

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 038**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2009 PCT/EP2009/061935**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2010 WO10029178**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2009 E 09748260 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2337849**

54 Título: **Mutante de polipéptido factor IX, sus usos y un método para su producción**

30 Prioridad:

15.09.2008 IT BO20080564
06.05.2009 IT BO20090275

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2018

73 Titular/es:

UNIQUE BIOPHARMA B.V. (100.0%)
Paasheuvelweg 25a
1105 BP Amsterdam, NL

72 Inventor/es:

SIMIONI, PAOLO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

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

ES 2 687 038 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

Mutante de polipéptido factor IX, sus usos y un método para su producción

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con usos de un polipéptido de FIX (factor IX) modificado. También se describen aquí una secuencia de nucleótidos, un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos y un método para producir el polipéptido de FIX modificado.

También se describen preparaciones farmacéuticas y usos del factor de FIX modificado y de la secuencia de nucleótidos.

Estado de la técnica

10 FIX es una glicoproteína dependiente de vitamina K que pertenece a la familia de serina-proteasa, y se sintetiza en el hígado del hombre y otros animales, incluyendo mamíferos, que desempeña un papel fundamental en tanto las rutas intrínsecas como extrínsecas de la cascada de coagulación. El FIX de humano circula en el plasma como un zimógeno de cadena simple compuesto de 415 aminoácidos. El FIX de humano tiene un peso molecular de 56 kD y una concentración de plasma de aproximadamente 5 mg/ml. El zimógeno se activa tanto por el factor XI activado (FXIa) como por el complejo del factor tisular (TF) - factor VII activado (FVIIa). La organización estructural de FIX es similar a la de otras proteínas de coagulación dependientes de vitamina K, como el factor VII (FVII), el factor X (FX) y proteína C (PC). La porción amino-terminal de la molécula comprende el dominio "Gla", una región rica en residuos gamma-carboxiglutámicos cuya carboxilación depende de la presencia de vitamina K. La función fisiológica principal de FIX, una vez activada, es convertir el factor X(FX) en el factor X activado (FXa) en un proceso que requiere la presencia de una superficie de fosfolípidos, iones de calcio y una proteína con efecto cofactor, es decir, factor VIII activado (FVIIIa). El propio FXa puede convertir la protrombina en trombina, que transforma el fibrinógeno en fibrina soluble que, en la polimerización, forma el coágulo. La acción de FXa se ve mejorada por la presencia del factor V activado (FVa)

25 El gen FIX humano está ubicado en el cromosoma X en la posición Xq27.1 y contiene 8 exones de longitudes que varían desde 25 pares de bases (pb) hasta 2000 pb. El ARNm de FIX humano tiene aproximadamente 3 kb de longitud y comprende 205 bases que forman la región 5'UTR, 1386 bases que codifican el polipéptido de FIX y 1392 bases de la región 3' UTR. Este ARNm codifica la síntesis de 461 aminoácidos que forman el precursor de FIX humano. Este precursor (SEQ ID NO: 1) comprende los siguientes segmentos y dominios: un péptido de señal hidrófoba (aminoácidos 1-28), un propéptido (aminoácidos 29-46), un dominio Gla (aminoácidos 47 a 92), un dominio 1 de tipo EGF (aminoácidos 93 a 129), un dominio 2 similar a EGF (aminoácidos 130 a 171), un péptido de activación (aminoácidos 192 a 226) y un dominio de serina-proteasa (aminoácidos 227 a 461). La forma madura de FIX de humano (SEQ ID NO: 2) pierde el péptido de señal hidrófoba y el propéptido. En consecuencia, las posiciones de aminoácidos correspondientes de los dominios mencionados anteriormente se convierten en las siguientes: un dominio Gla (aminoácidos 1 a 46), un dominio 1 similar a EGF (aminoácidos 47 a 83), un dominio 2 similar a EGF (aminoácidos 84 a 125), un péptido de activación (aminoácidos 146 a 180) y un dominio de serina-proteasa (aminoácidos 181 a 415). La SEQ ID NO: 1 (de la cual se deriva la SEQ ID NO: 2) corresponde a la secuencia en PubMed (categoría "Proteína") que se encuentra al ingresar el número de acceso AAB59620; esta secuencia de aminoácidos comprende el péptido de señal (46 AA), seguido de la secuencia de aminoácidos de la proteína madura.

40 Una deficiencia genética en FIX puede causar una serie de enfermedades de coagulación (coagulopatías), por ejemplo, la enfermedad hemorrágica conocida como hemofilia B en varones afectados (enfermedad genética relacionada con el sexo). La hemofilia B se puede clasificar en tres clases, cada una de ellas se caracteriza por la presencia de diferentes concentraciones plasmáticas de FIX. En la hemofilia B grave, los niveles plasmáticos de actividad de FIX están por debajo del 1% de lo normal; en la forma moderada, los niveles están entre 1% y 5%; en la forma leve, entre el 5 y el 25% de los niveles normales. También hay individuos portadores que tienen niveles medios de actividad de FIX, entre 25% y 50% de lo normal, pero muchos portadores pueden tener niveles que incluso superan el 50%. Los pacientes afectados por hemofilia B grave presentan manifestaciones hemorrágicas graves que pueden controlarse o evitarse mediante la administración de concentrados de FIX con origen de extracción (de plasma humano) o recombinante, actualmente solo disponible en una única formulación comercial.

50 Los intentos de corregir el defecto genético mediante terapia génica han sido hasta ahora infructuosos debido a diversos problemas. Estos incluyen en primer lugar los relacionados con la baja eficiencia de la expresión en el hombre de los niveles de FIX en plasma, es decir, alrededor del 1%, por lo tanto, no es suficiente para corregir la enfermedad; los relacionados con la inmunogenicidad del tratamiento con vectores virales; finalmente aquellos conectados a los efectos secundarios de la terapia génica en sí misma que incluyen hepatitis, miositis y otros.

55 Un aumento en el FIX en plasma a niveles superiores a los normales (el intervalo normal de FIX en plasma es del 70-120%, es decir, 70-120 U/dl, donde una unidad es la cantidad de FIX contenida en 1 mililitro de plasma normal, igual hasta aproximadamente 5 µg) se ha asociado con un mayor riesgo en humanos de desarrollar manifestaciones trombóticas en el sistema venoso. En particular, para valores superiores a 150 U/dl, se ha observado un aumento de

4.8 veces en el riesgo trombótico (O.R. corregido 4.8, IC 95%, de 2.3 a 10.1). Sin embargo, la base genética para el aumento de los niveles de FIX en el plasma de estos individuos nunca se ha identificado.

Los estudios de mutagénesis in vitro de la expresión de FIX recombinante mutada han demostrado la posibilidad de reproducir las alteraciones en la síntesis de FIX y la actividad encontrada in vivo en pacientes con hemofilia B. Viceversa, mediante mutagénesis específica de sitio en ciertas posiciones en la molécula FIX, los mutantes de FIX se han producido con "ganancia de función" (actividad aumentada en relación con la molécula normal) al alterar su especificidad por sustratos fisiológicos y/o modificar sus otras funciones. En el documento WO 99/03496 se divulga el mutante recombinante de FIX arginina 338 alanina que dio como resultado una ganancia de función cuyos niveles de actividad son 2-3 veces mayores que los encontrados en FIX de tipo salvaje. Estos mutantes con ganancia de función (en particular con una mayor actividad de proteasa hacia el sustrato fisiológico, es decir, FX, o con una mayor capacidad de interacción con FVIIIa, un cofactor de FIXa) aún no se han encontrado en la naturaleza, ni han sido probados en el hombre. Más explícitamente, no hay evidencia de: 1) la existencia de un portador humano de FIX mutado (mutante FIX natural) con ganancia de función caracterizada por una actividad funcional aumentada en comparación con el FIX normal (WT) con cualquier ganancia de función en actividad funcional; 2) pruebas realizadas in vivo en el hombre con administraciones de FIX recombinante modificado; 3) pruebas realizadas in vivo en el hombre con administraciones de FIX recombinante modificado con ganancia de función para la profilaxis y el tratamiento de pacientes afectados por hemofilia (genética o adquirida) u otras coagulopatías; 4) pruebas realizadas in vivo en el hombre con administraciones de FIX recombinante modificado que muestran la ausencia de efectos secundarios.

20 Resumen de la invención

Se describe aquí un polipéptido de FIX modificado, una secuencia de nucleótidos, un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos y un método para producir el polipéptido de FIX modificado. También se describen preparaciones farmacéuticas y usos para el factor de FIX modificado y la secuencia de nucleótidos.

Descripción detallada de la invención

25 Los polipéptidos de FIX modificados aquí descritos muestran una ganancia de función de al menos 5 veces superior a la de la molécula de FIX de tipo salvaje. Este aumento en el nivel de actividad es inesperadamente incluso mayor que el divulgado para el mutante recombinante de FIX arginina 338 alanina conocido.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un polipéptido de FIX (factor IX) modificado para uso en un tratamiento médico en una dosificación diaria de entre 0.1 µg/kg y 400 µg/kg de peso corporal, teniendo dicho polipéptido de FIX modificado al menos 70% identidad con una SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; en el que la leucina está presente en una posición correspondiente a la posición 338 de un polipéptido de FIX maduro no modificado como se identifica por la SEQ ID NO: 2.

