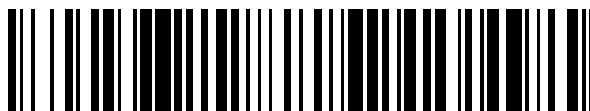


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 083**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/032616**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14018120**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13713325 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2877487**

54 Título: **Polipéptidos de factor x modificados y usos de los mismos**

30 Prioridad:

25.07.2012 US 201261741806 P

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

14.03.2019

73 Titular/es:

**CATALYST BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
611 Gateway Blvd., Suite 710
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**THANOS, CHRISTOPHER y
MADISON, EDWIN, L.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

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

ES 2 704 083 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

Polipéptidos de factor x modificados y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

Se proporcionan proteínas terapéuticas modificadas. En particular polipéptidos de Factor X modificados, que incluyen el zimógeno del Factor X, Se proporciona el Factor Xa y otras formas del Factor X, y usos de los mismos.

10 **Antecedentes**

La hemostasis es el proceso fisiológico complejo que conduce al cese de una hemorragia. Las plaquetas, proteínas plasmáticas, y vasos sanguíneos y células endoteliales son tres componentes que juegan cada uno un importante papel en los eventos que siguen inmediatamente a la lesión de un tejido y que, en circunstancias normales, dan como resultado la formación rápida de un coágulo. El punto central de esto es la coagulación en cascada, una serie de eventos proteolíticos en los que determinadas proteínas plasmáticas (o factores de coagulación) se activan secuencialmente en una "cascada" por otro factor de coagulación previamente activado, conduciendo a la rápida generación de trombina. Las grandes cantidades de trombina producidas en esta cascada funcionan a continuación para escindir el fibrinógeno en los péptidos de fibrina que se requieren para la formación del coágulo. Se ha propuesto al Factor X (FX) como sustancia terapéutica para tratar trastornos hemorrágicos y es ventajoso sobre otros tratamientos terapéuticos del factor de coagulación debido a su papel principal en la ruta de la coagulación. Los tratamientos actuales con FX se basan en el uso terapéutico del zimógeno no activado debido a que se considera que es una estrategia más segura. Existe una necesidad de tratamientos terapéuticos mejorados o alternativos a FX.

25 **Sumario**

Se proporciona en el presente documento un polipéptido con Factor Xa activo modificado aislado, que comprende una sustitución de aminoácido en una posición que corresponde a la posición 196 y en una posición que corresponde a la posición 332 en un polipéptido de FXa sin modificar con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, en la que:

las posiciones de aminoácidos correspondientes se determinan por alineación con la SEQ ID NO:134; la sustitución en la posición 196 es con un resto de aminoácido polar neutro que es serina (S) o treonina (T); la sustitución en la posición 332 es Alanina (A), Aspartato (D), Glutamato (E), Serina (S) o Glicina(G); el FXa sin modificar comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de la SEQ ID NO:134, en la que:

el FXa modificado presenta al menos una dependencia del cofactor de FVa aumentada 50 veces en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene la sustitución de aminoácido; y el FXa modificado comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, o veinte sustituciones de aminoácidos en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar.

Se describen en el presente documento polipéptidos de Factor X (FX) modificado o variante que presentan propiedades o actividades alteradas en comparación con un polipéptido de FX sin modificar tal como una dependencia del cofactor (FVa) aumentada, semivida aumentada, resistencia aumentada a los inhibidores (por ejemplo, antitrombina III) y/o glicosilación alterada. Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento pueden presentar algunas o todas las anteriores propiedades o actividades. Los polipéptidos de FX modificados pueden ser maduros, zimógenos, activos o activados o las formas catalíticamente activas de los mismos.

Por ejemplo, se describen en el presente documento polipéptidos de FX modificados de acuerdo con las presentes reivindicaciones que contienen una sustitución de aminoácido en un polipéptido de FX sin modificar de tal manera que la forma FX activa (FXa) del polipéptido de FX modificado presenta al menos una dependencia del cofactor de FVa aumentada 50 veces en comparación con el polipéptido de FXa que es igual que el polipéptido de FX modificado, pero que no contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s). El polipéptido de FX sin modificar es un polipéptido de FX activo (FXa) que tiene una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de la SEQ ID NO:134. En un ejemplo adicional, el polipéptido de FXa sin modificar es una forma catalíticamente activa para el FXa activo descrito anteriormente.

