

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 058**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2014 PCT/EP2014/077783**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15086854**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2014 E 14827185 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 3080157**

54 Título: **Serpinas modificadas para el tratamiento de trastornos hemorrágicos**

30 Prioridad:

13.12.2013 GB 201322091

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

14.03.2019

73 Titular/es:

**CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (100.0%)
The Old Schools Trinity Lane
Cambridge, Cambridgeshire CB2 1TN, GB**

72 Inventor/es:

**HUNTINGTON, JAMES ANDREW;
POLDERDIJK, STÉPHANIE y
BAGLIN, TREVOR**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 704 058 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

Serpinas modificadas para el tratamiento de trastornos hemorrágicos

5 **Campo**

La invención se refiere a moléculas de serpina modificadas con especificidad alterada, en particular moléculas de serpina modificadas que tienen especificidad aumentada por proteasas anticoagulantes; tal como la Proteína C activada (APC).

10

Antecedentes

Las hemofilias son trastornos hemorrágicos, que están causados por una deficiencia del fVIII (hemofilia A, HA) o fIX (hemofilia B, HB) (revisado en Bolton-Maggs y Pasi, 2003). Esto reduce la actividad de la tenasa intrínseca (Xasa) y de esta manera la cantidad de trombina generada cuando se produce la lesión tisular. Esto da lugar a una hemorragia incontrolada después de la lesión, así como hemorragia espontánea en las articulaciones y tejidos blandos.

15

La hemofilia afecta a alrededor de 1 de cada 5000 personas. Los 170.000 pacientes identificados en la Federación Mundial de Supervisión Global de hemofilia es una infraestimación de la carga sanitaria global (Federación Mundial de Hemofilia, 2011). Los costes de tratamiento son muy altos y el tratamiento es frecuente y de por vida.

20

Los tratamientos convencionales de hemofilia se basan en el remplazo del factor de coagulación afectado, utilizando factores derivados del plasma o recombinantes (revisado en Mannucci, 2003; 2008). Sin embargo, una proporción significativa de pacientes tratados de esta manera desarrollarán anticuerpos inhibidores contra el factor de coagulación suplementado, haciendo que el tratamiento sea ineficaz (revisado en Brettler, 1996). Existen inhibidores en un 30 % de los pacientes con hemofilia (revisado en Teitel y Sholzberg 2013) pero las estimaciones globales son bajas debido a la alta mortalidad en pacientes no tratados con un inhibidor y una baja prevalencia de los inhibidores en muchos países en los que la terapia con remplazo del factor VIII no está disponible. Otro inconveniente de las terapias convencionales es su precio, así como la corta semivida del factor de coagulación inyectado, que necesita frecuentes tratamientos (revisado en Lee et al, 2006).

25

30

En el caso en el que los pacientes desarrollan anticuerpos inhibidores, se utilizan antihemorrágicos para el tratamiento de los eventos hemorrágicos (revisado en Negrier et al, 2006). Los agentes antihemorrágicos reducen la hemorragia sin suplementar directamente el factor de coagulación afectado; lo que hacen es "saltarse" la actividad del complejo de la tenasa. Ejemplos de agentes antihemorrágicos habituales incluyen fVIIa recombinante y FEIBA (Factor ocho con actividad antihemorrágica), un concentrado de complejo de protrombina. Estos tratamientos de remplazo son muy caros (Bohn et al, 2004; Di Minno et al, 2010; Gringeri et al, 2003; Escobar, 2010) y se tienen que administrar incluso más frecuentemente que las terapias convencionales y a altas dosis debido a las semividas cortas de ambos productos (revisado en Haya et al, 2007). Además, se ha demostrado que la repuesta del paciente es variable e impredecible (revisado en Berntorp, 2009).

35

40

Además, la corta semivida de los concentrados de factores hace que la terapia de remplazo convencional en la hemofilia sea subóptima. Esto es particularmente evidente en la hemofilia A ya que el factor VIII tiene una semivida de menos de 12 horas. En consecuencia, a pesar de la disponibilidad de un tratamiento para ambas hemofilias A y B, las tasas de hemorragia son mayores en la hemofilia A y la artropatía hemofílica crónica es más común. Esto se puede relacionar con la corta semivida del factor VIII y en consecuencia con la dificultad de mantener un nivel hemostático del factor VIII (Escobar y Sallah 2013). En una revisión nacional del tratamiento, la frecuencia anual de hemorragia en pacientes con hemofilia A grave sin inhibidores era de 15 en comparación con 9 en los pacientes con hemofilia B (Nagel, et al 2011). La necesidad de cirugía musculoesquelética era 3 veces mayor en pacientes con hemofilia A. Tagariello et al descubrieron que los pacientes con hemofilia A necesitaban un remplazo de articulaciones tres veces más a menudo que los pacientes con hemofilia B (Tagariello, et al 2009). Lowe et al descubrieron que era necesaria una hospitalización tres veces más frecuentemente en pacientes con hemofilia A en comparación con hemofilia B (Lowe y Ludlam 2008).

45

50

55

Por lo tanto, los tratamientos actuales para los trastornos hemorrágicos, tales como la hemofilia, tienen una serie de inconvenientes.

El documento WO 2008/045148 expone métodos para la exploración de proteasas modificadas poniéndolas en contacto con un sustrato, tal como serpina, que, al escindirse del sustrato, atrapa la proteasa formando un complejo estable.

60

El documento WO 2006/090282 expone un inhibidor de la proteasa hK14 que comprende el bucle reactivo de serpina de una secuencia de serpina que se ha modificado al menos en una secuencia de sitio activo de sustrato para la proteasa hK14.

65

Sumario

Los presentes inventores han reconocido que la especificidad de las moléculas de serpina se puede modificar mediante la modificación de restos en el bucle central reactivo (RCL) y han identificado moléculas de serpina modificadas con especificidad aumentada para las proteasas anticoagulantes. Estas moléculas de serpina modificadas pueden ser útiles en la terapia, por ejemplo, para el tratamiento de hemorragias.

Un aspecto de la invención proporciona una serpina modificada que tiene unas mutaciones en los restos P1' y P2 y opcionalmente en los restos P4 y/o P1 del bucle central reactivo (RCL) de la misma, en la que el resto P1' está mutado en Q, H, K o R; y el resto P2 está mutado en H, K o R; y; en la que dichas mutaciones aumentan la inhibición de una o más proteasas anticoagulantes seleccionadas de entre la Proteína C activada y el complejo trombina: trombomodulina con respecto a la inhibición de una o más proteasas procoagulantes seleccionadas de entre trombina, fVIIa, fXa, fXIa y fXIIa.

Las mutaciones pueden aumentar la inhibición de la Proteína C activada con respecto a la inhibición de trombina.

Las mutaciones también pueden aumentar la inhibición de la Proteína C activada con respecto a la inhibición de otras proteasas procoagulantes, tales como fVIIa, fXIa, fXa y fXIIa.

Otros aspectos de la divulgación se refieren al uso de serpinas modificadas como se describen en el presente documento para el tratamiento de hemorragias, por ejemplo, hemorragias en pacientes con trastornos hemorrágicos hereditarios y hemorragias adquiridas, que incluyen traumatismos, cirugía y en pacientes que reciben terapia anticoagulante.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra la cascada de coagulación y el papel regulador de las serpinas en la cascada.

La Figura 2 muestra los resultados del ensayo de tiempo de protrombina (TP) para determinar el efecto de un inhibidor de la Proteína C (PCI) con un truncamiento del extremo N del resto 21 (el resto del extremo N es A22 en la secuencia de tipo silvestre, cuanto se cuenta el resto 1 del propéptido como resto 1 de la proteína madura) y que tienen K restos en las posiciones P2 y P1' del RCL (A22 P2KP1'K PCI) en la coagulación a través de ruta del factor tisular (extrínseca). El plasma normal agrupado de los tres plasmas diferentes se incubó con cualquiera de, sin PCI (barra negra, -) o 5 μ M de PCI de tipo silvestre (TS) (barra gris, TS) o 5 μ M de A22 P2KP1'K PCI (barra blanca, P2KP1'K). La coagulación se inició por la adición de un reactivo PT, para iniciar la coagulación mediante la ruta extrínseca y se midió el tiempo hasta la formación del coágulo. El ensayo se llevó a cabo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica. Se utilizó plasma diluido dos veces para aumentar la sensibilidad del ensayo para inhibidores de la coagulación. El A22 P2KP1'K PCI no tenía efecto sobre la coagulación en este ensayo de tiempo de protrombina (TP). Este resultado indica que no existe una inhibición significativa de FT: fVIIa, trombina y otras proteasas procoagulantes por el A22 P2KP1'K PCI.

La Figura 3 muestra los resultados de un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) para determinar el efecto de A22 P2KP1'K PCI sobre la coagulación a través de la ruta de activación de contacto (intrínseca). La Fig. 3A muestra el plasma normal agrupado de tres plasmas diferentes incubados con cualquiera de sin PCI (barra negra, -) o 5 μ M de PCR A22 de tipo silvestre (TS) (barra gris, TS) o A22 P2KP1'K PCI (barra blanca, P2KP1'K). La coagulación se inició mediante la adición de un reactivo TTPa, para iniciar la coagulación mediante la ruta intrínseca y se midió el tiempo hasta la formación del coágulo. Las barras muestran las medias de al menos tres mediciones, las barras de error muestran la desviación típica. El ensayo se detuvo a los 300 s. Las muestras que no mostraban coágulos a los 300 s en el tiempo del experimento se marcaron con asteriscos. La Fig. 3B muestra los datos de A sin las muestras de A22 PCI TS para demostrar el poco efecto sobre el tiempo de coagulación.

La Figura 4 muestra los resultados de un ensayo de tiempo de protrombina (TP) que determina el efecto de una α_1 -antitripsina mutante Pittsburg (Pitts) de longitud completa (FL) (M358 = P1R) que comprende adicionalmente una mutación C232S y mutaciones P357K (P2) y S359K (P1'K) en el RCL (FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K) sobre la coagulación mediante la ruta del factor tisular (extrínseca). El plasma normal agrupado de tres plasmas diferentes se incubó o sin α_1 AT (-, barra negra) o con 5 μ M de FL α_1 AT Pitts C232S (Pitts, barra gris) o 5 μ M de FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K (P2KP1'K, barra blanca). La coagulación se inició por la adición del reactivo de TP y se midió el tiempo hasta la formación del coágulo. Las barras muestran las medias de al menos tres mediciones, las barras de error muestran la desviación típica. Se utilizó plasma diluido 2 veces para aumentar la sensibilidad del ensayo para los inhibidores de la coagulación. La FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K a diferencia de la FL α_1 AT Pitts C232S no prolonga el TP. Esto indica que no hay un efecto inhibidor significativo sobre ninguna proteasa procoagulante, incluyendo el FT-fVIIa, trombina, o fXa.

La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) para determinar el efecto de FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K sobre la coagulación mediante la ruta de activación por

contacto (intrínseca). La Fig. 5A muestra el plasma normal agrupado de tres plasmas diferentes incubados con cualquiera de sin α_1 AT (barra negra) o concentraciones cada vez mayores de FL α_1 AT Pitts C232S (barras grises) o FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K (barras blancas). Se añadió el reactivo TTPa y se incubaron las muestras durante 5 min a 37 °C. Entonces se inició la coagulación por adición de CaCl_2 y se midió el tiempo hasta la formación del coágulo. Las barras muestran las medias de al menos tres mediciones, las barras de error muestran la desviación típica. El ensayo se detuvo a los 300 s. Las muestras que no mostraban coágulos a los 300 s en el tiempo del experimento se marcaron con asteriscos. La Fig. 5B muestra los datos de A sin las muestras de FL α_1 AT Pitts C232S para demostrar el poco efecto en el tiempo de coagulación de FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K. Sin embargo, este efecto no aumenta dependiendo de la dosis.

La Figura 6 muestra que FL α_1 AT Pitts C232S inhibe la generación de trombina en el plasma humano normal (NP). Las Fig. A-C muestran las curvas de generación de trombina representativas para las reacciones que contenían concentraciones cada vez mayores de FL α_1 AT Pitts C232S en presencia de (A) sin trombomodulina (TM), (B) 1,25 nM de trombomodulina (TM), (C) 10 nM de trombomodulina (TM). Las curvas muestran una media de los duplicados. Todos los ensayos se llevaron a cabo en plasma humano normal agrupado (NP) de George King Biomedical. La coagulación se inició por la adición de CaCl_2 y FT/fosfolípidos (FT bajo en RB y reactivo de fosfolípidos n.º 5006210, Technoclone GmbH) para activar la coagulación mediante la ruta extrínseca. La generación de trombina se midió a través de la escisión de un sustrato fluorogénico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Las unidades de fluorescencia se convirtieron en concentración de trombina calibrando las unidades de fluorescencia contra concentraciones conocidas de trombina, utilizando el kit de calibración Technothrombin (Technoclone). La Fig. 6D muestra los ETP (potenciales endógenos de trombina) medios, que representan la cantidad total de trombina generada durante las reacciones. Las barras muestran la media de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error representan la desviación típica. La trombomodulina (TM) que se utilizó se produjo de manera recombinante en célula HEK-EBNA y consiste en el dominio extracelular de la TM.

La Figura 7 Muestra que el FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K rescata el efecto anticoagulante de TM en plasma humano normal (NP). Las Fig. 7A-C muestran las curvas de generación de trombina representativas de las reacciones que contenían concentraciones cada vez mayores de FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K en presencia de (A) sin TM, (B) 1,25 nM de TM, (C) 10 nM de TM. Las curvas muestran una media de los duplicados. Todos los ensayos se llevaron a cabo en plasma humano normal agrupado (NP) del George King Biomedical. La coagulación se inició por la adición de CaCl_2 y FT/fosfolípidos (FT bajo en RB y reactivo de fosfolípidos n.º 5006210, Technoclone GmbH) para activar la coagulación mediante la ruta extrínseca. La generación de trombina se midió a través de la escisión de un sustrato fluorogénico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Las unidades de fluorescencia se convirtieron en concentración de trombina calibrando las unidades de fluorescencia contra concentraciones conocidas de trombina, utilizando el kit de calibración Technothrombin (Technoclone). La Fig. 6D muestra los ETP (potenciales endógenos de trombina) medios, que representan la cantidad total de trombina generada durante las reacciones. Las barras muestran la media de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error representan la desviación típica.

La Figura 8 muestra que FL α_1 AT Pitts C232S anula la generación de trombina en plasma humano de hemofilia A (HA, plasma deficiente en el fVIII (menos de un 1 % de actividad del fVIII) o (B) plasma humano deficiente en el fIX (menos del 1 % de actividad del fIX con las cantidades indicadas de trombomodulina (TM) añadida. Todos los plasmas eran del George King Biomedical. La coagulación se inició por la adición de CaCl_2 y FT/fosfolípidos (FT bajo en RB y reactivo de fosfolípidos n.º 5006210, Technoclone GmbH) con una dilución final de 1:4.000 de Dade Innovin (Siemens) para activar la coagulación mediante la ruta extrínseca. La generación de trombina se midió a través de la escisión de un sustrato fluorogénico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Las unidades de fluorescencia se convirtieron en concentración de trombina calibrando las unidades de fluorescencia contra concentraciones conocidas de trombina, utilizando el kit de calibración Technothrombin (Technoclone). Se muestra la media de los ETP de al menos dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error representan la desviación típica.

La Figura 9 muestra que FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K rescata el efecto de la TM sobre el plasma humano de HA (plasma deficiente en fVIII). Las Fig. 9A-C muestran las curvas de generación de trombina representativas de las reacciones que contienen concentraciones cada vez mayores de FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K en presencia de (A) sin TM, (B) 1,25 nM de TM, (C) 5 nM de TM. Las curvas muestran una media de duplicados. Todos los ensayos se llevaron a cabo en plasma deficiente en fVIII (menos de un 1 % de actividad de fVIII) del George King Biomedical. La coagulación se inició por la adición de CaCl_2 y FT/fosfolípidos (FT bajo en RB y reactivo de fosfolípidos n.º 5006210, Technoclone GmbH) y 1:4.000 de Dade Innovin (Siemens) para activar la coagulación mediante la ruta extrínseca. La generación de trombina se midió a través de la escisión de un sustrato fluorogénico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Las unidades de fluorescencia se convirtieron en concentración de trombina calibrando las unidades de fluorescencia contra concentraciones conocidas de trombina, utilizando el kit de calibración Technothrombin (Technoclone). La Fig. 9D muestra los ETP (potenciales endógenos de trombina) medios, que representan la cantidad total de trombina generada durante las reacciones. Las barras muestran la media de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error representan la desviación típica.

La Figura 10 muestra que FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K rescata el efecto de la TM sobre el plasma humano de HB (plasma deficiente en fIX). (A-C) muestran las curvas de generación de trombina representativas de las reacciones que contienen concentraciones cada vez mayores de FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K en presencia de (A) sin TM, (B) 1,25 nM de TM, (C) 5 nM de TM. Las curvas muestran una media de duplicados. Todos los ensayos se llevaron a cabo en plasma deficiente en fVIII (menos de un 1 % de actividad de fIX) del George King Biomedical. La coagulación se inició por la adición de CaCl_2 y FT/fosfolípidos (FT bajo en RB y reactivo de fosfolípidos n.º 5006210, Technoclone GmbH) y 1:4.000 de Dade Innovin (Siemens) para activar la coagulación mediante la ruta extrínseca. La generación de trombina se midió a través de la escisión de un sustrato fluorogénico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Las unidades de fluorescencia se convirtieron en concentración de trombina calibrando las unidades de fluorescencia contra concentraciones conocidas de trombina, utilizando el kit de calibración Technothrombin (Technoclone). La Fig. 10D muestra los ETP (potenciales endógenos de trombina) medios, que representan la cantidad total de trombina generada durante las reacciones. Las barras muestran la media de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error representan la desviación típica.

La Figura 11 muestra el efecto de FL α_1 AT Pitts C232S y FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K en plasma de ratón con HB. Las Fig. 11A-D muestran las curvas de generación de trombina representativas de las reacciones que contenían concentraciones cada vez mayores de (A-B) FL α_1 AT Pitts C232S o (C-D) FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K en presencia de (A y C) sin TM (B y D) 750 nM de TM humana soluble. Todos los ensayos se llevaron a cabo en plasma de ratón HB que se recolectó del sangrado de la cola en citrato, se centrifugó para retirar los glóbulos rojos y se congeló a -80°C . La coagulación se inició por la adición de CaCl_2 y FT/fosfolípidos (FT bajo en RB y reactivo de fosfolípidos, Technoclone) y 1:12.000 de Dade Innovin (Siemens) para activar la coagulación mediante la ruta extrínseca. La generación de trombina se midió a través de la escisión de un sustrato fluorogénico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Las unidades de fluorescencia se convirtieron en concentración de trombina calibrando las unidades de fluorescencia contra concentraciones conocidas de trombina, utilizando el kit de calibración Technothrombin (Technoclone). La Fig. 11E muestra los ETP (potenciales endógenos de trombina) medios, que representan la cantidad total de trombina generada durante las reacciones. Las barras muestran la media de cuatro experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error representan la desviación típica. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 33°C .

La Figura 12 muestra que el FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K reduce el sangrado en ratones HB en un ensayo de recorte de la cola. El recorte de la cola representa la pérdida total de sangre durante un periodo de recolección de 10 después de la sección de la cola de 3 mm de diámetro en ratones de TS y ratones HB. Se les inyectó a los ratones cualquiera de entre PBS, FL α_1 AT Pitts C232S, FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K en las dosis indicadas en un volumen total de inyección de 200 μl . Las soluciones proteicas se llevaron hasta 200 μl utilizando PBS. Se determinó el volumen de pérdida de sangre por recolección de la sangre de la cola en 14 ml de solución salina. La sangre recolectada se centrifugó y se lisaron los glóbulos rojos, a continuación, se hizo la medición de la absorbancia a 575 nm. Se construyó una curva de referencia determinando la absorbancia a 575 nm después de la lisis de los glóbulos rojos utilizando volúmenes conocidos de sangre recolectada. La pérdida de sangre en las muestras experimentales se calculó entonces a partir de esta referencia. Cada punto indica los datos de un único ratón, y las líneas horizontales muestran la media de todos los animales por grupo. Se calcularon los valores de p utilizando un ensayo t no pareado. Los círculos indican los ratones de TS a los que se inyectó PBS, los cuadrados indican ratones HB a los que se inyectó PBS, los triángulos indican los ratones HB a los que se inyectaron 7,5 mg/kg de FL α_1 AT Pitts C232S, los triángulos invertidos indican los ratones HB a los que se inyectaron 7,5 mg/kg de FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K y los rombos indican los ratones HB a los que se inyectaron 15 mg/kg de FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K.

La Figura 13 muestra que el FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K aumenta la formación de coágulos estables en ratones HB en un modelo de lesión de arteriola del cremáster por láser. Se les infundió a los ratones HB un anticuerpo anti-fibrina- α marcado fluorescentemente y un anticuerpo marcado fluorescentemente para marcar las plaquetas, a través de una cánula por la vena yugular. Los controles indican el nivel básico de la formación de coágulos después de la lesión en los ratones a los que solo se les infundió anticuerpo. M indica el número de ratones por condición, n indica el número de lesiones llevadas a cabo para esa condición. El gris claro indica sin coágulo, el gris oscuro indica un coágulo solo de plaquetas, y el negro representa los coágulos que contienen plaquetas y fibrina.

La Figura 14 muestra que el FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K aumenta la formación de coágulos estables en ratones HB en un modelo de lesión de arteriola del cremáster por láser. La Figura 14 muestra los datos en bruto representativos de los resultados que se muestran en la Figura 13. Se cuantificó la fluorescencia durante el tiempo de todas las lesiones para cada condición. Los gráficos representan el valor de la mediana de todas las lesiones en la condición indicada. El número de ratones y el número total de lesiones era el siguiente: Control: 5 ratones, 8 lesiones; FL α_1 AT Pitts C232S a 7,5 mg/kg: 1 ratón, 7 lesiones; FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K a 7,5 mg/kg: 4 ratones, 18 lesiones; FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K a 15 mg/kg: 3 ratones, 20 lesiones.

La Figura 15 muestra la inhibición de la trombina y fXa por mutantes de α_1 AT específicos para APC sobre la trombina que se re-exploraba para la inhibición de fXa. Los cuatro mutantes resultados, que deberían haber

reducido la inhibición de fXa se ensayaron entonces en cuanto a la inhibición de (A) trombina y (B) fXa, para determinar si la exploración era satisfactoria en la producción de mutantes específicos de APC que no inhibieran la trombina o el fXa. Se incubó 1 μ M de serpina con 12,5 nM de proteasa durante diferentes cantidades de tiempo. En los puntos de tiempo indicados, se paró la reacción mediante la adición de un exceso de sustrato cromogénico (S2238 para trombina, S2222 para fXa). La actividad enzimática residual se dividió por la actividad enzimática inicial y se representó el logaritmo natural de este valor con respecto al tiempo. La pendiente de estos gráficos es la constante de velocidad observada, k_{obs} . Para obtener una estimación de la constante de velocidad de segundo orden k_2 , se dividió la k_{obs} por la concentración de serpina. Los valores seleccionados se muestran en la figura, para ilustrar la mayor inhibición de trombina y fXa, así como el valor para el único mutante que no inhibía sustancialmente el fXa (P2RP1'Q). Los mutantes que se muestran todas tienen la Mutación Pitts (M358R, P1R).

Descripción detallada

15 La divulgación se refiere a la modificación de serpinas para aumentar su especificidad por APC con respecto a otras proteasas de coagulación. Las variantes de serpina modificadas específicas para APC puede ser útil, por ejemplo, como procoagulantes.

20 Aunque son específicas para la APC, se espera que las serpinas modificadas descritas en el presente documento tengan pocos o ningún efecto fuera de la diana y son específicas de rutas que se activan con las lesiones. Esto permite que las serpinas modificadas se apliquen terapéutica y profilácticamente, así como en situaciones de emergencia, es decir, un traumatismo. La dosificación de serpinas modificadas se puede predecir ya que son inhibidores suicidas, que significa que una molécula de serpina no puede inhibir más que una molécula de proteasa. Además, debido a que los mecanismos de aclaramiento naturales eficaces son específicos de la serpina: Los complejos de proteasa sobre las serpinas solas, es probable que las semividas plasmáticas de las serpinas modificadas excedan las de los agentes antihemorrágicos actuales. Por ejemplo, la semivida de una serpina modificada como se describe en el presente documento puede ser de aproximadamente 5 días.

30 La Proteína C (ID genético 5624) es una glicoproteína plasmática dependiente de la vitamina K que es escinde para su forma activada (Proteína C activada, APC) por el complejo trombina-trombomodulina. La Proteína C humana tiene la secuencia de aminoácidos de referencia de NP 000303.1 GI: 4506115 y puede codificarse por la secuencia de nucleótidos de referencia de NM_000312.3 GI: 270483720. La APC es una proteasa anticoagulante que escinde proteolíticamente el fVa y fVIIIa (Figura 1), atenuando de esta manera la producción de trombina.

35 Una serpina modificada como se describe en el presente documento puede tener mutaciones en su bucle central reactivo (RCL); los restos en ambas posiciones P1' y P2 y opcionalmente P1 y/o P4 pueden estar mutados.

40 Los restos del RCL se numeran en el presente documento de acuerdo con la nomenclatura de Schechter-Berger para sustratos e inhibidores de serina proteasas (Schechter y Berger, 1967). Esta nomenclatura convencional permite el resto en posiciones específicas del RCL de la serpina tipo silvestre con mutaciones en las posiciones P1', P1, P2 y/o P4, que se van a identificar fácilmente en cualquier secuencia de serpina.

45 Preferentemente, estas mutaciones son las únicas mutaciones del RCL o la serpina modificada. Por ejemplo, el RCL puede consistir en la secuencia del RCL de la serpina de tipo silvestre con mutaciones en las posiciones P1' y P2 y opcionalmente P1 y/o P4.

50 El RCL de la serpina modificada puede tener mutaciones en las posiciones P1' y P2; mutaciones en las posiciones P1', P2 y P1; mutaciones en las posiciones P1', P1 y P4 o mutaciones en las posiciones P1', P2, P1 y P4. Los restos en las otras posiciones de RCL pueden ser restos de tipo silvestre sin mutar.

Preferentemente, los restos en las posiciones P1', P1 y P2 están mutados.

55 El bucle central reactivo (RCL) de una serpina tiene normalmente aproximadamente 20 restos de longitud y contiene el enlace escindible P1-P1' que es escinde por la proteasa diana. El RCL se extiende desde la cadena 5 de la lámina beta A hasta la cadena 1 de la lámina beta C de la serpina. Los restos P17 Glu, P15 Gly y P14 Thr se conservan en las serpinas. Por ejemplo, el RCL de una serpina puede comprender la secuencia de consenso P17 E, P16 E/K/R, P15 G, P14 T/S, P12-P9 (A/G/S)4 (Hopkins et al. 1993; Irving et al. 2000). El RCL comienza en el resto P17 y habitualmente termina en el resto P3'. Los RCL se pueden extender en algunas serpinas, tales como PCI, por restos adicionales en el lado P'. Por ejemplo, el RCL de la α_1 -antitripsina consiste en los restos P17-P3' y el RCL de PCI consiste en los restos P17-P6'. Ejemplos de serpinas con los restos P1', P1, P2 y P4 que se resaltan se muestran en las SEQ ID NO: 1 a 11 posteriormente. Los restos que constituyen las secuencias de serpina madura también se indican.

65 Los restos de las otras posiciones del RCL de la serpina puede no estar modificados, es decir, puede ser los restos nativos de la secuencia de serpina de tipo silvestre. La serpina modificada puede, por lo tanto, comprender un RCL que tiene una secuencia de tipo silvestre con mutaciones en las posiciones P1, P1', P2 y/o P4 como se ha descrito

anteriormente.

5 Las mutaciones del bucle central reactivo (RCL) de las serpinas modificadas pueden comprender una mutación en la posición P1'. Preferentemente, la mutación es una sustitución. El resto P1' nativo en el RCL de la serpina tipo silvestre puede remplazarse con un resto no nativo en la serpina modificada. Por ejemplo, el resto S nativo en la posición P10 de la secuencia de tipo silvestre de α_1 AT o PCI se puede remplazar con un residuo distinto de S en la serpina modificada.

10 El resto P1' nativo en el RCL de la serpina de tipo silvestre se puede remplazar con H, K, R o Q; más preferentemente K.

15 Las mutaciones del bucle central reactivo (RCL) de la serpina modificada puede comprender una mutación en el resto P2. Preferentemente, la mutación es una sustitución. Por ejemplo, el resto P2 nativo del RCL de la serpina de tipo silvestre se puede remplazar con un resto no nativo en la serpina modificada.

El resto P2 nativo en el RCL de la serpina de tipo silvestre se puede remplazar con R, H o K, preferentemente K.

20 Las mutaciones en el RCL de la serpina modificada puede comprender o consistir en sustituciones en el resto P1' y P2, es decir, los restos localizados en las posiciones P1' y P2 del RCL de la serpina de tipo silvestre se puede remplazar por otros restos en la serpina modificada.

Los restos adecuados en las posiciones P2 y P1' de la serpina modificada se han descrito anteriormente.

25 Los restos adecuados en las posiciones P2 y P1' respectivamente en una serpina modificada como se describe en el presente documento incluyen KK, RK, RH, KH, RQ o KQ y TQ.

En algunas realizaciones preferidas, tanto los restos de P1' y P2 se pueden modificar en restos cargados positivamente, tal como K, H o R, más preferentemente K.

30 En algunas realizaciones, el resto P1 puede no estar modificado en la serpina modificada. Por ejemplo, el resto en la posición P1 del RCL de la serpina modificada puede ser el resto que está presente en el resto P1 de la secuencia de serpina de tipo silvestre. Por ejemplo, el resto P1 en un PCI modificado puede ser un resto R.

35 En otras realizaciones, el resto P1 puede estar mutado en la serpina modificada. Por ejemplo, la una o más mutaciones en el bucle central reactivo (RCL) de la serpina modificada comprende una mutación en el resto P1. Preferentemente la mutación es una sustitución. El resto P1 nativo en el RCL de la serpina de tipo silvestre se puede remplazar con un resto no nativo en la serpina modificada.

40 En algunas realizaciones, el resto P1 puede estar mutado o modificado en un resto cargado positivamente tal como H, K o R, preferentemente R.

45 Preferentemente, un resto nativo que no está cargado positivamente en la posición P1 de la serpina de tipo silvestre se puede remplazar por un resto cargado positivamente en la serpina modificada. Por ejemplo, M en la posición P1 de la α_1 AT tipo silvestre puede remplazarse por un resto cargado positivamente, tal como R, en una α_1 AT modificada. La variante Pittsburgh (Pitts) de α_1 AT tiene una mutación en el resto 358 que reemplaza el resto M de la posición P1 con un resto R.

50 En algunas realizaciones, el resto P4 puede no estar modificado en la serpina modificada. Por ejemplo, el resto en la posición P4 en el RCL de la serpina modificada puede ser el resto que está presente en el resto P4 de la secuencia de serpina de tipo silvestre. Por ejemplo, el resto P4 en un armazón del PCI puede ser F y el resto P4 en un armazón de la α_1 AT puede ser A.

55 En otras realizaciones, el resto P4 puede estar mutado en la serpina modificada. Por ejemplo, la una o más mutaciones en el bucle central reactivo de la serpina modificada comprende adicionalmente una mutación en el resto P4.

60 Preferentemente, la mutación es una sustitución. El resto en el resto P4 del RCL de la serpina de tipo silvestre se puede remplazar con un resto diferente en la serpina modificada. Por ejemplo, el resto P4 en un PCI modificado puede estar mutado o modificado con un resto diferente de F y el resto P4 en una α_1 AT modificada puede estar mutado o modificado en un residuo distinto de A.

Los restos adecuados en la posición P4 del RCL de la serpina modificada incluyen S, R, V, C, W, K, G, L, H, F, T, Q y A.

65 En ejemplos de serpinas procoagulantes modificadas que se describen en el presente documento,

(1) el resto P4 es K, el resto P2 es R, el resto P1 es R y el resto P1' es H;

(2) el resto P4 es F, el resto P2 es K, el resto P1 es R y el resto P1' es K;

5 (3) el resto P4 es F, el resto P2 es R, el resto P1 es R y el resto P1' es K;

(4) el resto P4 es S, el resto P2 es H, el resto P1 es R y el resto P1' es R;

10 (5) el resto P4 es A, el resto P2 es R, el resto P1 es R, y el resto P1' es H;

(6) el resto P4 es A, el resto P2 es K, el resto P1 es R, y el resto P1' es H;

(7) el resto P4 es A, el resto P2 es K, el resto P1 es R, y el resto P1' es K;

15 (8) el resto P4 es A, el resto P2 es K, el resto P1 es R, y el resto P1' es Q, o

(9) el resto P4 es A, el resto P2 es R, el resto P1 es R, y el resto P1' es Q.

20 En algunas serpinas modificadas preferidas, el resto P4 es A, el resto P2 es K, el resto P1 es R y el resto P1' es K.

En alguna divulgación del presente documento, la combinación de los restos en las posiciones P4, P2, y P1' en una serpiente procoagulante modificada como se describe en el presente documento puede no ser de origen natural, es decir, la combinación de los restos en las posiciones P4, P2, y P1' no se encuentran en la serpiente natural de tipo silvestre (es decir, sin modificar) o en otras serpinas de tipo silvestre.

25 Una serpiente modificada como se describe en el presente documento puede comprender la secuencia de una serpiente de tipo silvestre (es decir, no modificada), preferentemente una serpiente de tipo silvestre madura, con una o más mutaciones en el RCL de la misma como se ha descrito anteriormente, opcionalmente una o más mutaciones adicionales fuera del RCL.

30 Las secuencias de las serpinas de tipo silvestre son bien conocidas en la técnica, y pueden incluir las SEQ ID NO: 1 a 11 como se ha expuesto en el presente documento. Las secuencias de las serpinas de tipo silvestre pueden incluir las secuencias de proteínas maduras de tipo silvestre.

