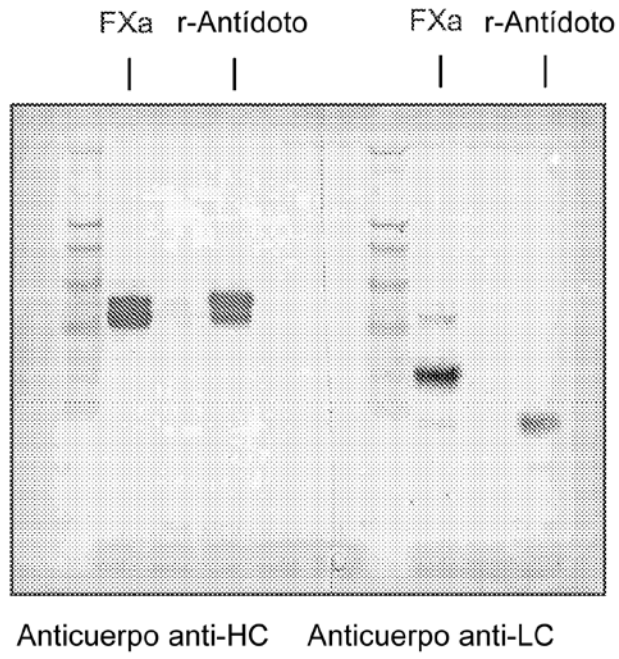


FIG. 15

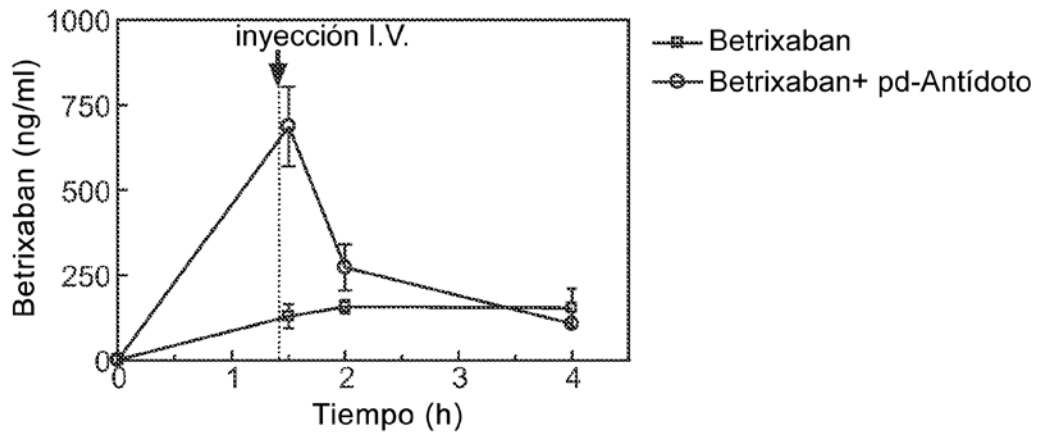


FIG. 16

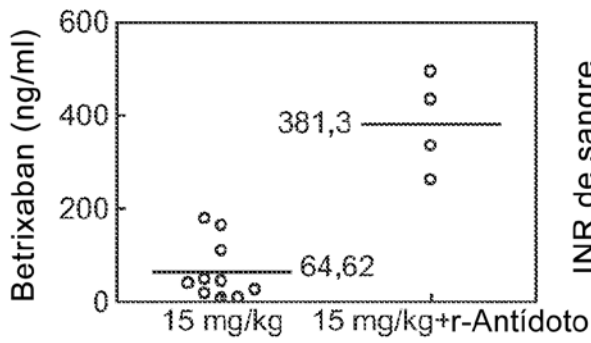


FIG. 17A

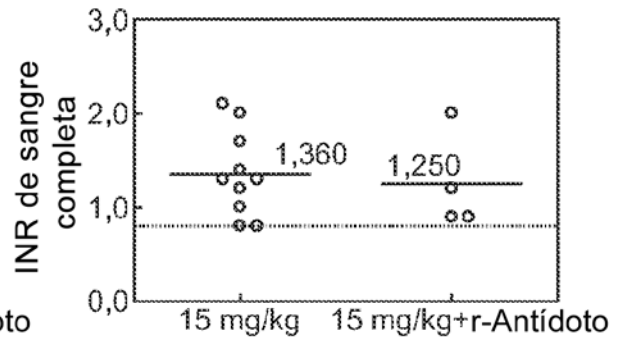


FIG. 17B

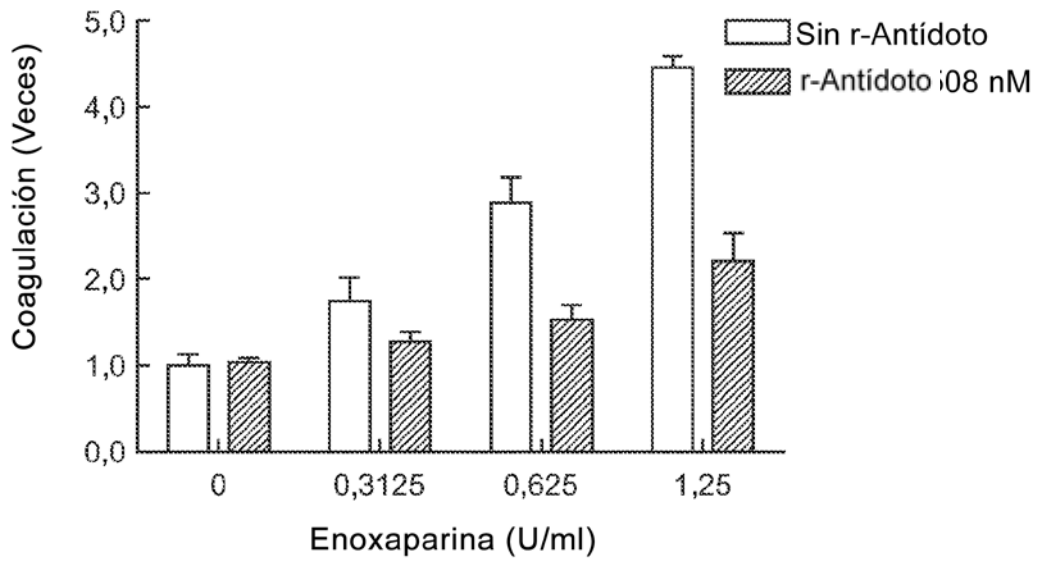


FIG. 18

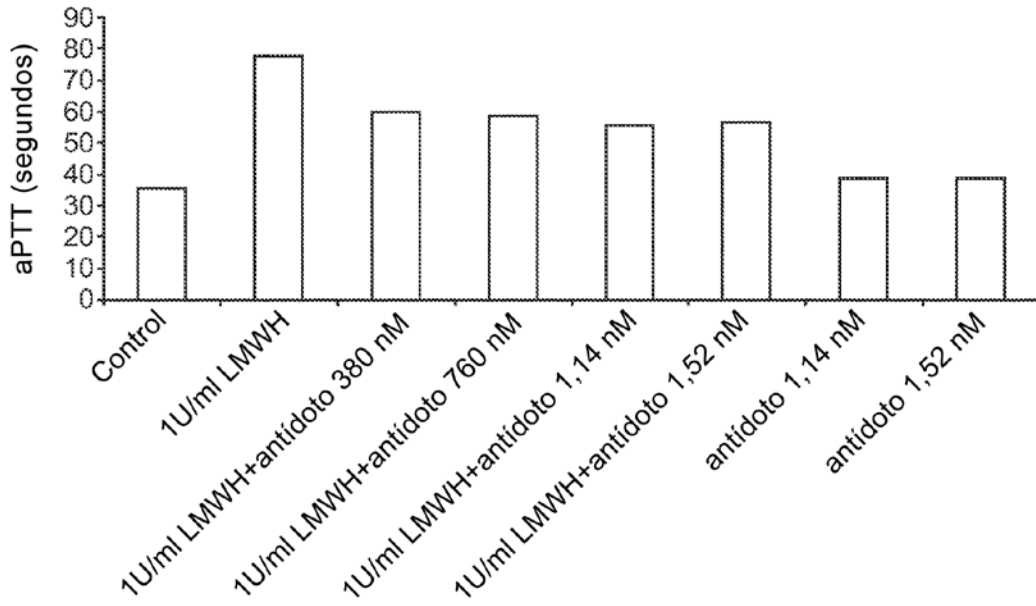


FIG. 19

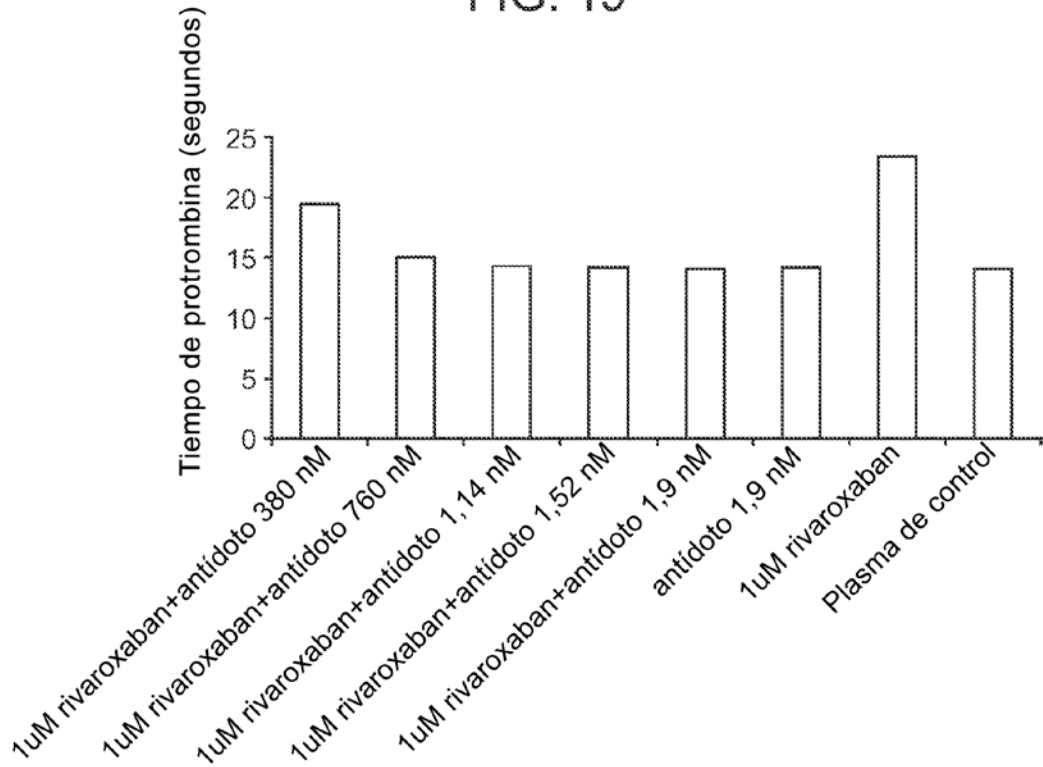


FIG. 20

atggggcgcccaactgcacctcgtcctcgtcagtgccctccctggctggcctcctgctgctc
 M G R P L H L V L L S A S L A G L L L L
 ggggaaagtctgttcacccgagggagcaggccaacaacatcctggcgaggggtcacgagg
 G E S L F I R R E Q A N N I L A R V T R
 gccaatcctttcttttctggaataaatacaagatggcgaccagtggtgagaccagtcct
 A N S F L F W N K Y K D G D Q C E T S P
 tgccagaaccagggcaaagtgtaaagacggcctcggggaatacacctgcacctgttttagaa