En ejemplos concretos de los polipéptidos de FX modificados proporcionados anteriormente y en el presente documento, la forma madura o zimógeno del polipéptido de FX modificado no contiene un péptido de activación heterólogo procedente de otra serina proteasa. En otros ejemplos, en el presente documento la forma madura o zimógeno del polipéptido de FX modificado no contiene un péptido de activación modificado. En ejemplos

adicionales en el presente documento, la forma FXa del polipéptido de FX modificado, o la porción catalíticamente activa del mismo, no se produce a partir de un polipéptido de FX zimógeno que contiene un péptido de activación heterólogo procedente de otra serina proteasa o un péptido de activación modificado. Los polipéptidos de FX modificados puede aislarse o purificarse sustancialmente o purificarse.

5 Se proporcionan también en el presente documento polipéptidos de Factor X activo modificado aislado (FXa) de acuerdo con las presentes reivindicaciones que contienen una sustitución de aminoácido en un polipéptido de FX sin modificar, en el que la forma FX activa (FXa) del polipéptido de FX modificado presenta una dependencia del cofactor aumentada, una dependencia del cofactor de FVa aumentada al menos 50 veces en comparación con el
10 polipéptido de FXa que es igual al polipéptido de FX modificado, pero que no contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s). El FXa modificado no contiene generalmente un péptido de activación. El polipéptido de FX sin modificar es un polipéptido de FX activo (FXa) que tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de la SEQ ID NO:134, o es una forma catalíticamente activa
15 del mismo.

En cualquiera de los ejemplos de los polipéptidos de FX modificados o de los polipéptidos de FX modificados aislados proporcionados en el presente documento que presentan dependencia del cofactor aumentada, la dependencia del cofactor puede estar aumentada al menos 75 veces, 100 veces, 125 veces, 150 veces, 200 veces,
20 250 veces, 300 veces, 350 veces, 400 veces, 450 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 2000 veces o más en comparación con el polipéptido sin modificar.

Incluidos entre dichos polipéptidos de FX modificados o polipéptidos de FX modificados aislados proporcionados en el presente documento están los polipéptidos por los cuales el resto de aminoácido nativo en la posición 196 con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134 o un resto que corresponde al
25 resto de aminoácido 196 en el polipéptido de FX sin modificar se sustituye con un resto de aminoácido polar neutro que es una serina (S) o treonina (T). Los restos de aminoácidos correspondientes (es decir, los restos de aminoácidos que corresponden a la posición 196 en un polipéptido de FX diferente que el que se muestra en la SEQ ID NO:4) se identifican por la alineación del polipéptido de FX sin modificar con el polipéptido de la SEQ ID NO:134.
30 Esto se ilustra en la Figura 3. Por ejemplo, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FX modificados que contienen una sustitución de aminoácido con S en una posición que corresponde a la posición 196 o una sustitución de aminoácido con una T en una posición que corresponde a la posición 196 con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:134, o la misma sustitución de aminoácido en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar que no comprende S o T en la posición
35 correspondiente a 196. En ejemplos particulares, el polipéptido de FX modificado contiene una sustitución de aminoácido con S en una posición que corresponde a la posición 196 con referencia a la posición de aminoácido que se muestra en la SEQ ID NO:134, o la misma sustitución de aminoácido en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar que no comprende S en la posición correspondiente a 196.

40 En cualquiera de los ejemplos de los polipéptidos de FX modificados o de los polipéptidos de FX aislados proporcionados en el presente documento o descritos anteriormente, el polipéptido puede contener una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) adicional(es) en la cadena ligera o en el dominio de la proteasa de la cadena pesada. Los polipéptidos de FX modificados o el polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento puede contener solo dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce,
45 quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o veinte sustituciones de aminoácidos en comparación con el polipéptido sin modificar de la misma forma, por ejemplo, el polipéptido sin modificar que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:134 o el zimógeno, la forma activa o catalíticamente activa del mismo.

50 En cualquiera de los ejemplos en el presente documento, la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) adicional(es) no corresponden a la sustitución con Isoleucina (I), Alanina (A), Valanina (V), Serina (S) o Treonina (T) en una posición que corresponde a la posición 195 o 197 con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la misma sustitución en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar. La(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) adicional(es) puede(n) dar como resultado o conferir o efectuar una
55 glicosilación alterada, una resistencia aumentada a un inhibidor y/o una actividad catalítica aumentada. Por ejemplo, la resistencia aumentada a un inhibidor puede ser una resistencia aumentada a anti-trombina III (ATIII).