35 La secuencia madura del inhibidor de Proteína C (PCI) que incluye su propéptido se corresponde con los restos 20 a 406 de la SEQ ID NO: 1. La α_1 -antitripsina madura se corresponde con los restos 26 a 423 de la SEQ ID NO: 2. La secuencia de inhibidor de esterasa C1 madura se corresponde con los restos 23-500 de la SEQ ID NO: 3. La secuencia de α_2 -antiplasmina madura se corresponde con los restos 28-491 de la SEQ ID NO: 4. La secuencia de antitrombina (ATIII) madura se corresponde con los restos 33-464 de la SEQ ID NO: 5. La secuencia del cofactor II de heparina madura se corresponde con los restos 20-499 de la SEQ ID NO: 6. La secuencia de α_1 -antitripsina (α_1 AT) madura se corresponde con los restos 25-418 de la SEQ ID NO: 7. La secuencia de kalistatina madura se corresponde con los restos 21-427 de la SEQ ID NO: 8. La secuencia del inhibidor de activador del plasminógeno madura se corresponde con la SEQ ID NO: 9. La secuencia del inhibidor dependiente de la proteína Z madura se corresponde con los restos 22-444 de la SEQ ID NO: 10. La secuencia de la isoforma a de la proteasa nexina 1 madura se corresponde con los restos 20-398 de la SEQ ID NO: 11.

50 Otras mutaciones de restos en el RCL como se ha descrito anteriormente, una serpiente modificada puede tener 50 o menos restos de aminoácidos alterados con respecto a una secuencia de aminoácidos de serpiente de tipo silvestre (por ejemplo, la secuencia de serpiente madura de una de las SEQ ID NO: 1 a 11, preferentemente la SEQ ID NO: 1 o 7), preferentemente 45 o menos, 40 o menos, 30 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos o 3 o menos. Por ejemplo, una serpiente modificada puede comprender la secuencia de una serpiente de tipo silvestre con 50 o menos, 45 o menos, 40 o menos, 30 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos o 3 o menos restos de aminoácidos mutados o alterados, además del uno, dos, tres o cuatro restos de aminoácidos del RCL de la serpiente que están mutados o alterados como se ha descrito anteriormente (es decir, los restos en las posiciones P1' y/o P2 y opcionalmente P1 y/o P4).

60 Un resto de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre se puede alterar o mutar por inserción, eliminación o sustitución, preferentemente una sustitución por un resto de aminoácidos diferente. Dichas alteraciones pueden producirse por una o más adición, inserción, eliminación o sustitución de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico codificante.

65 Por ejemplo, una serpiente modificada puede comprender la secuencia de aminoácidos de los restos 25-418 de la SEQ ID NO: 12 que tiene 50 o menos mutaciones, en el que dichas mutaciones están en posiciones distintas de P4, P2, P1 y P1', es decir, el resto P4 del RCL de la serpiente modificada es A, el resto P2 es K, el resto P1 es R y el resto P1' es K.

El resto P4 en la serpina modificada de la SEQ ID NO: 12 se localiza en la posición 379 (355 de la proteína madura), el resto P2 se localiza en la posición 381 (357 de la proteína madura), el resto P1 se localiza en la posición 382 (358 de la proteína madura), y el resto P1' se localiza en la posición 383 (359 de la proteína madura).

5 La serpina modificada puede compartir al menos un 50 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre o una serpina de tipo silvestre, por ejemplo, las secuencias de serpina madura de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 11, preferentemente la SEQ ID NO: 1 o 7, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

10 Por ejemplo, una serpina modificada puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50 % de identidad de secuencias con los restos 25-418 de la SEQ ID NO: 12, en la que el resto P4 del RCL de la serpina modificada es A, el resto P2 es K, el resto P1 es R y el resto P1' es K.

15 La identidad de secuencia se define comúnmente en referencia al algoritmo de GAP (Paquete Wisconsin GCG, Accelerlys Inc, San Diego USA). El GAP utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza en número de coincidencias y minimiza el número de huecos. En general, se utilizan los parámetros por defecto, con una penalización de creación de huecos = 12 y una penalización de extensión de huecos = 4. El uso de GAP puede preferirse, pero se pueden utilizar, por ejemplo, BLAST (que utiliza el método de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (que utiliza el método de Pearson y Lipman (1988)) PNAS USA 85: 2444-2448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), o el programa TBLASTN de Altschul et al. (1990) *supra*, empleando en general los parámetros por defecto. En particular, se puede utilizar el algoritmo psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402). La identidad de secuencia y similitud también se puede determinar utilizando el software Genomequest™ (Gene-IT, Worcester MA USA).

25 Las comparaciones de secuencia se hacen preferentemente sobre la longitud completa de la secuencia relevante descrita en el presente documento.

30 Preferentemente, una serpina procoagulante modificada como se describe en el presente documento comprende el consenso de RCL P17 E, P16 S/E/K/R, P15 G, P14 T/S, P12-P9 (A/G/S)₄.

35 Una serpina modificada puede comprender adicionalmente uno o más restos que están conservados en las secuencias de serpina de tipo silvestre. Por ejemplo, una serpina modificada puede comprender algunos o todos los restos siguientes (numerados de acuerdo con su posición en la α_1 AT): 33F, 49N, 53S, 54P, 56S, 61L, 67G, 72T, 80L, 130F, 147F, 157I, 158N, 161V, 165T, 167G, 169I, 180T, 184L, 186N, 190F, 191K, 192G, 194W, 198F, 203T, 208F, 218V, 220M, 221M, 277Y, 254L, 255P, 289P, 290K, 299L, 303L, 307G, 312F, 316A, 327L, 334H, 342E, 344G, 347A, 369P, 370F, 383L, 384F, 386G, y 391P (Irving et al 2008). Los restos conservados correspondientes en otras secuencias de serpina puede determinarse rápidamente utilizando análisis de secuencia de rutina.

40 Las mutaciones o variaciones fuera del RCL de la serpina modificada puede incluir el remplazo de uno o más restos de Cys en la serpina modificada, tal como el resto C232 (numeración de acuerdo con la secuencia madura) de α_1 AT, para anular la formación de puentes disulfuro u otras modificaciones; eliminación o sustitución de restos en el extremo N de la secuencia de tipo silvestre, por ejemplo, para facilitar la expresión; o la mutación o modificación de resto en los sitios de unión de heparina de las serpinas modificadas (es decir, la hélice D o la hélice H) con el fin de
45 alterar la actividad de unión de la heparina de la serpina modificada.

En alguna divulgación del presente documento, la serpina modificada puede tener un truncado del extremo N con respecto a la serpina de tipo silvestre. Por ejemplo, la serpina modificada puede tener un truncado de 10 a 30 restos en el extremo n, preferentemente aproximadamente 20 restos.

50 Uno de los restos de la serpina modificada pueden ser aminoácidos no naturales, aminoácidos modificados, o D-aminoácidos. El uso de dichos aminoácidos es bien conocido por los expertos en la técnica.

55 Una serpina modificada como se describe en el presente documento puede presentar la estructura secundaria de la serpina de tipo silvestre, por ejemplo, una serpina modificada puede presentar una estructura que comprende 3 láminas beta, 9-9 hélices alfa y un RCL flexible de aproximadamente 20 restos.

60 En alguna divulgación preferida del presente documento, la serpina modificada puede consistir en la secuencia de aminoácidos de serpina de tipo silvestre con una o más mutaciones en el bucle central reactivo (RCL) del mismo como se ha descrito en el presente documento.

Preferentemente, la serpina modificada no es inmunogénica en un ser humano. Por ejemplo, la serpina de tipo silvestre puede ser una serpina humana, preferentemente una serpina plasmática humana.

65 La serpina de tipo silvestre puede ser una α_1 -antiqumotripsina (SERPINA A3), α_2 -antiplasmina (SERPINA F2), antitrombina (ATIII) (SERPINA C1), cofactor II de heparina (HCII) (SERPINA D1), inhibidor de la Proteína C (PCI)

- (SERPINA A5), α_1 -antitripsina (α_1 AT) (SERPINA A1), kalistatina (SERPINA A4), inhibidor -1 del activador de plasminógeno (SERPINA E1), inhibidor de la esterasa C1 (SERPINA G1), proteasa nexina 1 (SERPINA E2) o inhibidor dependiente de la Proteína Z (SERPINA A10) (Whisstock et al JBC. 285 32 24307-24312, Rau et al Journal of Thrombosis and Hemostasis, 5 (Supl. 1): 102-115, Huntington, Journal of Thrombosis and Hemostasis, 9 (Supl. 1): 26-34).
- Preferentemente, la serpina de tipo silvestre es la ATIII, HCII, PCI o α_1 AT, más preferentemente PCI o α_1 AT (Huntington et al Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 113-121; Li et al JBC. 283 51 36039-36045; y Li et al PNAS 2008 105 4661-4666).
- La α_1 -antiquimotripsina (SERPINA A3; ID genético 12) puede tener la secuencia de aminoácidos de NP_001076.2 GI:50659080 (SEQ ID NO: 2) y se puede codificar por la secuencia de nucleótidos de referencia de NM_001085.4 GI:73858562.
- El inhibidor de esterasa C1 (SERPINA G1; ID genético 710) puede tener la secuencia de aminoácidos de referencia de NP_000053.2 GI: 73858568 (SEQ ID NO: 3) y se puede codificar por la secuencia de nucleótidos de referencia de NM_000062.2 GI:73858567.
- La α_2 -antiplasmina (SERPINA F2, ID genético 5345) puede tener la secuencia de aminoácidos de referencia de NP_000925.2 GI:115583663 (SEQ ID NO: 4) y se puede codificar por la secuencia de nucleótidos de referencia de NM_001165920.1 GI:260064047.
- La antitrombina (ATIII) (SERPINA C1, ID genético 462) puede tener la secuencia de aminoácidos de referencia de NP_000925.2 GI:115583663 (SEQ ID NO: 4) y se puede codificar por la secuencia de nucleótidos de referencia de NM_001165920.1 GI:260064047.
- El cofactor II de heparina (HCII) (SERPINA D1, ID genético 3053) puede tener la secuencia de aminoácidos de referencia de NP_000176.2 GI: 73858566 (SEQ ID NO: 6) y se puede codificar por la secuencia de nucleótidos de referencia de NM_000185.3 GI:73858565.
- Inhibidor de la Proteína C (PCI) (SERPINA A5, ID genético 5104) puede tener la secuencia de aminoácidos de referencia de NP_000615.3 GI: 194018472 y se puede codificar por la secuencia de nucleótidos de referencia de NM_000624.5 GI: 401782581. En alguna divulgación del presente documento, el inhibidor de la Proteína C (PCI) puede ser una variante alélica que resulta de una sustitución en SNP rs6115, VAR_013081 (la variante S45N, numeración de acuerdo con la proteína madura incluyendo el propéptido) y tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1. Los restos 1-19 de la SEQ ID NO: 1 se corresponde con la secuencia de señal. En el plasma, el PCI puede existir en forma de longitud completa que incluye el propéptido de restos 20-25 de la SEQ ID NO: 1 (es decir, los restos 20-406 de SEQ ID NO: 1) o la forma escindida en el extremo N que carece del propéptido (es decir, los restos 26-406 de la SEQ ID NO: 1).
- La α_1 -antitripsina (α_1 AT) (SERPINA A1, ID genético 5265) puede tener la secuencia de aminoácidos de referencia de NP_000286.3 GI:50363217 (SEQ ID NO: 7) y se puede codificar por la secuencia de nucleótidos de referencia de NM_000295.4 GI:189163524.
- La kalistatina (SERPINA A4, ID genético 5267) puede tener la secuencia de aminoácidos de referencia de NP_006206.2 GI: 21361302 (SEQ ID NO: 8) y se puede codificar por la secuencia de nucleótidos de referencia de NM_006215.2 GI: 21361301.
- El inhibidor-1 del activador del plasminógeno (SERPINA E1, ID genético 5054) puede tener la secuencia de aminoácidos de referencia de NP_000593.1 GI: 10835159 (SEQ ID NO: 9) y se puede codificar por la secuencia de nucleótidos de referencia de NM_000602.4 GI: 383286745.
- Inhibidor dependiente de la Proteína Z (PZI) (SERPINA A10; ID genético 51156) puede tener la secuencia de aminoácidos de referencia de NP_057270.1 GI: 7705879 (SEQ ID NO: 10) y se puede codificar por la secuencia de nucleótidos de referencia de NM_016186.2 GI: 154759289.
- La proteasa nexina 1 (PN1) (SERPINA E2, ID genético 5270) puede tener la secuencia de aminoácidos de referencia de NP_001130000.1 GI: 24307907, NP_001130002.1 GI: 211904152 o NP_006207.1 GI: 211904156 (SEQ ID NO: 11) y se puede codificar por la secuencia de nucleótidos de referencia de NM_001136528.1 GI: 211904151, NM_001136530.1 GI: 211904155 o NM_006216.3 GI: 211904150.
- Los restos P1', P1, P2 y P4 que pueden estar mutados como se ha descrito anteriormente se resaltan en negrita en las SEQ ID NO: 1 a 11.
- La una o más mutaciones del RCL alteran la especificidad de la serpina modificada con respecto a la serpina de tipo silvestre sin modificar. La serpina modificada presenta una selectividad aumentada por las proteasas

anticoagulantes sobre las proteasas procoagulantes en comparación con la serpina de tipo silvestre.

Preferentemente, la una o más mutaciones en el RCL aumentan la inhibición de la APC mediante la serpina modificada con respecto a la inhibición de otras proteasas de coagulación, en particular una o más proteasas procoagulantes distintas de la trombina, fXa, fVIIa, fIXa y fXIa.

Por ejemplo, la una o más mutaciones en el RCL de la serpina modificada puede aumentar la inhibición de la APC mediante la serpina modificada con respecto a la inhibición de la trombina. La inhibición selectiva de APC con respecto a la trombina puede aumentarse en presencia o ausencia de heparina.

Además, la una o más mutaciones en el RCL de la serpina modificada puede aumentar la inhibición de la APC mediante la serpina modificada con respecto a la inhibición de 1, 2, 3 o las 4 proteasas procoagulantes fXa, fVIIa, fIXa y fXIa.

Una serpina modificada como se describe en el presente documento presenta una mayor inhibición de APC con respecto a trombina y otras proteínas procoagulantes que la serpina de tipo silvestre sin modificar.

La serpina modificada puede presentar una mayor inhibición de la APC que inhibición de trombina. Por ejemplo, la inhibición de la APC por la serpina modificada puede ser al menos 5 veces más, al menos 10 veces más, al menos 100 o al menos 1000 veces más que la inhibición de la trombina mediante la serpina modificada. En algunas realizaciones, la serpina modificada puede inhibir la APC con una constante de velocidad de segundo orden (k_2) que es al menos 5 veces más, 10 veces más, al menos 100 o al menos 1000 veces más que la constante de velocidad de segundo orden para la inhibición de la trombina. Preferentemente la estequiometría de la inhibición de la serpina modificada por la APC es 1.

Preferentemente, una serpina modificada como se describe en el presente documento se puede unir e inhibir la APC, pero no presentar una unión o inhibición o sustancialmente no se une o inhibe a la trombina.

La una o más mutaciones en el RCL también puede aumentar la inhibición de la APC con respecto a la inhibición de 1, 2, 3 o las 4 de fVIIa, fIXa, fXa y fXIa. La inhibición de la APC con respecto a fVIIa, fIXa, fXa y/o fXIa puede estar aumentada en presencia o ausencia de heparina.

Por ejemplo, la serpina modificada puede presentar una mayor inhibición de la APC con respecto a 1, 2, 3 o las 4 de fVIIa, fIXa, fXa y fXIa que la serpina de tipo silvestre.

La serpina modificada puede inhibir la APC más de lo que inhibe el fVIIa. Por ejemplo, la inhibición de la APC por la serpina modificada puede ser al menos 2 veces más, al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, o al menos 1000 veces más que la inhibición del fVIIa por la serpina modificada. La serpina modificada inhibe la APC con una constante de velocidad de segundo orden (k_2) que es al menos 2 veces más, al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, o al menos 1000 veces más que la constante de velocidad de segundo orden para la inhibición del fVIIa.

La serpina modificada puede inhibir la APC más de lo que inhibe el fIXa. Por ejemplo, la inhibición de la APC por la serpina modificada puede ser al menos 2 veces más, al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, o al menos 1000 veces más que la inhibición del fIXa por la serpina modificada. La serpina modificada inhibe la APC con una constante de velocidad de segundo orden (k_2) que es al menos 2 veces más, al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, o al menos 1000 veces más que la constante de velocidad de segundo orden para la inhibición del fIXa.

La serpina modificada puede inhibir la APC más de lo que inhibe el fXa. Por ejemplo, la inhibición de la APC por la serpina modificada puede ser al menos 2 veces más, al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, o al menos 1000 veces más que la inhibición del fXa por la serpina modificada. La serpina modificada inhibe la APC con una constante de velocidad de segundo orden (k_2) que es al menos 2 veces más, al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, o al menos 1000 veces más que la constante de velocidad de segundo orden para la inhibición del fXa.

La serpina modificada puede inhibir la APC más de lo que inhibe el fXIa. Por ejemplo, la inhibición de la APC por la serpina modificada puede ser al menos 2 veces más, al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, o al menos 1000 veces más que la inhibición del fXIa por la serpina modificada. La serpina modificada inhibe la APC con una constante de velocidad de segundo orden (k_2) que es al menos 2 veces más, al menos 10 veces más, al menos 100 veces más, o al menos 1000 veces más que la constante de velocidad de segundo orden para la inhibición del fXIa.

Una serpina modificada como se describe en el presente documento puede ser parte de una proteína de fusión que contienen una o más secuencias de aminoácidos heterólogas adicionales a la secuencia de serpina modificada. Por ejemplo, la proteína de fusión que comprende la serpina modificada puede comprender adicionalmente uno o más dominios adicionales que mejoran la estabilidad, farmacocinética, direccionamiento, afinidad, propiedades de purificación y producción de la serpina modificada.

Los dominios adicionales adecuados incluyen dominios Fc de inmunoglobulinas. Los dominios Fc de

inmunoglobulinas se conocen bien en la técnica e incluyen el dominio Fc de IgG1 humana. Un dominio Fc de inmunoglobulina humana puede localizarse en el extremo N o extremo C de la serpina modificada.

5 Las serpinas modificadas que se describen en el presente documento se pueden proporcionar utilizando técnicas de síntesis o recombinantes que son convencionales en la técnica.

10 En alguna divulgación del presente documento, la serpina modificada se puede producir como una proteína de fusión que comprende adicionalmente un marcador de afinidad, que puede ser, por ejemplo, útil para la purificación. Un marcador de afinidad es una secuencia peptídica heteróloga que forma un miembro de un par de unión específica. Los polipéptidos que contienen el marcador se pueden purificar por la unión del otro miembro del par de unión específica al polipéptido, por ejemplo, en una columna de afinidad. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede formar un epítipo que se une a una molécula de anticuerpo.

15 Los marcadores de afinidad adecuados incluyen por ejemplo, glutatión-S-transferasa (GST), dominio de unión a maltosa (MBD), MRGS(H)₆, DYKDDDDK (FLAGTM), T7-, S- (KETAAAKFERQHMDS), poli-Arg (R₅₋₆), poli-His (H₂₋₁₀), poli-Cys (C₄) poli-Phe (F₁₁) poli-Asp (D₅₋₁₆), SUMO marcador (Invitrogen, sistema de expresión Champion pET SUMO), marcador Strept-II (WSHPQFEK), c-myc (EQKLISEEDL), marcador Influenza-HA (Murray, P. J. et al (1995) Anal Biochem 229, 170-9), marcador Glu-Glu-Phe (Stammers, D. K. et al (1991) FEBS Lett 283, 298-302), Marcador.100 (Qiagen; marcador derivado de la MAP cinasa 2 de mamíferos con 12 aa), marcador Cruz 09TM (MKAEFRRQESDR, Santa Cruz Biotechnology Inc.) y marcador Cruz 22TM (MRDALDRLDRLA, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Se revisan secuencias marcadoras conocidas en Terpe (2003) Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 523-533. En divulgaciones preferidas del presente documento se pueden utilizar un marcador poli-His tal como (H)₆, marcador His-SUMO (Invitrogen, sistema de expresión Champion pET SUMO), o MRGS(H)₆.

25 La secuencia marcadora de afinidad se puede separar de la serpina modificada después de la purificación, por ejemplo, utilizando proteasas específicas del sitio.

30 En alguna divulgación del presente documento, la serpina modificada se puede acoplar a un péptido líder de señal apropiado para dirigir la secreción del polipéptido de fusión de la célula al medio de cultivo. Se conoce un intervalo de péptidos líder de señal adecuados en la técnica. El péptido líder de señal puede ser una secuencia de señal de serpina o puede ser heterólogo a la serpina modificada, es decir, puede ser una secuencia de señal no serpínica. Por ejemplo, se puede emplear una señal de secreción factor- α o secuencia de señal BiP. Preferentemente, el péptido de señal se elimina mediante el procesamiento postraduccional después de la expresión del polipéptido.

35 Las serpinas modificadas como se describen en el presente documento pueden estar aisladas, en el sentido de estar libres de contaminantes, tales como serpinas sin modificar y otros polipéptidos y/o componentes del suero.

40 Las serpinas modificadas como se describen en el presente documento pueden inhibir una o más actividades de la Proteína C activada (APC). Por ejemplo, las serpinas modificadas como se describen en el presente documento pueden inhibir la escisión proteolítica de uno o más sustratos de la APC, tal como fVa o fVIIIa. Por ejemplo, la unión de la serpina modificada a la APC puede dar como resultado una disminución de al menos 5 veces, al menos 10 veces, o al menos 15 veces de la escisión proteolítica de fVa, fVIIIa y/u otro sustrato de la APC. En algunas realizaciones, la unión a la APC de la serpina modificada puede dar como resultado que no se pueda detectar una escisión del sustrato fVa, fVIIIa por la APC.

45 Las técnicas para la medición de la actividad de la APC, por ejemplo, midiendo la escisión proteolítica de los sustratos de la APC *in vitro* son convencionales en la técnica y se describen en el presente documento. Los ensayos adecuados para su uso en la determinación de la actividad de la APC incluyen ensayos cinéticos convencionales, por ejemplo, para medir las constantes de velocidad y los ensayos de coagulación, incluyendo los ensayos de 50 generación de trombina (TGA).

55 Las técnicas para la medición de la actividad de proteasas procoagulantes, por ejemplo, midiendo la escisión proteolítica de sustratos cromogénicos *in vitro* son convencionales en la técnica y se describen en el presente documento. Los ensayos adecuados para su uso en la determinación de la actividad de la APC incluyen ensayos cinéticos convencionales, por ejemplo, para medir las constantes de velocidad y los ensayos de coagulación, incluyendo los ensayos de generación de trombina (TGA), ensayos de tiempo de protrombina (TP) y ensayos de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa).

60 En alguna divulgación del presente documento, las serpinas modificadas como se describen en el presente documento se pueden modificar adicionalmente mediante modificación química, por ejemplo, mediante PEGilación, o mediante la incorporación en un liposoma, para mejorar sus propiedades farmacéuticas, por ejemplo, aumentando la semivida *in vivo*.

65 Una serpina modificada como se describe en el presente documento se puede unir a uno o más polietilenglicoles (PEG) u otros restos para aumentar la semivida *in vivo* de la serpina modificada (Cantín et al. 2002, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 27; 659-665). Por ejemplo, una serpina modificada puede estar mono-pegilada o poli-pegilada (por

ejemplo, con 2-6 restos de PEG). Los métodos de pegilación adecuados se conocen bien en la técnica.

Se puede determinar el efecto de una serpina modificada sobre la coagulación y el sangrado. Las técnicas adecuadas son convencionales en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar el efecto de una serpina modificada sobre la generación de trombina utilizando un ensayo de generación de trombina (TGA) o un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada o un ensayo de tiempo de protrombina que se describe en el presente documento. Otros modelos de coagulación adecuados se conocen bien en la técnica.

Otros aspectos de la invención proporcionan un ácido nucleico que codifica una serpina modificada como se ha descrito anteriormente y un vector que comprende dicho ácido nucleico.

Los vectores adecuados que se pueden escoger o construir, contienen las secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias amplificadoras, indicadores genéticos y otras secuencias según sea apropiado. Preferentemente, el vector contiene las secuencias reguladoras apropiadas para dirigir la expresión del ácido nucleico en células de mamífero. Un vector también puede comprender secuencias, tales como orígenes de replicación, regiones promotoras e indicadores genéticos, que permitan su selección, expresión y replicación en huéspedes bacterianos tales como *E. coli*.

Los vectores pueden ser plásmidos, víricos, por ejemplo, fagos o fagémidos, según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª edición, Russell et al., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos para la modificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, para la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en las células y expresión genética, se describen con detalle en Curten Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds. John Wiley & Son, 1992.

Un ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento se puede introducir en una célula huésped.

Otro aspecto de la invención proporciona una célula recombinante que comprende un ácido nucleico o vector que expresa un polipéptido que comprende o consiste en una serpina modificada como se ha descrito anteriormente.

Se conocen en la técnica un intervalo de células huésped adecuadas para la producción de serpinas modificadas recombinantes. Las células huésped adecuadas pueden incluir células procariotas, en particular bacterias tales como *Escherichia coli* y *Lactococcus lactis* y células eucariotas, que incluyen células de mamífero tales como CHO o líneas celulares derivadas de CHO (células de Lee), HeLa, COS, HEK293, y células HEK-EBNA, células de anfibio tales como oocitos de *Xenopus*, células de insecto tales como *Trichoplusia ni*, Sf9, y Sf21 y células de levaduras, tales como *Pichia pastoris*.

Las técnicas para la introducción de un ácido nucleico en las células están bien establecidas en la técnica y se puede emplear cualquier técnica adecuada, de acuerdo con las circunstancias particulares. Para las células eucariotas las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato cálcico, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción utilizando retrovirus u otros virus, por ejemplo, adenovirus, AAV, lentivirus o vaccinia. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación en cloruro cálcico, electroporación y transfección utilizando bacteriófagos.

Los indicadores genéticos tales como los genes de resistencia o sensibilidad a antibióticos se pueden utilizar para la identificación de clones que contienen el ácido nucleico de interés, como se conoce bien en la técnica.

El ácido nucleico introducido puede ser sobre un vector extra-cromosómico en la célula o el ácido nucleico se puede integrar en el genoma de la célula huésped. La integración se puede promover por la inclusión de secuencias en el ácido nucleico o vector que promuevan la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas convencionales.

En alguna divulgación del presente documento, el ácido nucleico que codifica una serpina modificada como se describe en el presente documento puede estar contenido en un vector adecuado para la administración a un individuo, por ejemplo, para aplicaciones de terapia genética. Los vectores adecuados incluyen vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, vectores adenovíricos o vectores AAV.

La introducción puede continuar con la expresión del ácido nucleico para producir la serpina modificada codificada. En alguna divulgación del presente documento, las células huésped (que pueden incluir células transformadas actualmente, aunque más frecuentemente las células serán descendientes de las células transformadas) se pueden cultivar *in vitro* en condiciones para la expresión del ácido nucleico, de manera que se produzca la serpina polipeptídica codificada. Cuando se utiliza un promotor inducible, la expresión puede necesitar la activación del promotor inducible.

El polipéptido expresado que comprende o consiste en la serpina modificada se puede aislar y/o purificar, después de la producción. Esto se puede conseguir utilizando cualquier método conveniente conocido en la técnica. Las técnicas para la purificación de polipéptidos recombinantes se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo,

HPLC, FPLC, o cromatografía de afinidad En alguna divulgación del presente documento, la purificación se puede llevar a cabo utilizando un marcador de afinidad en el polipéptido como se ha descrito anteriormente.

5 Otra divulgación del presente documento proporciona un método de producción de una serpina modificada que comprende la expresión de un ácido nucleico que codifica una serpina modificada como se ha descrito anteriormente en una célula huésped y opcionalmente el aislamiento y/o purificación de la serpina producida de esta manera.

10 Los polipéptidos que comprende o consisten en una serpina modificada producida como se ha descrito se puede investigar adicionalmente, por ejemplo, se pueden determinar sus propiedades farmacológicas y/o actividad. Los métodos y medios de análisis proteico se conocen bien en la técnica.

15 Una serpina modificada como se describe en el presente documento, el ácido nucleico que codifica una serpina modificada o una célula recombinante que expresa una serpina modificada, pueden ser útiles en terapias. Por ejemplo, una serpina modificada como se describe en el presente documento, un ácido nucleico que codifica la serpina modificada o una célula recombinante que expresa una serpina modificada se pueden administrar a un individuo para el tratamiento de hemorragias.

20 Aunque la serpina modificada se puede administrar sola, las serpinas modificadas se administrarán habitualmente en forma de composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además de la serpina modificada, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la serpina modificada o una célula recombinante que expresa la serpina modificada. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, además de la serpina modificada, ácido nucleico o célula, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. La expresión "farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en el presente documento se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, en el alcance del sano juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesivos, teniendo en cuenta una relación riesgo/beneficio razonable. Cada vehículo, excipiente, etc. debe ser también "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser en embolada, infusión, inyección o cualquier otra ruta adecuada, según se expone posteriormente.

35 En alguna divulgación del presente documento, las serpinas modificadas, ácidos nucleicos o células se pueden proporcionar en forma liofilizada para su reconstitución antes de la administración. Por ejemplo, las serpinas liofilizadas se pueden reconstituir en agua estéril y mezclarse con solución salina antes de la administración a un individuo.

40 Para la vía parenteral, por ejemplo, por administración subcutánea o intravenosa, por ejemplo, mediante inyección, la composición farmacéutica que comprende la serpina modificada, el ácido nucleico o la célula puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son bien capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como el cloruro sódico por inyección, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato, conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes, y/u otros aditivos se pueden emplear según se necesitan que incluyen tampones tales como de fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, tales como el ácido ascórbico, metionina; conservantes (tales como el cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos, tales como el metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3'-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas, polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como la glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trealosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn -proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Los vehículos, excipientes, etc. adecuados se pueden encontrar en los textos farmacéuticos convencionales, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990.

60 Las composiciones y formulaciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se puede preparar por cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. Dichos métodos incluyen la etapa de poner en asociación la serpina modificada con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones ser preparan para poner en asociación uniforme e íntimamente el compuesto activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos divididos finamente o ambos, y luego si es necesario dar forma al producto.

65 Preferentemente, las serpinas modificadas, ácidos nucleicos o células como se describen en el presente documento se formulan en una composición farmacéutica para la administración intravenosa o subcutánea.

Una composición farmacéutica que comprende una serpina modificada, un ácido nucleico o una célula se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, sea simultánea o secuencialmente dependiendo de la afección que se vaya a tratar.

5 Una serpina modificada, un ácido nucleico o célula como se describe en el presente documento se puede utilizar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal, incluyendo el tratamiento terapéutico y profiláctico o preventivo (por ejemplo, el tratamiento antes de la aparición de una afección en un individuo para reducir el riesgo de que exista la afección en el individuo; retrasar su aparición; o reducir su gravedad después de la aparición). El método de tratamiento puede comprender la administración de una serpina modificada a un individuo que necesita la misma.

10 Un individuo adecuado para el tratamiento como se ha descrito anteriormente puede ser un mamífero, tal como un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, un ratón), murino (por ejemplo, un ratón), canino (por ejemplo, un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo, un caballo), un primate, simio (por ejemplo, un mono o simio), un mono (por ejemplo, un tití, babuino), un simio (por ejemplo, un gorila, chimpancé, orangután, gibón), o un ser humano.

15 En alguna divulgación del presente documento, el individuo es un ser humano. En otra divulgación del presente documento, se pueden emplear mamíferos no humanos, especialmente mamíferos que se utilizan convencionalmente como modelos para demostrar la eficacia terapéutica en seres humanos (por ejemplo, animales murinos, primates, porcinos, caninos o conejos). La inhibición de la APC humana y murina por serpinas modificadas sin inhibición de la trombina humana o murina se muestra posteriormente.

20 La administración es normalmente en una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad profilácticamente eficaz", siendo esta suficiente para demostrar un beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad actual que se administra, y la tasa y curso en el tiempo de la administración, dependerá de la naturaleza y la gravedad de que se va a tratar, el mamífero en particular que se va a tratar, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro de la composición, el método de administración, la programación de administración y otros factores conocidos por los facultativos médicos.

25 Una composición se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, sea simultánea o secuencialmente dependiendo de las circunstancias del individuo que se va a tratar.

30 La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., es responsabilidad de los facultativos generales y otros doctores médicos y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o progresión de una enfermedad que se va a tratar. Las dosis apropiadas de los polipéptidos terapéuticos se conocen bien en la técnica (Ledermann J.A. et al. (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664; Bagshawe K.D. et al. (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922). Las dosificaciones específicas se pueden indicar en el presente documento o en the *Physician's Desk Reference* (2003) según sea apropiado para que se pueda utilizar el tipo de medicamento que se va a administrar. Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis adecuada de una serpina modificada se puede determinar comparando su actividad *in vitro* y su actividad *in vivo* en un modelo animal. Los métodos de extrapolación de las dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de ensayo a los seres humanos se conocen. La dosis precisa dependerá de varios factores, incluyendo si la serpina modificada es para la prevención o el tratamiento, el tamaño y localización del área que se va a tratar, la naturaleza de la serpina modificada y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida a la serpina modificada.

35 Una dosis de serpina modificada típica estará en el intervalo de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg, por ejemplo, 1 a 80 mg/kg. Por ejemplo, se puede utilizar una dosis en el intervalo de 100 µg a 1 g para aplicaciones sistémicas, y 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. Se puede administrar una dosis de carga inicial mayor, seguida por una o más dosis más bajas. Esto es una dosis para un tratamiento único de un paciente adulto, que se puede ajustar proporcionalmente para niños y bebés, y también se ajusta para otros formatos de serpina modificada en proporción al peso molecular. Los tratamientos se pueden repetir en intervalos diarios, de dos veces a la semana, semanales o mensuales, a discreción del médico. El calendario de tratamiento para un individuo puede depender de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la composición de serpina modificada, la vía de administración y la naturaleza de la afección que se va a tratar.