A menos que se especifique explícitamente lo contrario, los siguientes términos tienen los significados que se indican a continuación.

35 En el presente texto, el término "identidad porcentual" y " % de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos (péptido) o de ácidos nucleicos (nucleótidos) indica el porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos en posiciones correspondientes en las dos secuencias alineadas óptimamente.

Para determinar el "porcentaje de identidad" de las dos secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean juntas. Para lograr una coincidencia óptima, se pueden introducir espacios en la secuencia (es decir, eliminaciones o inserciones que también pueden colocarse en los extremos de la secuencia). Luego se comparan los residuos de aminoácidos y nucleótidos en las posiciones correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo aminoácido o residuo de nucleótido que ocupa la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas divididas por las secuencias [es decir % de identidad = (número de posiciones idénticas/número total de posiciones) x 100]

De acuerdo con una realización ventajosa, las secuencias tienen la misma longitud. Ventajosamente, las secuencias comparadas no tienen espacios (o inserciones).

El porcentaje de identidad se puede obtener usando algoritmos matemáticos. Un ejemplo no limitante de un algoritmo usado para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 2264-2268] modificado por Karlin y Altschul [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 5873 - 5877]. Dicho algoritmo se incorpora en los programas BLASTn y BLASTp de Altschul [Altschul y col., J. Mol. Bio. 215 (1990) 403 - 410].

Con el fin de lograr alineamientos incluso en la presencia de uno o más espacios (o inserciones), se pueden usar métodos que asignan una penalización relativamente alta para cada espacio (o inserción) y una penalización menor para cada aminoácido o residuo de nucleótido adicional en el espacio (este aminoácido o residuo de nucleótido

adicional se define como extensión de espacio). Altas penalizaciones obviamente conducirán a que las alineaciones se optimicen con el menor número de espacios.

5 Un ejemplo de un programa capaz de lograr este tipo de alineamiento es el programa BLAST como se describe en Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389 - 3402. Para este propósito, los programas BLASTn y BLASTp se pueden usar con los parámetros predeterminados. Cuando se usa el programa BLAST, típicamente se emplea la matriz BLOSUM62.

10 Un ejemplo ventajoso y no limitante de un programa para lograr una alineación óptima es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, EEUU; Devereux et al., 1984, *Nucleic Acid Research* 12: 387). Los parámetros por defecto se usan nuevamente, es decir, para una secuencia de aminoácidos, permiten una penalización de -12 para un espacio y una penalización de -4 para cada extensión.

En el presente texto, el término "porcentaje de homología" y "% de homología" entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos indica el porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos homólogos en posiciones correspondientes en las dos secuencias óptimamente alineadas.

15 El porcentaje de homología entre dos secuencias se determina de una manera sustancialmente idéntica a la descrita anteriormente para determinar el porcentaje de identidad excepto por el hecho de que las posiciones homólogas y no solo las posiciones idénticas se consideran en el cálculo.

Con respecto a una secuencia de nucleótidos, dos posiciones homólogas presentan dos nucleótidos diferentes pero que, dentro de su codón, codifican el mismo aminoácido.

20 Con respecto a una secuencia de aminoácidos, dos posiciones homólogas presentan dos aminoácidos homólogos, es decir, aminoácidos que poseen propiedades fisicoquímicas similares, por ejemplo, aminoácidos que pertenecen a los mismos grupos, tales como: aromáticos (Phe, Trp, Tyr), ácidos (Glu, Asp), polares (Gin, Asn), básicos (Lys, Arg, His), alifáticos (Ala, Leu, Ile, Val), con un grupo hidroxilo (Ser, Thr), con una cadena de lado corto (Gly, Ala, Ser, Thr, Met). Se espera que las sustituciones entre estos aminoácidos homólogos no cambien el fenotipo de las proteínas (sustituciones de aminoácidos conservativas). Se conocen ejemplos específicos de sustituciones conservativas en este campo técnico y se describen en diversas publicaciones (por ejemplo, Bowie et al., *Science*, 247: 1306 - 1310 (1990)).

Otros ejemplos de programas y/o artículos relacionados con la determinación de alineaciones y homologías porcentuales y/o identidades se indican, por ejemplo, en los documentos US2008003202, US2007093443, WO06048777.

30 En el presente texto, el término "posición correspondiente" indica una posición en un polipéptido o secuencia de ácido nucleico que, siguiendo un alineamiento, corresponde a (o las caras), una posición precisa en una secuencia de referencia. Por ejemplo, una posición que corresponde a una posición precisa en el polipéptido de FIX que presenta la SEQ ID NO: 2 puede determinarse alineando la SEQ ID N°: 2 con un polipéptido de interés; la alineación puede llevarse a cabo manualmente o como se explicó anteriormente en relación con la determinación de porcentaje de identidad.

En el presente texto, el término "cadena desnuda" indica un polipéptido que no ha sido modificado químicamente pero que contiene solo aminoácidos unidos covalentemente.

40 En el presente texto, el término "promotor" indica una porción de ADN de un gen que controla (activa) la transcripción de una secuencia de nucleótidos a la que está unida operativamente (pero no necesariamente flanqueándola). El promotor incluye una o más secuencias de ADN, que son reconocidas por el ARN polimerasa y se unen al ARN polimerasa de modo que el propio ARN polimerasa inicia la transcripción.

En el presente texto, el término "tratar" o "tratamiento" de una patología indica la profilaxis y/o terapia y/o cura de esta patología. El término profilaxis indica ventajosamente detener al menos parcialmente el desarrollo de una enfermedad potencial y/o prevenir el empeoramiento de los síntomas o la progresión de una enfermedad.

45 Ventajosamente, el término terapia indica un alivio parcial o total de los síntomas de la enfermedad

En el presente texto, el término "vector" indica un elemento usado para introducir un ácido nucleico en una célula para la expresión o replicación de dicho ácido nucleico. Un ejemplo de vectores son los episomas, que son capaces de una replicación cromosómica adicional. Los vectores también pueden integrarse en los cromosomas del huésped. Los vectores a menudo están en la forma de plásmidos, generalmente ADN de doble hélice circular.

50 En el presente texto, "vehículo que presenta un ácido nucleico" indica: un vector que incluye ácido nucleico; una célula que incluye ácido nucleico; o un excipiente farmacéuticamente aceptable combinado con el ácido nucleico por mezcla. Ventajosamente, el vehículo se elige de un vector o una célula.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un polipéptido de FIX modificado que comprende leucina en una posición correspondiente a la posición 338.

El polipéptido de FIX modificado debe ser capaz de llevar a cabo su función dentro de la cascada de coagulación y puede ser de origen sintético o natural, por ejemplo, de origen humano o animal.

5 Los ejemplos de polipéptidos de FIX incluyen (pero no se limitan a) FIX de tipo silvestre no modificado (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2), precursores de dicho FIX de tipo silvestre (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 1), variantes polimórficas naturales (tales como: un polipéptido que presenta una alanina en una posición correspondiente a la posición T148 o a un polipéptido precursor de la misma).

10 En el presente texto, los loci (posiciones) de las secuencias de aminoácidos modificadas o no modificadas se identifican por referencia a la numeración de aminoácidos en las posiciones correspondientes de un polipéptido de FIX maduro no modificado, identificado por la SEQ ID NO: 2. Las posiciones correspondientes se pueden determinar por alineación de residuos no modificados (véase arriba). A modo de ejemplo, informamos en lo sucesivo las secuencias y las numeraciones relativas del polipéptido de FIX maduro (SEQ ID NO: 2) y del precursor de polipéptido de FIX (SEQ ID NO: 1).

SEQ ID NO: 1

MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG
 KLEEFVQGNL ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN
 PCLNGGSCKD DINSYECWCP FGFEGKNCEL DVTCNIKNGR CEQFCKNSAD
 NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVFPFCGR VSVSQTSKLT RAEAVFPDVD
 YVNSTEAE TI LDNITQSTQS FNDFTRVVG EDAKPGQFPW QVVLNGKVDA
 FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRN VIRII
 PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPIC IADKE YTNIFLKF GS
 GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLV DRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH
 EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMKGK YGIYTKVSR Y
 VNWIKEKTKL T

15 en negrilla subrayado Arg 384 correspondiente a Arg 338 en SEQ ID NO: 2

SEQ ID NO: 2

YNSGKLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTE FWKQYVDGDQ
 CESNPCLNGG SCKDDINSYE CWCPFGFEGK NCELDVTCNI KNGRCEQFCK
 NSADNKVVCS CTEGYRLAEN QKSCEPAVPF PCGRVSVSQT SKLTRAETVF
 PDVDYVNSTE AETILDNITQ STQSFNDFTR VVGGEDAKPG QFPWQVVLNG
 KVDAFCGGS I VNEKWIVTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE TEHTEQKRN V
 IRIIPHHNYN AAINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNIFL
 KFGSGYVSGW GRVFHKGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLRST KFTIYNNMFC
 AGFHEGGRDS CQGDSSGGPHV TEVEGTSFLT GIISWGEECA MKGKYGIYTK
 VSR YVNWIKE KTKLT

en negrilla subrayado Arg 338.