En los ejemplos concretos del presente documento, cualquiera del polipéptido de FX modificado o del polipéptido de FX modificado aislado descrito en el presente documento o anteriormente tiene una(s) sustitución(ones) en una
60 posición de un aminoácido que corresponde a una posición seleccionada entre 211, 214, 216, 218, 219, 273, 276, 306, 326, 332, 338, 420 y 424, con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, en el que las posiciones de aminoácidos correspondientes se identifican por la alineación del polipéptido de FX sin modificar con el polipéptido que se muestra en la SEQ ID NO:134. Por ejemplo, la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) puede(n) ser la(s) sustitución(ones) con: S en una posición que corresponde a la posición 211; D en una posición que corresponde a la posición 214; A en una posición que corresponde a la posición 214; S en una posición que corresponde a la posición 214; R en una posición que corresponde a la posición 216; K en una posición
65

que corresponde a la posición 216; A en una posición que corresponde a la posición 216; S en una posición que
 corresponde a la posición 216; R en una posición que corresponde a la posición 218; K en una posición que
 corresponde a la posición 218; A en una posición que corresponde a la posición 218; H en una posición que
 corresponde a la posición 219; A en una posición que corresponde a la posición 273; E en una posición que
 5 corresponde a la posición 273; A en una posición que corresponde a la posición 276; E en una posición que
 corresponde a la posición 276; E en una posición que corresponde a la posición 306; S en una posición que
 corresponde a la posición 326; T en una posición que corresponde a la posición 326; V en una posición que
 corresponde a la posición 326; Q en una posición que corresponde a la posición 326; N en una posición que
 10 corresponde a la posición 326; M en una posición que corresponde a la posición 326; K en una posición que
 corresponde a la posición 326; Y en una posición que corresponde a la posición 326; E en una posición que
 corresponde a la posición 326; D en una posición que corresponde a la posición 326; A en una posición que
 corresponde a la posición 332; D en una posición que corresponde a la posición 332; E en una posición que
 corresponde a la posición 332; S en una posición que corresponde a la posición 332; G en una posición que
 15 corresponde a la posición 332; A en una posición que corresponde a la posición 338; S en una posición que
 corresponde a la posición 338; N en una posición que corresponde a la posición 338; R en una posición que
 corresponde a la posición 338; V en una posición que corresponde a la posición 338; Y en una posición que
 corresponde a la posición 338; M en una posición que corresponde a la posición 338; A en una posición que
 20 corresponde a la posición 420; E en una posición que corresponde a la posición 420; A en una posición que
 corresponde a la posición 424; o E en una posición que corresponde a la posición 424, con referencia a las
 posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la(s) misma(s) sustitución(ones) en un resto de
 aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar.

Por ejemplo, entre los polipéptidos de FX modificados o los polipéptidos de FX modificados aislados descritos en el
 presente documento, incluyendo cualquiera descrito anteriormente, están los polipéptidos de FX que contienen
 25 una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s): S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición
 que corresponde a la posición 211 y H en una posición que corresponde a la posición 219; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y D en una posición que corresponde a la posición 214; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 214; S en una posición que
 30 corresponde a la posición 196 y S en una posición que corresponde a la posición 214; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y R en una posición que corresponde a la posición 216; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y K en una posición que corresponde a la posición 216; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 216; S en una posición que
 35 corresponde a la posición 196 y S en una posición que corresponde a la posición 216; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y R en una posición que corresponde a la posición 218; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y K en una posición que corresponde a la posición 218; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 218; S en una posición que
 40 corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 273; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 273; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 276; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 276; S en una posición que
 45 corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 306; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 326; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y D en una posición que corresponde a la posición 326; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y M en una posición que corresponde a la posición 326; S en una posición que
 50 corresponde a la posición 196 y N en una posición que corresponde a la posición 326; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y Q en una posición que corresponde a la posición 326; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 332; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y D en una posición que corresponde a la posición 332; S en una posición que
 55 corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 332; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y S en una posición que corresponde a la posición 332; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y G en una posición que corresponde a la posición 332; S en una posición que
 60 corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 338; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y S en una posición que corresponde a la posición 338; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 420; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 420; S en una posición que
 65 corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 424; S en una posición que
 corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 424; o S en una posición que
 corresponde a la posición 196, E en una posición que corresponde a la posición 420 y E en una posición que
 corresponde a la posición 424, con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID
 NO:134, o la misma sustitución de aminoácido en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX
 sin modificar, o la(s) misma(s) sustitución(ones) en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX
 sin modificar.