40 El tratamiento puede ser periódico, y el periodo entre administraciones puede ser de aproximadamente una semana o más, por ejemplo, aproximadamente dos semanas o más, aproximadamente tres semanas o más, aproximadamente cuatro semanas o más, aproximadamente una vez al mes o más, aproximadamente cinco semanas o más, o aproximadamente seis semanas o más. Por ejemplo, el tratamiento puede ser cada dos a cuatro semanas o cada cuatro a ocho semanas. El tratamiento se puede dar antes, y/o después de una cirugía y/o se puede administrar o aplicar directamente en el sitio anatómico del traumatismo, tratamiento quirúrgico o procedimiento invasivo. Las formulaciones adecuadas y las vías de administración se han descrito anteriormente.

45 En alguna divulgación del presente documento, las serpinas modificadas como se describe en el presente documento se pueden administrar como inyecciones subcutáneas. Las inyecciones subcutáneas se pueden

administrar utilizando un auto inyector, por ejemplo, para la profilaxis/tratamiento a largo plazo.

En alguna divulgación del presente documento, el efecto terapéutico de la serpina modificada puede persistir varias semividas, dependiendo de la dosis.

5 Las serpinas modificadas que se describen en el presente documento inhiben la APC sin inhibir o inhibir sustancialmente los factores procoagulantes, tales como la trombina, y puede ser útil en el tratamiento de la hemorragia y trastornos hemorrágicos; en particular los trastornos producidos por la reducción de generación de trombina o el aumento de la actividad de la ruta anticoagulante de la APC.

10 La hemostasia es la coagulación normal en respuesta a una lesión, es decir, evita el sangrado o la hemorragia, por ejemplo, de un vaso sanguíneo dañado. La hemostasia detiene el sangrado y la hemorragia de los vasos sanguíneos del cuerpo. Las serpinas modificadas pueden promover la hemostasia, es decir, promueven o aumentan la detención del sangrado y la hemorragia de los vasos sanguíneos del cuerpo, por ejemplo, en individuos con trastornos hemorrágicos o un traumatismo.

15 La divulgación proporciona; una serpina modificada como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal; una serpina modificada como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de una hemorragia o la promoción de la hemostasia; el uso de una serpina modificada como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hemorragia o la promoción de la hemostasia; y un método de tratamiento o la promoción de la hemostasia que comprende la administración de una serpina modificada como se describe en el presente documento a un individuo que necesita la misma.

25 El sangrado puede incluir el sangrado y la hemorragia de los vasos sanguíneos del cuerpo.

Un individuo adecuado para el tratamiento con una serpina modificada como se describe en el presente documento puede tener un trastorno hemorrágico.

30 Los trastornos hemorrágicos pueden producirse o se asocian con una generación reducida de trombina o un aumento de la actividad de la ruta anticoagulante de la APC.

35 Los trastornos hemorrágicos pueden incluir cualquier trastorno hemorrágico congénito o adquirido en el que hay una generación reducida de trombina, una formación reducida del coágulo de fibrina o una estabilidad reducida del coágulo. Por ejemplo, los trastornos hemorrágicos pueden incluir las deficiencias congénitas de los factores VII, VIII, X, IX, XI y XIII; deficiencia combinada de V y VIII; deficiencia de protrombina, deficiencia de fibrina; y deficiencias raras de otros factores de coagulación; hemofilia A, B y C; aumento de sangrado asociada con hiperfibrinólisis; aumento del sangrado debido a la reducción del recuento plaquetario o reducción de la función plaquetaria; y enfermedad de von Willebrand.

40 Los trastornos hemorrágicos adquiridos pueden incluir la coagulopatía de dilución asociada con una pérdida grande de sangre, la hemorragia resultante de un traumatismo y cirugía y los efectos de la terapia anticoagulante.

45 En alguna divulgación del presente documento, el individuo puede ser resistente a los factores de coagulación exógenos, tales como el fVIII o fIX exógenos. Por ejemplo, los fVIII o fIX exógenos puede dar lugar a una respuesta inmunitaria en el individuo, por ejemplo, la producción de aloanticuerpos inhibidores.

50 Un individuo adecuado para el tratamiento con una serpina modificada como se describe en el presente documento puede tener un trastorno hemorrágico adquirido, tal como una hemorragia relacionada con un traumatismo, cirugía o terapia anticoagulante. Por ejemplo, un individuo adecuado para el tratamiento con una serpina modificada como se describe en el presente documento puede haber sufrido un traumatismo; o puede haberse sometido o va a someterse a una cirugía o terapia anticoagulante. Los individuos adecuados pueden tener un sangrado o riesgo de sangrado de uno o más vasos sanguíneos del cuerpo.

55 En alguna divulgación del presente documento, una serpina modificada como se describe en el presente documento puede ser útil en la prevención o el tratamiento de i) sangrado en pacientes con aloanticuerpos contra factores de coagulación; ii) sangrado en pacientes con alto riesgo de desarrollo de un inhibidor, por ejemplo, para evitar el desarrollo de aloanticuerpos; iii) sangrado en pacientes con deficiencia del factor VIII en ausencia de inhibidores; iv) sangrado en pacientes con trastornos hemorrágicos congénitos, por ejemplo, un trastorno hemorrágico congénito para el que no haya una terapia de remplazo óptimo recombinante, tal como una deficiencia grave del factor VII, deficiencia del factor XI, deficiencia combinada VIII y V, deficiencia del factor X y deficiencia del factor V; v) sangrado en pacientes con hemofilia, por ejemplo, pacientes para los que la terapia de remplazo es inapropiada o no disponible; o vi) sangrado adquirido, que incluye el sangrado relacionado con traumatismos, cirugía, y terapia con anticoagulantes.

65 Otra divulgación del presente documento proporciona el uso de una serpina modificada como se describe en el

presente documento como un procoagulante y el uso de una serpina modificada para inhibir la APC en el tratamiento de hemorragias.

5 Distintos aspectos adicionales y realizaciones de la presente invención serán aparentes para los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación.

10 Otros aspectos y realizaciones de la invención proporcionan los aspectos y realizaciones descritos anteriormente con la expresión "que comprende" sustituida por la expresión "que consiste en" y los aspectos y realizaciones descritos anteriormente con la expresión "que comprende" sustituida por la expresión "que consiste esencialmente en".

15 Se tiene que entender que la solicitud desvela todas las combinaciones de cualquiera de los aspectos anteriores y las realizaciones descritas anteriormente entre ellos, a menos de que el contexto demande otra cosa. De manera similar, la aplicación desvela todas las combinaciones de las características preferidas y/u opcionales sea únicamente o junto con cualquiera de otros aspectos, a menos de que el contexto demande otra cosa.

20 "y/o" cuando se utiliza en el presente documento se tiene que tomar como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con y sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" se tiene que tomar como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, justo como si cada uno se expusieran individualmente en el presente documento.

Ciertos aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán ahora por medio de ejemplos y con referencia a las figuras descritas anteriormente y las tablas descritas posteriormente.

25 La Tabla 1 muestra constantes de velocidad de segundo orden para la inhibición de trombina y APC por el A22 PCI (un PCI con el extremo N truncado, que comienza con Ala22, la numeración utiliza la secuencia de la proteína madura, incluyendo el propéptido), FL α_1 AT Pitts (α_1 AT de longitud completa con la mutación P1R Pittsburgh (Pitts)) y sus variantes. Se muestran los errores estándar. * La constante de velocidad de la inhibición para la trombina por la variante P2KP1' de PCI es una estimación ya que después de la inhibición inicial, las reacciones parece que no alcanzan la inhibición completa, potencialmente debido a que la serpina es transportada abajo en la ruta del sustrato o la disociación del complejo inhibidor serpina: proteasa.

30

35 La Tabla 2 muestra las constantes de velocidad de segundo orden para la inhibición de la trombina y la APC por el PCI y sus variantes en presencia de heparina. Se muestran los errores estándar. * la constante de velocidad de la inhibición para la trombina por la variante P2KP1'K del PCI es una estimación de la pendiente inicial del gráfico de la actividad residual de trombina frente al tiempo. La inhibición completa no se conseguía debido a que la serpina es transportada abajo en la ruta del sustrato o la disociación del complejo inhibidor serpina: proteasa.

40 La Tabla 3 muestra las constantes de velocidad de segundo orden para la inhibición de fXa por el α_1 AT Pitts y el PCI y sus variantes. Se muestran los errores estándar.

45 La Tabla 4 muestra las constantes de velocidad de segundo orden para la inhibición de fXIa por el PCI y la variante PCI P2KP1'K. La inhibición de la APC se muestra para compararla (de la Tabla 12). Se muestran los errores estándar.

50 La Tabla 5 muestra las constantes de velocidad de segundo orden para la inhibición de trombina y APC por las variantes de PCI generadas por mutagénesis aleatoria dirigida. Se muestran los errores estándar. Las constantes para el PCI de TS y P2KP1' se muestran para compararlas. * la constante de velocidad de la inhibición para la trombina por la variante P2KP1' de PCI es una estimación ya que después de la inhibición inicial, no parece que las reacciones consigan una inhibición completa, potencialmente debido a que la serpina es transportada abajo en la ruta del sustrato o la disociación del complejo inhibidor covalente serpina: proteasa.

55 La Tabla 6 muestra constantes de velocidad de segundo orden para la inhibición de fXIa por FL α_1 AT Pitts C232S y su variante P2KP1'K. La inhibición de APC se muestra para comparación (de la Tabla 1). Se muestran los errores estándar.

60 La Tabla 7 muestra una fracción de las secuencias del RCL de las variantes de PCI determinadas por mutagénesis aleatoria dirigida para que sean específicas para la inhibición de APC sobre la inhibición de trombina. Las secuencias que se muestran son de un experimento inicial en el que se evaluaron 88 mutantes. Los restos P4, P2 y P1' que se variaron en este experimento se muestran en negrita. Las secuencias de PCI de TS y P2KP1'K PCI se muestran para compararlas.

65 La Tabla 8 muestra una fracción de las secuencias del RCL de las variantes de PCI determinadas por mutagénesis aleatoria dirigida para que sean específicas para la inhibición de APC sobre la inhibición de trombina. Las secuencias que se muestran son de un experimento inicial en el que se evaluaron 460 mutantes. Los restos P4, P2 y P1' que se variaron en este experimento se muestran en negrita. Las secuencias de PCI de TS y P2KP1'K PCI se

muestran para compararlas.

5 La Tabla 9 muestra una fracción de las secuencias del RCL de las variantes α_1 AT determinadas por mutagénesis aleatoria dirigida para que sean específicas para la inhibición de APC sobre la inhibición de trombina. Las secuencias se muestran comparadas con α_1 AT de TS y α_1 AT Pitts. Los restos P2 y P1' se muestran en negrita, los restos P1 están subrayadas. Los prefijos muestran la biblioteca de origen del mutante en particular viniendo de los mutantes denotados como P2.nr de la biblioteca de variantes de P2, viniendo P1'.nr de la biblioteca de variantes de P1' y viniendo los mutantes marcados como 1-5.nr de las placas 1-5 de la biblioteca de variantes de P2P1'.

10 La Tabla 10 muestra las constantes de velocidad de segundo orden para la inhibición de trombina y APC por un subconjunto de variantes de α_1 AT determinadas por mutagénesis aleatoria dirigida para que sean más específicas de la APC que de la trombina. Se muestran los errores estándar. Las constantes de velocidad de segundo orden de la inhibición de la trombina y la APC por FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K y FL α_1 AT Pitts C232S se dan para su comparación.

15 La Tabla 11 muestra los resultados de los ensayos de TP y TTPa para investigar la inhibición de proteasas procoagulantes por los mejores de la mutagénesis aleatoria sobre el fondo de FL α_1 AT Pitts C232S. Los ensayos de TP se llevaron a cabo utilizando plasma diluido 1/4 para aumentar la sensibilidad del ensayo y se llevaron a cabo por triplicado, excepto para las reacciones que se muestran para el FL α_1 AT Pitts C232S P2RP1C, que se llevaron a cabo por duplicado. El error que se muestra es la desviación típica. Los ensayos de TTPa eran experimentos únicos, no se muestra el error. Para ambos TP y TTPa se añadió un tampón de único control, en vez de la proteína, el tampón (TBS) al plasma se utilizó como control. Los aumentos del TP o TTPa con respecto al control son una indicación de la inhibición de las proteasas procoagulantes. Para ambos ensayos TP y TTPa, se utilizaron mutantes de serpina a una concentración de 5 μ M. Para la comparación, se muestran los mutantes P2K y P1'K como una media de triplicados. Como se muestra por las constantes de velocidad de inhibición en las Tablas 1 y 3, estos mutantes presentan una alta especificidad por la APC por encima de la trombina, pero inhiben significativamente el fXa. Por lo tanto, son buenos comparadores de una inhibición de proteasas procoagulantes distintas de la trombina. ND indica no determinado.

30 La Tabla 12 muestra las constantes de velocidad de segundo orden para la inhibición de fXa por variantes de α_1 AT de la mutagénesis aleatoria dirigida. Los mutantes evaluados aquí presentaban especificidad por la APC sobre la trombina, inhibición sustancial de APC y no presentaban una prolongación del TP. Sobre todo, presentaban también solo una mínima prolongación del TTPa. Debido a estas características, se seleccionaron para análisis posteriores. Para la comparación se muestran también, la inhibición de fXa por FL α_1 AT Pitts C232S y FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K (de la tabla 3).

40 La Tabla 13 muestra un resumen de la caracterización de dos mutante más de α_1 AT descubiertos por la combinación de la información de la mutagénesis aleatoria y racional. Se muestran el FL α_1 AT Pitts C232S y FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K C232S para su comparación (datos de las Tablas 1 y 3 y la Figura 5). Los TTPa para P2RP1'Q y P2KP1'Q son la media de cuatro mediciones diferentes, el error se muestra como la desviación típica. El valor obtenido para el plasma con tampón se muestra entre corchetes, de nuevo con la desviación típica que se muestra como el error. Los TTPa presentados para Pitts y P2KP1'K son el resultado de al menos tres mediciones diferentes, el error que se muestra es la desviación típica. El valor que se muestra en corchetes es el valor obtenido para el plasma con tampón, que se muestra con la desviación típica como el error. Todos los TTPa se obtuvieron utilizando una concentración final de 5 μ M de serpina. El FL α_1 AT Pitts C232S a esta concentración hacía que el plasma no se pudiera coagular. El valor de 300 s que se muestra es el corte del ensayo. Las constantes de velocidad de segundo orden para la inhibición de trombina, APC y fXa por las variantes se muestran con el error estándar.

50 Experimentos

La cascada de coagulación y el papel regulador de las serpinas en esta cascada se muestran en la Figura 1. Dos rutas dan lugar a la activación de la cascada de coagulación, la cascada extrínseca (o ruta del factor tisular) y la ruta intrínseca (ruta de activación por contacto). Se cree que la ruta fisiológica principal de la activación es la ruta extrínseca. En esta ruta, el factor tisular (FT) se expone sobre la superficie del vaso sanguíneo dañado. El FT puede unirse entonces al fVIIa y fVII. El FT: fVIIa activa el fVII, así como el FT: fVII se activa espontáneamente a FT: fVIIa. El FT: fVIIa activa el fX a fXa y esto activa la protrombina a trombina (fIIa); la proteasa central de la cascada de coagulación. La trombina activa las plaquetas por escisión de los receptores activados por proteasa (PAR) y escinde el fibrinógeno a fibrina. La fibrina se entrecruza con el fXIIIa, que se activa a si mismo por la trombina, para formar el coágulo de fibrina estable. Además, la trombina activa un mecanismo de retroalimentación para potenciar su propia formación. Esto activa el fVIII a fVIIIa y fV a fVa. El fVIIIa se une al fIXa para formar el complejo tenasa (Xasa) intrínseco. La Xasa intrínseca activa más fX. Esta fXa puede unirse a fVa para formar la protrombinasa. La protrombinasa activa la protrombina a trombina y es responsable de la mayoría de la trombina generada después del inicio de la coagulación. Además del mecanismo de retroalimentación positivo de trombina, la trombina también puede parar su propia activación mediante un mecanismo de retroalimentación negativo. Cuando se une a su cofactor trombomodulina (TM), el complejo trombina:TM puede activar la proteína C (PC) en proteína C activada

(APC). La APC escinde e inactiva tanto el fVIIIa como el fVa, parando eficazmente la generación de trombina. Las serpinas son importantes inhibidores de la cascada de coagulación. Las acciones inhibitoras de las serpinas inhibitoras de la proteína C (PCI), antitrombina (ATIII), cofactor II de heparina (HCII) y α_1 -antitripsina (α_1 AT) se muestran en la Figura 1.

5 Posteriormente los inventores describen la conversión de serpinas en inhibidores específicos de la APC para su uso como agentes procoagulantes (tratamiento, profilaxis, agente antihemorrágico o sinérgico) en el tratamiento de trastornos hemorrágicos tales como la hemofilia. Las modificaciones descritas en el presente documento para el PCI como α_1 AT se muestran como prueba del principio de que pequeños cambios en estas proteínas se pueden utilizar para crear inhibidores específicos de la APC.

15 El PCI se describió primero como un inhibidor fisiológico de APC y por lo tanto sirvió como un punto de partida para estas investigaciones (Suzuki et al, 1983; 1984). Sin embargo, el PCI es promiscuo y también inhibe la trombina, trombina:TM, fXIa, fXa y FT: fVIIa (Elisen et al, 1998; Mosnier et al, 2001; Suzuki et al, 1984; Fortenberry et al, 2011; Meijers et al, 1988). En consecuencia, el PCI puede funcionar como pro- y anticoagulante. Esta actividad está regulada por la unión con glicosaminoglicanos, tales como los sulfatos de heparina y heparano (Pratt y Church, 1992; Pratt et al, 1992; Li y Huntington, 2008). Para un resumen del papel del PCI en la cascada de coagulación, véase la Figura 1.

20 La α_1 AT es el inhibidor natural de la elastasa de los neutrófilos (Kalsheker, 1989). A diferencia de otras serpinas de la cascada de coagulación que tiene Arg o Leu en P1, la α_1 AT tiene a su vez una Met. Esto hace que sea un inhibidor muy pobre de las proteasas de coagulación. No obstante, debido a la alta concentración de α_1 AT en el plasma, se cree que inhibe la APC en un grado fisiológicamente significativo (Heeb y Griffin, 1988). La mutagénesis del resto P1 ha demostrado que el uso de una Arg o Leu en P1 mejora drásticamente la inhibición de las proteasas de coagulación por la α_1 AT (Heeb et al, 1990). Esto se ejemplifica por la variante Pittsburgh (M358R (P1R); Pitts) de α_1 AT que produce un trastorno hemorrágico grave (Owen et al, 1983).

30 Para desarrollar serpinas específicas de la inhibición de la APC sobre las proteasas procoagulantes, se utilizaron el PCI y la α_1 AT Pittsburgh (P1R, α_1 AT Pitts) como matriz de armazones de serpina. Todas las proteínas utilizadas en este estudio se expresaron a partir de cultivos de *Escherichia coli* (Rosetta2(DE3) pLysS, Novagen) utilizando el vector de expresión pETSUMO (Invitrogen) y se purificaron utilizando una combinación de cromatografía en Ni, de intercambio aniónico y en el caso de PCI cromatografía de afinidad con heparina. El marcador SUMO se retiró posteriormente mediante escisión con SUMO proteasa y el marcador se retiró por un tándem de cromatografía Ni-intercambio aniónico para α_1 AT Pittsburgh (Pitts, P1R) y un tándem de cromatografía de intercambio aniónico-heparina para el PCI. La construcción de PCI está truncada en el extremo N, que comienza con la Ala 22 (A22, numeración de acuerdo con la secuencia de la proteína madura, comenzando con el propéptido). La construcción α_1 AT Pitts (P1R) tiene una longitud completa (FL) y tiene una mutación adicional C232S para anular la formación de puentes disulfuro intermoleculares y otras modificaciones durante la expresión y purificación (Yamasaki et al, 2011). Debido al vector de expresión utilizado, la construcción α_1 AT Pitts tiene una Ser (S) en su primer resto en vez de Glu (E). No se espera que las mutaciones C232S y E1S alteren la actividad de la α_1 AT.

45 Se introdujeron restos de Lys en diferentes posiciones del RCL del PCI y α_1 AT Pittsburgh y los mutantes resultantes se ensayaron en cuanto a la inhibición de trombina y APC. En los estadios iniciales de este estudio, no se exploraban ni se ensayaban los inhibidores en cuanto a su inhibición de otras proteasas de coagulación con la premisa de que una vez que la inhibición de la trombina era anulada en favor de la inhibición de la APC, el inhibidor podría potencialmente modificarse adicionalmente si tenía una actividad inhibitora residual significativa para otras proteasas de coagulación. Los restos RCL se numeraron de acuerdo con la nomenclatura de Schechter-Berger para las serpinas (Schechter y Berger, 1967).

50 Las constantes de velocidad de la inhibición de trombina y APC se midieron en condiciones de pseudo primer orden utilizando un exceso de serpina sobre proteasa (Tabla 1). La serpina y la proteasa se incubaron juntas durante periodos de tiempo variables y se determinó la actividad residual añadiendo un exceso de sustrato cromogénico para la proteasa (S2238 para trombina y S2366 para APC). Se midió entonces la actividad residual de la proteasa siguiendo la absorbancia a 405 nm. Los gráficos de la actividad residual de proteasas durante el tiempo daban la constante de velocidad observada k_{obs} . La constante de velocidad de segundo orden, k_2 , es la pendiente del gráfico de la k_{obs} frente a la concentración de serpina (ajustada utilizando un modelo de regresión lineal). Se muestran los errores estándar de la pendiente.

60 Las mutaciones de lisina introducidas en P2 y P1' eran altamente eficaces en aumentar la especificidad de PCI y α_1 AT por la APC sobre la trombina para todas las variantes que se muestran en la Tabla 1. En general, la inhibición de la trombina estaba muy reducida en todos los casos. La inhibición de APC también se redujo en todos los mutantes, pero no casi en el mismo grado. Ambas serpinas inicialmente inhibían la trombina mejor que la APC. Esto se invirtió en todas las mutantes ensayadas.

65 El PCI, a diferencia de la α_1 AT, se une a la heparina y esa unión aumenta considerablemente su inhibición de trombina y APC (Pratt y Church, 1992). Por lo tanto, los inventores ensayaron la inhibición de trombina y APC por los

mutantes de PCI P1'K y P2KP1'K en presencia de heparina para ver si el cambio de especificidad que se ve en la Tabla 1 persistía. Las constantes de velocidad se midieron en condiciones de pseudo primer orden utilizando un exceso de PCI sobre proteasa. El PCI se preincubó con una concentración equimolar de heparina no fraccionada durante 30 min antes del experimento. Se incubaron el PCI: heparina y la proteasa juntos durante periodos de tiempo variables y se determinó la actividad residual después de llegar a ciertos puntos de tiempo determinados mediante la adición de un exceso de sustrato cromogénico para la proteasa mezclado con polibreno para unirse a la heparina. Los gráficos de la actividad residual de proteasa durante el tiempo daban la constante de velocidad observada k_{obs} . La constante de velocidad de segundo orden, k_2 , es la pendiente del gráfico de k_{obs} frente a la concentración de serpina (ajustada utilizando un modelo de regresión lineal). Se muestran los errores estándar de la pendiente. El valor calculado para la inhibición de trombina por el P2KP1'K PCI era una estimación de la pendiente inicial del gráfico de actividad residual de trombina frente al tiempo, ya que el gráfico sugiere que no se consigue la inhibición completa. Esto puede ser debido a la ruta de sustrato o la disociación del complejo. Las constantes de velocidad de segundo orden se muestran en la Tabla 2. Como para la inhibición en ausencia de heparina, los mutantes P1'K y P2KP1'K de PCI, a diferencia de la proteína de TS eran específicos de la APC sobre la trombina (Tabla 2).

Estos experimentos demostraban que introduciendo solo una o dos modificaciones en el RCL de la serpina eran suficientes para anular o reducir enormemente la inhibición de la trombina tanto en presencia como en ausencia de cofactores. La inhibición de APC se reducía, pero seguía siendo considerable, especialmente para las variantes de la α_1 AT y las variantes de PCI en presencia de heparina. Sin embargo, la especificidad del PCI y α_1 AT Pitts no se limita a la trombina y APC. Abas de estas serpinas también inhiben el fXa, otra proteasa procoagulante. Con el fin de no inhibir la coagulación. Las variantes de los inventores también necesitan ser específicas para la APC sobre el fXa. Los inventores por lo tanto determinaron también las constantes de velocidad de la inhibición del PCI y α_1 AT y sus variantes para el fXa (Tabla 3). Las constantes de velocidad se midieron en condiciones de pseudo primer orden utilizando un exceso de serpina sobre la proteasa. La serpina y la proteasa se incubaron juntas durante periodos de tiempo variables y se determinó la actividad residual añadiendo un exceso de sustrato cromogénico (S2222) para la proteasa. Los gráficos de la actividad residual de proteasa durante el tiempo daban la constante de velocidad observada k_{obs} . La constante de velocidad de segundo orden, k_2 , es la pendiente del gráfico de k_{obs} frente a la concentración de serpina (ajustada utilizando un modelo de regresión lineal). Se muestran los errores estándar de la pendiente (Tabla 3).

Como se ha visto antes para la protrombina, el PCI de TS inhibía mejor el fXa que la APC. La α_1 AT Pitts inhibía la APC mejor que el fXa, pero la inhibición del fXa seguía siendo considerable. La inhibición de fXa seguía siendo significativa para el P1'K PCI, P2K α_1 AT Pitts y P1'K α_1 AT Pitts (Tabla 3). Las variantes P2KP1'K de α_1 AT Pitts y PCI ambas eran altamente específicas para la APC sobre el fXa, con una inhibición del fXa ausente o insignificante y por lo tanto se consideraron como principales candidatos. La variante P1'K de PCI también tiene interés porque su inhibición de fXa es muy lenta en ausencia de heparina. La presencia de heparina acelera la velocidad de inhibición de la APC significativamente, lo que podría potencialmente desviar la relación de especificidad en favor de la APC.

Los compuestos de PCI principales se expondrán primero, seguidos por el compuesto principal de α_1 AT.

Para investigar las propiedades de A22 P2KP1'K PCI en un sistema de plasma más complejo y para desechar cualquier efecto negativo sobre las proteasas procoagulantes, se llevó a cabo un ensayo de tiempo de protrombina (TP). Este ensayo mide el tiempo hasta la formación del coagulo en el plasma después de iniciar la coagulación mediante la ruta extrínseca. El A22 PCI de TS presentaba un pequeño aumento del tiempo de coagulación, mientras que el P2KP1'K presentaba un aumento más pequeño, lo que era consistente con la actividad inhibidora reducida hacia las proteasas procoagulantes.

Además, los inventores querían descartar cualquier efecto del PCI mutante en la ruta de activación por contacto de la coagulación. Para hacerlo, se midieron las constantes de velocidad de inhibición por la inhibición del fXIa y se hizo un ensayo TTPa. Este ensayo es similar al ensayo el TP excepto que se mide la coagulación iniciada mediante la ruta intrínseca.

Las constantes de velocidad de inhibición de segundo orden para la inhibición del fXIa por el PCI y la variante P2KP1'K se midieron en condiciones de pseudo primer orden utilizando un exceso de serpina sobre la proteasa. La serpina y la proteasa se incubaron juntas durante periodos de tiempo variables y la actividad residual se determinó añadiendo un exceso de sustrato cromogénico para la proteasa (S2366). Los gráficos de la actividad residual de proteasa durante el tiempo daban la constante de velocidad observada k_{obs} . La constante de velocidad de segundo orden, k_2 , es la pendiente del gráfico de k_{obs} frente a la concentración de serpina (ajustada utilizando un modelo de regresión lineal). Se muestran los errores estándar de la pendiente. La inhibición de fXIa por A22 PCI P2KP1'K no se completó en el curso del experimento, potencialmente debido a la escisión de la serpina por la proteasa. En comparación con el TS, el mutante P2KP1'K presentaba una inhibición mucho más reducida hacia el fXIa y una mayor especificidad por la APC que por el fXIa (Tabla 4).

El ensayo del TTPa demostraba que el PCI de TS era un potente inhibidor de la ruta de activación por contacto, potencialmente debido a la inhibición de fXIa o fXIIa (Figura 3). El mutante P2KP1'K presentaba un pequeño

aumento del TTPa. Sin embargo, aunque la ruta de activación por contacto activa en primer lugar la coagulación mediante la activación del fXIa, la inhibición de la activación por contacto hasta una pequeña extensión es probable que sea insignificante en hemofílicos ya que son deficientes de la diana principal de la activación por contacto (fIX) o su cofactor (fVIII).

5 Los resultados presentados aquí hasta ahora demuestran que tanto el A22 P1'K PCI y A22 P2KP1'K PCI son compuestos principales específicos de APC prometedores para el desarrollo de agentes antihemorrágicos para el tratamiento de la hemofilia.

10 Para generar mutantes de PCI adicionales con especificidad para la APC sobre la trombina, se empleó una estrategia de mutagénesis aleatoria dirigida sobre el armazón del PCI. Los restos dirigidos eran P4, P2 y P1'. La estrategia aleatoria se basaba en una selección por inhibición de APC y contra la inhibición de la trombina ensayando la actividad inhibidora de lisados bacterianos después de la expresión de PCI en un formato de 96 pocillos.

15 El ensayo se calibró utilizando el mutante de PCI más específico generado de la mutagénesis racional combinada con el ensayo de la especificidad esbozado anteriormente; A22 P2KP1'K PCI. Se utilizó el PCI de TS como un control adicional. La selección negativa contra la inhibición de trombina se consiguió incubando lisados bacterianos durante un periodo de tiempo de manera que el A22 PCI de TS presentaba una inhibición completa y el periodo de incubación se extendía desde este momento para seleccionar también contra la menor inhibición. La selección positiva para la inhibición de APC se calibró de manera que tanto el PCI de tipo silvestre como el P2KP1'K se encontraban en el intervalo intermedio de actividad inhibidora de APC por lo que los inventores eran capaces de determinar ambos aumentos, así como las disminuciones de inhibición.

25 En un ensayo inicial, se exploraron 88 variantes en cuanto a la actividad inhibidora para la trombina y la APC. Los cultivos se cultivaron, se indujeron y expresaron la proteína en placas de 96 pocillos. Las células se lisaron mediante la adición de un tampón de lisis y los lisados se ensayaron en cuanto a la actividad inhibidora contra trombina y APC incubando el lisado con la proteasa durante 1 h para la trombina y 30 min para la APC. Entonces se leyó la actividad residual de proteasa por la adición de un sustrato cromogénico para la proteasa. Se utilizaron A22 PCI de TS y A22 P2KP1'K PCI como controles. Ningún lisado con una actividad residual de trombina más alta o equivalente o actividad residual de APC menor o equivalente en comparación con el P2KP1'K PCI se consideró como candidato promotor específico de APC. Estas secuencias se muestran en la Tabla 7. Las posiciones P4, P2 y P1' se muestran en negrita.

35 El mutante con la mayor actividad inhibidora de la APC para este conjunto de experimentos (D8, P4QP2RP1'N) se caracterizó en una manera preliminar y se demostró que era más específico para la inhibición de la APC que para la trombina, aunque utilizando diferentes mutaciones de la P2KP1'K (Tabla 5). Esto indicaba que sería posible producir mutaciones adicionales en el RCL de la serpina, que tendrían efectos equivalentes a las mutaciones ya descritas.

40 Para generar un conjunto de datos mayor, se exploraron 460 mutantes adicionales en ensayos tanto de selección positiva como negativa. Los cultivos se cultivaron, indujeron y expresaron la proteína en placas de 96 pocillos. Las células se lisaron mediante la adición de un tampón de lisis y los lisados se ensayaron en cuanto a la actividad inhibidora contra trombina y APC incubando el lisado con la proteasa durante 1 h para la trombina y 30 min para la APC. Entonces se leyó la actividad residual de proteasa por la adición de un sustrato cromogénico para la proteasa. Se utilizaron A22 PCI de TS y A22 P2KP1'K PCI como controles. Ningún lisado con una actividad residual de trombina más alta o equivalente o actividad residual de APC menor o equivalente en comparación con el P2KP1'K PCI se consideró como candidato promotor específico de APC. A partir de este conjunto de datos, se escogieron colonias y se secuenciaron en cuanto a serpinas que presentaran una mejor inhibición de APC y una inhibición peor o equivalente de trombina que el P2KP1'K y se re-ensayaron por triplicado en el mismo ensayo para verificar que eran además aciertos verdaderos y no falsos positivos. De este re-ensayo se determinó que 15 de los 17 mutantes encontrados en la exploración inicial eran mejores o equivalentes en la inhibición de la APC que el P2KP1'K y peores o equivalente en la inhibición de trombina (Tabla 8). Las secuencias de las variantes que eran positivas después del re-ensayo se muestran en la Tabla 8. De manera interesante, la mutagénesis aleatoria confirmaba los efectos beneficiosos de los restos cardados positivamente en las posiciones P2 y P1'. Si embargo se encontraron también composiciones de RCL alternativas.

60 Las constantes de velocidad de segundo orden preliminares para la inhibición de la trombina y APC por mutagénesis aleatoria de variantes del PCI se midieron en condiciones de pseudo primer orden utilizando un exceso de serpina sobre la proteasa. La serpina y la proteasa se incubaron juntas durante periodos de tiempo variables y se determinó la actividad residual añadiendo un exceso de sustrato cromogénico para la proteasa. Los gráficos de la actividad residual de proteasa durante el tiempo daban la constante de velocidad observada k_{obs} . La constante de velocidad de segundo orden, k_2 , es la pendiente del gráfico de k_{obs} frente a la concentración de serpina (ajustada utilizando un modelo de regresión lineal). Se muestran el TS y P2KP1'K para la comparación. Las constantes de velocidad se muestran en la Tabla 5. El error que se muestra es el error estándar de la pendiente.