20 Igualmente, se identifican las posiciones de las secuencias de nucleótidos modificadas o no modificadas, a menos que se indique lo contrario, con referencia a la numeración de nucleótidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de nucleótidos identificada por el número de acceso K02402 (GenBank). La secuencia de nucleótidos K02402 codifica el precursor de polipéptido de FIX (SEQ ID NO: 1) e incluye algunas regiones de intrón (a este respecto, véase Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, Brownlee GG. The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. The EMBO Journal 1984;3:1053-1060).

25 Incluidos dentro de la definición de un polipéptido de FIX modificado están las variantes químicas que pueden producirse reemplazando aminoácidos o dominios enteros del FIX con aminoácidos o secuencias de otros factores que pertenecen a la familia del factor de coagulación (por ejemplo, factor VII o factor X).

- De acuerdo con otras realizaciones, el polipéptido de FIX modificado presentado aquí es ya sea una cadena desnuda o exhibe modificaciones postranscripcionales. Los ejemplos de modificaciones incluyen una o más modificaciones químicas, que comprenden (pero no se limitan a): glucosilación, acilación, metilación, fosforilación, sulfatación, carboxilación, salificación, modificaciones dependientes de vitamina C tales como hidrólisis de prolina, ácido aspártico, lisina, o amidación carboxiterminal; modificaciones dependientes de la vitamina K tales como la carboxilación de residuos de ácido glutámico; incorporación de selenio para formar una o más selenocisteínas; incorporación de un resto de PEG (polietilenglicol).
- Además de las posibles modificaciones divulgadas aquí, el polipéptido de FIX modificado puede contener una o más variantes conocidas en el estado de la técnica tales como hiperglicosilación, desimmunización y otras (véase por ejemplo: los documentos US6277618, US6315995, US6531298, US2004/01 02388, US2004/011 0675, US2004/02541 06, US2005/01 00982, US2006/0040856).
- Los ejemplos no limitantes de variantes de polipéptidos de FIX modificados se pueden deducir a partir de una o más de las siguientes referencias: documento US2006/040856, Friedler y col. (2000) J. Biol Chem. 275:23783-23789, documento US2004/1 02388, documento WO2006/018201, Lim y col. (1990) J. Biol Chem. 265(1):144-150, Cheung et al. (1992) J. Biol. Chem. 267 (29): 20529-20531, Gui et al. (2002) Blood 100 (1): 153-158, Schuettrumpf et al. (2005) Blood 105 (6): 2316-2323, US2004/110675, US6315995.
- El polipéptido de FIX modificado tiene al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 94%, 97%, 99%, o 100% de homología (o, ventajosamente, identidad) con una secuencia peptídica elegida del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- Ventajosamente, el polipéptido de FIX modificado tiene al menos 80% de homología (o, ventajosamente, identidad) con una secuencia peptídica elegida del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- Ventajosamente, el polipéptido de FIX modificado tiene al menos 90% de homología (o, ventajosamente, identidad) con una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- Ventajosamente, la secuencia peptídica es la SEQ ID NO: 2.
- También se describe aquí una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de FIX de la presente invención.
- De acuerdo con algunas alternativas, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 94%, 97%, 99%, 100% de homología (o, ventajosamente, identidad) con la secuencia que tiene el número de acceso K02402 (GenBank).
- Ventajosamente, la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 70% de homología (o, ventajosamente, identidad) con la secuencia que tiene el número de acceso K02402 (GenBank). Ventajosamente, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 90% de homología (o, ventajosamente, identidad) con la secuencia que tiene el número de acceso K02402 (GenBank). Ventajosamente, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 100% de homología (o, ventajosamente, identidad) con la secuencia que tiene el número de acceso K02402 (GenBank).
- De acuerdo con algunas alternativas, la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ARN y tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 94%, 97%, 99%, 100% de homología (o, ventajosamente, identidad) con la secuencia desde la posición 31 a la posición 1411 (SEQ ID NO: 3) (ventajosamente desde la posición 169 a la posición 1411 - SEQ ID NO: 4) del polinucleótido de la figura 2 en el artículo de Anson OS, Chao KH, Rees OJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA y Brownlee GG. The gene structure of human anti-hemophilic factor IX. The EMBO Journal 1984; 3: 1053-1060. En este caso (es decir, con referencia a la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4), los números de posición se refieren a la numeración informada en la figura 2 mencionada anteriormente.
- Ventajosamente, la secuencia de ARN tiene al menos 80% de homología (o, ventajosamente, identidad) con la secuencia SEQ ID NO: 3 (ventajosamente, SEQ ID NO: 4). Ventajosamente, la secuencia de ARN tiene al menos 90% de homología (o, ventajosamente, identidad) con la secuencia SEQ ID NO: 3 (ventajosamente, SEQ ID NO: 4).
- Ventajosamente, la secuencia de ARN tiene al menos un 95% de homología (o, ventajosamente, identidad) con la secuencia SEQ ID NO: 3 (ventajosamente, SEQ ID NO: 4).
- La secuencia de ARN se puede unir, en la cabeza y/o la cola, a cadenas de nucleótidos adicionales que no están ya sea traducidas o traducidas por separado.
- De acuerdo con algunas alternativas, la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN y comprende (en particular, consiste en) porciones de intrón y exón, que presentan una secuencia global (es decir, porciones de exón sin espacios y unidas entre sí en orden) que tienen al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 94%, 97%, 99%, 100% de homología (o, ventajosamente, identidad) con la secuencia global de regiones de exón en la secuencia (SEQ ID NO: 5) de la figura 4 en el artículo de Anson DS, Chao KH, Rees OJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA y Brownlee GG. The gene structure of human anti-hemophilic factor IX. The EMBO Journal 1984; 3: 1 053-1060.

- Ventajosamente, las porciones de exón están separadas entre sí y colocadas en orden (dispuestas una respecto de la otra) como lo son las respectivas regiones de exón en la secuencia SEQ ID NO: 5. Ventajosamente, la secuencia global de las porciones de exón tiene al menos 80% de homología (o, ventajosamente, identidad) con la secuencia global de las regiones de exón. Ventajosamente, la secuencia global de las porciones de exón tiene al menos 90% de homología (o, ventajosamente, identidad) con la secuencia global de las regiones de exón. Ventajosamente, la secuencia global de las porciones de exón tiene al menos 95% de homología (o, ventajosamente, identidad) con la secuencia global de las regiones de exón.
- De acuerdo con algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos comprende una timina en una posición correspondiente a la posición 34099 (o en la posición correspondiente 32318 de acuerdo con la numeración dada en la SEQ ID NO: 5 o en la posición correspondiente 31134 de acuerdo con la numeración dada en la base de datos de mutaciones de la hemofilia B (Giannelli et al., hemofilia B: Database of point mutations and short additions and deletions. Nucleic Acids Research 1990; 18: 4053-9); o un uracilo en la posición correspondiente 11180 de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4).
- En otras palabras, la secuencia de nucleótidos anteriormente mencionada difiere de la secuencia que tiene el número de acceso K02402 (GenBank) al menos por el hecho de llevar una mutación de guanina a timina en la posición 34099 (G34099T) o en una posición correspondiente (por ejemplo posición 32318 de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 5, o de guanina a uracilo en la posición correspondiente 11180 de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4).
- En este caso, la secuencia de nucleótidos codifica para una leucina en una posición correspondiente a la posición 338.
- La secuencia de nucleótidos, en las posiciones correspondientes a 34098, 34099 y 34100, puede presentar un triplete elegido del grupo que consiste en: TTA, UUA, TTG, UUG, CTT, CUU, CTC, CUC, CTA, CUA, CTG, CUG. En particular, cuando la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN, el triplete se elige del grupo que consiste en TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG. Ventajosamente, el triplete es CTA. En estos casos, la secuencia codifica para una leucina en una posición correspondiente a la posición 338.
- Los porcentajes de homología (o identidad) antes mencionados se calculan sin considerar las posiciones mutadas específicas indicadas. En otras palabras, por ejemplo, la secuencia SEQ ID NO: 2 modificada con una leucina en la posición 338 se considera que tiene 100% de homología (e identidad) con la secuencia no modificada SEQ ID NO: 2.
- También se describe aquí un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se describió anteriormente.
- El ácido nucleico puede comprender un promotor en enlace operativo con la secuencia de nucleótidos.
- También se describe aquí un vector que comprende un ácido nucleico como se definió anteriormente. En particular, el vector comprende una secuencia de nucleótidos como se describió anteriormente.
- El vector se puede elegir entre: un vector procariota, un vector eucariota o un vector viral. Ventajosamente, el vector es un vector viral. En particular, el vector se elige entre: un adenovirus, un retrovirus, un virus herpes, un lentivirus, un poxvirus, un citomegalovirus.
- También se describe un método para la producción de un polipéptido de FIX modificado, en el que el polipéptido de FIX modificado se expresa por medio de un ácido nucleico como se describió anteriormente.
- El método puede comprender los pasos de: introducir un vector como se describió anteriormente en una célula; y cultivar la célula de manera que se exprese el polipéptido de FIX.
- Alternativamente, el polipéptido de FIX modificado puede ser producido por un animal anfitrión o in vitro a partir de la secuencia de nucleótidos anteriormente mencionada.
- Un método particular comprende los pasos de: introducir la secuencia de nucleótidos como se describió anteriormente en un sistema sin células; expresar el polipéptido modificado en el sistema libre de células. El método puede permitir que el polipéptido de FIX modificado se exprese en un animal transgénico que comprende un ácido nucleico como se describió anteriormente (en particular, la secuencia de nucleótidos como se describió anteriormente).
- Los anfitriones útiles para la expresión del polipéptido de FIX modificado incluyen: E. coli, levaduras, plantas, células de insecto, células de mamífero (Pham et al. (2003) Biotechnol. Bioeng., 15 84: 332-42; Bonet al. (1998) Semin Hematol. 35 (2 Suppl 2): 11-17; Wahij y col., J. Biol. Chem. 280 (36) 31603 - 311607) y animales transgénicos.
- Los anfitriones pueden variar en cuanto a sus niveles de producción de proteínas y también los tipos de modificaciones inducidas en el polipéptido de FIX modificado después de la transcripción.