En cualquiera de los polipéptidos de FX modificados o los polipéptidos de FX modificados aislados proporcionados
 65 en el presente documento, incluyendo cualquiera descrito anteriormente, el polipéptido de FX modificado puede
 contener una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) que altera(n) la glicosilación mediante la introducción de un sitio

de glicosilación no nativo. Por ejemplo, el sitio de glicosilación no nativo puede introducirse mediante la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con: N en una posición que corresponde a la posición 51; N en una posición que corresponde a la posición 56 y S en una posición que corresponde a la posición 58; N en una posición que corresponde a la posición 62 y S en una posición que corresponde a la posición 64; N en una posición que
5 corresponde a la posición 65 y S en una posición que corresponde a la posición 67; N en una posición que corresponde a la posición 67; N en una posición que corresponde a la posición 73 y S en una posición que corresponde a la posición 75; N en una posición que corresponde a la posición 75 y S en una posición que
10 corresponde a la posición 77; N en una posición que corresponde a la posición 77 y S en una posición que corresponde a la posición 79; N en una posición que corresponde a la posición 78 y S en una posición que
15 corresponde a la posición 80; S en una posición que corresponde a la posición 82; N en una posición que corresponde a la posición 83; N en una posición que corresponde a la posición 82 y S en una posición que
20 corresponde a la posición 84; N en una posición que corresponde a la posición 85 y S en una posición que corresponde a la posición 87; N en una posición que corresponde a la posición 86 y S en una posición que
25 corresponde a la posición 88; N en una posición que corresponde a la posición 95 y S en una posición que
30 corresponde a la posición 97; N en una posición que corresponde a la posición 114; N en una posición que
35 corresponde a la posición 119 y S en una posición que corresponde a la posición 121; S en una posición que
40 corresponde a la posición 122; N en una posición que corresponde a la posición 215 y S en una posición que
45 corresponde a la posición 217; N en una posición que corresponde a la posición 243 y S en una posición que
50 corresponde a la posición 245; N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que
55 corresponde a la posición 266; N en una posición que corresponde a la posición 293 y S en una posición que
60 corresponde a la posición 295; N en una posición que corresponde a la posición 388; N en una posición que
65 corresponde a la posición 389 y S en una posición que corresponde a la posición 391; N en una posición que
70 corresponde a la posición 428 y S en una posición que corresponde a la posición 430; o N en una posición que
75 corresponde a la posición 429 y S en una posición que corresponde a la posición 431, con referencia a las
80 posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la(s) misma(s) sustitución(ones) en un resto de
85 aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar.