65 La caracterización preliminar de algunos de los mutantes seleccionados del ensayo de mutagénesis aleatoria

demostraban que los mutantes seleccionados eran al menos funcionalmente equivalentes al P2KP1'K PCI, y algunos tenían una velocidad de inhibición de la APC ligeramente mejorada (Tabla 5). Estos experimentos sugieren fuertemente que el P2KP1'K no es la única composición que se podría utilizar para generar serpinas específicas de la APC.

5 El compuesto principal basado en α_1 AT Pitts de las constantes de velocidad que se muestran en las Tabla 1 y 3 era el FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K. Se demostró que este mutante no inhibía la trombina y solo inhibía lentamente el fXa, pero mantenía la inhibición de la APC (Tablas 1 y 3).

10 Para investigar las propiedades de este mutante en un sistema de plasma más complejo y para descartar cualquier efecto negativo sobre las proteasas procoagulantes se llevó a cabo un ensayo de tiempo de protrombina (TP). Este ensayo mide el tiempo hasta la formación de un coágulo después de iniciarse la coagulación mediante la ruta extrínseca. Como se esperaba, el anticoagulante α_1 AT Pitts presentaba un aumento del tiempo de coagulación, debido a su inhibición de la trombina y el fXa (Figura 4). Por el contrario, el mutante P2KP1'K de α_1 AT Pitts no presentaba un aumento del tiempo de coagulación y por lo tanto no interfería con la coagulación normal en este ensayo.

20 Los datos hasta ahora indicaban que el mutante P2KP1'K de la α_1 AT Pitts no interfería con las proteasas procoagulantes ni en la ruta extrínseca (factor tisular) o la ruta común de coagulación. Además, los inventores querían determinar si la FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K afectaba la ruta intrínseca (activación por contacto) Se midieron las constantes de velocidad de segundo orden de inhibición del fXIa por la FL α_1 AT Pitts C232S y la variante P2KP1'K en condiciones de pseudo primer orden utilizando un exceso de serpinas sobre la proteasa. La serpina y la proteasa se cultivaron juntas durante periodos de tiempo variables y se determinó la actividad residual añadiendo un exceso de sustrato cromogénico para la proteasa (S2366). Los gráficos de la actividad residual de proteasa durante el tiempo daban la constante de velocidad observada k_{obs} . La constante de velocidad de segundo orden, k_2 , es la pendiente del gráfico de k_{obs} frente a la concentración de serpina (ajustada utilizando un modelo de regresión lineal). Se muestran los errores estándar de la pendiente.

30 El fXI se activa durante la ruta de activación por contacto y alimenta la ruta común de coagulación activando el fIX. Además, se activa el fXI una vez que se inicia la coagulación por la trombina. El fXIa se inhibía en un grado significativo por la FL α_1 AT Pitts C232S sin embargo esta inhibición estaba muy reducida por la FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' (Tabla 6).

35 Debido al bajo grado de inhibición del fXIa por el mutante P2KP1'K de α_1 AT Pitts que se detectó y para determinar cualquier efecto negativo sobre el fXIIa, los inventores llevaron a cabo un ensayo adicional de TTPa. Este ensayo es similar al ensayo del TP excepto que mide la coagulación iniciada mediante la ruta intrínseca de la coagulación. El TTPa podía por lo tanto utilizarse para detectar cualquier efecto negativo sobre el fXIa y la ruta de activación por contacto de la coagulación. En este ensayo, el plasma incubado con FL α_1 AT Pitts C232S no coagulaba en el tiempo del ensayo excepto en una reacción con 0,67 μ M de serpina (Figura 5A). La FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K presentaba un pequeño aumento del tiempo de coagulación, pero no era un aumento dependiente de la dosis (Figura 5B). Esto indica que la actividad inhibidora del fXIa de FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K probablemente es demasiado lenta para afectar significativamente la ruta de activación por contacto. Además, la ruta de activación por contacto activa la cascada de coagulación mediante la activación del fIXa. Como los hemofílicos carece del fIX o su cofactor esencial el fVIII, el papel de un pequeño grado de inhibición de la ruta de activación por contacto en hemofílicos es probable que sea mínima.

50 Para investigar si el mutante P2KP1'K de la α_1 AT Pitts era capaz de inhibir la APC en un sistema de plasma, los inventores utilizaron un ensayo de generación de trombina (TGA) modificado. La generación de trombina se midió en plasma humano normal agrupado (NP) en presencia y ausencia de trombomodulina soluble recombinante (TM). Esta TM se expresaba y purificaba a partir de un sistema de expresión HEK-EBNA y comprende el dominio extracelular soluble. La TM no está presente normalmente en el TGA debido a que fisiológicamente es una proteína transmembrana, presente en la membrana endotelial y está sobre todo ausente en el plasma. Por lo tanto, no hay una activación de la ruta PC en un TGA normal u otros ensayos de coagulación que utilizan plasma, tales como los ensayos del TP y TTPa. Añadiendo TM al ensayo se permite la activación del PC y por lo tanto se puede dar una imagen más realista de la generación de trombina *in vivo*. Los ensayos que se muestran en las Figura 6 y 7 se llevaron a cabo en plasma humano normal agrupado (NP) del George King Biomedical. La coagulación se inició mediante la adición de $CaCl_2$ y FT/fosfolípidos (FT bajo en RB y reactivo de fosfolípido, Technoclone) para activar la coagulación mediante la ruta extrínseca. La generación de trombina se midió mediante la escisión de un sustrato fluorogénico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Las unidades de fluorescencia se convirtieron en concentración de trombina calibrando las unidades de fluorescencia contra concentraciones conocidas de trombina, utilizando el kit de calibración Technothrombin (Technoclone).

65 La adición de TM al plasma normal agrupado reducía la generación de trombina de una manera dependiente de la dosis. A partir de este experimento, los inventores escogieron dos concentraciones de TM para disminuir la generación de trombina a niveles intermedios (concentración del ensayo final de 1,25 nM de TM) o a niveles bajos (concentración del ensayo final de 10 nM de TM) Estas concentraciones se utilizaron en ensayos posteriores para

evaluar la capacidad de la FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K para inhibir la APC del plasma.

La adición de FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K al plasma humano normal (NP) reducía la generación de trombina en todas las concentraciones utilizadas, probablemente debido a la inhibición de trombina, así como del fXa (Figura 6).
 5 Por el contrario, la FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K no tenía efecto sobre el NP en ausencia de TM (Figura 7A). Sin embargo, en presencia de TM, la FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K rescataba de manera dependiente de la dosis la generación de trombina (Figuras 7B-D). Ese efecto es el resultado de la inhibición específica de la APC por la FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K.

10 Con el fin de llevar a cabo los mismos experimentos en el plasma deficiente de fVIII o fIX, era necesario aumentar la cantidad de factor tisular (FT) utilizado para iniciar el ensayo debido a que en las condiciones básicas (solo se desencadena por RB), no había una generación detectable de trombina en el plasma deficiente en factor. Para demostrar el efecto de un aumento del FT en la generación de trombina, las reacciones se vertieron con diferentes diluciones de reactivo con FT (Dade Innovin, Siemens) además del reactivo RB utilizado para desencadenar el
 15 ensayo en condiciones básicas. La concentración de FT en el reactivo Innovin no se desvela por el fabricante, sin embargo, las mediciones previas demostraron que era alrededor de 7,36 nM (Duckers et al, 2010). El aumento de FT desencadena un pico tanto acortado en el tiempo como aumentado de trombina y trombina endógena potencial (ETP) en el NP humano, plasma deficiente en fVIII (HA) y deficiente en fIX (HB). A partir de estos experimentos, los inventores escogieron una dilución de Innovin de 1:4.000 en la reacción final para iniciar la generación de trombina.
 20 El reactivo RB, que contienen tanto los fosfolípidos como el FT se añadió debido a la necesidad de añadir fosfolípidos al ensayo.

Debido al uso de que el plasma deficiente en factores necesitaba una modificación de los parámetros del ensayo, los inventores repitieron el ensayo de titulación TM para el plasma humano normal agrupado en plasma de HA humana
 25 con la adición de 1:4.000 de Innovin. El ensayo se llevó a cabo en plasma deficiente en fVIII humano (menos de un 1 % de actividad de fVIII) del George King Biomedical. La coagulación se inició mediante la adición de CaCl_2 y FT/fosfolípidos (FT bajo en RB y reactivo de fosfolípido, Technoclone) para activar la coagulación mediante la ruta extrínseca. La generación de trombina se midió mediante la escisión de un sustrato fluorogénico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Las unidades de fluorescencia se convirtieron en concentración de trombina calibrando las unidades de
 30 fluoresceína contra concentraciones conocidas de trombina, utilizando el kit de calibración Technothrombin (Technoclone). Se descubrió que la trombomodulina (TM) reducía la generación de trombina en el ensayo de generación de trombina (TGA) en el plasma deficiente en fVIII (HA).

A partir de este experimento se seleccionaron 1,25 nM y 5 nM de TM para los experimentos posteriores. La
 35 concentración alta de TM utilizada era menor que para los NP, debido principalmente a que la generación total de trombina en el plasma de HA en las condiciones del ensayo utilizadas era menor.

Los efectos tanto de la FL α 1AT Pitts C232S como FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K sobre el plasma de HA y HB eran comparables a los resultados del NP agrupado. La FL α 1AT Pitts inhibía la generación de trombina en presencia y
 40 ausencia de TM tanto en plasma de HA (deficiente en fVIII) y HB (deficiente en fIX) (Figura 8). La FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K podía rescatar el efecto de la TM sobre la generación de trombina tanto en plasma deficiente de fVIII como de fIX y no tenía efecto en ausencia de TM (Figuras 9 y 10). Esto indica que la FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K puede inhibir la APC y tiene un efecto procoagulante en plasma deficiente de factores. Esto significa que se podría potencialmente promover la formación de coágulos y reducir el sangrado en pacientes de hemofilia. La
 45 magnitud de este efecto procoagulante se determinará por la contribución relativa del sistema de proteína C en la reducción de la generación de trombina *in vivo*. Los experimentos *in vitro* que se muestran aquí no se pueden utilizar para predecir la eficacia probable de este mutante *in vivo*, sin embargo, no demuestra que en los sistemas de plasma complejos FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K pueden inhibir la APC y no interfiere en las rutas procoagulantes, y que estos efectos son independientes de la presencia o ausencia de fIX y fVIII.

50 Con el fin de verificar sus datos *in vitro*, los inventores querían utilizar modelos de hemofilia en ratón *in vivo*. Sin embargo, para verificar que el efecto del α 1AT humano sobre el plasma de ratón sería comparable al efecto visto en el plasma humano, los inventores llevaron a cabo un TGA en el plasma de ratón. Esto se hizo utilizando un protocolo modificado de TGA (Bunce et al, 2011; Ivanciu et al, 2011). Comparable al sistema humano, no había generación de
 55 trombina en el plasma de HB en las condiciones básicas del ensayo. Por lo tanto, los inventores llevaron a cabo una titulación vertiéndolo en diferentes concentraciones de Innovin. Se escogió una concentración de 1:12.000 de Innovin para posteriores ensayos.

Debido a que no estaba disponible una TM murina, los inventores utilizaron la TM humana soluble utilizada en los
 60 TGA del plasma humano para promover la formación de APC en el ensayo TGA de ratón. La concentración necesaria para ver cualquier efecto de la TM humana en el plasma de ratón con HB era ~100 veces mayor que la vista en plasma humano. Esto se podía explicar por la observación de que los ratones sin inactivación de la TM humana reducían la actividad para activar PC murino (Raife et al, 2011). Esto indica que la TM humana es menos potente en la promoción de PC que la TM murina. Se utilizó una concentración de 750 nM de TM humana en los
 65 experimentos posteriores.

Se añadieron entonces diferentes concentraciones de FL α 1AT Pitts C232S y FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K a las condiciones determinadas en el plasma de ratón HB tanto en ausencia y presencia de TM para comparar el efecto de estos mutantes en el plasma de ratón respecto a los resultados previos del TGA en plasma humano.

- 5 La FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K reducía la generación de trombina en el plasma de ratón HB en ausencia de TM como se ve en el plasma humano (Figura 11A). Sin embargo, en presencia de TM, a la concentración más baja de α 1AT, había un rescate parcial de la generación de trombina (Figura 11B). Esto puede ser debido potencialmente a una diferencia en las velocidades de inhibición relativas para la trombina murina y la APC murina por la FL α 1AT Pitts en comparación con las velocidades vistas en los seres humanos, de manera que la APC generada se inhibe antes de la inhibición de la trombina. Cuando se aumenta la concentración de FL α 1AT Pitts C232S a niveles en los que toda la APC se ha inhibido, la trombina también se inhibe. Esto podría explicar los resultados que se ven en la Figura 11B, pero no se investigó adicionalmente. La FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K rescataba la generación de trombina anulada por la adición de TM al plasma de ratón con HB como pasaba en el plasma humano (Figura 11D). Sin embargo, cuando se añadió FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K al plasma de ratón HB en ausencia de TM, se observó también un aumento de la generación de trombina (Figura 11C). Es posible que este efecto se relacione con el método de recolección de sangre empleada para estos experimentos. Para recolectar el plasma, la cola se seccionó y se recogió la sangre en citrato. Se centrifugó entonces y el plasma se retiró y se congeló. La lesión infringida por la recolección de sangre da lugar a la activación del sistema de coagulación y puede causar la generación de APC en el plasma antes del experimento. Adicionalmente, los ratones no tienen PCI en su plasma (Zechmeister-Machhart et al, 1996), lo que puede aumentar la semivida circulante de APC, de manera que no se active antes del ensayo de TGA. Una explicación alternativa que no se puede descartar hasta el presente sería un efecto procoagulante no de diana en el plasma de ratón. Sin embargo, aunque este efecto no se ve en plasma humano, implicaría la inhibición de una proteasa anticoagulantes específica de ratón.
- 10
- 15
- 20
- 25 Para investigar un efecto potencial *in vivo* de la FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K y para determinar si podría ser potencialmente útil como agente profiláctico o como tratamiento para la hemofilia, los inventores utilizaron dos ensayos con ratones *in vivo*; el modelo del corte de cola y la lesión de arteriolas del cremáster con láser. Los ratones utilizados eran ratones knockout para el fIX, machos, sobre un fondo de BALB/c (Lin et al, 1997; Ivanciu et al, 2011).
- 30 En el ensayo de corte de la cola, se inyectó proteína o tampón a través de la vena caudal y después de un periodo de incubación de 5 min, se seccionó la cola a un diámetro de 3 mm y se colocó en 15 ml de solución salina a 37 °C en un baño de agua a 37 °C. La sangre se recolectó durante 10 min y la pérdida de sangre resultante se cuantificó midiendo la hemoglobina total después de la lisis de glóbulos rojos midiendo la absorbancia a 575 nm (Ivanciu et al, 2011). El volumen de pérdida de sangre se calculó haciendo una curva de referencia en la que se procesaron volúmenes conocidos de sangre recolectados por sección de la cola de manera similar a las muestras de corte de cola. Después de la lisis de los glóbulos rojos se determinó la absorbancia a 575 nm y se hizo una gráfica contra el volumen de pérdida de sangre para generar la curva de referencia. Los ensayos de corte de cola presentaban un potente efecto procoagulante de la FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K (Figura 12). A la dosis de 15 mg/kg, la pérdida de sangre de los ratones con HB se restauraba al nivel de los ratones de TS inyectados con PBS (Figura 12). La dosis menor de FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K también presentaba una tendencia a la reducción del sangrado con respecto a los ratones con HB, aunque esta no era estadísticamente significativa. La FL α 1AT Pitts C232S no presentaba un efecto significativo de pérdida de sangre a 7,5 mg/kg.
- 35
- 40

Otro modelo *in vivo* utilizado para la evaluación de los agentes procoagulantes es el modelo de lesión inducida por láser de arteriolas del cremáster intravital (Falati et al, 2002). En este sistema, se inserta una cánula en la vena yugular del ratón para permitir la infusión de la proteína terapéutica, así como los anticuerpos marcados fluorescentemente contra la fibrina y plaquetas. El músculo cremáster se dispersa entonces para la creación de imágenes. La formación de un coágulo después de la lesión inducida por láser a las arteriolas se toma en imágenes y se cuantifican utilizando microscopía de fluorescencia.

45

50

Para la evaluación cualitativa total, las lesiones se clasificaron en tres categorías: no se forma coágulo (no se detecta fluorescencia), coágulo de plaquetas (solo son visibles plaquetas, estos coágulos eran en general inestables y se disolvían en el curso de la toma de imágenes) y plaquetas + fibrina (fluorescencia visible tanto de plaquetas como de fibrina y el coágulo se mantienen estable durante el curso de la toma de imágenes). Esto demuestra que hay un aumento dependiente de la dosis en la formación del coágulo de plaquetas + fibrina al aumentar la concentración de la FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K (Figura 13). Todas las imágenes se cuantificaron en cuanto a fluorescencia de plaquetas y fibrina. El valor de la mediana para cada momento se calculó y los resultados se graficaron en la Figura 14. Estos datos incluían la cuantificación de todas las imágenes, independientemente de la categoría asignada para la Figura 13. Los gráficos de la mediana muestran que el control o ratones infundidos con FL α 1AT Pitts C232S no presentaban formación de coágulos, mientras que tanto la dosis alta como la baja de FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K presentaban agregación plaquetaria y depósito de fibrina en el sitio de la lesión. No se podía detectar ninguna diferencia entre las dos dosis en términos de agregación plaquetaria. Para la fibrina había un aumento dependiente de la dosis en el depósito de fibrina por la FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K y no había fibrina en ninguno de entre los ratones de control o infundidos con FL α 1AT Pitts C232S (Figura 14).

55

60

65

En conjunto, estos resultados muestran que la FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K tiene un efecto procoagulante tanto en

los ensayos *in vitro* como en los modelos *in vivo* de hemofilia. Los experimentos *in vivo* se hicieron todos en modelos de hemofilia B de ratón, sin embargo, los resultados del TGA en plasma humano (Figuras 9 y 10) y el mecanismo de acción propuesto de FL α 1AT Pitts C232S P2KP1'K indican que su efecto procoagulante debería ser independiente de la deficiencia de fIX o fVIII y por lo tanto se podría utilizar tanto en hemofilia A como en B. El efecto procoagulante visto *in vivo* era suficiente para reducir el sangrado a los mismos niveles que los que se ven en ratones de TS (Figura 12) indicando que las serpinas que inhiben la APC se pueden utilizar para trastornos hemorrágicos y no solo como profilácticos o adyuvantes para los tratamientos existentes.

También se empleó una estrategia de mutagénesis aleatoria dirigida en el almacén de la α 1AT Pitts con el fin de explorar el potencial de mutantes adicionales específicos de la APC sobre el almacén α 1AT.

Se generaron tres bibliotecas diferentes de variantes de la α 1AT sobre el fondo de FL α 1AT Pitts C232S: uno aleatorio de P2, uno aleatorio de P1' y una tercera biblioteca aleatoria de ambos P2 y P1'. Las bibliotecas de plásmidos resultantes se transformaron en la cepa de expresión Rosetta2(DE3) pLysS y la proteína se expresó en placas de 96 pocillos. Las bacterias se lisaron y los lisados se ensayaron en cuanto a inhibición de trombina y APC.

Para las bibliotecas de variantes únicas, se ensayaron 88 colonias por biblioteca. Para la biblioteca de variantes dobles (P2P1'), se ensayaron 460 colonias. Se expresaron FL α 1AT Pitts y FL α 1AT Pitts P2KP1'K (las variantes principales específicas de APC) en placas de ensayo como una referencia. Las variantes con mayor o igual actividad inhibidora de APC (menor o igual actividad residual de APC) y menor o igual actividad inhibidora de trombina (mayor o igual actividad residual de trombina) en comparación con la P2KP1'K α 1AT se consideraron candidatas para las variantes específicas de APC sobre la trombina. Un subconjunto de variantes candidatas se escogió y se re-ensayó con la misma configuración para verificar los resultados de la primera exploración. Los mutantes que presentaban propiedades similares en ambos ensayos se secuenciaron entonces. Las secuencias resultantes se muestran en la Tabla 9. Para verificar la capacidad de este ensayo para escoger variantes, que fueran específicas de la APC sobre la trombina, las nueve variantes identificadas en la Tabla 9 se expresaron a una escala mayor en *E. coli* y se purificó. La constante de velocidad de inhibición de segundo orden con respecto a la trombina y APC se determinó entonces para cada mutante. Los resultados se muestran en la Tabla 10. Estos resultados confirmaban que todas las variantes ensayadas tenían una mayor especificidad por la APC que por la trombina a diferencia de la variante FL α 1AT Pitts C232S.

Ciertos tipos de restos estaban favorecidos en el almacén de α 1AT Pitts en ambas posiciones P2 y P1' (Tabla 9). La especificidad era conferida por la presencia de un volumen polar (Q, N, Y) volumen hidrófobo (W) o restos cargados positivamente (R, H, K) en P2 y P1'. Otros restos que se veían en estas posiciones incluían C, A, T, S y V. Estos restos pequeños o medios se acompañaban en la biblioteca de variantes dobles por un resto cargado positivamente grande complementario (R, K) o un resto polar grande (Y, N, Q) en la otra posición, lo que probablemente tiene una mayor influencia sobre la desviación de la especificidad. Sin embargo, hay un efecto cooperativo en estas mutaciones también, especialmente si P1' es R. El P1'R presentaba resultados variables en la exploración de únicas variantes y puede tener alguna actividad inhibidora residual de la trombina. El P2P es conocido por ser importante para la escisión de los sustratos por la trombina (Gallwitz et al, 2012). La retirada simple de este resto acoplado a una mutación de desviación de la especificidad en P1' puede ser suficiente para generar un inhibidor específico de APC con poca actividad inhibidora residual de trombina. Especialmente a T en P2 puede tener algún efecto sobre sí misma, independientemente de sus restos de acompañamiento en P1' (Q, N, Y, R), solamente R se identificó en la biblioteca de una única variante en el resto P1' que era suficiente para producir una desviación de especificidad por sí mismo.

De manera interesante, los mutantes no específicos que se agrupan alrededor de la α 1AT Pitts de control demostraron ser sobre todo α 1AT Pitts. Todos los que mantenían el P2P, mostraban su importancia en el mantenimiento de la actividad inhibidora de trombina. El P1' era más variable, consistente con la distribución de mutantes en la biblioteca de variantes P1'. En comparación con la diseminación de variantes en las bibliotecas de P2 y P1', la trombina parecía ser más tolerante a las mutaciones de P1' que la de P2. Sin embargo, la aparición de restos favorables en las bibliotecas de variantes dobles que no estaban presentes en las bibliotecas de únicas variantes indica que los efectos de estos restos sobre la especificidad pueden ser cooperativos y las mutaciones dobles pueden ser más eficaces que las mutaciones sencillas en el aumento de la especificidad.

Los resultados de la mutagénesis aleatoria que se han presentado anteriormente demostraban que era posible generar mutantes que presenten una especificidad por la APC sobre la trombina distintos de los mutantes de lisina ya identificados. Hasta ahora, se utilizó la estrategia de mutagénesis aleatoria, asumiendo que una vez que se obtenía la especificidad sobre la trombina, estos mutantes también presentarían algún grado de especificidad por la APC sobre otras proteasas procoagulantes. Para ensayar esto, se ensayaron el TP y TTPa de los mutantes aleatorios de la Tabla 10. Estos resultados se presentan en la Tabla 11. Ninguno de los mutantes tenía un efecto significativo sobre el TP, a diferencia de lo mostrado anteriormente para la FL α 1AT Pitts C232S (Figura 4). Esto proporciona una indicación de que los mutantes que han perdido mucha de su actividad inhibidora hacia proteasas procoagulantes. Sin embargo, los TTPa son más sensibles a la presencia de inhibidores. Por lo tanto, la medición de un TTPa puede dar una representación más precisa de inhibición residual más pequeña. Los experimentos previos (Figura 5) presentaba que la FL α 1AT Pitts C232S daba lugar a un plasma que se coagulaba en el ensayo TTPa.

Por el contrario, solo uno de los mutantes evaluados aquí presentaba este efecto (el P2KP1'N). Algunos mutantes tales como P2KP1'H y P2KP1'N presentaba solo una relativamente pequeña prolongación del TTPa y por lo tanto era potencialmente interesante.

- 5 A partir de estos resultados, los inventores seleccionaron cuatro mutantes, P2R, P2QP1'K, P2KP1'H y P2KP1'N (todos con el fondo Pitts, P1R). estos presentaban tanto una alta inhibición sobre la trombina (Tabla 10) y en algunos también una baja prolongación del TTPa (P2KP1'H y P2KP1'N). Debido a que no prolongaban el TP, es improbable que inhiban el FT frVIIa. Los candidatos más probables para la prolongación del TTPa serían la inhibición del fXIa, o fXa. De estos, la inhibición de fXa inhibiría el que más los estadios iniciales de la coagulación y por lo tanto se consideraría ser una barrera más significativa para un inhibidor satisfactorio. Las constantes de inhibición para la inhibición de fXa por estos cuatro mutantes se determinaron por lo tanto como se ha descrito anteriormente (Tabla 12). El P2R presentaba una inhibición significativa del fXa, que puede ser la razón de su prolongación del TTPa. Los otros tres mutantes presentaban una inhibición del fXa menor, pero ninguno de los mutantes era tan específico como el mutante P2KP1'K identificado previamente. No obstante, P2KP1'N, P2KP1'K y P2KP1'H representan candidatos adicionales prometedores para el desarrollo posterior ya que presentan especificidad por la APC sobre la trombina y fXa. Además, su inhibición de la APC tiene un aumento de más o menos 2 veces con respecto al mutante P2KP1'K descrito anteriormente. Esta rápida inhibición puede compensarse en parte por la especificidad ligeramente reducida.
- 10
- 15
- 20 Sin embargo, estos resultados indicaban que la selección por la especificidad para APC sobre la trombina no es completamente suficiente para diseñar un inhibidor que también muestra especificidad sobre el fXa y otras proteasas procoagulantes. Por lo tanto, la estrategia de mutagénesis aleatoria se extendió adicionalmente. Los mutantes que se habían seleccionado anteriormente por su especificidad por la APC sobre la trombina, se re-exploraron contra el fXa y se seleccionaron los mutantes, que tenían una inhibición reducida del fXa, mientras que se mantiene baja la inhibición de trombina y la inhibición de APC.
- 25

Se identificaron cuatro mutantes adicionales de esta exploración adicional. Todos estos tenían la mutación P1R y además tenía P2RP1'A, P2RP1'Q, P2WP1'I o P2WP1'H. Para verificar la especificidad de estos mutantes, se llevó a cabo un experimento inicial, utilizando solo una concentración de serpina y ensayando se inhibición de la trombina y el fXa. La inhibición de la APC no se consideraba en este estadio, debido a que los mutantes se seleccionaban en su baja inhibición de trombina y fXa. La serpina y la proteasa se incubaron durante diferentes tiempos y en los momentos indicados, se paró la reacción por adición de un exceso del sustrato cromogénico. La actividad residual de proteasa se dividió por la actividad de proteasa inicial y se hizo un gráfico del log natural de este valor contra el tiempo (Figura 15). La pendiente de esta línea dividida por la concentración de serpina da una estimación de la constante de velocidad de la inhibición de segundo orden. Estos ensayos demostraban que mientras los mutantes apenas inhiban la trombina, con el inhibidor más rápido, el P2KP1'H que tenía una constante de velocidad de segundo orden de $-50,3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (en comparación con la constante de inhibición de FL $\alpha 1\text{AT Pitts C232S}$ de $2,928 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Sin embargo, P2RP1'A, P2WP1'I y P2WP1'H presentaban una inhibición significativa de fXa. La constante de velocidad de segundo orden solamente se reducía ~10 veces para estos mutantes en comparación con el FL $\alpha 1\text{AT Pitts C232S}$ ($4.070,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para P2RP1'A en comparación con $4,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para el FL $\alpha 1\text{AT Pitts C232S}$). P2RP1'A, P2WP1'I y P2WP1'H presentaban una inhibición de fXa similar entre ellos.

30

35

40

Solamente un mutante presentaba una selectividad significativa contra la trombina y el fXa. Este mutante tenía una mutación P2RP1'Q además de la Pitts (P1R). Debido a esta selectividad, era interesante para una investigación exhaustiva. Los resultados previos de los estudios de mutagénesis racional y aleatoria indicaban que los restos R y K actúan de manera razonablemente similar. Por lo tanto, los inventores generaron un mutante P2RP1'Q sobre el fondo P1R que como se esperaba por los resultados que se muestran aquí tuviera propiedades similares. Los resultados de las mediciones de las constantes de inhibición y el TTPa (experimentos llevados a cabo como se describe anteriormente) para ambos mutantes se muestran en la Tabla 13. El mutante P2KP1'K se muestra para su comparación. Tanto P2KP1'Q y P2RP1'Q presentaban muy baja inhibición de la trombina y el fXa. Además, también apenas había un efecto sobre el TTPa. La inhibición de ATP era significativa, estando solo ligeramente reducida en comparación con el P2KP1'K. Por lo tanto, se esperaba que estos dos mutantes actuaran de manera similar que P2KP1'K y pueden representar otras moléculas potencialmente prometedoras alternativas para su desarrollo posterior.

45

50

55

Los inventores evaluaron la inhibición de la trombina murina y APC por la FL $\alpha 1\text{AT Pitts C232S}$ P2KP1'K. La trombina y la APC se obtuvieron de fuentes recombinantes. Las proteasas utilizadas estaban truncadas con respecto a la versión plasmática, que incluían solo dominios EGF2 proteasa para APC (APC sin dominio Gla) y el dominio proteasa para la trombina. Por lo tanto, los inventores también ensayaron las versiones humanas de estas proteasas para asegurar que ninguna diferencia se debiera a una diferencia de especie, más que a una diferencia de construcción. La trombina humana y murina no presentaban ninguna o poca reactividad con la FL $\alpha 1\text{AT Pitts C232S}$ P2KP1'K por SDS-PAGE, indicando que, a este respecto, los resultados de los sistemas de modelo fueran relevantes para el sistema humano. Las constantes de velocidad de inhibición de segundo orden eran $(8,14 \pm 0,58) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, para la APC humana sin dominio Gla, $(3,80 \pm 0,37) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para la APC murina sin dominio Gla, en comparación con $(14,88 \pm 1,87) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para la APC plasmática humana. Estos resultados proporcionan una indicación de que mientras que la reactividad del mutante en modelos de ratón sería probablemente menor que en

60

65

seres humanos, es decir, la dosis relativa para el mismo efecto tiene que ser mayor, el efecto en términos de inhibición de proteasa es probablemente similar.

5 Los datos presentados se muestran como una prueba del principio de que el armazón de la serpina se puede utilizar para generar inhibidores específicos de APC, utilizando solo muy pocas mutaciones, que estos inhibidores pueden tener actividades procoagulantes tanto *in vitro* como *in vivo* y por eso son prometedores como agentes procoagulantes para el tratamiento y profilaxis de trastornos hemorrágicos tales como la hemofilia.