Los anfitriones eucariotas pueden incluir levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* (Skoko y colaboradores (2003) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38 (Pt 3): 257-65), células de insecto (Muneta et al. (2003) *J. Vet. Med. Sci.* 65 (2): 219-23), plantas y células de plantas tales como tabaco, arroz, algas (Mayfield et al. (2003) *PNAS* 100: 438-442) etc.

- 5 Las plantas se modifican típicamente por transferencia directa de ADN y transformaciones mediadas por agrobacterium. Los vectores utilizables ventajosamente comprenden secuencias promotoras y elementos de terminación y control de la transcripción.

Las levaduras generalmente se modifican replicando vectores episomales o mediante una integración cromosómica estable mediante recombinación homóloga. Ventajosamente, los promotores se usan para regular la expresión génica. Los ejemplos de promotores incluyen GAL 1, GAL7, GAL5, CUP1. Las proteínas producidas por las levaduras generalmente son solubles; alternativamente, las proteínas expresadas en levaduras se pueden secretar.

10 La expresión en anfitriones eucarióticos también incluye la producción en animales, por ejemplo en suero, leche y huevos. Se conocen animales transgénicos para la producción de polipéptidos de FIX (por ejemplo, los documentos US2002/0166130 y US2004/0133930) y pueden adaptarse para producir el polipéptido de FIX modificado como se ha definido anteriormente.

15 Las células procariotas en particular *E. coli* se pueden usar ventajosamente para producir grandes cantidades de polipéptido de FIX modificado como se ha definido anteriormente (Piatís et al., (2003) *Protein Exp. Purif.* 31 (2):222-30; Khalizzadeh et al. (2004) *J. Ind. Microbial. Biotechnol.* 31 (2): 63 - 69).

20 Los vectores usados con *E. coli* contienen ventajosamente promotores capaces de inducir altos niveles de expresión de proteínas y expresar proteínas que muestran cierta toxicidad hacia las células anfitrionas. Los ejemplos de promotores son ARN T7 y SP6.

Se pueden usar agentes reductores tales como 13-mercaptoetanol para solubilizar polipéptidos que pueden precipitarse en el entorno citoplasmático de *E. coli*.

25 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un polipéptido de FIX modificado como se describió anteriormente, para uso como un medicamento.

El polipéptido de FIX modificado se puede usar para tratamientos de enfermedades ya sea solo o en combinación con otros compuestos activos.

30 El polipéptido de FIX modificado es útil para tratar coagulopatías (congénitas o adquiridas), enfermedades hematológicas (congénitas o adquiridas), trastornos hemorrágicos (tales como gastritis hemorrágica y/o hemorragia uterina), otras enfermedades cardiovasculares.

De acuerdo con algunas realizaciones, el polipéptido de FIX modificado se proporciona para el tratamiento de al menos una coagulopatía.

De acuerdo con algunas realizaciones, el polipéptido de FIX modificado se proporciona para el tratamiento de enfermedades hematológicas.

35 De acuerdo con algunas realizaciones, el polipéptido de FIX modificado se proporciona para el tratamiento de trastornos hemorrágicos.

De acuerdo con algunas realizaciones, el polipéptido de FIX modificado se administra a pacientes periódicamente durante periodos de tiempo relativamente largos o antes, durante y/o después de procedimientos quirúrgicos para reducir y/o prevenir hemorragias.

40 El uso del polipéptido de FIX modificado para el tratamiento de coagulopatías es particularmente efectivo.

Ventajosamente, el polipéptido de FIX modificado se usa para el tratamiento de la hemofilia, y en particular hemofilia A y hemofilia B.

45 De acuerdo con realizaciones ventajosas, el polipéptido de FIX modificado se proporciona para tratar la hemofilia B, y ventajosamente la hemofilia B severa y/o moderada. Ventajosamente, el polipéptido de FIX modificado se usa para el tratamiento de mamíferos, en particular pacientes humanos

El uso del polipéptido de FIX modificado como se describió anteriormente se proporciona para preparar un fármaco (preparación farmacéutica) ventajosamente para tratar una coagulopatía; y una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido de FIX modificado y, ventajosamente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 De acuerdo con algunas realizaciones, la preparación farmacéutica es para el tratamiento de una patología elegida del grupo que consiste en: coagulopatías (congénitas o adquiridas), enfermedades hematológicas (congénitas o adquiridas), trastornos hemorrágicos (tales como gastritis hemorrágica y/o hemorragia uterina), hemofilia (hemofilia

A o hemofilia B). De acuerdo con realizaciones específicas, la preparación farmacéutica es para tratar una coagulopatía.

De acuerdo con realizaciones específicas, la preparación farmacéutica es para tratar la hemofilia.

5 La presente invención también se relaciona con un método para tratar al menos una coagulopatía, este método permite la administración de una cantidad efectiva de un polipéptido de FIX modificado como se ha definido anteriormente.

10 El polipéptido de FIX modificado se puede administrar como un compuesto puro, pero se presenta ventajosamente en la forma de una preparación farmacéutica. Ejemplos no limitantes de preparaciones farmacéuticas si se necesitan para este fin se explican a continuación. El polipéptido de FIX modificado puede formularse para administración oral, parenteral o rectal, o en formas adecuadas para administraciones mediante inhalación o insuflación (por la boca o la nariz). Las formulaciones para administración oral o parenteral son ventajosas.

15 Para las administraciones orales, las preparaciones farmacéuticas están en la forma de, por ejemplo, tabletas o cápsulas preparadas por métodos conocidos con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como aglutinantes (por ejemplo almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o metilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); aditivos (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata); y/o lubricantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Las tabletas pueden recubrirse usando métodos conocidos. Las preparaciones líquidas para administración oral tienen la forma, por ejemplo, de soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden estar en la forma de un producto seco que puede disolverse en agua u otro líquido antes de su uso. Dichas preparaciones se preparan por métodos conocidos con
20 aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, sorbitol, derivados de celulosa, grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsificantes (por ejemplo, lecitina o acacia); líquidos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y/o conservantes (por ejemplo, metilo o propilhidroxibenzoatos, ácido sórbico o ácido ascórbico). Las preparaciones también pueden contener, en casos apropiados, sales amortiguadoras, agentes colorantes, aromatizantes y/o
25 edulcorantes.

Las preparaciones para administración oral se formulan de manera conocida, con el fin de proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

30 El polipéptido de FIX modificado se formula, de manera conocida, para administración parenteral, mediante inyección o administración continua. Las formulaciones para inyección están, ventajosamente, en la forma de unidades de dosificación, por ejemplo, en ampollas o recipientes de dosificación múltiple que contienen conservantes. La composición puede estar en la forma de una suspensión, en líquidos acuosos u oleosos, y puede contener elementos de la formulación como agentes dispersantes y estabilizantes. Alternativamente, el compuesto activo puede estar en forma de polvo para disolverse justo antes de su uso en un líquido según sea necesario, tal como agua estéril.

35 El polipéptido de FIX modificado puede formularse para la administración rectal como supositorios o enemas, por ejemplo, que contienen excipientes para supositorios de tipo conocido tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

40 El polipéptido de FIX modificado también se formula, de manera conocida, en composiciones de liberación prolongada. Estas composiciones de liberación prolongada se administran, por ejemplo, por medio de un implante (por ejemplo, subcutáneo o intramuscular) o una inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, el polipéptido de FIX modificado se formula con un polímero adecuado o materiales hidrófobos (tales como una emulsión o un aceite) o resinas de intercambio iónico, o derivados relativamente poco solubles, tales como sales relativamente poco solubles.