Por ejemplo, entre los polipéptidos de FX modificados o los polipéptidos de FX modificados aislados descritos en el presente documento, incluyendo cualquiera descrito anteriormente, están los polipéptidos de FX que contienen una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con: S en una posición que corresponde a la posición 196 y N en una
30 posición que corresponde a la posición 51; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición
35 que corresponde a la posición 56 y S en una posición que corresponde a la posición 58; S en una posición que
40 corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 58 y S en una posición que
45 corresponde a la posición 60; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que
50 corresponde a la posición 62 y S en una posición que corresponde a la posición 64; S en una posición que
55 corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 65 y S en una posición que
60 corresponde a la posición 67; S en una posición que corresponde a la posición 196 y N en una posición que
65 corresponde a la posición 67; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que
70 corresponde a la posición 73 y S en una posición que corresponde a la posición 75; S en una posición que
75 corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 75 y S en una posición que
80 corresponde a la posición 77; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que
85 corresponde a la posición 77 y S en una posición que corresponde a la posición 79; S en una posición que
90 corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 78 y S en una posición que
95 corresponde a la posición 80; S en una posición que corresponde a la posición 196 y S en una posición que
100 corresponde a la posición 82; S en una posición que corresponde a la posición 196 y N en una posición que
105 corresponde a la posición 83; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que
110 corresponde a la posición 82 y S en una posición que corresponde a la posición 84; S en una posición que
115 corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 85 y S en una posición que
120 corresponde a la posición 87; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que
125 corresponde a la posición 86 y S en una posición que corresponde a la posición 88; S en una posición que
130 corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 95 y S en una posición que
135 corresponde a la posición 97; S en una posición que corresponde a la posición 196 y N en una posición que
140 corresponde a la posición 114; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que
145 corresponde a la posición 114, S en una posición que corresponde a la posición 211 y H en una posición que
150 corresponde a la posición 219; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que
155 corresponde a la posición 119 y S en una posición que corresponde a la posición 121; S en una posición que
160 corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 114, N en una posición que
165 corresponde a la posición 119, S en una posición que corresponde a la posición 121, S en una posición que
170 corresponde a la posición 211 y H en una posición que corresponde a la posición 219; S en una posición que
175 corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 119, S en una posición que
180 corresponde a la posición 121, S en una posición que corresponde a la posición 211 y H en una posición que
185 corresponde a la posición 219; S en una posición que corresponde a la posición 196 y S en una posición que
190 corresponde a la posición 122; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que
195 corresponde a la posición 215 y S en una posición que corresponde a la posición 217; S en una posición que

- corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 243 y S en una posición que corresponde a la posición 245; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que corresponde a la posición 266; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 119, S en una posición que
- 5 corresponde a la posición 121, N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que corresponde a la posición 266; S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que corresponde a la posición 211, H en una posición que corresponde a la posición 219, N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que
- 10 corresponde a la posición 264 y S en una posición que corresponde a la posición 266; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 119, S en una posición que corresponde a la posición 121, S en una posición que corresponde a la posición 211, H en una posición que
- 15 corresponde a la posición 219, N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que corresponde a la posición 266; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 114, N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que
- 20 corresponde a la posición 266; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 114, S en una posición que corresponde a la posición 211, H en una posición que corresponde a la posición 219 y N en una posición que
- 25 corresponde a la posición 388; S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que corresponde a la posición 211, H en una posición que corresponde a la posición 219, N en una posición que corresponde a la posición 264, S en una posición que corresponde a la posición 266 y N en una posición que
- 30 corresponde a la posición 388; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 119, S en una posición que corresponde a la posición 121, S en una posición que
- 35 corresponde a la posición 119, S en una posición que corresponde a la posición 121, S en una posición que corresponde a la posición 211, H en una posición que corresponde a la posición 219 y N en una posición que
- 40 corresponde a la posición 388; S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 389 y S en una posición que corresponde a la posición 391; S en una posición que
- 45 corresponde a la posición 196, N en una posición que corresponde a la posición 428 y S en una posición que corresponde a la posición 430; o S en una posición que corresponde a la posición 196, N en una posición que
- 50 corresponde a la posición 429 y S en una posición que corresponde a la posición 431, con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la(s) misma(s) sustitución(ones) en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar.
- 40 En un ejemplo, se describen en el presente documento polipéptidos de FX modificados o polipéptidos de FX modificados aislados que contienen una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 169, 205-208, 214-243 y 246-265, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 % de identidad de la secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se muestran en cualquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 169, 205-208, 214-243 y 246-265 y que contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s).
- 45 En otro ejemplo, se describen en el presente documento polipéptidos de FX modificado o polipéptidos de FX modificados aislados que contienen una secuencia de aminoácidos que contiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 143-448 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 169, 205-208, 214-243 y 246-265, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 % de identidad de la secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se muestran como los restos 1-139 y una cadena pesada que
- 50 tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 143-448 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 169, 205-208, 214-243 y 246-265 y que contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s). En un ejemplo adicional, se describen en el presente documento polipéptidos de FX modificado o polipéptidos de FX modificados aislados que contienen una secuencia de aminoácidos que contiene una cadena ligera que tiene la secuencia de
- 55 aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 169, 205-208, 214-243 y 246-265, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 % de identidad de la secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se muestran como los restos 1-139 y una cadena pesada que tiene la
- 60 secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 169, 205-208, 214-243 y 246-265 y que contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s). En un Ejemplo adicional, Se describen en el presente documento polipéptidos de FX modificados o polipéptidos de FX modificados aislados que contienen una forma catalíticamente activa de cualquiera de las anteriores formas que incluye la(s) modificación(ones) y presenta actividad catalítica.
- 65 Se describen en el presente documento polipéptidos de Factor X modificados (FX) que contiene una sustitución de aminoácido en un polipéptido de FX sin modificar en un resto de aminoácido nativo que es 198, 202, 211,214, 217,