10 Referencias

- 10 Berntorp E (2009) Haemophilia 15: 3-10
 Bertina RM, et al (1994) Nature 369: 64-67
 Bohn RL et al (2004) Haemophilia 10: 63-68
 Bolton-Maggs PHB y Pasi KJ (2003) Lancet 361: 1801-1809
 15 Brettler DB (1996) Baillieres Clin. Haematol.9: 319-329
 Brummel-Ziedins KE et al (2011) J. Thromb. Haemost. 9: 2262-2267
 Bunce MW et al (2011). Blood 117: 290-298
 Butenas S et al (2006) J. Thromb. Haemost. 4: 2411-2416
 Carrell R et al (1985) Trends in Biochemical Sciences 10: 20-24
 20 Chuansumrit A et al (2000) Haemophilia 6: 61-65
 De Nanteuil G et al (2006) J. Med. Chem. 49: 5047-5050
 Di Minno MND et al (2010) Haemophilia 16: e190-201
 DiMichele D (2007) J. Haematol. 138: 305-315
 Duckers C et al (2010) Blood 115: 879-886
 25 Elisen MGLM et al (1998) Blood 91: 1542-1547
 Escobar MA (2010) Haemophilia 16 Supl 3: 29-34
 Escobar M y Sallah S et al (2013) J. Thromb. Haemost. 11, 1449-1453.
 Falati S et al (2002) Nat. Med. 8: 1175-1181
 Fortenberry YM et al (2011) J. Thromb. Haemost. 9: 861-863
 30 Franchini M y Lippi G (2010) Thrombosis Research 125: 119-123
 Fukudome K et al (1996) J. Biol. Chem. 271: 17491-17498
 Gallwitz et al (2012) PLoS ONE 7(2): e31756
 Gettins PGW (2002) Chem. Rev. 102: 4751-4803
 Gringeri A et al (2003) Blood 102: 2358-2363
 35 Haya S et al (2007) Haemophilia 13 Supl 5: 52-60
 Heeb MJ y Griffin JH (1988) J. Biol. Chem. 263: 11613-11616
 Heeb MJ et al (1990) J. Biol. Chem. 265: 2365-2369
 Hopkins et al (1993) Biochemistry 32: 7650-7657
 Hua B et al (2009) Haematologica 94: 881-884
 40 Huntington JA et al (2000) Nature 407: 923-926
 Irving et al (2000) Genome Res. 10: 1845-1864
 Ivanciu L et al (2011) Nat. Biotechnol. 29: 1028-1033
 Kalsheker N (1989) Biosci. Rep. 9: 129-138
 Laurell CB et al (1977) Clin Sci Mol Med 52: 457-461
 45 Laurell M et al (1990) Blood 76: 2290-2295
 Lee M et al (2006) Haemophilia 12 Supl 3: 1-7
 Li W y Huntington JA (2008) J. Biol. Chem. 283: 36039-36045
 Li W et al (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 4661-4666
 Lin HF et al (1997) Blood 90: 3962-3966
 50 Lowe, G.D. y Ludlam, C.A. (2008) J. Thromb. Haemost.6, 1982-1983.
 Lu D et al (1996) Blood 87: 4708-4717
 Mannucci PM (2003) J. Thromb. Haemost. 1: 1349-1355
 Mannucci PM (2008) Haemophilia 14 Supl 3: 10-18
 Mather T et al (1996) EMBO J 15: 6822-6831
 55 Meijers JC et al (1988) Biochemistry 27: 4231-4237
 Mosnier LO et al (2001) Thromb. Haemost. 86: 1057-1064
 Nagel K. et al (2011) Haemophilia, 17, 872-874.
 Negrier C et al (2006) Haemophilia 12 Supl 6: 48-52- discussion 52-3
 Owen MC et al (1983) iV. Engl. J. Med. 309: 694-698
 60 Pratt CW y Church FC (1992) J. Biol. Chem. 267: 8789-8794
 Pratt CW et al (1992) J. Biol. Chem. 267: 8795-8801
 Raife TJ et al (2011) Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 31: 2509-2517
 Schechter I et al (1967) Biochem Biophys Res Comm 27: 157-162
 Stearns-Kurosawa DJ et al (1996) PNAS. U.S.A. 93: 10212-10216
 65 Suzuki K et al (1983) J. Biol. Chem. 258: 163-168
 Suzuki K et al (1984) Journal of Biochemistry 95: 187-195

Tagariello, G et al (2009) Blood, 114, 779-784.
 Tchaikovski SN et al (2007) J. Thromb. Haemost. 5: 2079-2086
 Teitel JM (1999) Haemophilia 5 Supl 3: 43-49
 Teitel, JM y Sholzberg, M (2013) Blood Reviews 27 103-109
 5 Turecek PL, et al (2004) Haemophilia 10 Supl 2: 3-9
 Ullman M et al (2006) Haemophilia 12 Supl 6: 74-9; discussion 79-80
 World Federation of Hemophilia (2011) 2010 WFH Global Survey Report
 Yamasaki M et al (2011) EMBO Rep. 12: 1011-1017
 10 Zechmeister-Machhart M et al (1996) Immunopharmacology 32: 96-98

Tabla 1

Constantes de velocidad de inhibición de segundo orden ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
Variante	Trombina	APC	Veces de inhibición APC/trombina
A22 TS PCI	28,21 +1,51	0,68 + 0,032	0,02
A22 PI'K PCI	0,022 + 0,0024	0,88 + 0,074	40
A22 P2KP1'K PCI	~ 0,03*	0,28 + 0,013	9,3
FL α_1 AT Pitts C232S	292,76 + 17,60	108,16 + 7,086	0,4
FL α_1 AT Pitts C232S P2K	0,051 + 0,0028	64,82 + 7,14	1,271
FL α_1 AT Pitts C232S PI'K	0,17 + 0,017	95,66 + 13,70	563
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1 'K	Sin inhibición 4 h	15,14 + 1,68	Sin inhibición de trombina

Tabla 2

Constantes de velocidad de inhibición de segundo orden ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
Variante	Trombina + heparina	APC + heparina	Veces de inhibición APC/trombina
A22 TS PCI	1310,32 + 218,72	564,47 + 71,29	0,4
A22 PI'K PCI	0,017 + 0,0019	321,54 + 31,94	18914
A22 P2KP1'K PCI	0,11 + 0,040*	146,38 + 18,85	1331,7

Tabla 3

Constantes de velocidad de inhibición de segundo orden ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)		
Variante	fXa	Veces de inhibición APC/trombina
A22 TS PCI	10,31 + 0,73	0,07
A22 PI'K PCI	0,52 + 0,079	1,7
A22 P2KP1'K PCI	Inhibición no detectable	Sin inhibición de fXa
FL α_1 AT Pitts C232S	41,33 + 2,36	2,6
FL α_1 AT Pitts C232S P2K	3,93 + 0,31	16,5
FL α_1 AT Pitts C232S PI'K	4,89 + 0,16	19,6
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K	0,12 + 0,010	126,2

Tabla 4

Constantes de velocidad de inhibición de segundo orden ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
Variante	fXIa	APC	Inhibición de APC/fXIa
A22 TS PCI	8,59 + 0,43	0,68 + 0,032	0,08
A22 P2KP1'K PCI	0,023 \pm 0,0052	0,28 + 0,013	12,2

Tabla 5

Constantes de velocidad de inhibición de segundo orden ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
Variante	Trombina	APC	Inhibición de APC/Trombina
A22 TS PCI	28,21 + 1,51	0,68 + 0,032	0,02
A22 P2KP1'K PCI	~ 0,03*	0,28 + 0,013	9,3
A22 D8 PCI (P4QP2RP1'N)	0,084 + 0,0016	1,00 ± 0,15	11,9
A22 4.H11 PCI (P4KP2RP1'H)	0,021 + 0,0012	0,45 + 0,15	21,4
A22 2. B10 PCI (P4SP2LP1'K)	0,016 + 0,00090	0,43 + 0,0086	26,9
A22 5. E12 PCI (P4HP2RP1'V)	0,023 + 0,0021	0,26 + 0,035	11,3

Tabla 6

Constantes de velocidad de inhibición de segundo orden ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)			
Variante	fXla	APC	Inhibición de APC/fXla
FL α_1 AT Pitts C232S	398,88 + 13,012	108,16 + 7,086	0,3
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K	0,47 + 0,037	15,14 + 1,68	32,2

Tabla 7

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
TS	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
P2KP1'K	T	I	F	T	K	R	K	A	R	L
E7	T	I	S	T	H	R	R	A	R	L
E10	T	I	R	T	Q	R	V	A	R	L
E11	T	I	T	T	L	R	Y	A	R	L
D8	T	I	Q	T	R	R	N	A	R	L
H11	T	I	A	T	Q	R	Y	A	R	L

Tabla 8

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
TS	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
P2KP1'K	T	I	F	T	K	R	K	A	R	L
2.B10	T	I	S	T	L	R	K	A	R	L
3.B11	T	I	F	T	F	R	R	A	R	L
3.C3	T	I	V	T	R	R	I	A	R	L
3.E8	T	I	F	T	R	R	K	A	R	L
3.G10	T	I	C	T	L	R	K	A	R	L
3.G11	T	I	W	T	W	R	N	A	R	L
3.H11	T	I	W	T	W	R	N	A	R	L
4.E4	T	I	K	T	D	R	M	A	R	L
4.F7	T	I	F	T	V	R	K	A	R	L
4.F10	T	I	R	T	R	R	I	A	R	L
4.H7	T	I	G	T	I	R	R	A	R	L
4.H11	T	I	K	T	R	R	H	A	R	L
5.D2	T	I	T	T	R	R	V	A	R	L
5.E7	T	I	L	T	R	R	I	A	R	L
5.E12	T	I	H	T	R	R	V	A	R	L

ES 2 704 058 T3

Tabla 9

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
α_1 AT TS	L	E	A	I	P	<u>M</u>	S	I	P	P
α_1 AT Pitts	L	E	A	I	P	<u>R</u>	S	I	P	P
P2. G11	L	E	A	I	K	<u>R</u>	s	I	P	P
P2. F10	L	E	A	I	R	<u>R</u>	s	I	P	P
P2. D8	L	E	A	I	K	<u>R</u>	s	I	P	P
P2. G8	L	E	A	I	R	<u>R</u>	s	I	P	P
P2. E7	L	E	A	I	R	<u>R</u>	s	I	P	P
P2. D10	L	E	A	I	R	<u>R</u>	s	I	P	P
P2. G4	L	E	A	I	R	<u>R</u>	s	I	P	P
P2. F4	L	E	A	I	R	<u>R</u>	s	I	P	P
P1'.H8	L	E	A	I	P	<u>R</u>	E	I	P	P
P1'. A11	L	E	A	I	P	<u>R</u>	R	I	P	P
P1'. F10	L	E	A	I	P	<u>R</u>	E	I	P	P
P1'. F9	L	E	A	I	P	<u>R</u>	K	I	P	P
P1'. F4	L	E	A	I	P	<u>R</u>	E	I	P	P
4.G9	L	E	A	I	T	<u>R</u>	N	I	P	P
4.G4	L	E	A	I	Q	<u>R</u>	K	I	P	P
3.E5	L	E	A	I	R	<u>R</u>	A	I	P	P
3.B6	L	E	A	I	S	<u>R</u>	R	I	P	P
3.B2	L	E	A	I	K	<u>R</u>	N	I	P	P
3.A10	L	E	A	I	T	<u>R</u>	Y	I	P	P
2.H1	L	E	A	I	R	<u>R</u>	H	I	P	P
2.C6	L	E	A	I	T	<u>R</u>	R	I	P	P
1.H10	L	E	A	I	V	<u>R</u>	R	I	P	P
1.B11	L	E	A	I	R	<u>R</u>	C	I	P	P
1.A12	L	E	A	I	K	<u>R</u>	H	I	P	P
2.E5	L	E	A	I	T	<u>R</u>	R	I	P	P
3.G9	L	E	A	I	Y	<u>R</u>	R	I	P	P
3.F4	L	E	A	I	A	<u>R</u>	R	I	P	P
3.C9	L	E	A	I	C	<u>R</u>	K	I	P	P
2.H5	L	E	A	I	K	<u>R</u>	N	I	P	P
2.E7	L	E	A	I	W	<u>R</u>	N	I	P	P
1.B2	L	E	A	I	S	<u>R</u>	R	I	P	P
5.C12	L	E	A	I	H	<u>R</u>	N	I	P	P
5.A6	L	E	A	I	R	<u>R</u>	N	I	P	P
4.EI	L	E	A	I	P	<u>R</u>	K	I	P	P
4.C12	L	E	A	I	N	<u>R</u>	N	I	P	P
3.F8	L	E	A	I	T	<u>R</u>	M	I	P	P
3.C10	L	E	A	I	T	<u>R</u>	H	I	P	P
2.E8	L	E	A	I	K	<u>R</u>	S	I	P	P
1.H9	L	E	A	I	T	<u>R</u>	Q	I	P	P

Tabla 10

Constantes de velocidad de inhibición de segundo orden (mM⁻¹. s⁻¹)			
Variante	Trombina	APC	Inhibición de APC/Trombina
FL α ₁ AT Pitts C232S	292,76 + 17,60	108,16 + 7,086	0,4
FL α ₁ AT Pitts C232S P2KP1'K	Sin inhibición después de 4 h	15,14 + 1,68	Sin inhibición de trombina
FL α ₁ AT Pitts C232S P2R	0,042 ± 0,0024	61,12 + 6,26	1455,2
FL α ₁ AT Pitts C232S P1'R	0,68 + 0,068	131,57 + 13,32	193,5
FL α ₁ AT Pitts C232S P1'E	0,15 + 0,015	2,99 + 0,29	19,9
FL α ₁ AT Pitts C232S P2TP1'N	0,27 + 0,047	62,37 + 2,46	231,0
FL α ₁ AT Pitts C232S P2TP1'Y	0,023 + 0,0014	5,70 + 0,83	247,8
FL α ₁ AT Pitts C232S P2QP1'K	0,0038 + 0,0013	33,41 + 6,36	8792,1
FL α ₁ AT Pitts C232S P2KP1'H	Sin inhibición después de 2 h	28,84 + 3,05	Sin inhibición de trombina
FL α ₁ AT Pitts C232S P2KP1'N	0,015 + 0,0026	37,80 + 2,48	2520,0
FL α ₁ AT Pitts C232S P2RP1'C	0,034 + 0,0094	24,55 + 2,15	722,1

Tabla 11

Variante	TP (s)	TTPa (s)
Plasma	27,2 ± 08	60,3
FL α ₁ AT Pitts C232S P2K	27,0 ± 05	107,2
FL α ₁ AT Pitts C232S P1'K	27,1 ± 04	228,1
FL α ₁ AT Pitts C232S P2R	27,8 ± 04	111,6
FL α ₁ AT Pitts C232S P1'R	28,1 ± 05	287
FL α ₁ AT Pitts C232S P1'E	27,2 ± 04	84
FL α ₁ AT Pitts C232S P2TP1'N	29,5 ± 09	>300
FL α ₁ AT Pitts C232S P2TP1'Y	28,3 ± 08	185,4
FL α ₁ AT Pitts C232S P2QP1'K	27,9 ± 03	111,5
FL α ₁ AT Pitts C232S P2KP1'H	27,4 ± 09	77,8
FL α ₁ AT Pitts C232S P2KP1'N	27,8 ± 03	81,9
FL α ₁ AT Pitts C232S P2RP1'C	28,5 ± 06	ND

Tabla 12

Constantes de velocidad de inhibición de segundo orden (mM⁻¹. s⁻¹)		
Variante	fXa	Inhibición de APC/fXa
FL α ₁ AT Pitts C232S	41,33 ± 2,36	2,6
FL α ₁ AT Pitts C232S P2KP1'K	0,12 ± 0,010	126,2
FL α ₁ AT Pitts C232S P2R	4,79 ± 0,58	12,8

FL α_1 AT Pitts C232S P2QP1'K	1,082 \pm 0,15	30,9
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'H	0,62 \pm 0,040	46,5
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'N	0,91 \pm 0,13	41,5

Tabla 13

Constantes de velocidad de inhibición de segundo orden ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)				TTPa (s)
Variante	Trombina	APC	fXa	
FL α_1 AT Pitts C232S	292,76 \pm 17,60	108,16 \pm 7,086	41,33 \pm 2,36	>300 (55,0 \pm 3,8)
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K	Sin inhibición después de 4 h	15,14 \pm 1,87	0,12 \pm 0,010	62,1 \pm 4,2 (55,0 \pm 3,8)
FL α_1 AT Pitts C232S P2RP1'Q	0,0054 \pm 0,0011	8,30 \pm 1,11	0,13 \pm 0,0067	55,1 \pm 2,8 (49,3 \pm 2,5)
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'Q	0,0029 \pm 0,0015	9,00 \pm 0,67	0,17 \pm 0,010	53,9 \pm 3,0 (49,3 \pm 2,5)

Secuencias

5 1 mqlfllllclv llspqgaslh rhhpremkkr vedlhvgatv apssrrdftf dlyralasaa
 61 psqniffspv sismslaml l gagsstkmq ileglglnlq kssekelhrq fqllqelnq
 121 prdgfqlslg nalftdlvvd lqdtfvsamk tlylادتفpt nfrdsagamk qindyvakqt
 181 kgkivdlkn ldsnavvimv nyiffkakwe tsfnhkgtqe qdfyvtsetv vrvpmsred
 241 qhylldrnl scrvgvpyq gnatalfilp segkmqven glsektlrkw lkmfkkqrle
 301 lylpkfsieg syqlekvlp l gisnvtsh adlsgisnhs niqvsemvhk avvedesgt
 361 raaaatgtif **tfrs**arlmsq rlvfnrpfm fivdnnilfl gkvnrp

SEQ ID NO: 1 Inhibidor de la proteína C (PCI)

10 La proteína madura, que incluye el propéptido, se corresponde con los restos 20 a 406. La secuencia de señal se corresponde con los restos 1-19. El propéptido se corresponde con los restos 20-25. Los restos P4, P2, P1 y P1' del RCL están en negrita y subrayados.

1 mermlpllal gllaagfcpa vlchpnspld eenltqenqd rgthvdlgla sanvdfafsl
 61 ykqlvlpkd knvifspisi stalafslg ahnttlteil kglkfnltet seaeihqsfq
 121 hllrtlnqss delqlsmgna mfvkeqlsll drftedakrl ygseafatdf qdsaaakkli
 181 ndyvkngrtrg kitdlikdld sqtmmlvny iffkakwemp fdpqdthqsr fylskkkwvm
 241 vpmmslhht ipyfrdeels ctvvelkytg nasalfilpd qdkmeeveam llpetlkrwr
 301 dslefrefeige lylpkfsisr dynlndillq lgieeaftsk adlsgitgar nlavsqvvhk
 361 avldvfeegt easaatavki **tlls**alvetr tivrfnrpfl miivptdtqn iffmskvtnp
 421 kqa

15 SEQ ID NO: 2 Alfa-1-antiquimotripsina

La proteína madura se corresponde con los restos 26 a 423. Los restos P4, P2, P1 y P1' del RCL están en negrita y subrayados.

1 masrltlltl lllllagdra ssnpnatsss sqdpeslqdr gegkvattvi skmlfvepil
 61 evsslpttns ttnsatkita nttdepttqp ttepttqpti pptqpttqlp tdsptqpttg
 121 sfcpgpvtlc sdleshstea vlgdalvdfs lklyhafsam kkvetnmafs pfsiaslltq
 181 vllgagentk tnlesilsyp kdftcvhgal kgfttkgvtv vsqifhspdl airdtfvnas
 241 rtlysssprv lsnnsdanle lintwvaknt nnkisrlls lpsdtrlvll naiylsakwk
 301 ttfdpkktrm epfhfknsvi kvpmnsskky pvahfidgtl kakvgqlqls hnslsilvlp
 361 qnlkhrledm eqalspsvfk aimeklemsk fqptlltlpr ikvttsqdm l simekleffd
 421 fsydlnlcgl tedpdlqvs a mqhqtvllet etgveaaaaa **aivart**llv fevqqpflfv
 20 481 lwdqqhkfpv fmgrvydpra

SEQ ID NO: 3 Inhibidor de C1-esterasa

25 La proteína madura se corresponde con los restos 23-500. Los restos P4, P2, P1 y P1' del RCL están en negrita y subrayados.

1 mallwgllvl swsclqgpcs vfspvsamep lgrqltsqpn qeqvsplitll klgnqepggg
 61 talkspgvc srdptpeqth rlarammaft adlflsvaqt stcpnlilsp lsvalalshl
 121 algaghtlq rlqqlvhags gpclphllsr lcqdlqpgaf rlaarmylqk gfpikedfle
 181 qseqlfgakp vsltgkqedd laninqwvke ategkigefl sglpedtvll llnaihfqgf
 241 wrnkfdpslt qrdsfhldeq ftvpvemmqa rtyplrwlfl eqpeiqvahf pfknmsfvv
 301 lvpthfewnv sqvlanlswd tlhpllvwer ptkvrlpkly lkhqmdlvat lsqglqelf
 361 qapdlrgise qslvvsgvqh qstlelsevg veaaaatsiamsrmslssfs vnrpflffif
 421 edttglplfv gsvrnpnpsa prelkeqqds pgnkdflqsl kgfprgdklf gpdklvppm
 481 eedypqfgsp k

SEQ ID NO: 4 α_2 -Antiplasmina

- 5 La proteína madura se corresponde con los restos 28-491. Los restos P4, P2, P1 y P1' del RCL para la inhibición de quimotripsina están en negrita los restos para la inhibición de plasmina están subrayados.

1 mysnvigtvt sgkrkvyls llligfwdcv tchgspvdic takprdipmn pmciyrspk
 61 katedegseq kipeatnrrv welskansrf attfyqhlad skndndnifl splsistafa
 121 mtklgacondt lqqimevfkf dtisektsdq ihffaklnc rlyrkankss klvsanrlfg
 181 dkslftfety qdiselvyga klqpldfken aeqsraaink wvsnktegri tdvipseain
 241 eltvvlvnt iyfkglwksk fspentrkel fykadgescs asmmyqegkf ryrrvaegtq
 301 vlelfpkgdd itmvlilpkp ekslakveke ltpevlqewl deleemmlvv hmprfriedg
 361 fslkeqlqdm glvdlfspek sklpgivaeg rddlyvsdaf hkaflevnee gseaaastav
 421 vigrslnpn rvtfkanrpf lvfirevpln tiifmgrvan pcvk

- 10 SEQ ID NO: 5 Antitrombina (ATIII)

La proteína madura se corresponde con los restos 33-464. Los restos P4, P2, P1 y P1' del RCL están en negrita y subrayados.

1 mkhslnalli fliitsawgg skgpldqlek ggetaqsadp qweqlnnknl smpllpadfh
 61 kentvtdwi pegeedddyl dlekifsedd dyidivdsls vsptdsdvs gnilqlfhgk
 121 sriqrlniln akfafnlyrv lkdqvntfdn ifiapvgist amgmislglk getheqvhsi
 181 lhfkdvnas skyeittihn lfrklthrlf rrfngytlrs vndlyiqkqf pilldfktkv
 241 reyyfaeaqi adfsdpafis ktnnhimklt kglikdalen idpatqmmil nciyfkgsww
 301 nkfpvemthn hnfrlnerev kvksmmqtkg nflaandqel dcdilqleyv ggismliivp
 361 hkmsgmktle aqltprvver wqksmtnrtr evllpkfkle knynlveslk lmgirmlfdk
 421 ngnmagisdq riaidlfkhq gtitvneegt qattvtvqf mplstqvrft vdrpflfliy
 481 ehrtscillfm grvanpsrs

- 15

SEQ ID NO: 6 Cofactor II de la Heparina

La proteína madura se corresponde con los restos 20-499. Los restos P4, P2, P1 y P1' del RCL están en negrita y subrayados.

- 20

1 mpssvswgil llaqlcllvp vslaedpqqd aaqktdtshh dqdhtfnki tpnlaefafs
 61 lyrqlahqsn stniffspvs iatafamsl gtkadhdei leglnfnlte ipeaqihegf
 121 qellrtlnqp dsqqlttgn glflsegklk vdkfledvkk lyhseaftvn fgdteeakkq
 181 indyvekgtq gkivdlvkel drdtvfalvn yiffkgkwer pfevkdtee dfhvdqvttv
 241 kvpmmkrlgm fniqhckkls swvllmkylg nataiffld egklqlhene lthdiitkfl
 301 enedrrsas1 hlpklsitgt ydlksvlqql gitkvfsnga dlsgvteeap lklskavhka
 361 vltidekgte aagamfleai pmsippevkf nkpfvflmie qntksplfmg kvvnptqk

SEQ ID NO: 7 α_1 -antitripsina (α_1 AT)

- 25

La proteína madura se corresponde con los restos 25-418. Los restos P4, P2, P1 y P1' del RCL están en negrita y subrayados.

1 mhlidylllll lvglalshg qlhvehdges csnsshqqil etgegspslk iapanadfaf
 61 rfyyliaaset pgkniffspl sisaayamls lgacshsrsq ileglgfnlt elsedvhrq
 121 fqhlhtlnl pghgletrvg salflshnlk flakflndtm avyeaklfht nfydvtgtiq
 181 lindhvket rgkivdlvse lkkdvlmvlv nyiyfkalwe kpfissrttp kdfyvdeent
 241 vrvpmmldq ehwhylhdry lpcsvlrmly kgdatvffil pnqgkmreie evltpemlrm
 301 wnnllrkrnf ykklehlhpk fsisgsvld qilprlgftd lfskwadlsg itkqqkleas
 361 ksfhkatldv deagteaaaa tsfaikffsa qtnrhilrfn rpflvifst stqsvflglk
 421 vvdptkp

- 30

SEQ ID NO: 8 Kalistatina

ES 2 704 058 T3

La proteína madura se corresponde con los restos 21-427. Los restos P4, P2, P1 y P1' del RCL están en negrita y subrayados.

```

1  mqmspaltcl  vlglalvfge  gsavhhppsy  vahlasdfgv  rvfqqvaqas  kdrnvvfspy
61 gvasvlamlq  lttggetqqq  iqaamgfkid  dkgmapalrh  lykelmgpwn  kdeisttdai
121 fvqrdlklvq  gfmphffrlf  rstvkqvdfs  everarfiin  dwvkthtkgm  isnllgkgav
181 dqltrlvlvn  alyfngqwkt  pfpdssthrr  lfhksdgstv  svpmaqtnk  fnytefttpd
241 ghyydilelp  yhgdtlsmfi  aapyekevpl  saltnilsaq  lishwkgnmt  rlprllvlpk
301 fsletevdlr  kplenlgmtd  mfrqfqadft  slsdqeplhv  aqalqkvkie  vnesgtvass
361 stavivsarm  apeiimdrp  flfvvrhnpt  gtvlfmgqvm  ep

```

5

SEQ ID NO: 9 Inhibidor del activador del plasminógeno

La proteína madura se corresponde con los restos 24-402. Los restos P4, P2, P1 y P1' del RCL están en negrita y subrayados.

10

```

1  mkvpsllls  vllaqvlvp  glapsqspe  tpapqntsr  vvqapkeeee  deqeaseeka
61 seekawlma  srqqlakets  nfgfsllrki  smrhdgnmvf  spfgmslamt  glmlgatgpt
121 etqikrglhl  qalkptkpgl  lpslfkglre  tlsrnlelgl  tqgsfafihk  dfdvkettffn
181 lskryfdtec  vpmnfrnasq  akrlmhyin  ketrgkipkl  fdeinpetkl  ilvdyilfkg
241 kwltpfdpvf  tevdtfhldk  yktikvpmmy  gagkfastfd  knfrchvlkl  pyqgnatmlv
301 vlmekmgdhl  aledylttdl  vetwlrnmkt  rnmevffpkf  kldqkyemhe  llrqmgirri
361 fspfadlsel  satgrnlqvs  rvlqrtviev  dergteavag  ilseitaysm  ppvikvdrpf
421 hfmiyeetsg  mllflgrvn  ptll

```

SEQ ID NO: 10 Inhibidor dependiente de la Proteína Z

15 La proteína madura se corresponde con los restos 22-444. Los restos P4, P2, P1 y P1' del RCL están en negrita y subrayados.

```

1  mnwhlplfll  asvtlpsics  hfnplsleel  gsntgiqvfn  qivksrphdn  ivisphgias
61 vlgmlqlgad  grtkkqlamv  mrygvngvgk  ilkkinkaiv  skknkdivtv  anavfvknas
121 eievpfvtrn  kdvfqcevrn  vnfedpasac  dsinawvkne  trdmidnlls  pdlidgvltr
181 lvlnavyfk  glwksrfqpe  ntkkrtfvaa  dgksyqvpml  aqlsvfrcgs  tsapndlwyn
241 fielpyhges  ismlialpte  sstplsaiip  histktidsw  msimvpkrvq  vilpkftava
301 qtdlkeplv  lgitdmfds  kanfakittg  senlhvshil  qkakievsed  gtkasaatta
361 liarsppw  fivdrpflfff  irhnptgavl  fmgqinkp

```

20 SEQ ID NO: 11 Proteasa nexina 1

La proteína madura se corresponde con los restos 20-398 – isoforma a. Los restos P4, P2, P1 y P1' del RCL están en negrita y subrayados.

```

1  mpssvswgil  llaglcclvp  vslaedpqgd  aaqktdtshh  dqdhptfnki  tpnlaefafs
61 lyrqlahqsn  stniffspvs  iatafamlsl  gtkadhdei  leglnfnlte  ipeaqihegf
121 qellrtlnqp  dsqlqlttgn  glflseglkl  vdkfledvkk  lyhseaftvn  fgdteeakkq
181 indyvekgtq  gkivdlvkel  drdtvfalvn  yiffkgkwer  pfevkdteee  dfhvdqvttv
241 kvpmmkrlgm  fniqhckkls  swvllmkylg  nataifflpd  egklqhlene  lthdiitkfl
301 enedrrsasl  hlpklsitgt  ydlksvlgql  gitkvfsnga  dlsgvteeap  lklskavhka
25 361 vltidekgte  aagamfleaikrk  ippevkf  nkpfvflmie  qntksplfmg  kvnptqk

```

SEQ ID NO: 12 Serpina modificada en el almacén de α_1 AT

30 La proteína madura se corresponde con los restos 25-418. Los restos P4, P2, P1 y P1' del RCL están en negrita y subrayados.

REIVINDICACIONES

1. Una serpina modificada que tiene mutaciones en los restos P1' y P2 y opcionalmente en P1 y/o P4 en el bucle central reactivo (RCL) de la misma,
 5 en donde el resto P1' está mutado en Q, H, K o R; y el resto P2 está mutado en H, K o R, y;
 en donde dichas mutaciones aumentan la inhibición de una o más proteasas anticoagulantes seleccionadas de entre Proteína C activada y el complejo trombina:trombomodulina con respecto a la inhibición de una o más proteasas procoagulantes seleccionadas de entre trombina, fVIIa, fXa, fIXa y fXIa.
- 10 2. Una serpina modificada de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el resto P1' está mutado en K o Q.
3. Una serpina modificada de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la que el resto P2 está mutado en K.
- 15 4. Una serpina modificada de acuerdo con la reivindicación 1 en la que los restos P2 y P1' respectivamente en la serpina modificada son KK, RK, RH, KH, RQ o KQ.
5. Una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la serpina modificada comprende una mutación en P4, opcionalmente en donde el resto P4 está mutado en F, S, R, V, C, W, K,
 20 G, L, H, T, Q o A.
6. Una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la serpina modificada comprende una mutación en P1, opcionalmente en donde el resto P1 está mutado en R.
- 25 7. Una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la serpina modificada tiene un resto R en la posición P1.
8. Una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde las mutaciones en el RCL de la serpina modificada consisten en mutaciones en las posiciones P1' y P2; las posiciones P1', P2 y P1; las
 30 posiciones P1', P2 y P4; o las posiciones P1', P2, P4 y P1.
9. Una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde;
 el resto P4 del RCL de la serpina modificada es A, el resto P2 es K, y el resto P1' es K;
 el resto P4 del RCL de la serpina modificada es A, el resto P2 es R, y el resto P1' es H;
 35 el resto P4 del RCL de la serpina modificada es A, el resto P2 es K, y el resto P1' es H;
 el resto P4 del RCL de la serpina modificada es A, el resto P2 es R, y el resto P1' es Q;
 el resto P4 del RCL de la serpina modificada es A, el resto P2 es K, y el resto P1' es Q;
 el resto P4 del RCL de la serpina modificada es A, el resto P2 es K, el resto P1 es R y el resto P1' es K;
 el resto P4 del RCL de la serpina modificada es A, el resto P2 es K, el resto P1 es R y el resto P1' es Q; o
 40 el resto P4 del RCL de la serpina modificada es A, el resto P2 es R, el resto P1 es R y el resto P1' es Q;
 el resto P4 del RCL de la serpina modificada es K, el resto P2 es R y el resto P1' es H;
 el resto P4 del RCL de la serpina modificada es F, el resto P2 es K y el resto P1' es K;
 el resto P4 del RCL de la serpina modificada es F, el resto P2 es R y el resto P1' es K; o
 el resto P4 del RCL de la serpina modificada es S, el resto P2 es H y el resto P1' es R.
- 45 10. Una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de una serpina de tipo silvestre.
- 50 11. Una serpina modificada de acuerdo con la reivindicación 10 en donde la serpina de tipo silvestre se selecciona de entre el grupo que consiste en α_1 -antiquimotripsina (SERPINA A3), inhibidor de esterasa C1, α_2 -antiplasmina (SERPINA F2) antitrombina (ATIII) (SERPINA C1), cofactor II de heparina (HCII) (SERPINA D1), inhibidor de la proteína C (PCI) (SERPINA A5) o α_1 -antitripsina (α_1 AT) (SERPINA A1), Kalistatina (SERPINA A4), inhibidor del activador del plasminógeno (SERPINA E1), Proteasa nexina 1 (SERPINA E2) e inhibidor de proteasa dependiente de Proteína Z (SERPINA A10).
- 55 12. Una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con los restos 25-418 de la SEQ ID NO: 12, en donde el resto P4 del RCL de la serpina modificada es A, el resto P2 es K, el resto P1 es R y el resto P1' es K.
- 60 13. Una serpina modificada de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende:
- (i) la secuencia de aminoácidos de restos 25-418 de SEQ ID NO: 12;
 65 (ii) la secuencia de aminoácidos de restos 25-418 de SEQ ID NO: 12 con una mutación de C en S en el resto 256;

(iii) la secuencia de aminoácidos de restos 25-418 de SEQ ID NO: 12 con una mutación de E en S en el resto 25;
o

(iv) la secuencia de aminoácidos de restos 25-418 de SEQ ID NO: 12 con una mutación de E en S en el resto 25 y una mutación de C en S en el resto 256.

5 14. Un ácido nucleico que codifica una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o una célula recombinante que comprende un vector que expresa una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

10 15. Una composición farmacéutica que comprende una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 16. Una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal.

17. Una serpina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento o la prevención del sangrado o la promoción de hemostasia en un individuo.

20 18. Una serpina modificada para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el individuo tiene un trastorno hemorrágico, opcionalmente en donde el trastorno hemorrágico es hemofilia.

25 19. Una serpina modificada para su uso de acuerdo con la reivindicación 17 en donde el individuo es un paciente de un traumatismo.