45 Para administración intranasal, el polipéptido de FIX modificado se formula mediante administraciones a través de un dispositivo (conocido), tal como en un polvo con un vehículo adecuado.

Las dosificaciones del polipéptido de FIX modificado dependerán de la edad y el estado del paciente, por lo que la dosificación precisa deberá decidirse cada vez por el médico. La dosificación también dependerá del modo de administración y del compuesto particular seleccionado. Las dosificaciones utilizables pueden estar comprendidas, por ejemplo, entre 0.1 µg/kg y 400 µg/kg de peso corporal por día.

50 La secuencia de nucleótidos descrita anteriormente puede ser para uso como un medicamento (ventajosamente para tratar una coagulopatía).

La secuencia de nucleótidos puede usarse para tratar una patología ya sea sola o en combinación con otros compuestos activos.

55 La secuencia de nucleótidos es útil para tratar las patologías descritas anteriormente en relación con el polipéptido de FIX modificado.

La secuencia de nucleótidos anteriormente mencionada puede usarse para preparar un fármaco ventajosamente para tratar una coagulopatía; y una preparación farmacéutica puede contener la secuencia de nucleótidos.

En lugar de administrar el polipéptido de FIX modificado, es posible administrar la secuencia de nucleótidos que lo codifica.

- 5 La secuencia de nucleótidos puede insertarse en células o tejidos por medio de cualquier método conocido.

La secuencia de nucleótidos puede incorporarse en un vector para manipulaciones posteriores.

Por ejemplo, ciertas células podrían modificarse para expresar el polipéptido de FIX modificado, integrando la secuencia de nucleótidos anteriormente mencionada en una ubicación genómica operativamente unida a las secuencias promotoras. Dichas células pueden administrarse a un paciente localmente o sistémicamente.

- 10 Los vectores virales utilizables incluyen poxvirus, herpes virus, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado y otros virus adecuados para terapia génica.

Los vectores pueden permanecer como episómicos o pueden integrarse en los cromosomas del individuo tratado. Los serotipos de adenovirus están disponibles comercialmente en la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville).

- 15 Los vectores virales, en particular adenovirus, se usan ex vivo; por ejemplo, las células se aíslan de un paciente y se transducen con un adenovirus que expresa el polipéptido de FIX modificado. Después de un período adecuado de cultivo, las células transducidas se administran al paciente localmente o sistémicamente.

- 20 Alternativamente, los virus, en particular los adenovirus, que expresan el polipéptido de FIX modificado se aíslan y formulan con un excipiente farmacéuticamente aceptable y se administran al paciente. Típicamente, los adenovirus se administran en dosificaciones de 1 a 1014 partículas por kilogramo de peso del paciente, generalmente de 106 a 1012 partículas por kilogramo de peso del paciente.

Ejemplos adicionales de tipos de células para la expresión y liberación del polipéptido de FIX modificado son fibroblastos y células endoteliales (Palmer et al. (1989) Blood 73: 483-445; Yao et al (1991) PNAS 88: 8101-8105).

- 25 Un vehículo que presenta la secuencia de nucleótidos antes mencionados se puede formular de una manera similar a la descrita anteriormente para el polipéptido de FIX modificado.

La secuencia de nucleótidos y/o fármacos y/o vehículos que presentan dicha secuencia de nucleótidos pueden usarse para tratar las patologías mencionadas anteriormente en relación con el péptido de FIX modificado.

Ventajosamente, la secuencia de nucleótidos antes mencionada se usa para tratar mamíferos, en particular pacientes humanos.

- 30 Se puede usar un método para detectar la proteína de la presente invención y/o la secuencia de nucleótidos como se describió anteriormente.

Los métodos utilizables son los conocidos en el estado de la técnica, y se pueden adaptar a aquellos polimorfismos bajo estudio para incluir, por ejemplo, ensayos inmunoenzimáticos, pruebas de actividad de proteínas de coagulación (que incluyen actividad de FIX), pruebas coagulométricas y cromogénicas.

- 35 El método puede comprender un paso de amplificación por parte de PCR de una molécula de ácido nucleico (en la que se requiere verificar la presencia de la secuencia de nucleótidos como se describió anteriormente).

De manera ventajosa, el paso de amplificación está precedido por un paso de purificación, en particular de aislamiento, de la molécula de ácido nucleico.

Ventajosamente, el paso de amplificación va seguido de un paso de secuenciación.

- 40 A modo de ejemplo, se pueden seguir los métodos de los ejemplos 2 y 3 a continuación para detectar la secuencia de nucleótidos mencionada anteriormente.

El método para detectar la secuencia de proteínas y/o nucleótidos se puede usar para ayudar en la identificación de aquellos individuos que muestran una alta tendencia a desarrollar enfermedades sanguíneas tales como trombosis.

- 45 Otras características de la presente invención se derivarán de la siguiente descripción de algunos ejemplos que son meramente ilustrativos y no limitantes.

Ejemplo 1 - Pruebas de laboratorio de rutina llevadas a cabo en el Probando

Se llevaron a cabo pruebas de rutina de coagulación de laboratorio con respecto al cribado de trombofilia en un individuo (definido como Probando) que presenta episodios de trombosis venosa profunda pero no otros problemas de salud.

En particular, se llevaron a cabo los siguientes: tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina, niveles de factor IX, niveles de factor VIII y XI, niveles de antitrombina (actividad y antígeno), niveles de proteína C (actividad coagulométrica y cromogénica, antígeno), niveles de proteína S (antígeno total, antígeno libre y actividad), resistencia a proteína C activada, análisis de ADN para factor V Leiden, análisis de ADN para la variante de protrombina G20210A, anticuerpos antifosfolípidos, plasminógeno, pruebas de fibrinólisis. Las pruebas de coagulación realizadas en Probando se encontraron todas dentro de los límites normales, excepto para la actividad de FIX (ver ejemplo 4 a continuación).

Ejemplo 2 - Aislamiento del FIX mutante del plasma y del medio de cultivo celular.

El aislamiento de FIX del plasma o del medio de cultivo se logró mediante la técnica de columna de inmutafinidad, usando una resina (sefarosa 4B) a la que el anticuerpo monoclonal anti-FIX AHIX-5041 [Haematologic Technologies, Inc. (Essex Junction, VT, USA)] se unió covalentemente (3.5 mg de anticuerpo monoclonal por 3 ml de resina de sefarosa). Brevemente, la columna se equilibró con amortiguador que contenía 20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1 mM de benzamidina (mM = milimolar). A partir del plasma, los factores dependientes de la vitamina K se precipitaron mediante la adición de cloruro de bario. Después de la centrifugación, el sedimento se resuspendió en una solución que contenía 0.2 M de EDTA. La preparación así obtenida se dializó extensivamente (2 veces, durante al menos 2 horas) en una solución que contenía 20 mM de Tris, 150 mM de NaCl. Después de la diálisis, se permitió que la preparación pasara a través de la columna a una tasa de 0.5 ml/min. Después de un extenso lavado de columna (10 volúmenes de columna) con amortiguador de Tris/NaCl, la elución se llevó a cabo usando una solución de glicina ácida (pH 2.45). El pH del eluato se neutralizó inmediatamente añadiendo 2 M de Tris a pH 7.5. Las fracciones eluidas que contienen proteína (analizadas mediante el ensayo de proteína Bradford) se agruparon y dializaron contra una solución de Tris-NaCl, el FIX se concentró a continuación a través de una microcolumna de 200 ml de sefarosa Q de flujo rápido (intercambio iónico). La pureza de la preparación se evaluó aplicando la técnica de tinción de plata en el gel de SDS-PAGE.

Ejemplo 3 - Estudio genético de FIX

La amplificación por PCR y secuenciación directa de exones y sitios de corte del gen de FIX Probando se llevaron a cabo usando técnicas y cebadores estandarizados según se informa en la bibliografía (De: Methods in Molecular Medicine, Vol 31: Hemostasis and Thrombosis Protocols. Editado por DJ Perry y K.J. Pasi. Humana Press Inc. Totowa, NJ. Capítulo 16: Hemophilia B mutational analysis. Por Peter Green). Brevemente, la amplificación se llevó a cabo usando pares de cebadores de intrón que flanquean cada uno de los ocho exones del gen FIX. La secuenciación se realizó con un secuenciador ABI PRISM 310 (Perkin Elmer, Foster City, CA) usando el kit ABI PRISM BigDye Terminator para reacciones de secuenciación cíclica. Los datos de secuencia se analizaron usando el programa Sequencing Analysis 3.0 (Perkin Elmer, CA). La secuencia obtenida se comparó con la secuencia FIX informada en la base de datos GenBank (número de acceso: K02402).

El análisis de la secuencia de nucleótidos del gen FIX Probando ha documentado una sola mutación en el exón VIII del gen FIX en comparación con la secuencia normal. Se encontró que el paciente era portador de una mutación de G a T en la posición 34099 del gen FIX (secuencia normal del gen FIX, número de acceso de Gene bank: K02402) (o en la posición correspondiente 31134 de acuerdo con la numeración dada en la Base de datos de mutaciones de la Hemofilia B (Giannelli et al., Hemofilia B: Database of point mutations and short additions and deletions. Nucleic Acids Research 1990;18:4053-9) capaz de cambiar el codón 338 de Arginina a Leucina. Por lo tanto, la molécula de FIX presente en el plasma de Probando (FIX mutado) difiere de la molécula de FIX normal solo por la presencia de la sustitución de aminoácido en la posición 338 donde hay una Leucina en lugar de Arginina.