 C Q N Q G K C K D G L G E Y T C T C L E
 ggattcgaaggcaaaaactgtgaattattcacacgggaagctctgcagcctggacaacggg
 G F E G K N C E L F T R K L C S L D N G
 gactgtgaccagttctgccacgaggaacagaactctgtggtgtgctcctgcgcccgggg
 D C D Q F C H E E Q N S V V C S C A R G
 tacacctggctgacaacggcaaggcctgcattcccacagggccctaccctgtgggaaa
 Y T L A D N G K A C I P T G P Y P C G K
 cagacctggaacgcaggaagaggaggaagaggatcgtgggaggccaggaatgcaaggac
 Q T L E R R K R R K R I V G G Q E C K D
 ggggagtgctcctggcagggcctgctcatcaatgaggaaaacgaggggtttctgtggtgga
 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
 ttcaaggtgagggtaggggaccggaacacggagcaggaggagggcggtgaggcggtgcac
 F K V R V G D R N T E Q E E G G E A V H
 gaggtggaggtggtcatcaagcacaaccggttcacaaaggagacctatgacttogacatc
 E V E V V I K H N R F T K E T Y D F D I
 gccgtgctccggctcaagacccccatcaccttcogcatgaacgtggcgccctgctgctc
 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
 ttggggcgacccacgagaaggggccggcagtcaccaggctcaagatgctggaggtgccc
 F G R T H E K G R Q S T R L K M L E V P
 tacgtggaccgcaacagctgcaagctgtccagcagcttcacatcacccagaacatgttc
 Y V D R N S C K L S S S F I I T Q N M F
 tgtgcccgtacgacaccaagcaggaggatgctgcccagggggacgcagggggcccgac
 C A G Y D T K Q E D A C Q G D A G G P H
 gtcacccgcttcaaggacacctacttcgtgacagggcatcgtcagctggggagagggctgt
 V T R F K D T Y F V T G I V S W G E G C
 gcccgtaaggggaagtacgggatctacaccaaggtcaccgccttctcaagtggatogac
 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
 tcctctccattaaagtga
 S S P L K -