219, 327 y/o 338 con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o un resto que corresponde a un resto de aminoácido 198, 202, 211,214, 217, 219, 327 y/o 338, por lo cual, el polipéptido de FX modificado presenta una actividad catalítica dependiente de FVa. En dichos ejemplos, los restos de aminoácidos correspondientes se identifican por la alineación del polipéptido de FX sin modificar con el polipéptido que se muestra en la SEQ ID NO:134, por ejemplo, como se ilustra en la Figura 3. el polipéptido de FX sin modificar tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:134 o es la forma zimógena, activa o catalíticamente activa del mismo, o tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75% de identidad de la secuencia con la SEQ ID NO:134 o un zimógeno, la forma activa o catalíticamente activa del mismo. En un ejemplo, el polipéptido de FX sin modificar puede ser un polipéptido de FX zimógeno que tiene una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 143-448 de la SEQ ID NO:134, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 % de identidad de la secuencia con el polipéptido de FX zimógeno que tiene una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 143-448 de la SEQ ID NO:134. En otro ejemplo, el polipéptido de FX sin modificar puede ser un polipéptido de FX (FXa) activo que tiene una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de la SEQ ID NO:134, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 % de identidad de la secuencia con el polipéptido de FXa que tiene una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de la SEQ ID NO:134. En un ejemplo adicional, el polipéptido de FXa sin modificar es una forma catalíticamente activa del FXa activo descrito anteriormente. Cualquiera de los polipéptidos de FX sin modificar puede tener al menos un 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de la secuencia con la SEQ ID NO:134 o el zimógeno, la forma activa o catalíticamente activa del mismo. Dichos polipéptidos de FX modificados pueden aislarse o purificarse sustancialmente.

Por ejemplo, los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento contienen una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con: S en una posición que corresponde a la posición 202; S en una posición que corresponde a la posición 211; D en una posición que corresponde a la posición 214; A en una posición que corresponde a la posición 214; S en una posición que corresponde a la posición 214; S en una posición que corresponde a la posición 217; H en una posición que corresponde a la posición 219; A en una posición que corresponde a la posición 327; L en una posición que corresponde a la posición 327; A en una posición que corresponde a la posición 338; S en una posición que corresponde a la posición 338; N en una posición que corresponde a la posición 338; R en una posición que corresponde a la posición 338; V en una posición que corresponde a la posición 338; Y en una posición que corresponde a la posición 338 y M en una posición que corresponde a la posición 338, con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la(s) misma(s) sustitución(ones) en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar.

En ejemplos concretos de los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento, el polipéptido de FX modificado contiene sustituciones de aminoácidos con S en una posición que corresponde a la posición 211 y H en una posición que corresponde a la posición 219, con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la(s) misma(s) sustitución(ones) en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar. Por ejemplo, Los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento incluyen todos aquellos que contienen una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con: S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que corresponde a la posición 211 y H en una posición que corresponde a la posición 219; A en una posición que corresponde a la posición 197, S en una posición que corresponde a la posición 214 y H en una posición que corresponde a la posición 219; o L en una posición que corresponde a la posición 195, S en una posición que corresponde a la posición 211 y H en una posición que corresponde a la posición 219, con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la(s) misma(s) sustitución(ones) en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar.

En otros ejemplos de los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento, el polipéptido de FX modificado contiene una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con A en una posición que corresponde a la posición 327 y H en una posición que corresponde a la posición 338; o una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con L en una posición que corresponde a la posición 327 y M en una posición que corresponde a la posición 338, cada una con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o las mismas sustituciones en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar. Por ejemplo, se describen en el presente documento polipéptidos de FX modificados que contienen una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con V en una posición que corresponde a la posición 200, L en una posición que corresponde a la posición 327 y M en una posición que corresponde a la posición 338; o la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con V en una posición que corresponde a la posición 200, L en una posición que corresponde a la posición 327, A en una posición que corresponde a la posición 334 y M en una posición que corresponde a la posición 338.