Ejemplo 4 - Mutagénesis in vitro, expresión y purificación de FIX recombinante que contiene la mutación Leu 338

Se llevó a cabo mutagénesis específica de sitio de acuerdo con técnicas estándar descritas por Kunkel (Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection; Proc Natl Acad Sci, USA 1985, 82: 488-492). La secuenciación del ADNc se llevó a cabo para garantizar que la mutación era correcta y que no se habían introducido nuevas mutaciones. La expresión del FIX recombinante se obtuvo usando "línea 293 celular de riñón embrionario humano" y los métodos ya informados en la literatura (Chang JL, Jin JP, Lollar P, y otros. Changing residue 338 in human factor IX from arginine to alanine causes an increase in catalytic activity. J. Biol. Chem. 1998; 273: 12089-12094). El FIX recombinante se aisló del sobrenadante (medio de cultivo) por medio de una columna de inmutafinidad, como se ha descrito anteriormente. Brevemente, el sobrenadante del cultivo celular se recogió cada 24 horas durante 10 días y se conservó a -20°C. Para la purificación, el sobrenadante se descongeló y se añadieron benzamidina y EDTA a una concentración final de 5 milimoles y 4 milimoles, respectivamente. Después de la filtración a través de un filtro Millipore, el sobrenadante se incubó con resina de Sepharosa Q de flujo rápido durante 12 horas a 4°C. La resina se volvió a equilibrar en amortiguador de Tris, NaCl y benzamidina y se cargó en la columna. La elución se realizó con un gradiente de calcio de 0-60 nM. El eluato se dializó a continuación en un amortiguador de Tris-NaCl. La preparación se aplicó luego a la columna de inmutafinidad siguiendo el método descrito en el ejemplo 2 (en la expresión "in vitro" de la proteína recombinante). A partir del medio de cultivo, el procedimiento fue el mismo que para el plasma, a excepción del procedimiento de precipitación usando BaCl. El medio de cultivo se centrifugó a 4000 g durante 20 minutos, luego se sometió a diálisis en Tris-NaCl y se cargó en la columna de inmutafinidad a una tasa de 0.5 ml/min.

Los pasos restantes fueron los mismos que los tomados para el plasma.

5 El FIX con la mutación del gen G34099T que resulta en la sustitución de aminoácido 338Leu, se obtuvo mediante mutagénesis in vitro y técnicas de expresión. Se encontró que el nivel de expresión en el cultivo celular era similar al que se puede obtener con FIX recombinante no mutado (molécula normal). Específicamente, el nivel de expresión del FIX recombinante no mutado estaba entre 750 y 880 ng/ml mientras que para el factor IX recombinante con la mutación del gen G34099T que resulta en la sustitución del aminoácido 338Leu, el nivel estaba entre 590 y 629 ng/ml.

Ejemplo 5: ensayo funcional de FIX

10 El ensayo funcional de FIX se llevó a cabo en el plasma de Probando con una prueba coagulométrica usando Actin (Dade Behring, Marburg, Alemania) y plasma deficiente en FIX (Dade Behring, Marburg, Alemania). Brevemente para la prueba coagulométrica se usó una variante del tiempo de tromboplastina parcial (PTT) en un sistema que contenía plasma deficiente en FIX. Después de agregar el cloruro de calcio, el tiempo de coagulación se midió en segundos. Este tiempo de coagulación se comparó con los de una curva de calibración obtenida por diluciones seriadas de un conjunto de plasma normal como referencia que contiene FIX en una cantidad de 5 µg/ml (es decir, 15 100%), y el porcentaje de FIX presente en la muestra se calculó en 100% del pool de plasma normal (de acuerdo con los métodos estandarizados comunes).

El intervalo normal para la prueba se había obtenido previamente analizando, usando el mismo método, 100 individuos sanos de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 70 años.

20 Se encontró que los niveles de actividad de FIX en el Probando eran iguales a 776% (intervalo normal en 100 individuos sanos, 80-120%).

Ejemplo 6 - Ensayo de antígeno de FIX

25 El antígeno de FIX se determinó con la prueba ELISA usando un primer anticuerpo monoclonal anti-FIX (Affinity Biologicals, Ontario, Canadá) recubierto (unido) sobre la placa para la captura y un segundo anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Affinity Biologicals, Canadá) para la detección de FIX. La curva de referencia se construyó diluyendo un conjunto de plasma normal de 1:100 a 1:3200 en un amortiguador para las muestras, de acuerdo con procedimientos estandarizados. Brevemente, el primer anticuerpo se unió a la placa después de la dilución en amortiguador de bicarbonato de sodio a pH básico (pH = 9.0) a una concentración final de 4 µg/ml. Después del lavado extensivo de la placa con amortiguador de Tris-NaCl-Tween20, las muestras, diluidas 30 1:100 y 1:200 en el mismo amortiguador, se cargaron en los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la eliminación de las muestras de los pocillos y del lavado extenso con el amortiguador, se añadieron 100 µl de una solución que contenía el segundo anticuerpo conjugado con HRP a cada uno de los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Después de otros lavados, se añadieron 100 µl de una solución que contenía tetrametilbenzidina (TMB) y se midió el color desarrollado mediante un espectrofotómetro con un filtro de 450 nanómetros. El nivel de antígeno de FIX se calculó usando la curva de referencia y se expresó como un porcentaje del conjunto de plasma normal. El intervalo de prueba normal se obtuvo 35 previamente usando el mismo método mediante el análisis de 100 individuos sanos de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 70 años.

40 Se encontró que los niveles de antígeno de FIX eran iguales al 92% (intervalo normal 80-120%). Este resultado (combinado con el obtenido en el ejemplo 5) fue compatible con la presencia de cantidades normales de un FIX circulante sintetizado, pero con su función procoagulante que es alrededor de 8-9 veces mayor que la molécula de FIX normal.

Ejemplo 7 - Actividad y niveles de antígeno de FIX después de la reconstitución de un plasma deficiente en FIX con un FIX extraído del plasma de Probando y con FIX recombinante

45 Después de aislar FIX del plasma de Probando, este FIX se usó para reconstituir un plasma deficiente en FIX (Dade-Behring, Milán, Italia) con una concentración final de FIX de 5 µg/ml (igual al 100% de lo normal). Las mediciones de la actividad de FIX y del antígeno en el plasma así reconstituido fueron de 740% y de 95%, respectivamente, siendo estas comparables con las del plasma de Probando.

50 Para ensayar la actividad del FIX recombinante obtenido de acuerdo con el ejemplo 4, se usó el mismo sistema después de la recomposición de un plasma deficiente en FIX con una cantidad de FIX recombinante mutado (rFIX 338Leu) para restaurar la concentración de FIX normal en plasma humano normal, es decir, 5 mg/ml (que corresponde al 100% de lo normal) (mg = microgramos). Las mediciones de la actividad del factor IX recombinante y antígenos fueron del 780% y del 90%, respectivamente, siendo estos comparables con los del plasma de Probando. Esto indica que la proteína recombinante así obtenida, que contiene la sustitución de aminoácidos también presente en el factor IX de Probando, tiene una actividad biológica al menos 8-9 veces mayor que el factor IX normal.

55 Ejemplo 8-SDS-PAGE y inmunomancha de FIX

La SDS-PAGE y la inmunomancha (mancha occidental) del FIX se llevaron a cabo en un gel de gradiente lineal al 5-15% de acuerdo con procedimientos estándar. Brevemente, las muestras que contenían FIX normal o FIX recombinante se cargaron en los pocillos de gel de poliacrilamida y se sometieron a electroforesis.

5 El FIX se sometió a continuación a una inmunomancha en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) usando un aparato semisecco (Novablot, GE-Healthcare, Milán, Italia).

Se detectó el FIX en la membrana de PVDF después de la inmunomancha usando un anticuerpo monoclonal anti-FIX conjugado con HRP (Affinity Biologicals, Ontario, Canadá).

10 La Figura 1 muestra que el FIX aislado del Probando, el FIX recombinante 338Leu y el FIX normal muestran la misma movilidad electroforética y el mismo patrón de inmunomancha (en la Figura 1, 1 indica marcadores de peso molecular, 2 indica FIX normal, 3 indica FIX modificado natural, 4 indica el FIX recombinante modificado).

Por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas (ni cuantitativas ni cualitativas) entre FIX humano normal, FIX humano mutante natural 338 Leu y FIX recombinante 338 Leu utilizando esta técnica.

De lo anteriormente expuesto, está claro que la presencia de una leucina en una posición correspondiente a la posición 338 aumenta sorprendentemente la actividad del polipéptido de FIX en casi ocho veces.