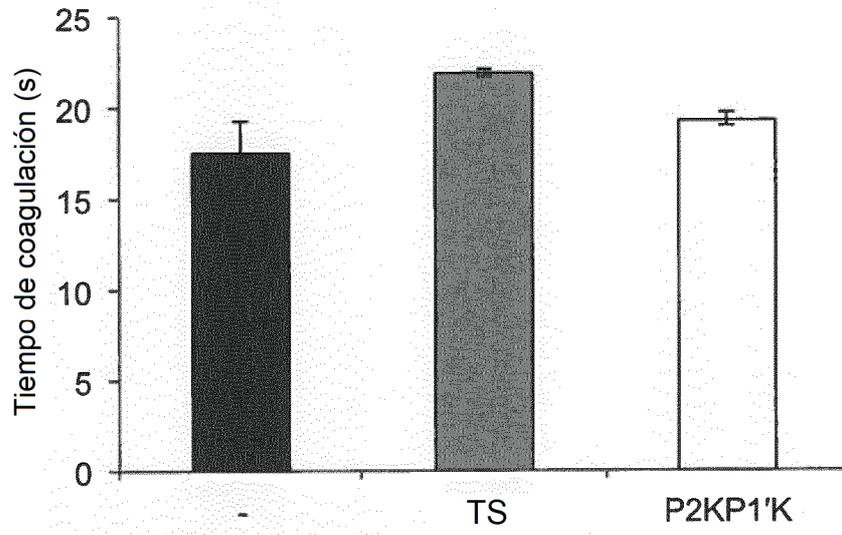


Figura 2

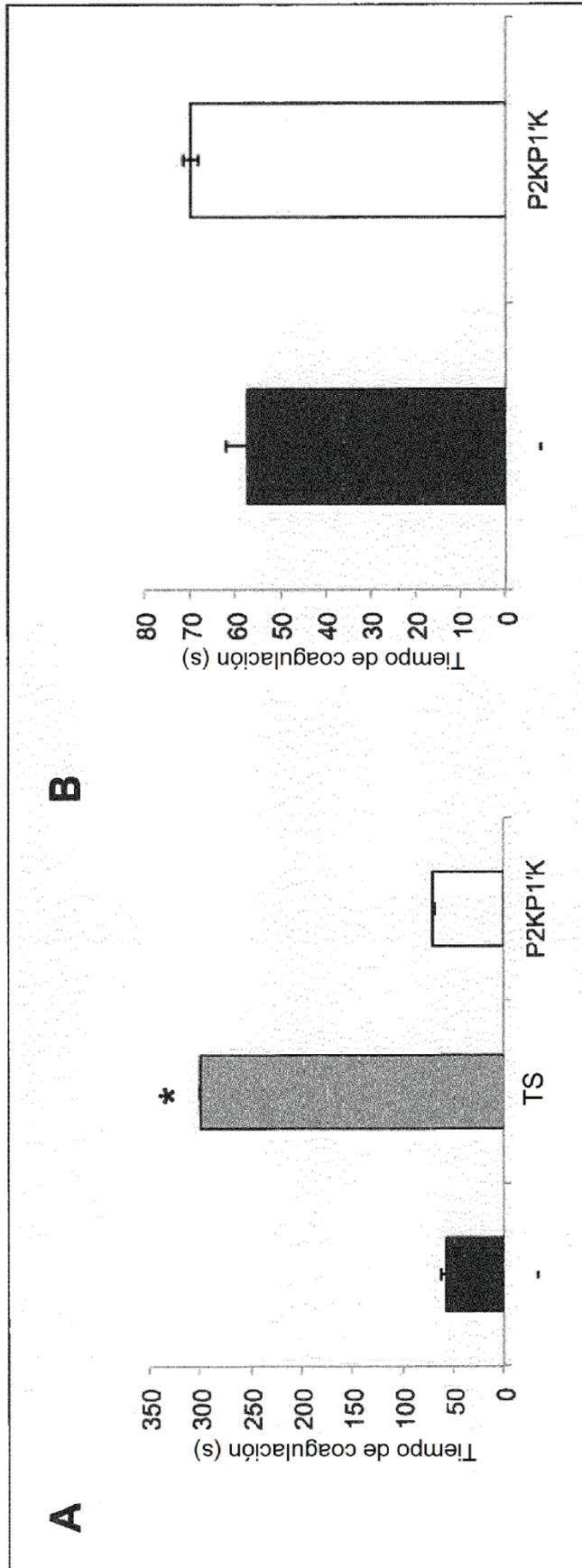


Figura 3

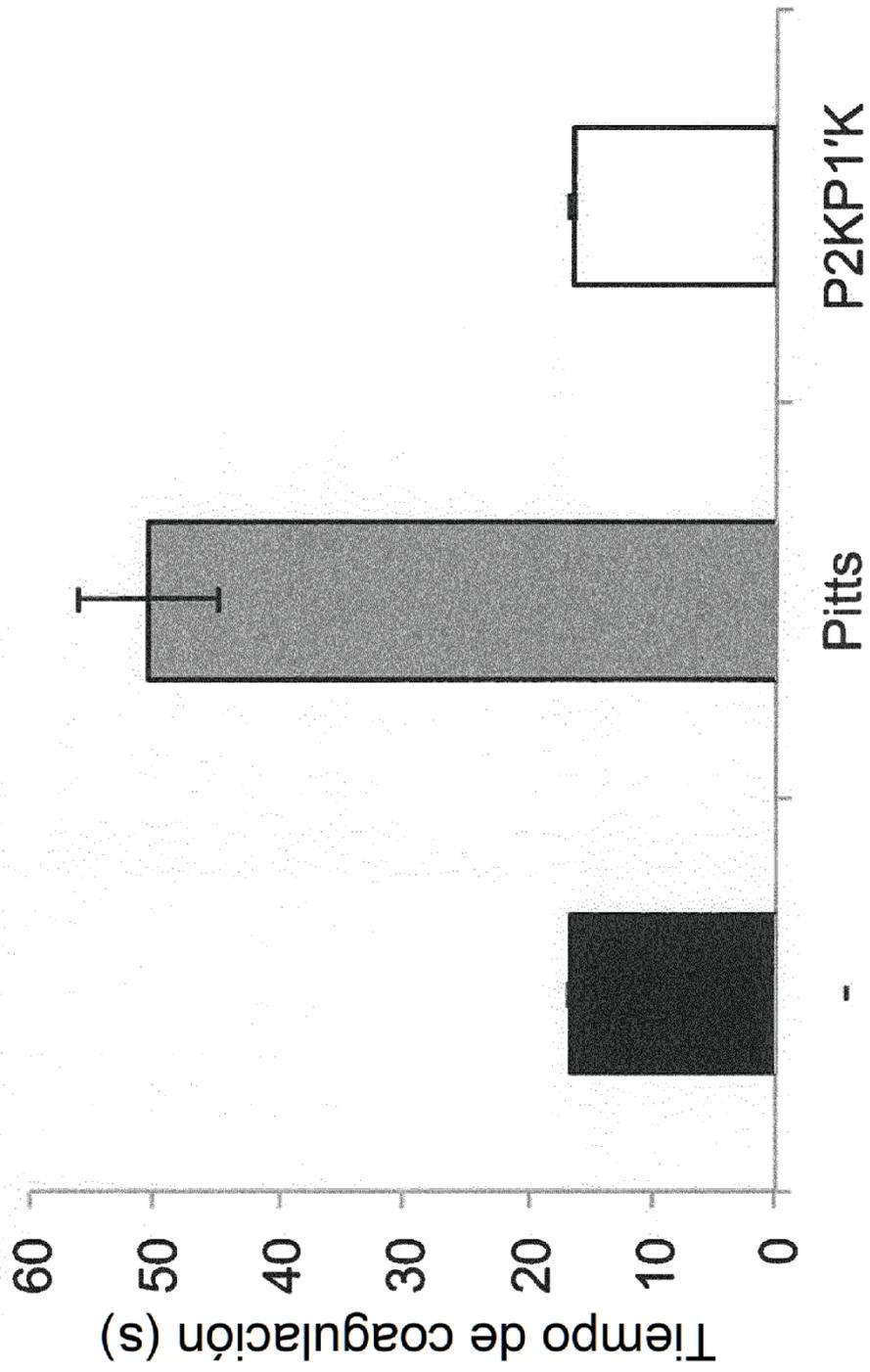


Figura 4

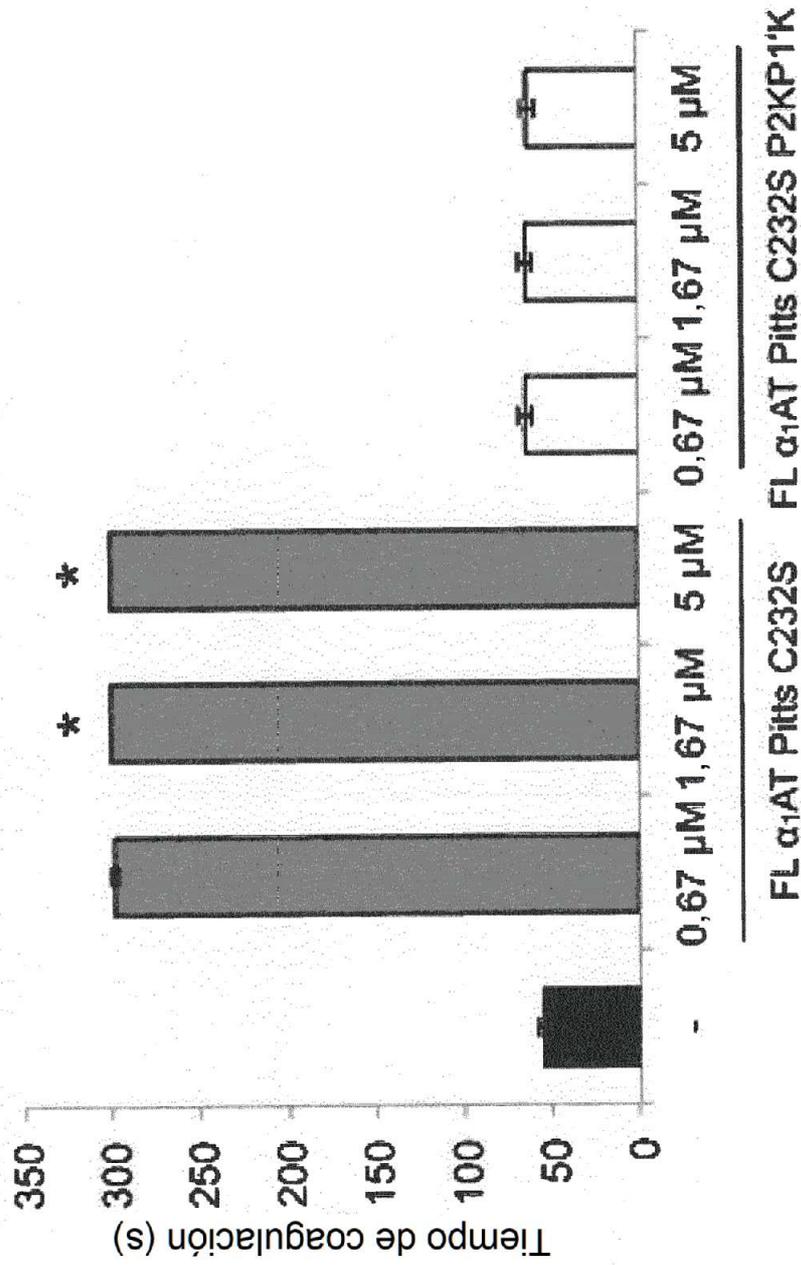


Figura 5A

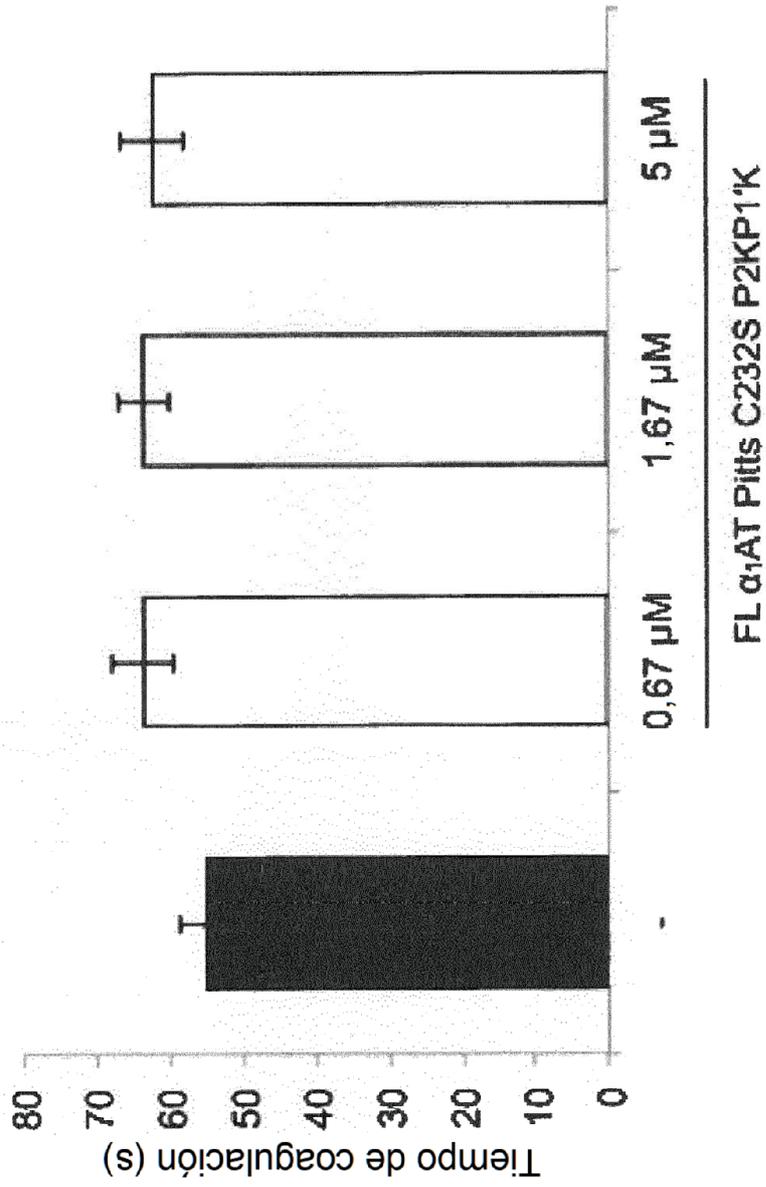


Figura 5B

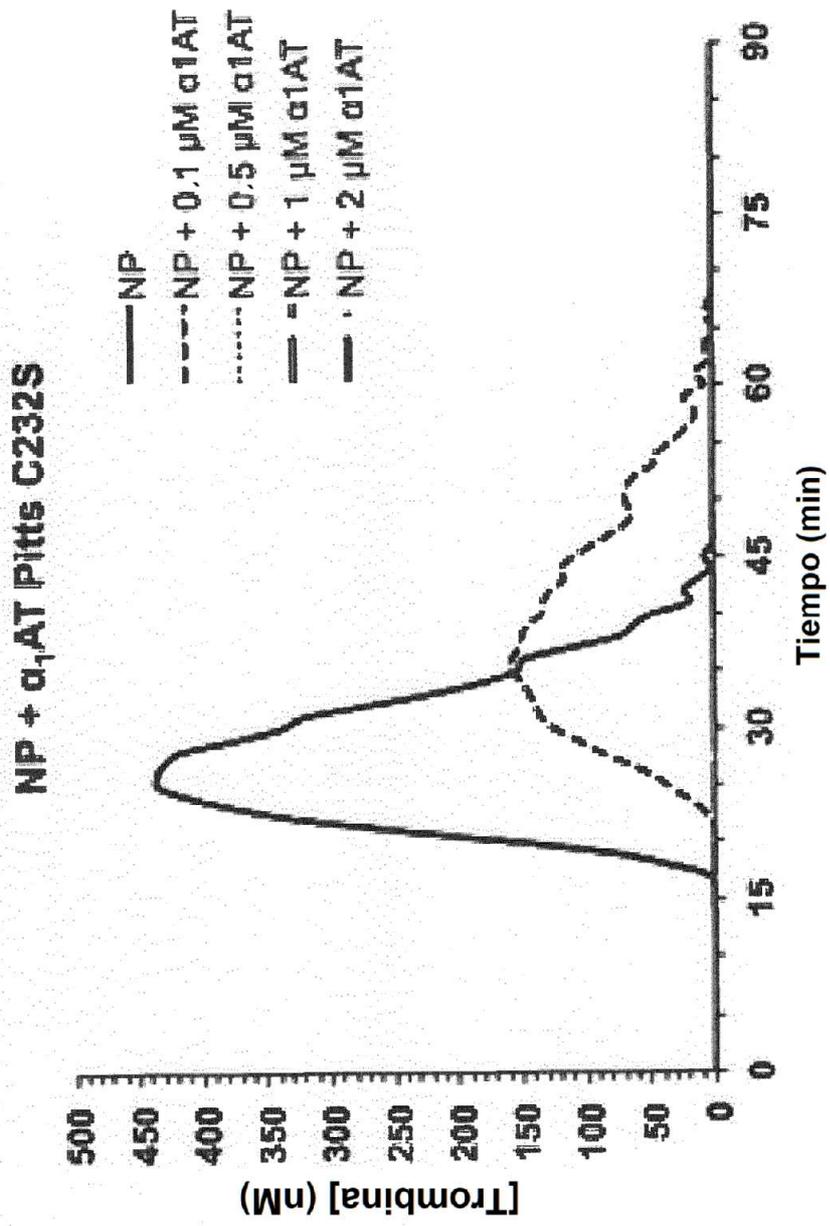


Figura 6A

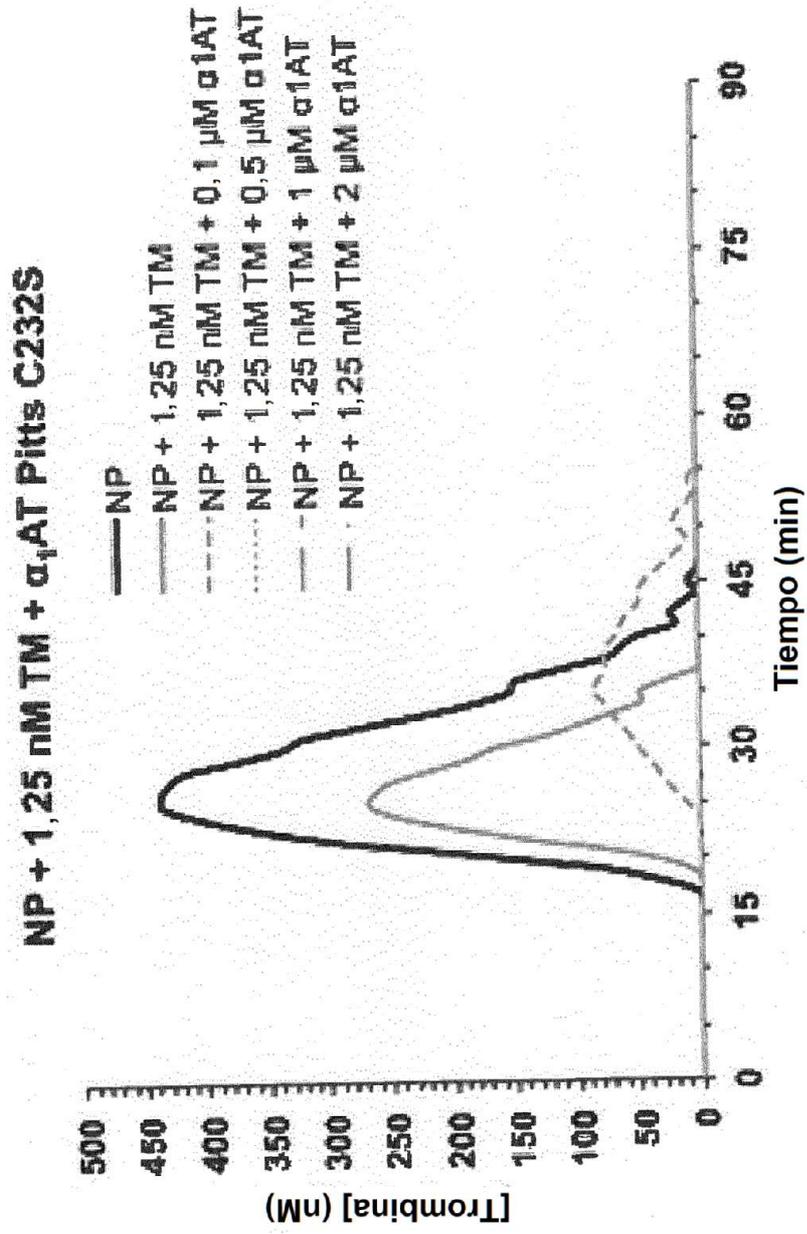


Figura 6B

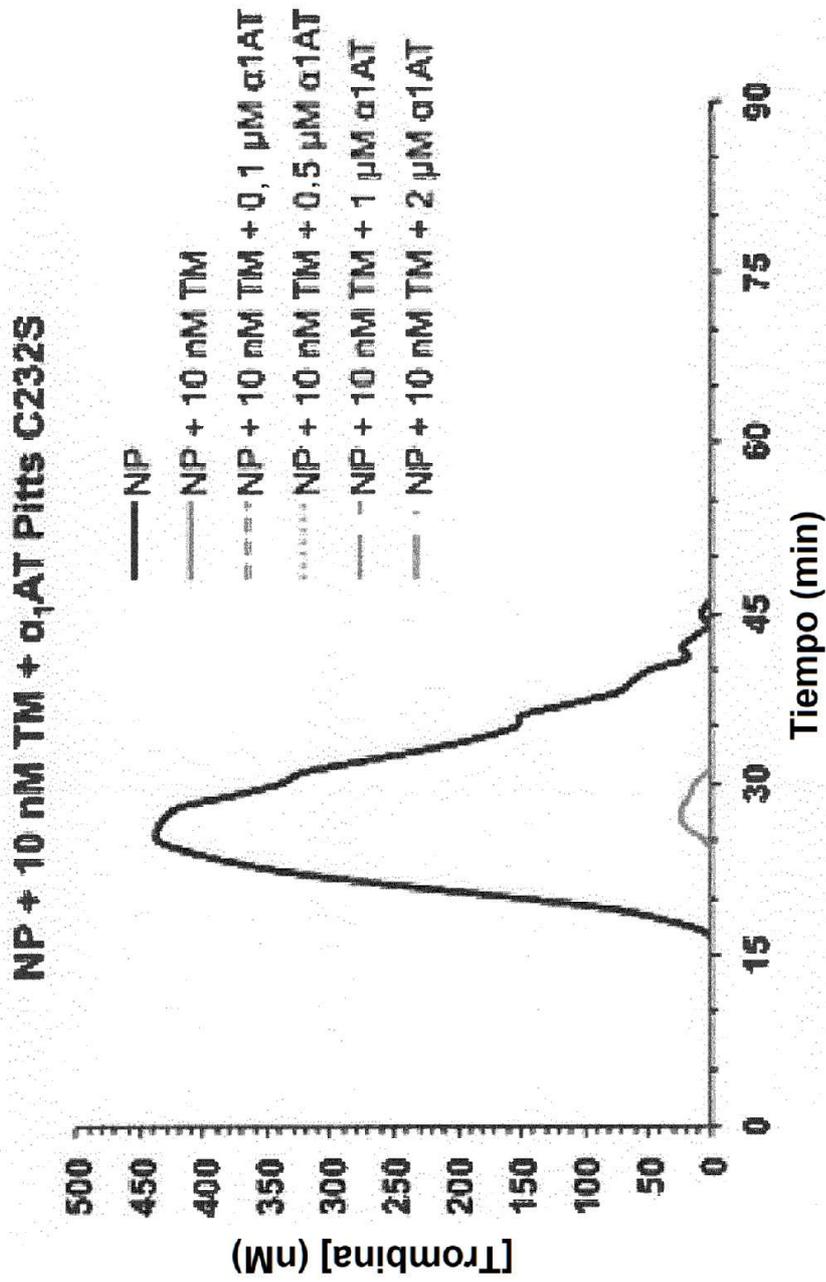


Figura 6C

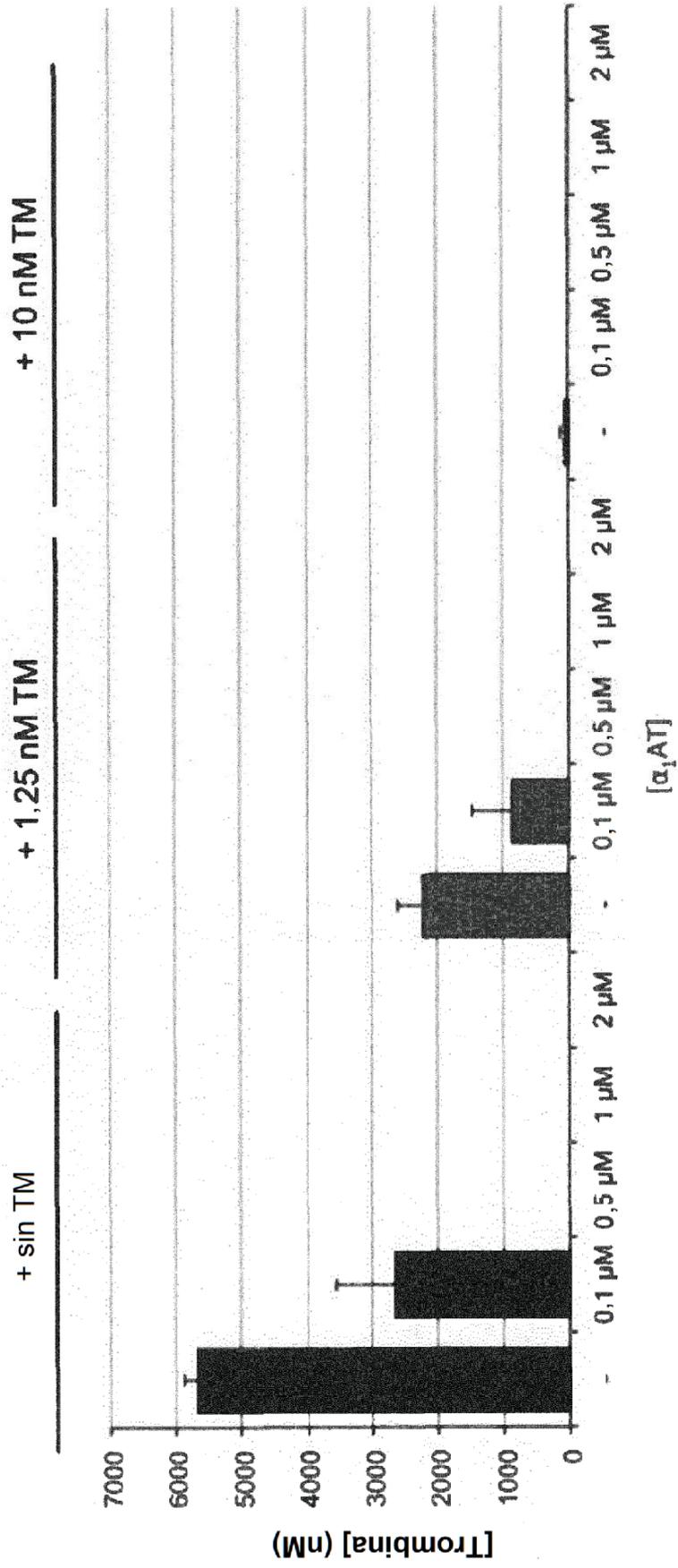


Figura 6D

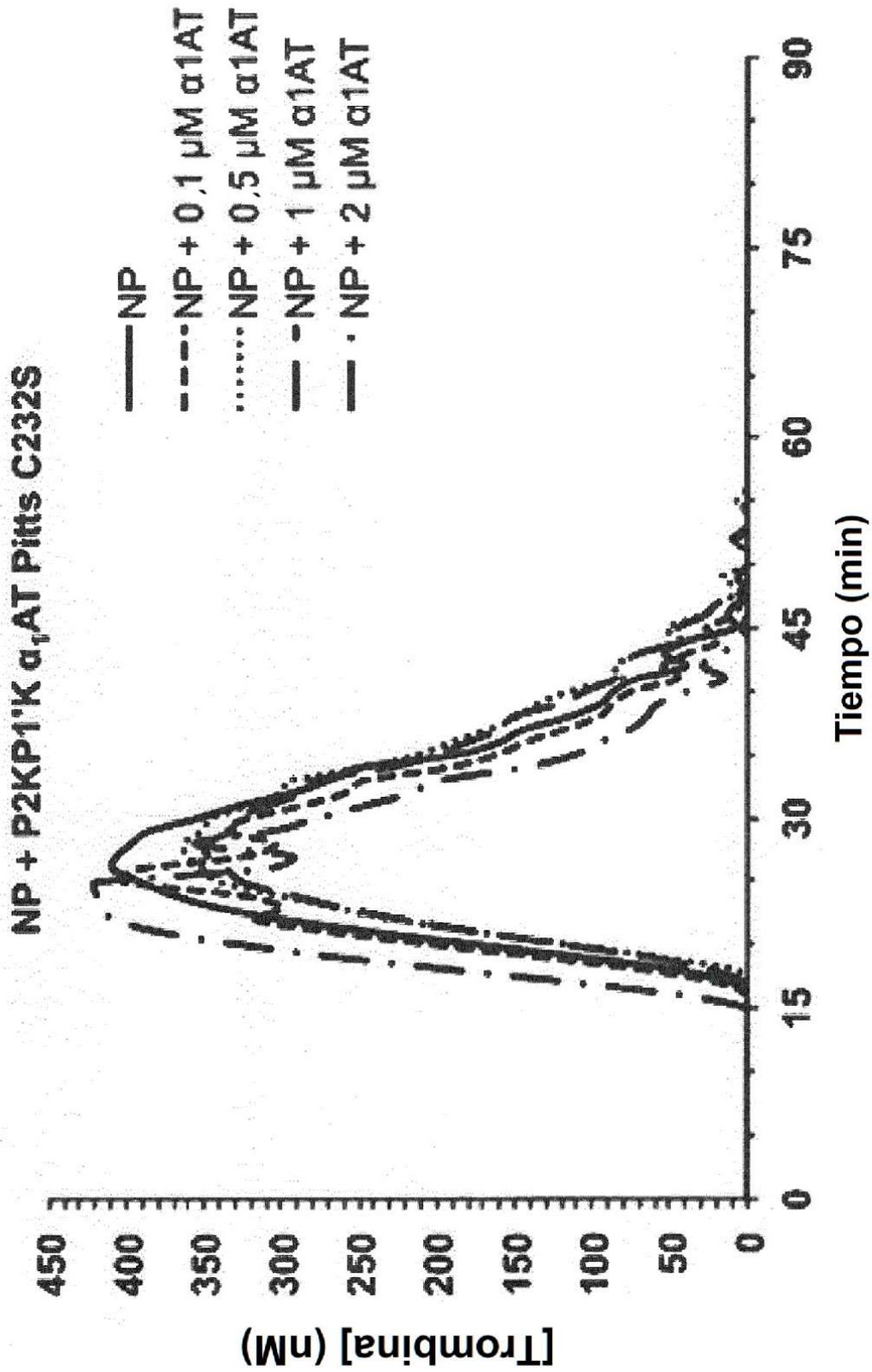


Figura 7A

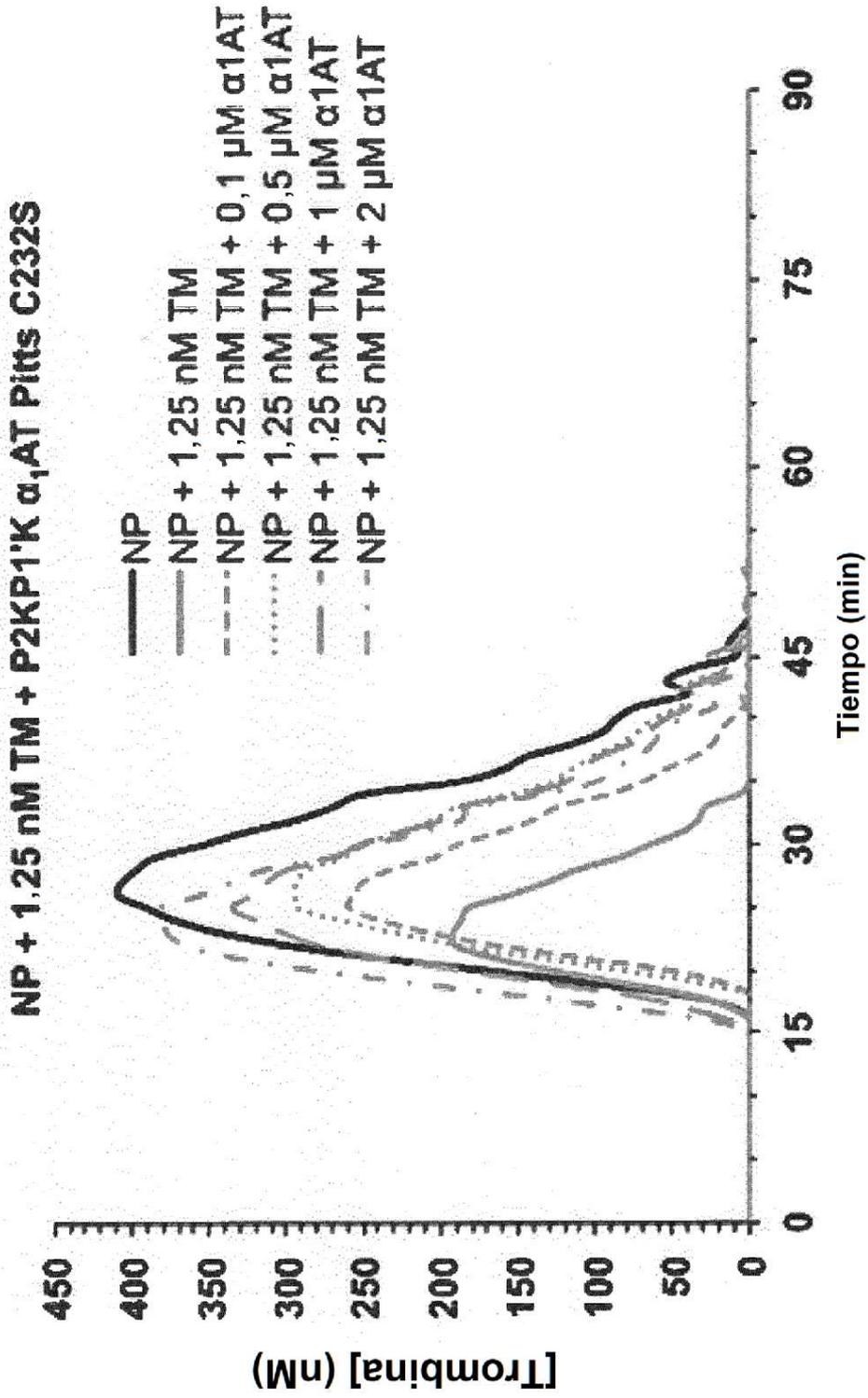


Figura 7B