FIG. 21

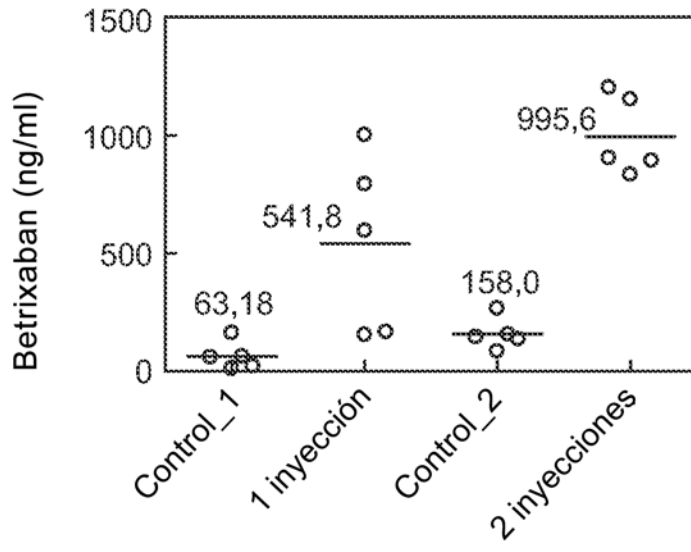


FIG. 22A

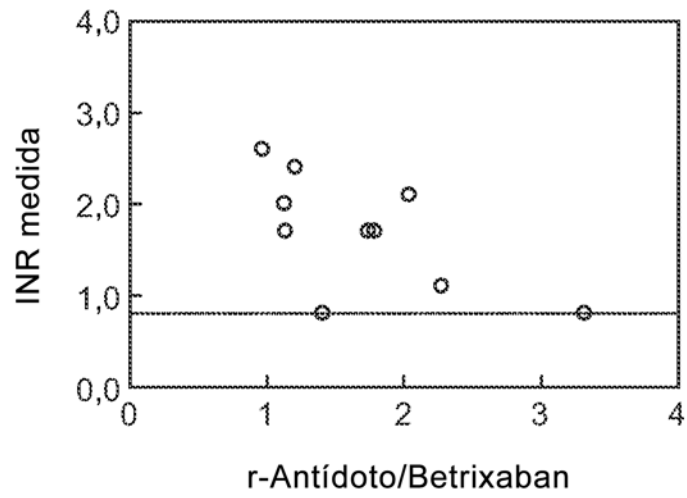