15 La presente invención demuestra ser una mejora particular en el estado de la técnica ya que proporciona un polipéptido de FIX modificado que in vivo en el hombre no causa ningún efecto secundario distinto de una actividad de coagulación aumentada.

Ejemplo 9 - Mutagénesis in vitro, expresión y purificación del FIX recombinante que contiene la mutación 338 Asp (338 ácido aspártico, 338D) (Ejemplo de referencia)

20 La mutagénesis específica de sitio se llevó a cabo de acuerdo con las técnicas estándar descritas por Kunkel (Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection; Proc Natl Acad Sci EE. UU. 1985, 82: 488-492) insertando una guanina en lugar de citosina en la posición 34098, y una alanina en lugar de guanina en la posición 34099 y una timina en lugar de alanina en la posición 34100 (la mutagénesis también se repitió insertando una guanina en lugar de citosina en la posición 34098, una adenina en lugar de guanina en posición 34099 y una guanina en lugar de adenina en posición 34100).

25 La secuenciación del ADNc se llevó a cabo para garantizar que la mutación era correcta y que no se habían introducido nuevas mutaciones. La expresión del FIX recombinante se obtuvo usando "línea 293 celular de riñón embrionario humano" y los métodos ya informados en la literatura (Chang JL, Jin JP, Lollar P, et al. Changing residue 338 in human factor IX from arginine to alanine causes an increase in catalytic activity. J. Biol. Chem. 1998; 273: 12089-12094). El FIX recombinante se aisló del sobrenadante (medio de cultivo) por medio de una columna de inmunoafinidad, como se ha descrito anteriormente. Brevemente, el sobrenadante del cultivo celular se recogió cada 24 horas durante 10 días y se conservó a -20°C. Para la purificación, el sobrenadante se descongeló y se añadieron benzamidina y EDTA a una concentración final de 5 milimoles y 4 milimoles, respectivamente. Después de la filtración a través de un filtro Millipore, el sobrenadante se incubó con resina de Sefarosa Q de flujo rápido durante 35 12 horas a 4°C. La resina se volvió a equilibrar en amortiguador de Tris, NaCl y benzamidina y se cargó en la columna. La elución se realizó con un gradiente de calcio de 0-60 nM. El eluato se dializó a continuación en un amortiguador de Tris-NaCl. La preparación se aplicó a la columna de inmunoafinidad siguiendo el método descrito en el ejemplo 2 (en la expresión "in vitro" de la proteína recombinante). A partir del medio de cultivo, el procedimiento fue el mismo que para el plasma, a excepción del procedimiento de precipitación con BaCl. El medio de cultivo se centrifugó a 4000 g durante 20 minutos, luego se sometió a diálisis en Tris-NaCl y se cargó en la columna de inmunoafinidad a una rata de 0.5 ml/min. Los pasos restantes fueron los mismos que los tomados para el plasma.

40 El FIX con la sustitución del aminoácido 338 Asp se obtuvo mediante mutagénesis in vitro y técnicas de expresión. Se encontró que el nivel de expresión en el cultivo celular era similar al que se puede obtener con FIX recombinante no mutado (molécula normal). Específicamente, el nivel de expresión del FIX recombinante no mutado estaba entre 45 750 y 880 ng/ml mientras que para el factor IX recombinante con la sustitución del aminoácido 338 Asp, el nivel estaba entre 650 y 740 ng/ml.

Ejemplo 10 - Actividad y niveles de antígeno de FIX después de la reconstitución de un plasma deficiente en FIX con FIX recombinante con mutación 338Asp (Ejemplo de referencia)

50 Para el ensayo de la actividad de FIX recombinante obtenido de acuerdo con el ejemplo 9, se usó el mismo sistema después de la recomposición de un plasma deficiente en FIX con una cantidad de FIX recombinante mutado (rFIX 338Asp) para restaurar la concentración normal de FIX en plasma humano normal, es decir, 5 µg/ml (que corresponde al 100% de lo normal) (mg = microgramos). Las mediciones de actividad y antígenos del factor IX recombinante fueron 460% y 98%, respectivamente.

55 Esto indica que la proteína recombinante así obtenida (FIX 338 Asp) tiene una actividad biológica al menos 5 veces mayor que el factor IX normal.

Ejemplo 11 - SDS-PAGE e inmunomancha de FIX (Ejemplo de referencia)

La SDS-PAGE y la inmunomancha (inmunomancha de occidente) del FIX se llevaron a cabo en un gel de gradiente lineal al 5-15% de acuerdo con los procedimientos estándar. Brevemente, las muestras que contenían FIX normal o FIX recombinante se cargaron en los pocillos de gel de poliacrilamida y se sometieron a electroforesis.

- 5 El FIX se sometió a continuación a una inmunomancha en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) usando un aparato semiseco (Novablot, GE-Healthcare, Milán, Italia).

Se detectó el FIX en la membrana de PVDF después de la inmunomancha usando un anticuerpo monoclonal anti-FIX conjugado a HRP (Affinity Biologicals, Ontario, Canadá).

- 10 El FIX recombinante 338Asp y el FIX normal exhiben la misma movilidad electroforética y el mismo patrón de inmunomancha. Por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas (ni cuantitativas ni cualitativas) entre el FIX humano normal y el FIX recombinante 338Asp usando esta técnica.

De lo anteriormente descrito, está claro que la presencia de un ácido aspártico en una posición correspondiente a la posición 338 aumenta sorprendentemente la actividad del polipéptido FIX en casi ocho veces.

- 15 El presente ejemplo demuestra ser una mejora particular en el estado de la técnica ya que proporciona un polipéptido FIX modificado que in vivo en el hombre no causa ningún efecto secundario aparte de una actividad de coagulación aumentada.

Ejemplo 12 - Mutagénesis in vitro, expresión y purificación de FIX recombinante que contiene la mutación 338Gln (338 Glutamina, 338Q) (Ejemplo de referencia)

- 20 La mutagénesis específica de sitio se llevó a cabo de acuerdo con las técnicas estándar descritas por Kunkel (Kunkel T A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection; Proc Natl Acad Sci EE. UU. 1985, 82: 488-492) insertando una adenina en lugar de guanina en la posición 34099 (la mutagénesis también se repitió insertando una adenina en lugar de guanina en la posición 34099, y una guanina en lugar de adenina en la posición 34100). La secuenciación del ADNc se llevó a cabo para garantizar que la mutación era correcta y que no se habían introducido nuevas mutaciones. La expresión del FIX recombinante se obtuvo usando "línea 293 celular de riñón embrionario humano" y los métodos ya informados en la literatura (Chang JL, Jin JP, Lollar P, et al. Changing residue 338 in human factor IX from arginine to alanine causes an increase in catalytic activity, J. Biol. Chem. 1998; 273: 12089-12094). El FIX recombinante se aisló del sobrenadante (medio de cultivo) por medio de una columna de inmutafinidad, como se ha descrito anteriormente. Brevemente, el sobrenadante del cultivo celular se recogió cada 24 horas durante 10 días y se conservó a -20°C. Para la purificación, el sobrenadante se descongeló y se añadieron benzamidina y EDTA a una concentración final de 5 milimoles y 4 milimoles, respectivamente. Después de la filtración a través de un filtro Millipore, el sobrenadante se incubó con resina de Sefarosa Q de flujo rápido durante 12 horas a 4°C. La resina se volvió a equilibrar en amortiguador de Tris, NaCl y benzamidina y se cargó en la columna. La elución se realizó con un gradiente de calcio de 0-60 nM. El eluato se dializó a continuación en un amortiguador de Tris-NaCl. La preparación se aplicó luego a la columna de inmutafinidad siguiendo el método descrito en el ejemplo 2 (en la expresión "in vitro" de la proteína recombinante). A partir del medio de cultivo, el procedimiento fue el mismo que para el plasma, excepto para el procedimiento de precipitación usando BaCl. El medio de cultivo se centrifugó a 4000 g durante 20 minutos, luego se sometió a diálisis en Tris-NaCl y se cargó en la columna de inmutafinidad a una tasa de 0.5 ml/min. Los pasos restantes fueron los mismos que los tomados para el plasma.

- 40 El FIX con la sustitución del aminoácido 338 Gln se obtuvo mediante mutagénesis in vitro y técnicas de expresión. Se encontró que el nivel de expresión en el cultivo celular era similar al que se puede obtener con FIX recombinante no mutado (molécula normal). Específicamente, el nivel de expresión del FIX recombinante no mutado estaba entre 750 y 880 ng/ml mientras que para el factor IX recombinante con la sustitución del aminoácido 338 Gln, el nivel estaba entre 600 y 720 ng/ml.

- 45 Ejemplo 13 - Niveles de actividad y antígeno del FIX después de la reconstitución de un plasma deficiente en FIX con FIX recombinante con mutación 338Gln (Ejemplo de referencia)

- 50 Para el ensayo de la actividad de FIX recombinante obtenido de acuerdo con el ejemplo 12, se usó el mismo sistema después de la recomposición de un plasma deficiente en FIX con una cantidad de FIX recombinante mutado (rFIX 338Gln) para restaurar la concentración normal de FIX en plasma humano normal, es decir, 5 µg/ml (que corresponde al 100% de lo normal) (µg = microgramos). Las mediciones de actividad y antígenos de factor IX recombinante fueron 1360% y 99%, respectivamente. Esto indica que la proteína recombinante obtenida así (FIX 338 Gln) tiene una actividad biológica al menos 13 veces mayor que el factor IX normal.