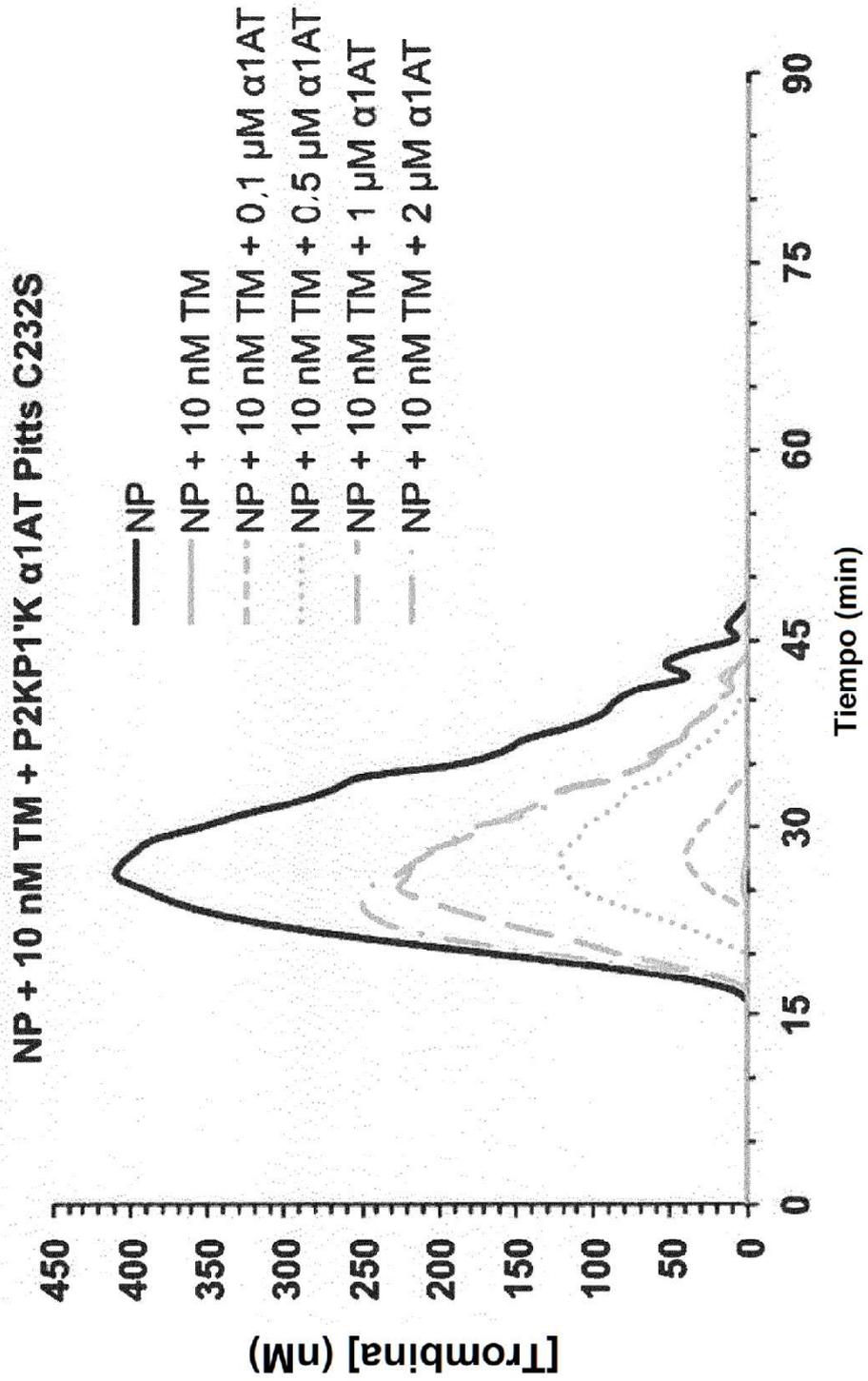


Figura 7C

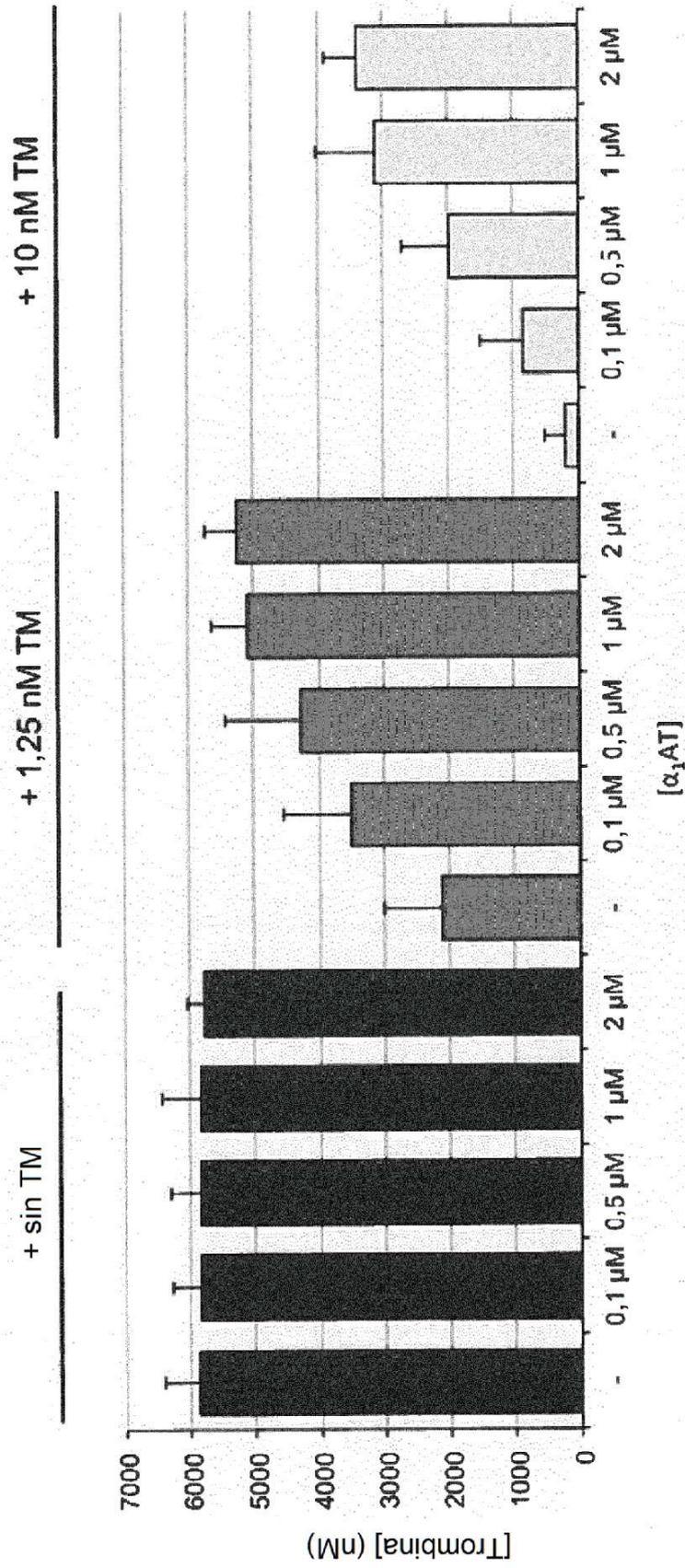


Figura 7D

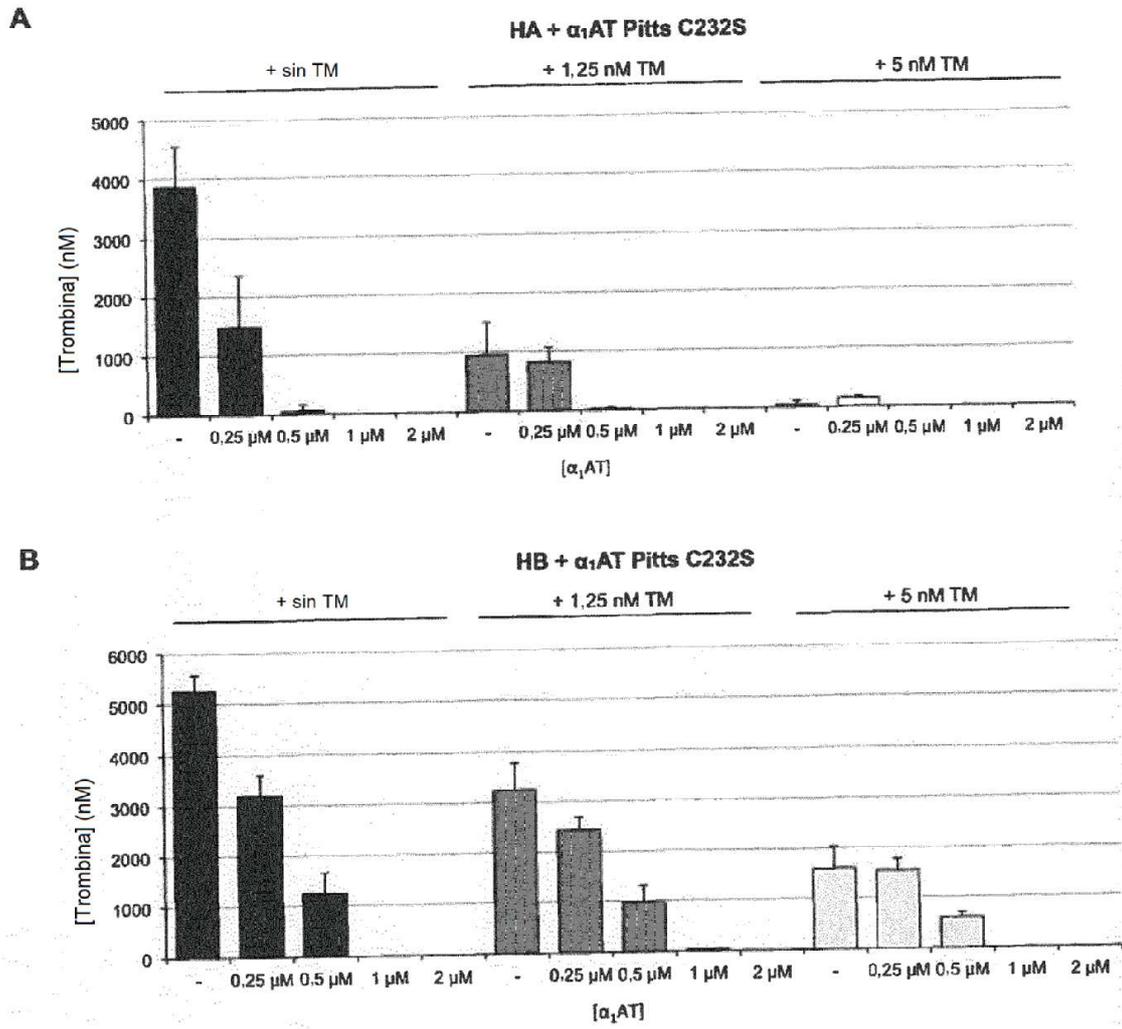


Figura 8

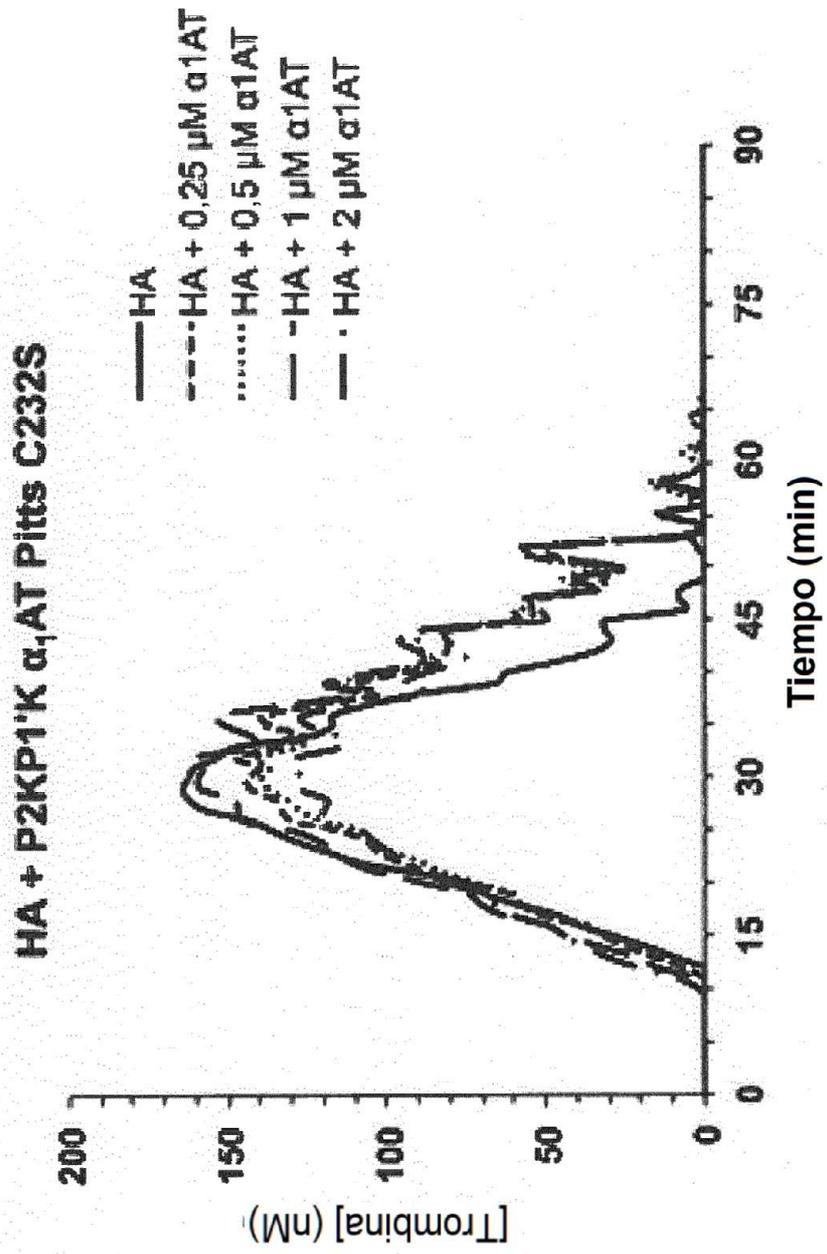


Figura 9A

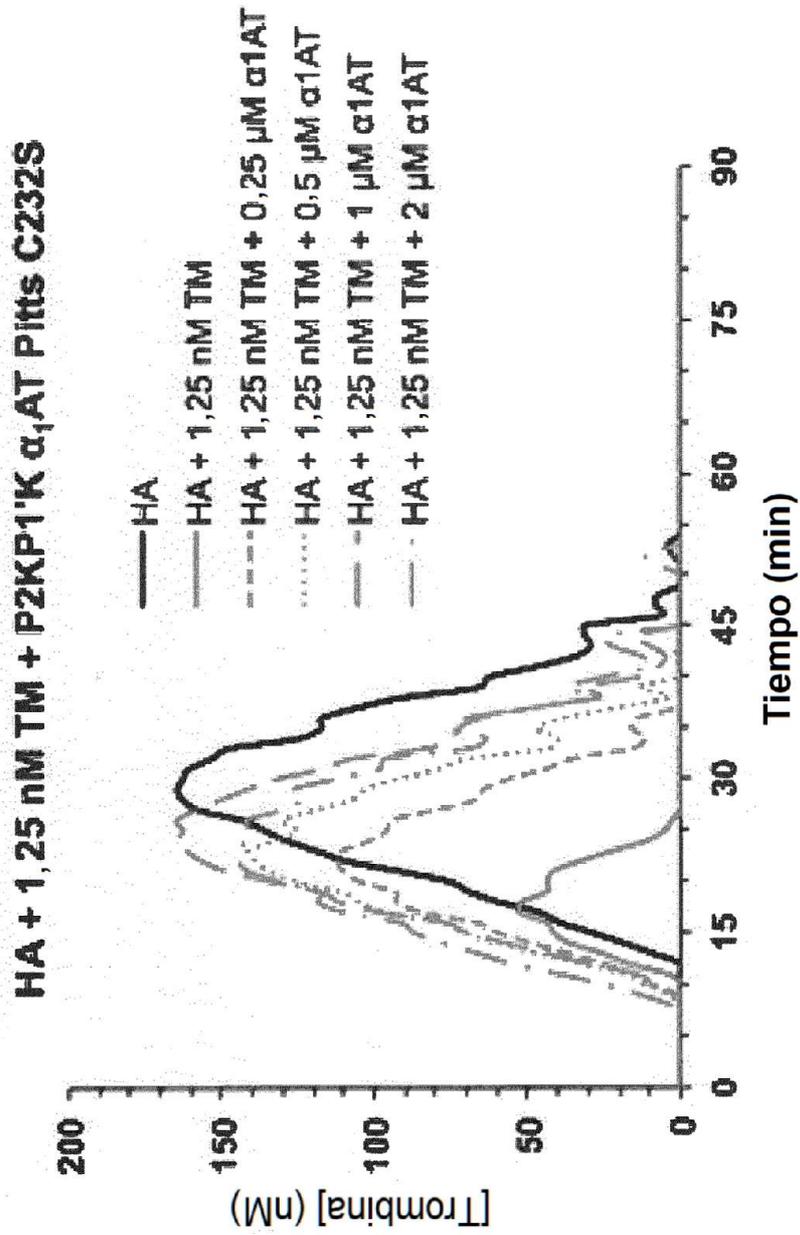


Figura 9B

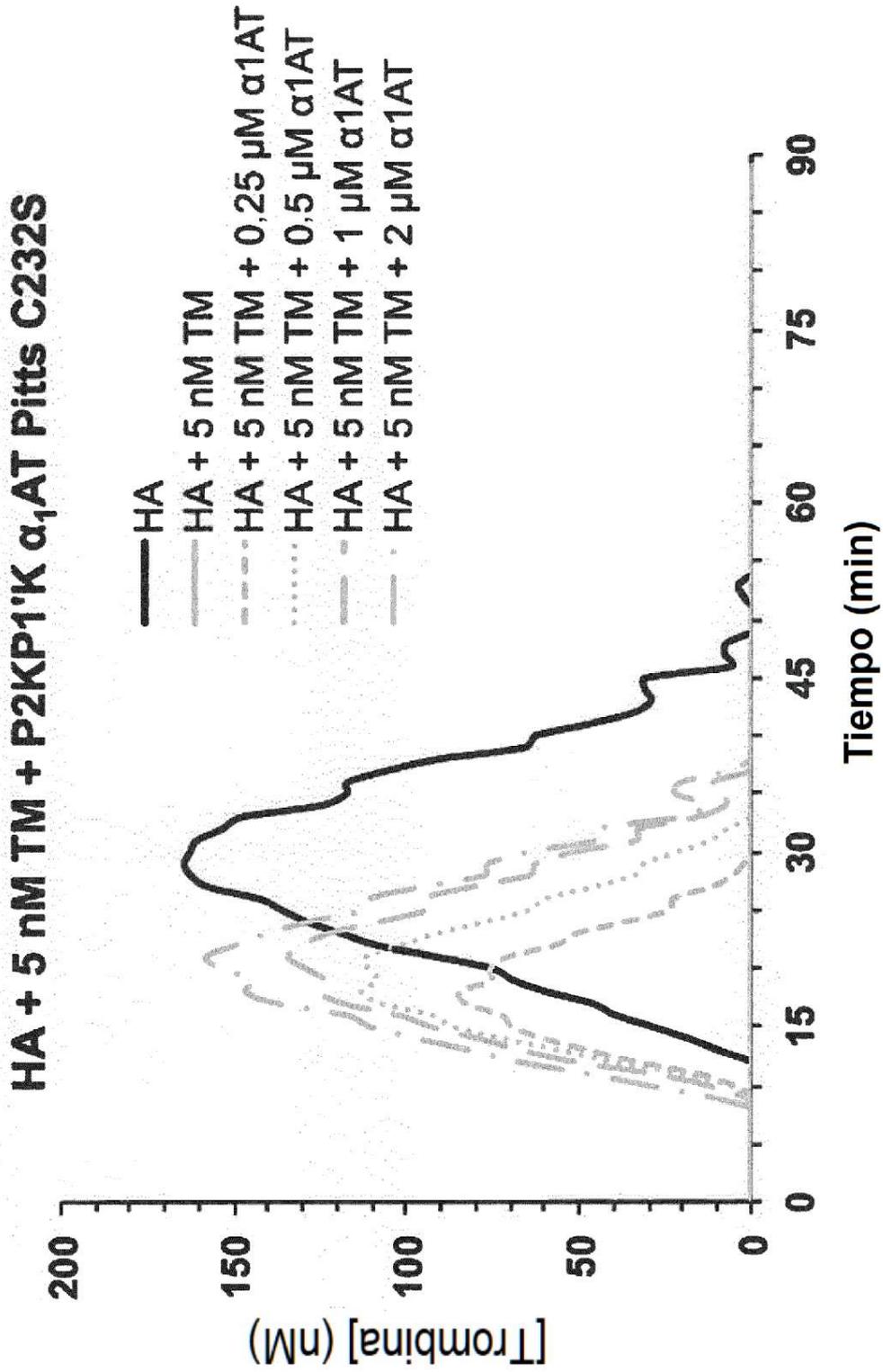


Figura 9C

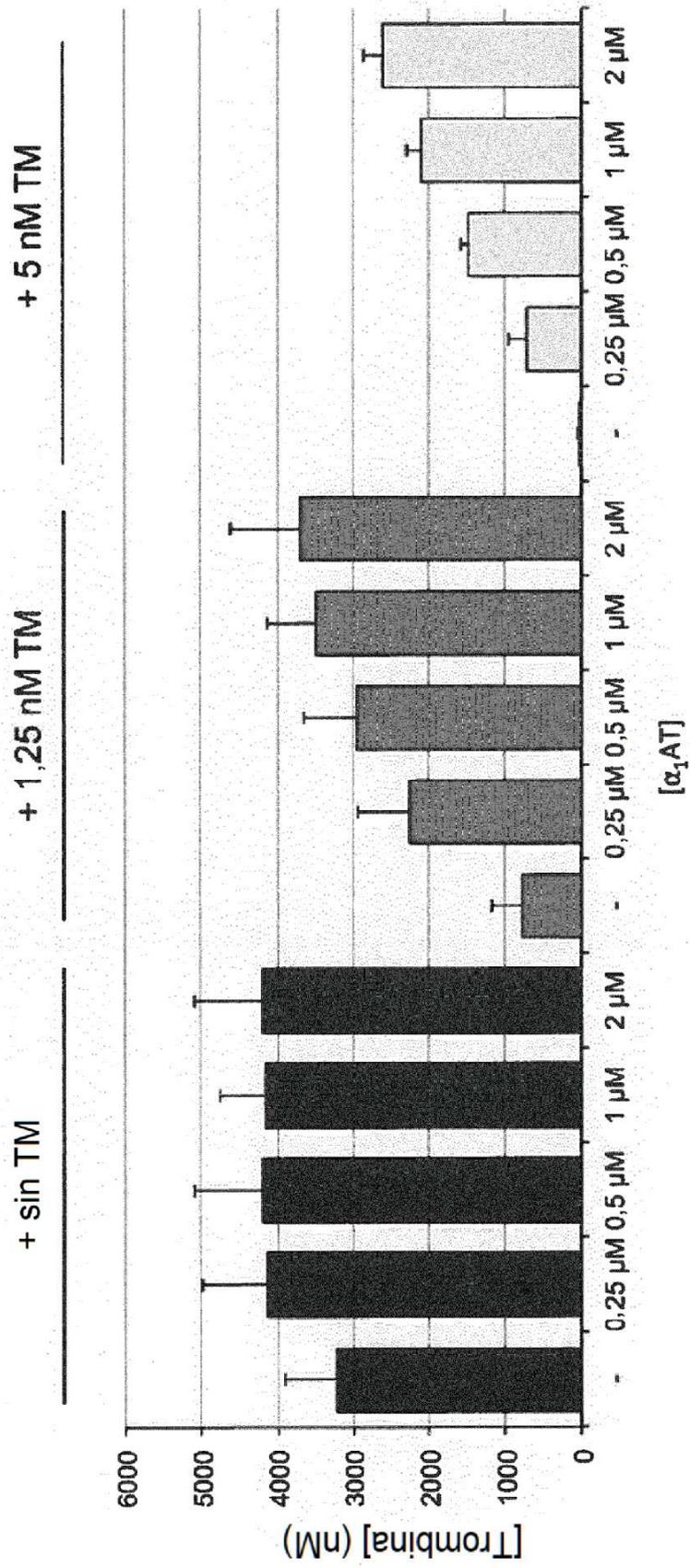


Figura 9D

HB + P2KP1'K α_1 AT Pitts C232S

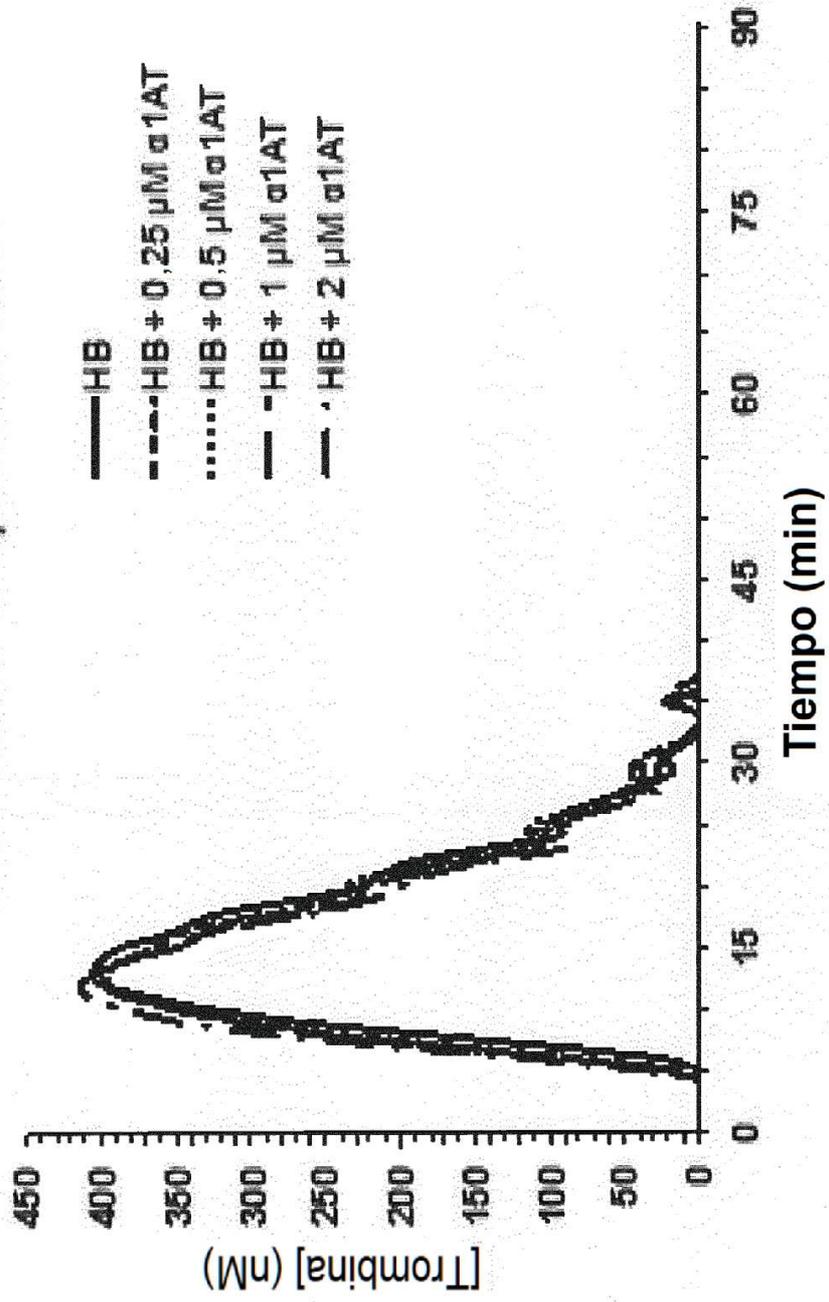


Figura 10A

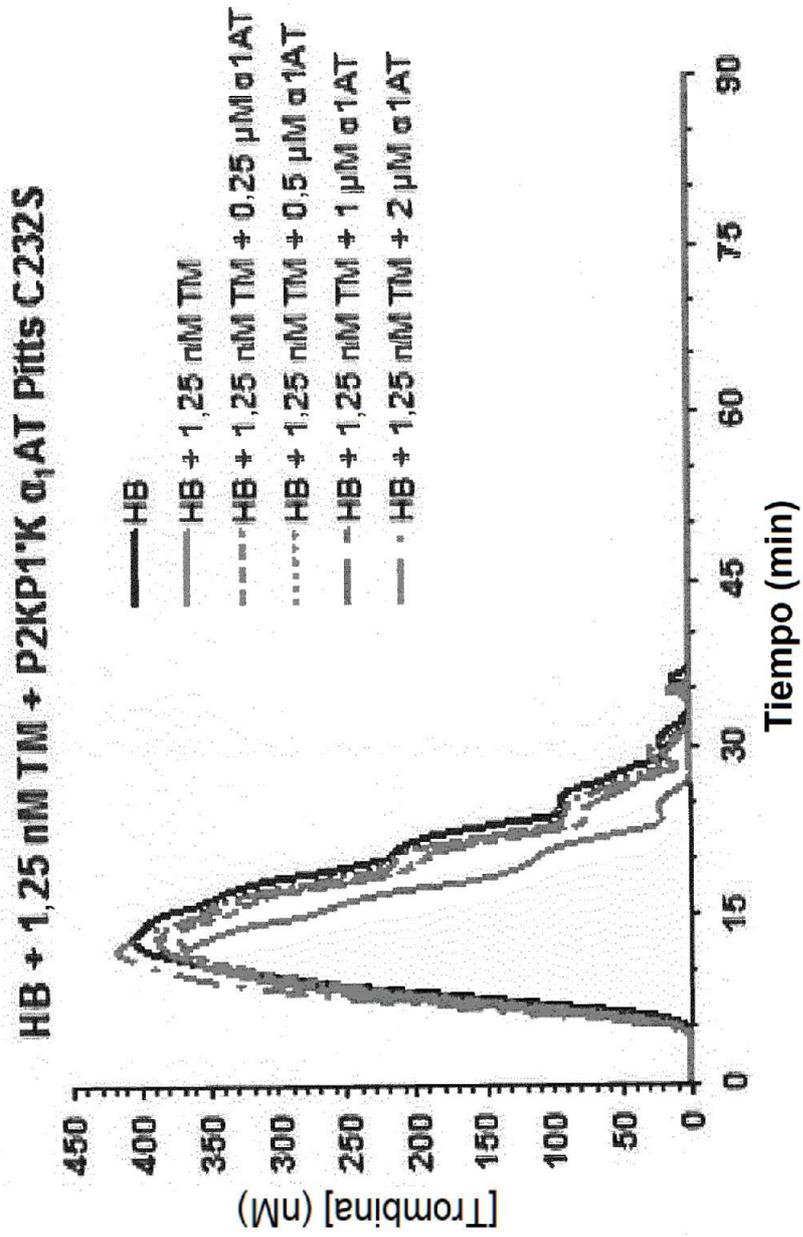


Figura 10B

HB + 5 nM TM + P2KPI1K α_1 AT Pitts CZ32S

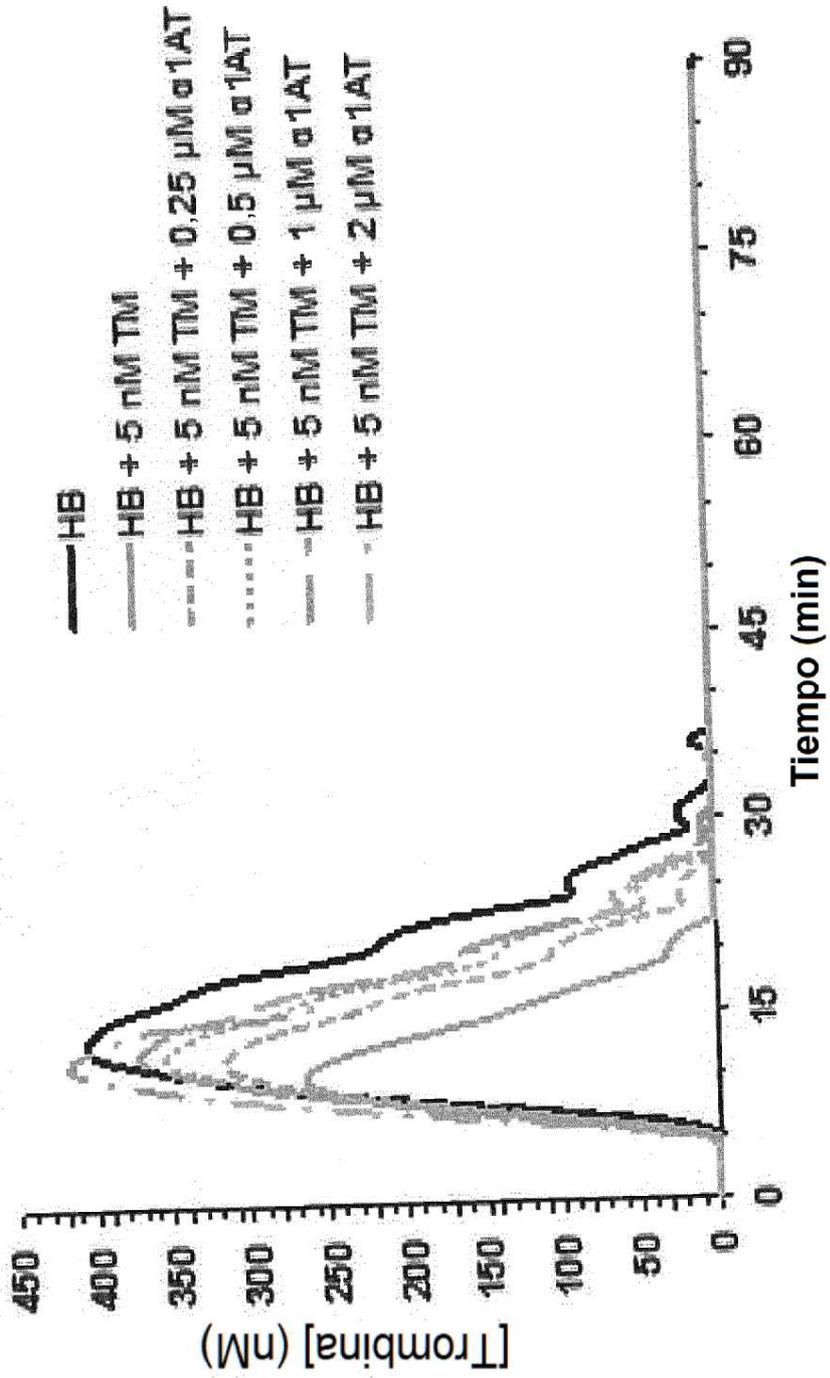


Figura 10C