FIG. 22B

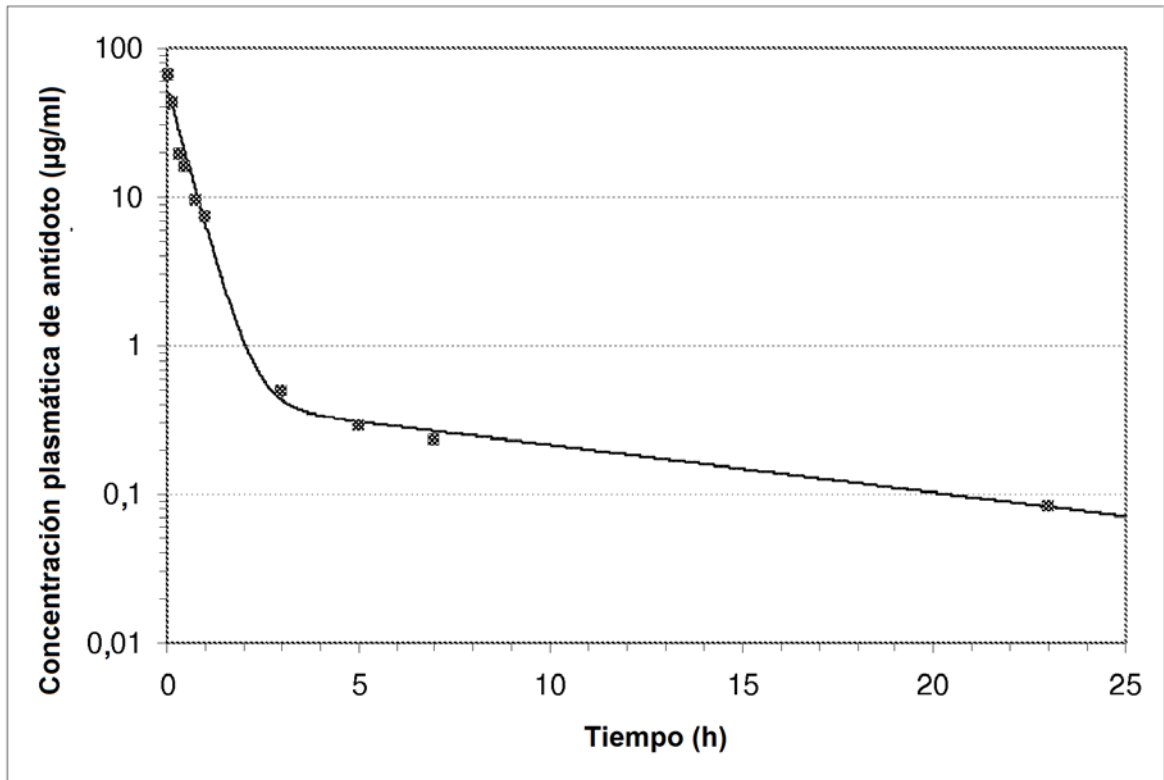


FIG. 23

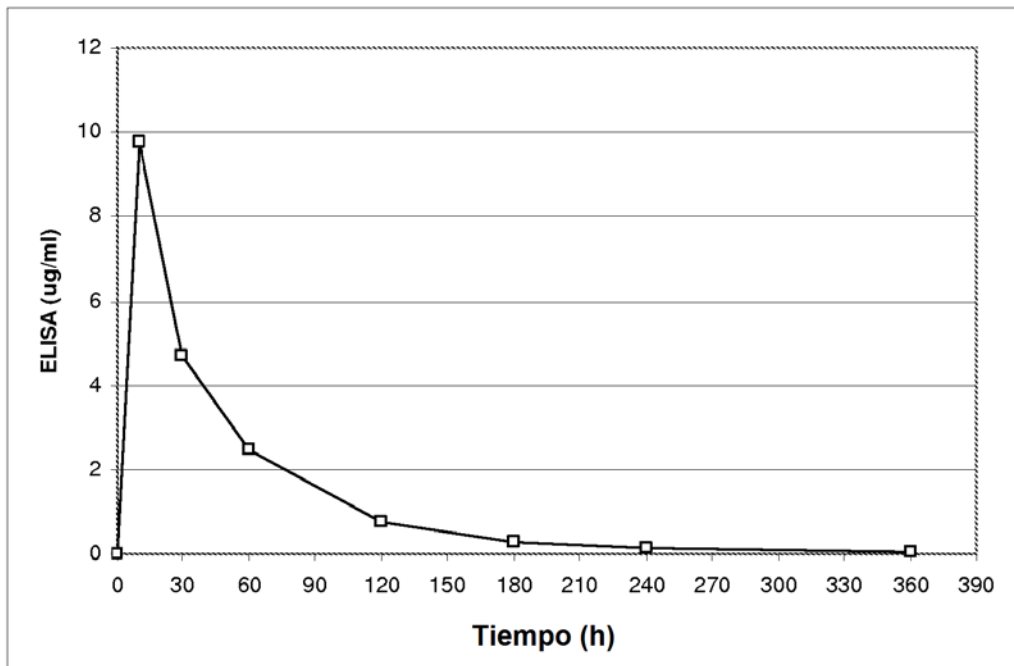


FIG. 24