Ejemplo 14 - SDS-PAGE e inmunomancha de FIX (Ejemplo de referencia)

- 55 La SDS-PAGE y la inmunomancha (inmunomancha de occidente) del FIX se llevaron a cabo en un gel de gradiente lineal al 5-15% de acuerdo con procedimientos estándar. Brevemente, las muestras que contenían FIX normal o FIX recombinante se cargaron en pocillos de gel de poliacrilamida y se sometieron a electroforesis.

El FIX se sometió a continuación a una inmunomancha sobre una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) usando un aparato semiseco (Novablot, GE-Healthcare, Milán, Italia).

El FIX se detectó en la membrana de PVDF después de la inmunomancha usando un anticuerpo monoclonal anti-FIX conjugado con HRP (Affinity Biologicals, Ontario, Canadá).

- 5 El FIX recombinante 338Gln y el FIX normal exhibieron la misma movilidad electroforética y el mismo patrón de inmunomancha. Por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas (ni cuantitativas ni cualitativas) entre el FIX humano normal y el FIX recombinante 338Gln utilizando esta técnica.

De lo anteriormente expuesto, está claro que la presencia de una glutamina en una posición correspondiente a la posición 338 aumenta sorprendentemente la actividad del polipéptido de FIX en casi trece veces.

- 10 El presente ejemplo demuestra ser una mejora particular en el estado de la técnica ya que proporciona un polipéptido de FIX modificado que in vivo en humanos no causa ningún efecto secundario aparte de una actividad de coagulación aumentada.

Por lo tanto, se proporciona evidencia de que:

- 15 1) se ha descubierto un mutante FIX de origen natural (arginina 338 leucina) con una actividad funcional incrementada 8-9 veces en comparación con FIX de tipo silvestre;

2) polipéptidos de FIX recombinantes modificados (no conocidos anteriormente) con 5 veces (FIX arginina 338 ácido aspártico), 8 a 9 veces (FIX arginina 338 leucina), 13 veces (FIX arginina 338 glutamina) de aumento de la actividad funcional (procoagulante), respectivamente, se pueden generar en comparación con FIX de tipo silvestre.

- 20 El uso de los mutantes de la invención, que muestran tal actividad funcional específica de 5 veces o más, y en particular de 8 a 9 veces en comparación con FIX de tipo silvestre, para uso médico y en particular para la profilaxis y el tratamiento de pacientes con hemofilia B; dicho uso de los mutantes de la invención nunca se ha considerado anteriormente y es parte de la presente invención.

- 25 El uso de los mutantes de la invención, que muestran una actividad funcional específica de 5 veces o superior, y en particular de 8 a 9 veces en comparación con FIX de tipo silvestre, para la terapia génica de pacientes con hemofilia B nunca se ha considerado antes y es parte de la presente invención.

El uso de los mutantes de la invención, que muestran una actividad funcional específica de 5 veces o superior, y en particular de 8 a 9 veces en comparación con FIX de tipo silvestre, para la profilaxis y el tratamiento de coagulopatías hemorrágicas distintas de la hemofilia B o para la terapia génica de tales enfermedades, nunca se ha considerado antes y es parte de la presente invención.

- 30 Se debe observar que el uso de los mutantes de la invención, que muestran una actividad funcional específica de 5 veces o superior, y en particular de FIX arginina 338 leucina que muestra de 8 a 9 veces mayor actividad funcional en comparación con el FIX de tipo silvestre, se considera óptimo para el tratamiento de pacientes con hemofilia B debido a la presencia de un mutante idéntico que se produce de forma natural en humanos (nunca descrito anteriormente) que no genera anticuerpos neutralizantes. Además, los niveles de actividad funcional de FIX expresados por FIX arginina 338 leucina, es posiblemente la mejor opción que es mayor que la de FIX arginina 338 alanina (anteriormente conocida y descrita en el documento WO 99/03496, con un aumento modesto en la actividad de 2 a 3 veces el de FIX de tipo silvestre) y no demasiado alto para causar complicaciones trombóticas en pacientes con hemofilia B o pacientes con otras coagulopatías hemorrágicas.

- 40 FIX arginina 338 leucina, también es la mejor opción para el uso de mutantes de FIX en la terapia génica mediante el uso de vectores virales, dada la eficiencia real y el rendimiento del método para el tratamiento (corrección parcial) de la Hemofilia B.

Bibliografía

- Ameri A, Kurachi S, Sueishi K, Kuwahara M, Kurachi K. Myocardial fibrosis in mice with overexpression of human blood coagulation factor IX. *Blood*. 2003 Mar 1; 101 (5):1871-3. Epub 2002 Oct 24.
- 45 - Chang JL, Jin JP, Lollar P, et al. Changing residue 338 in human factor IX from arginine to alanine causes an increase in catalytic activity. *J Biol Chem* 1998;273:12089-12094.
- Lowe GDO. Factor IX and thrombosis. *British Journal of Haematology*, 2001, 115, 507-513.
- Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82:488-492.
- 50 - Kurachi K, Davie EW. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:6461-6464.

- Murphy SL, High KA. Gene therapy for haemophilia. Br J Haematol. 2008 Mar;140(5):479-87.

- Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, et al. Nucleotide Sequence of thr Gene for Human Factor IX (Antihemophilic Factor B). Biochemistry 1985;24:3736-3750.

5 - Toomey JR, Valocik RE, Koster PF, Gabriel MA, McVey M, Hart TK, Ohlstein EH, Parsons AA, Barone FC. Inhibition of factor IX(a) is protective in a rat model of thromboembolic stroke. Stroke. 2002 Feb;33(2):578-85.

Lista de secuencias

<110> KEDRION

<120> Factor IX de polipéptido modificado, sus usos y método para su producción

<130> 9871PTWO

10 <150> IT BO2008A000564

<151> 2008-09-15

<150> IT BO2009A000275

<151> 2009-05-06

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> Señal

<222> (1)..(56)

<223> Péptido de señal

<220>

25 <221> Péptido

<222> (1)..(461)

<220>

<221> Residuo

<222> (384)..(384)

30 <223> Residuo de Arg que corresponde a 338 de SEQ ID No. 2

<220>

<221> Residuo

<222> (384)..(384)

<223> Residuo mutado en la invención reivindicada

35 <300>

<308> GeneBank AAB59620.1

<309> 1996-04-30

<313> (1)..(461)

ES 2 687 038 T3

<400> 1

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
 20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
 35 40 45

ES 2 687 038 T3

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
180 185 190

Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
275 280 285

ES 2 687 038 T3

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
 290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
 305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
 325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
 340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
 355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
 370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
 385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
 405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
 420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
 435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 450 455 460

210> 2

<211> 415

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Péptido

<222> (1)..(415)

10 <220>

<221> Residuo

<222> (338)..(338)

<223> Residuo que corresponde a 384 de SEQ ID No. 2

<220>

<221> Residuo

<222> (338)..(338)

5 <223> Residuo mutado en la invención reivindicada

<300>

<308> NCBI/NP_000124

<309> 2009-07-12

<313> (1)..(415)

10 <400> 2

ES 2 687 038 T3

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

ES 2 687 038 T3

Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 210 215 220

Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 225 230 235 240

Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 245 250 255

His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 260 265 270

Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285

Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 290 295 300

Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 305 310 315 320

Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 325 330 335

Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 340 345 350

Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 355 360 365

His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 370 375 380

Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
 385 390 395 400

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 405 410 415

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de FIX (factor IX) modificado para uso en un tratamiento médico en una dosificación diaria entre 0.1 µg/kg y 400 µg/kg de peso corporal, teniendo dicho polipéptido de FIX modificado al menos 70% de identidad con una SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; en el que la leucina está presente en una posición correspondiente a la posición 338 de un polipéptido de FIX maduro no modificado como se identifica por la SEQ ID NO: 2.
2. Un polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
3. Un polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el tratamiento es por administración oral, parenteral, rectal, inhalación o insuflación.
4. Un polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho polipéptido es para uso en el tratamiento de una coagulopatía congénita o adquirida, una enfermedad hematológica congénita o adquirida, un trastorno hemorrágico u otra enfermedad cardiovascular.
5. Un polipéptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el tratamiento de gastritis hemorrágica, hemorragia uterina o hemofilia.
6. Un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para uso en el tratamiento de al menos una coagulopatía.
7. Un polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el tratamiento de la hemofilia A o la hemofilia B.
8. Un polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que dicho polipéptido se proporciona en una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; donde dicho polipéptido de FIX modificado está presente en la composición farmacéutica en una cantidad adecuada para administración en una dosificación diaria comprendida entre 0.1 mg/kg y 400 mg/kg de peso corporal.
9. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha composición farmacéutica se formula para administración oral, parenteral, rectal, inhalación o insuflación.