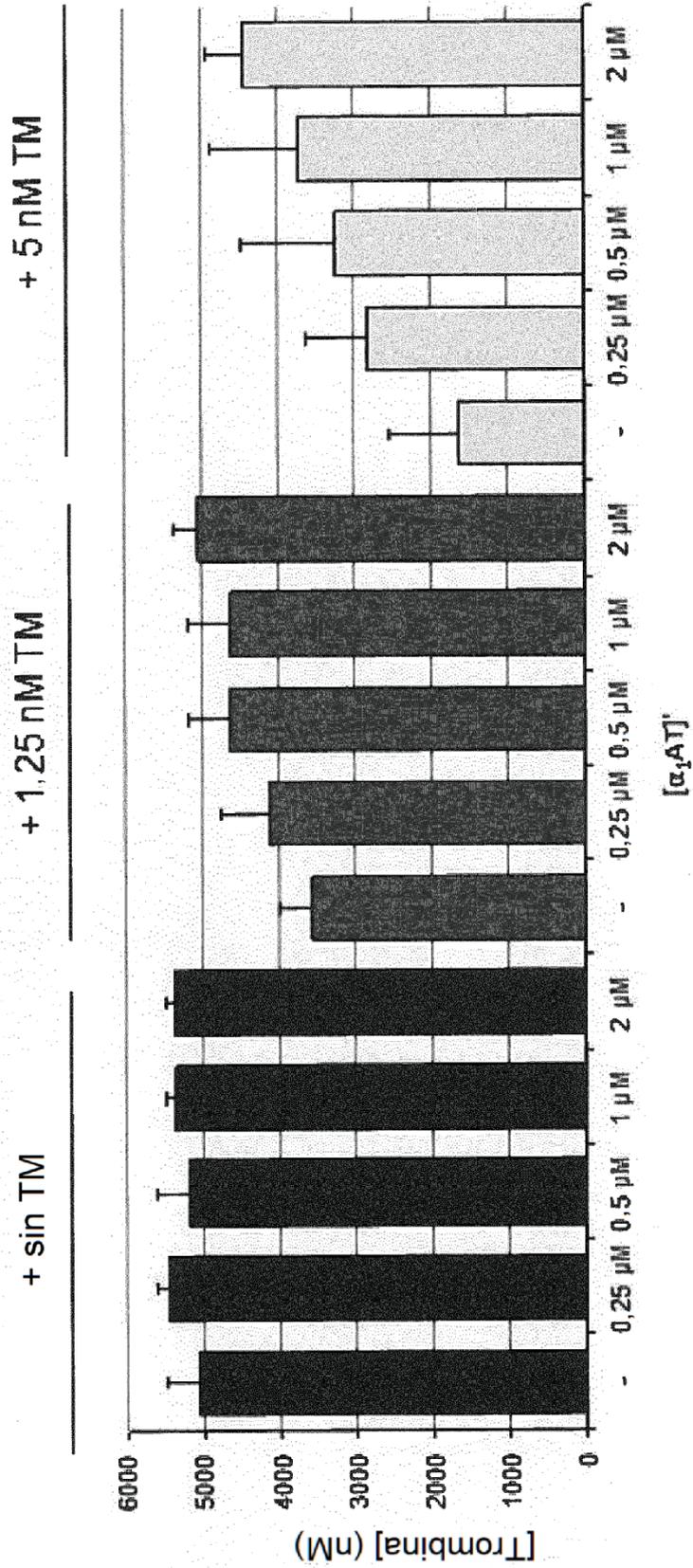


Figura 10D

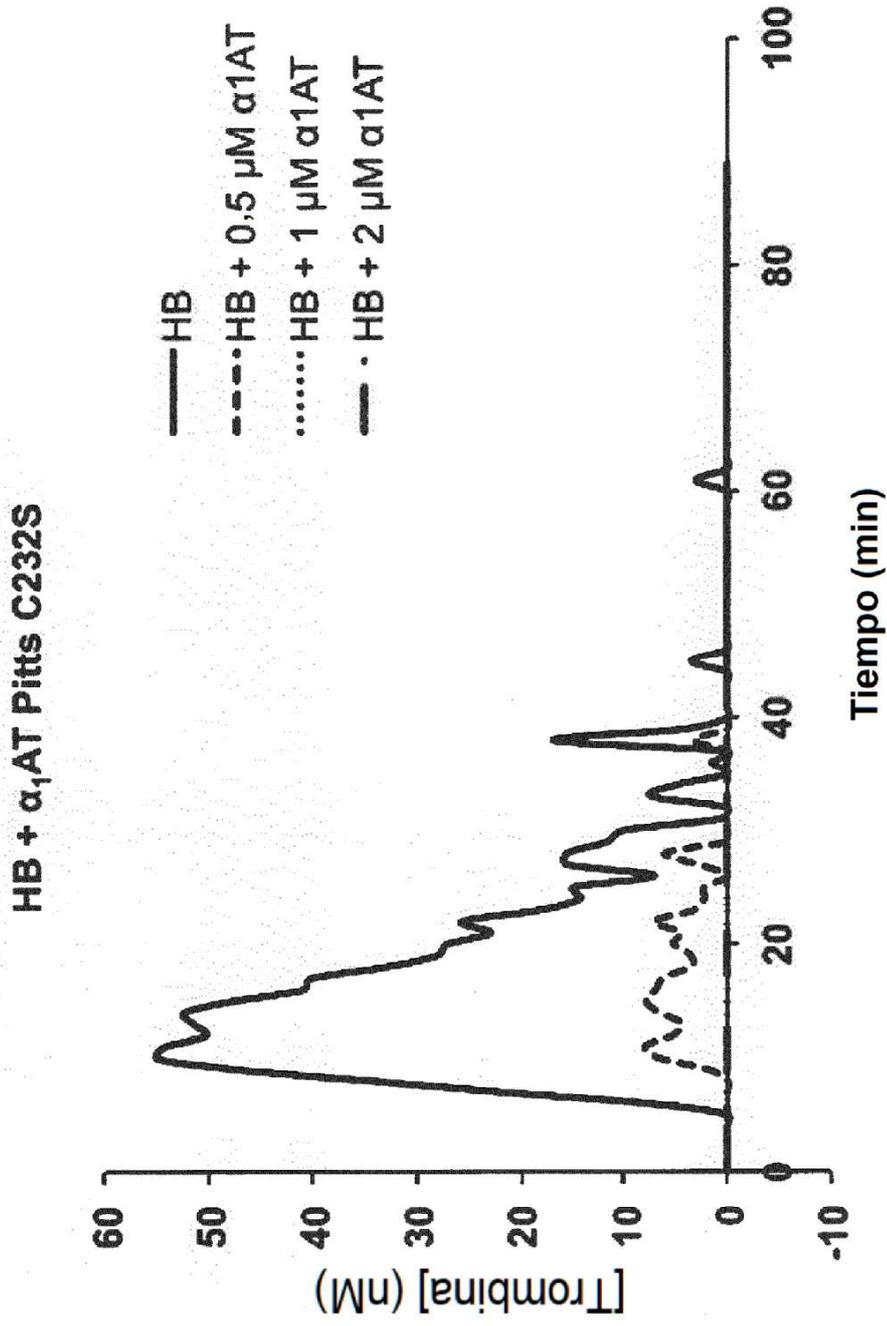


Figura 11A

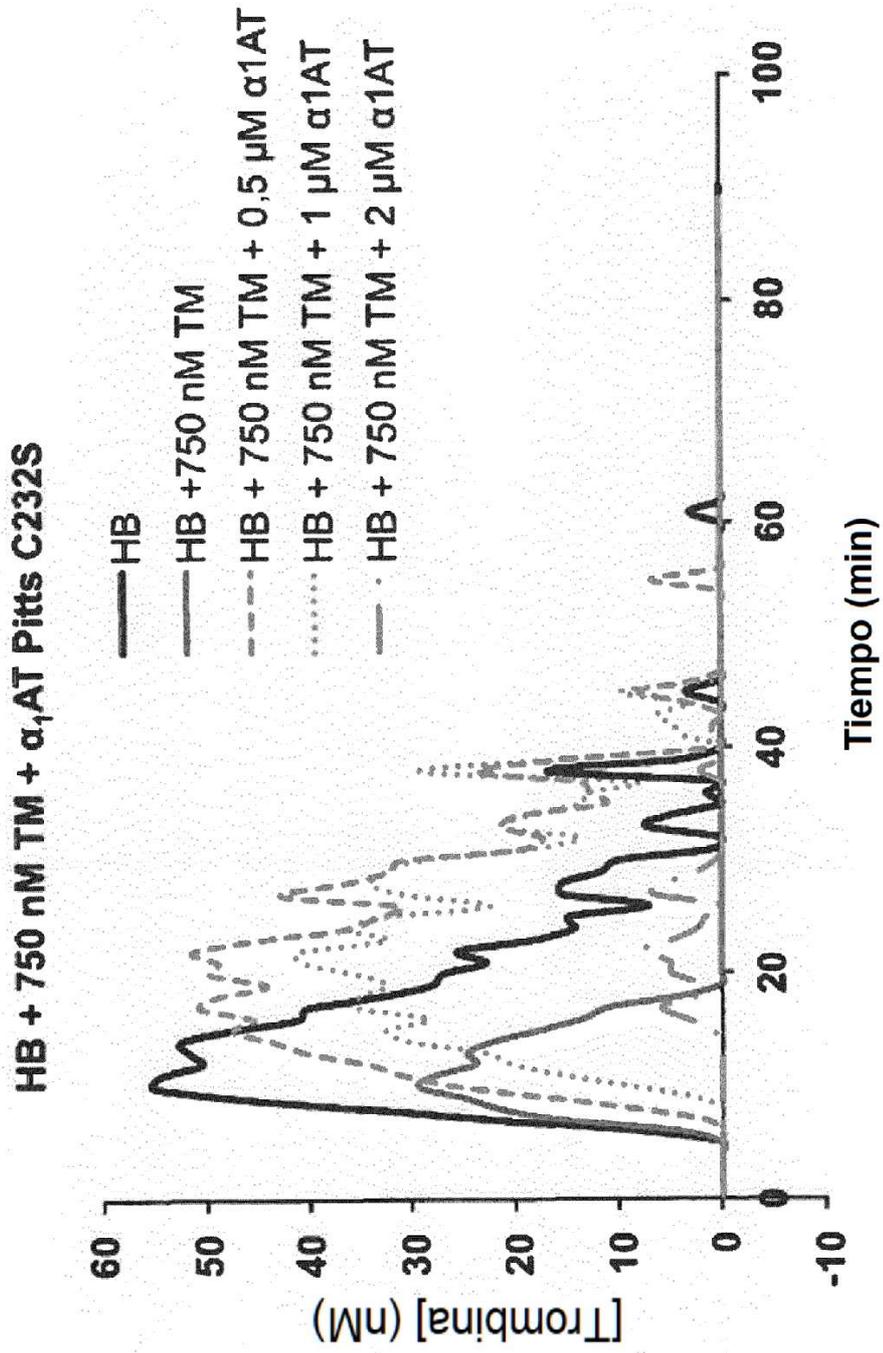


Figura 11B

HB + P2KP1'K α_1 AT Pitts C232S

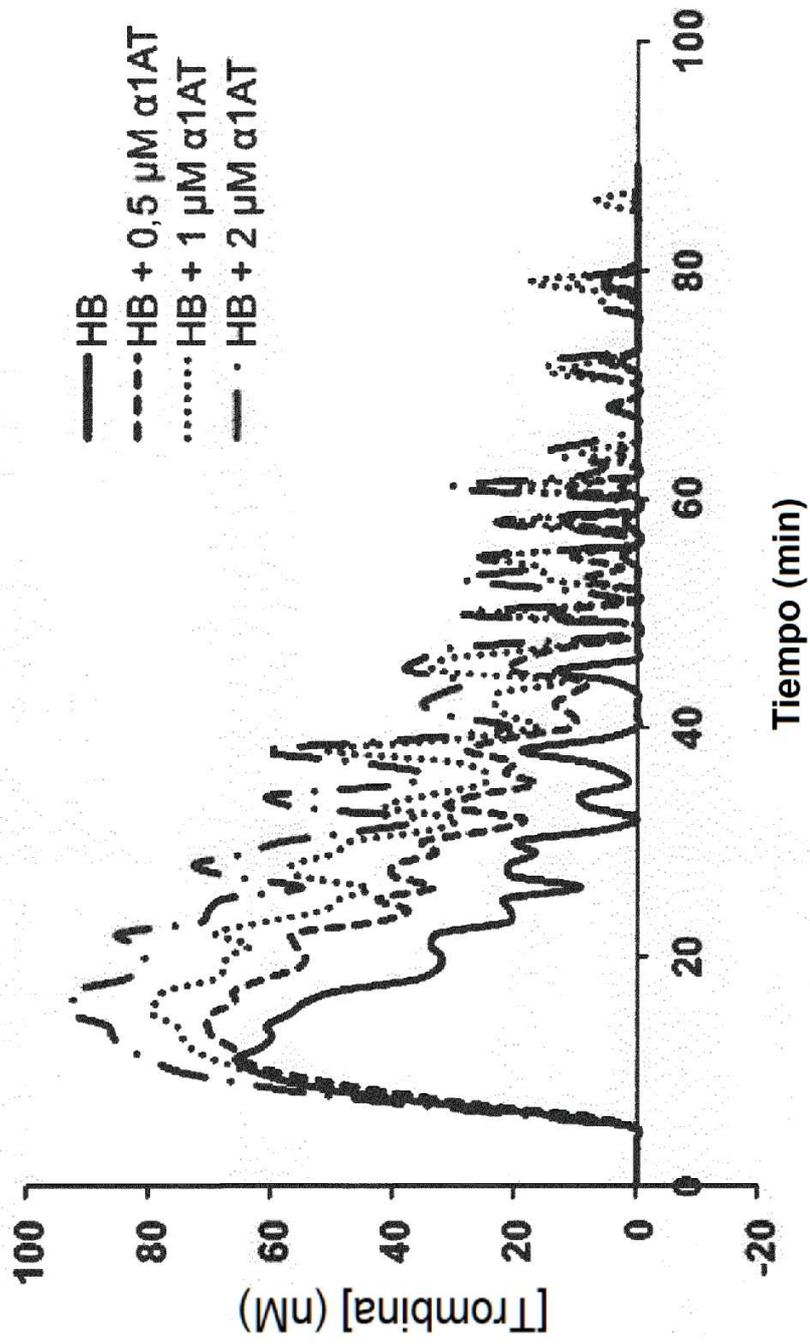


Figura 11C

HB + 750 nM TM + P2K^{P1}K α_1 AT Pitts C232S

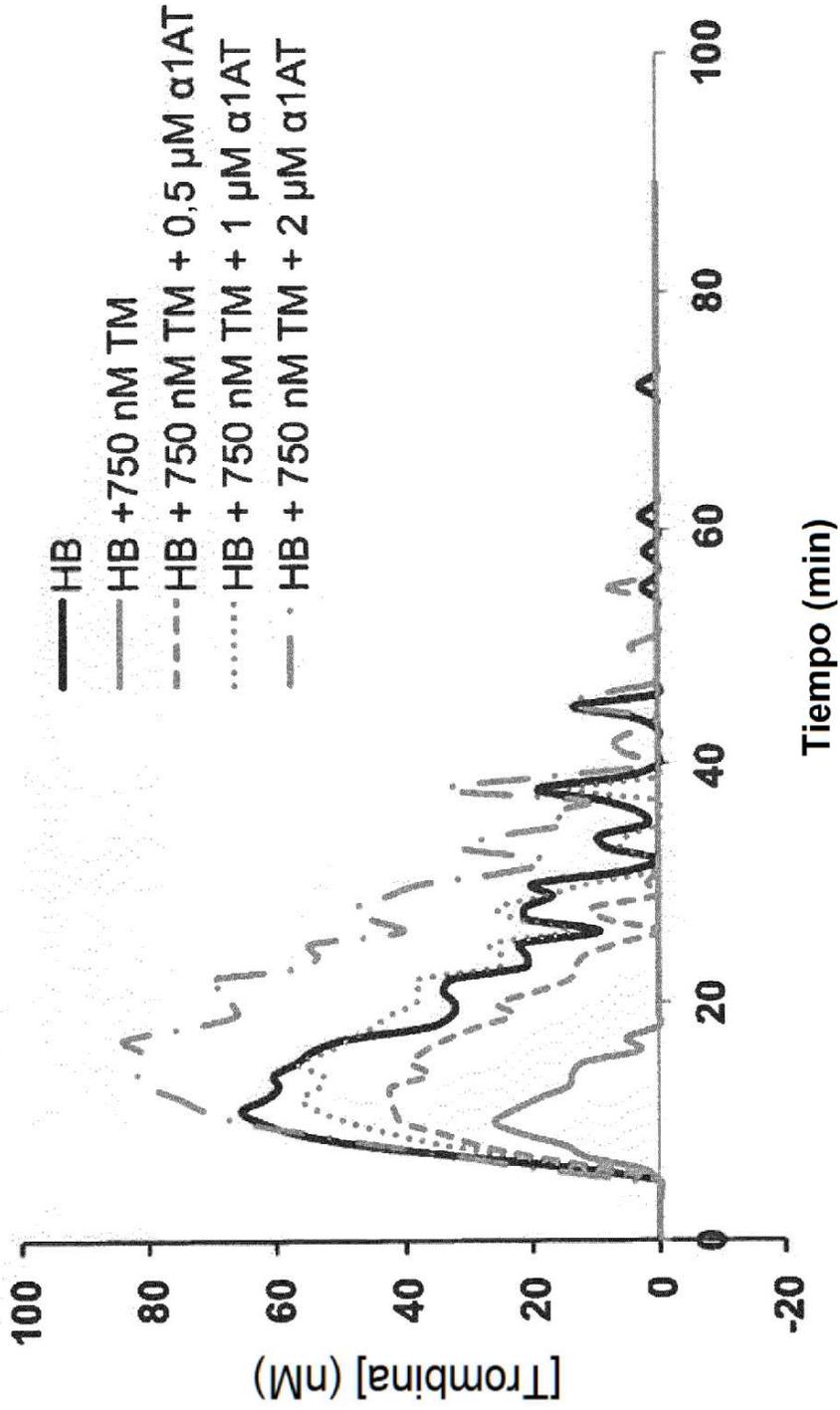


Figura 11D

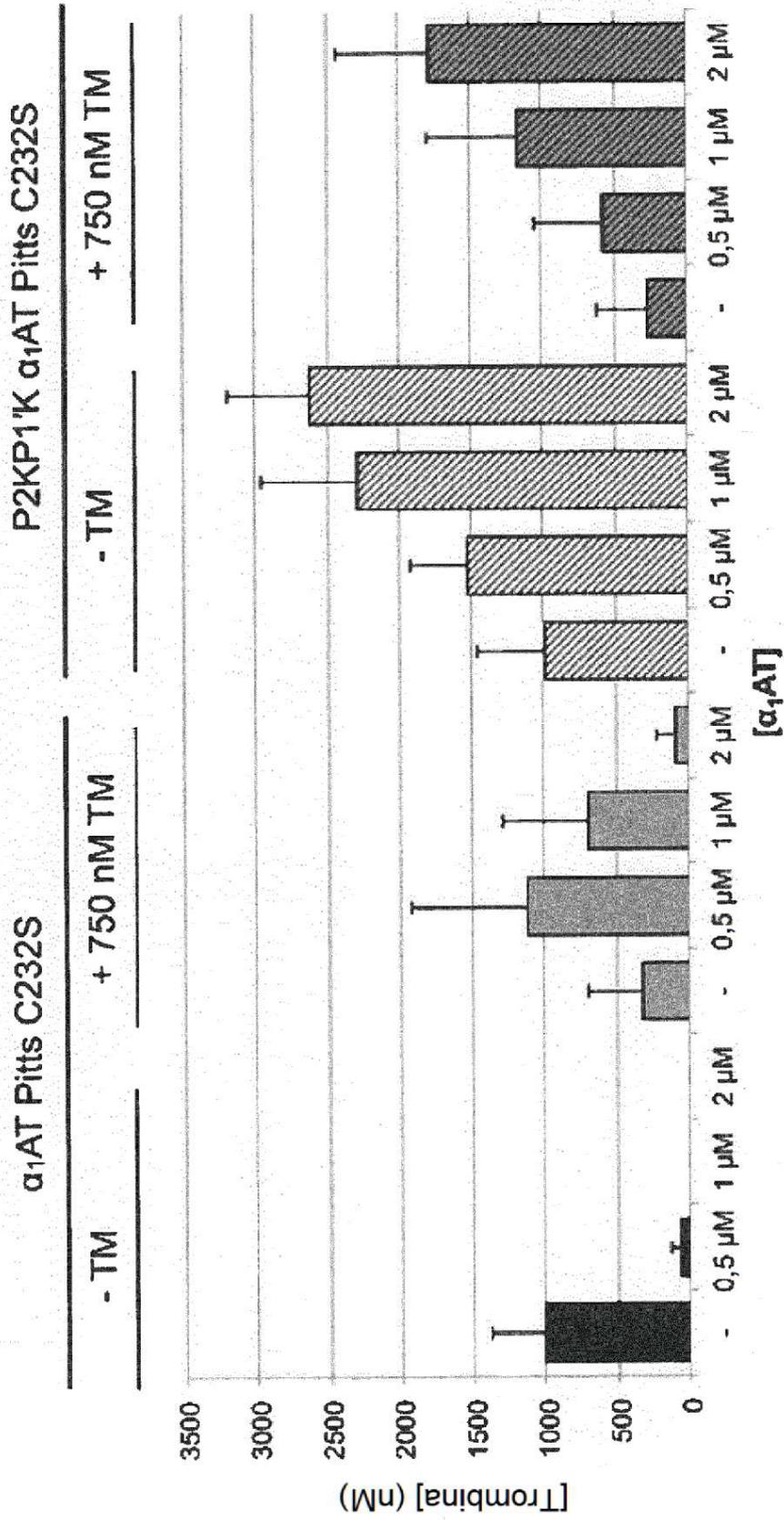


Figura 11E

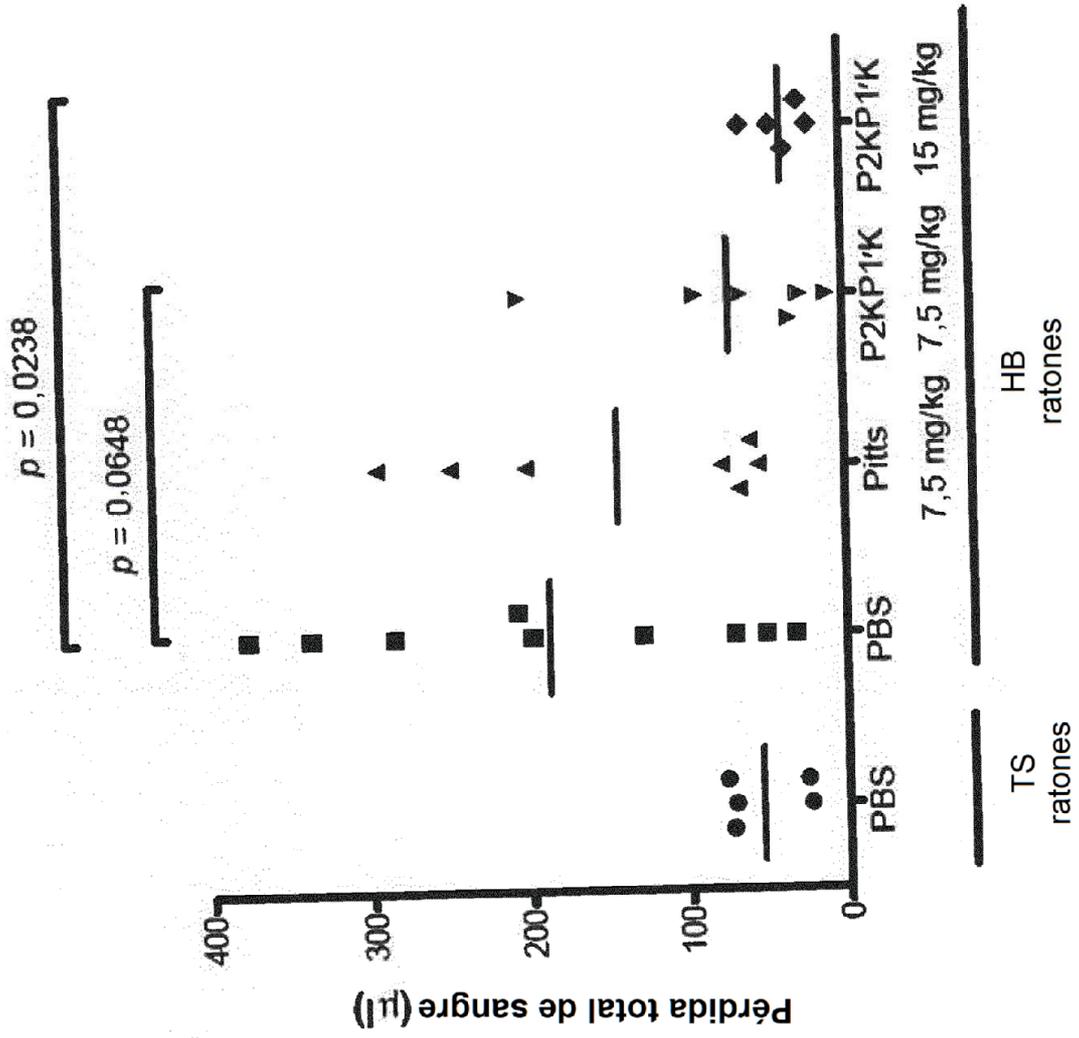


Figura 12

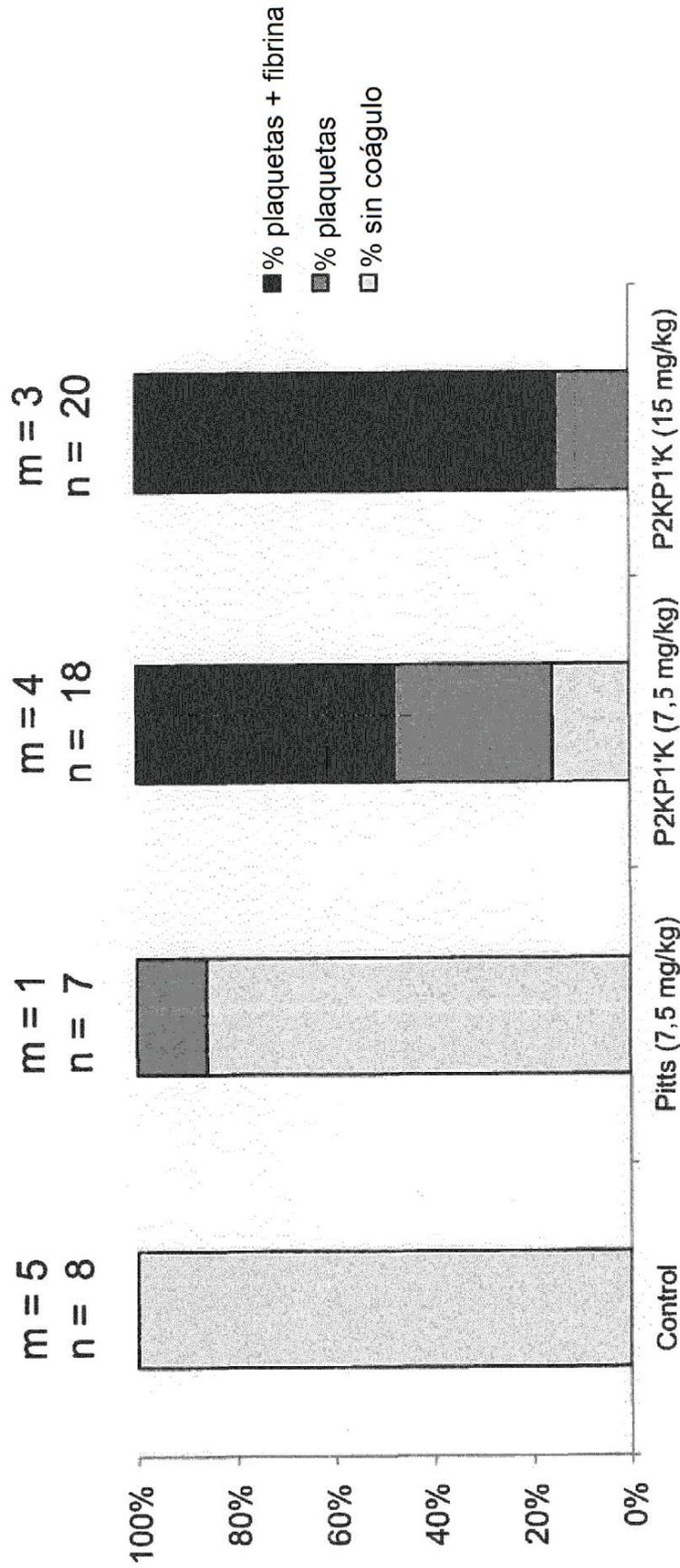


Figura 13

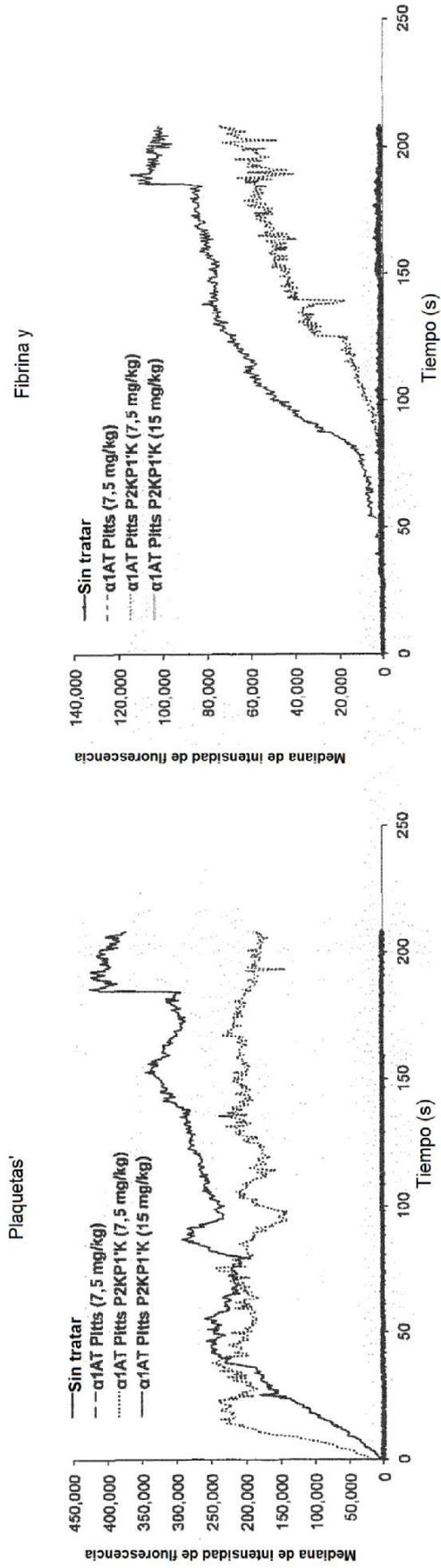


Figura 14

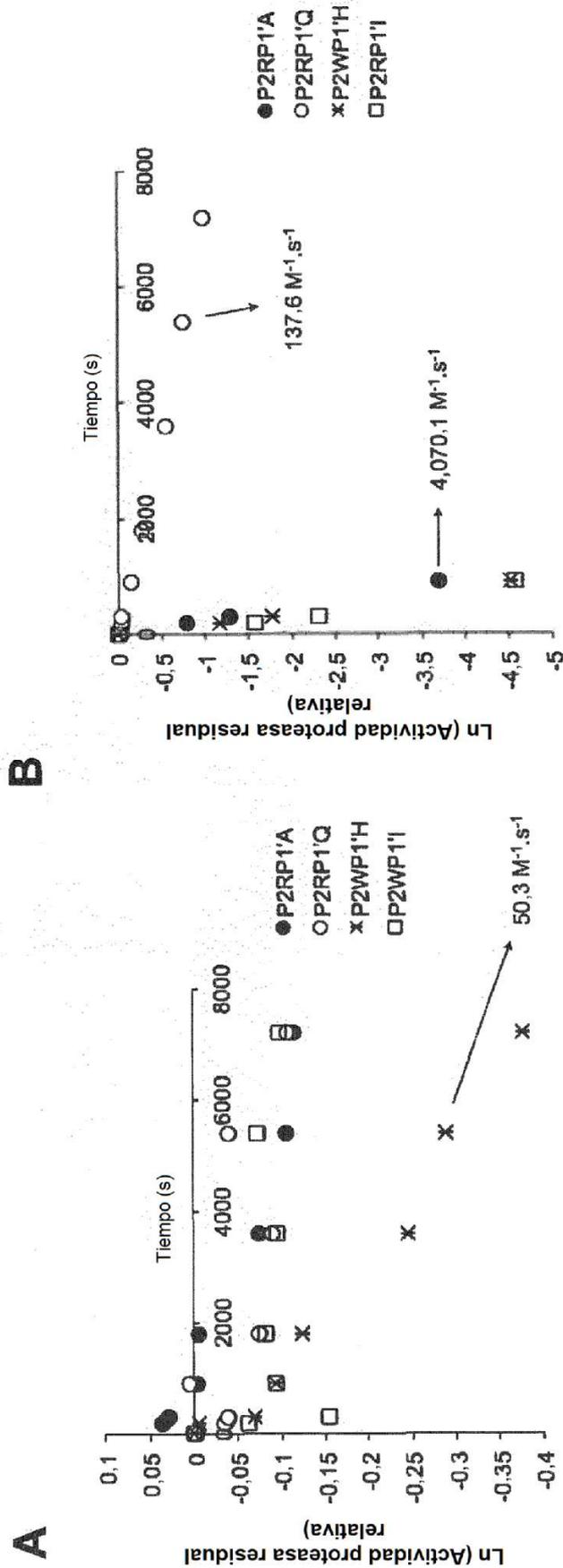


Figura 15