Se describen en el presente documento polipéptidos de Factor X modificados (FX) que contienen una sustitución de aminoácido en un polipéptido de FX sin modificar que es S en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 200; V en una posición que corresponde a la posición 200; S en una posición que corresponde a la posición 326; T en una posición que corresponde a la posición 326; V en una posición que corresponde a la posición 326; N en una posición que corresponde a la posición 326, M en una posición que corresponde a la posición 326; K en una posición que corresponde a la posición 326; Y en una posición que corresponde a la posición 326; A en una posición que corresponde a la posición 327; L en una posición que corresponde a la posición 327; A en una posición que corresponde a la posición 334; T en una posición que corresponde a la posición 334; N en una posición que corresponde a la posición 334; E en una posición que corresponde a la posición 336; A en una posición que corresponde a la posición 338; S en una posición que corresponde a la posición 338; N en una posición que corresponde a la posición 338; R en una posición que corresponde a la posición 338; V en una posición que corresponde a la posición 338; Y en una posición que corresponde a la posición 338; y/o M en una posición que corresponde a la posición 338, cada una con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o las mismas sustituciones en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar, por lo cual, el polipéptido de FX modificado presenta una actividad catalítica dependiente de FVa. En dichos ejemplos, los restos de aminoácidos correspondientes se identifican por la alineación del polipéptido de FX sin modificar con el polipéptido que se muestra en la SEQ ID NO:134, por ejemplo, como se ilustra en la Figura 3. el polipéptido de FX sin modificar tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:134 o es la forma zimógena, activa o catalíticamente activa del mismo, o tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75% de identidad de la secuencia con la SEQ ID NO:134 o una forma zimógena. activa o catalíticamente activa del mismo. En un ejemplo, el polipéptido de FX sin modificar puede ser un polipéptido de FX zimógeno que tiene una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 143-448 de la SEQ ID NO:134, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 % de identidad de la secuencia con el polipéptido de FX zimógeno que tiene una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 143-448 de la SEQ ID NO:134. En otro ejemplo, el polipéptido de FX sin modificar puede ser un polipéptido de FX (FXa) activo que tiene una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de la SEQ ID NO:134, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 % de identidad de la secuencia con el polipéptido de FXa que tiene una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de la SEQ ID NO:134. En un ejemplo adicional, el polipéptido de FXa sin modificar es una forma catalíticamente activa para el FXa activo descrito anteriormente. Cualquiera de los polipéptidos de FX sin modificar puede tener al menos un 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de la secuencia con la SEQ ID NO:134 o el zimógeno, la forma activa o catalíticamente activa del mismo. Dichos polipéptidos de FX modificados pueden aislarse o purificarse sustancialmente.

En otros ejemplos de los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento, el polipéptido de FX modificado puede contener también una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) en una posición que corresponde a la posición 196, I en una posición que corresponde a la posición 196; L en una posición que corresponde a la posición 196; T en una posición que corresponde a la posición 196; A en una posición que corresponde a la posición 326 y/ Q en una posición que corresponde a la posición 326.

Los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento, incluyendo cualquiera que presente actividad catalítica dependiente de FVa, pueden contener una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) que altera(n) la glicosilación mediante la introducción de un sitio de glicosilación no nativo. Por ejemplo, el sitio de glicosilación no nativo puede introducirse mediante la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con: N en una posición que corresponde a la posición 51; N en una posición que corresponde a la posición 56 y S en una posición que corresponde a la posición 58; N en una posición que corresponde a la posición 62 y S en una posición que corresponde a la posición 64; N en una posición que corresponde a la posición 65 y S en una posición que corresponde a la posición 67; N en una posición que corresponde a la posición 67; N en una posición que corresponde a la posición 73 y S en una posición que corresponde a la posición 75; N en una posición que corresponde a la posición 75 y S en una posición que corresponde a la posición 77; N en una posición que corresponde a la posición 77 y S en una posición que corresponde a la posición 79; N en una posición que corresponde a la posición 78 y S en una posición que corresponde a la posición 80; S en una posición que corresponde a la posición 82; N en una posición que corresponde a la posición 83; N en una posición que corresponde a la posición 82 y S en una posición que corresponde a la posición 84; N en una posición que corresponde a la posición 85 y S en una posición que corresponde a la posición 87; N en una posición que corresponde a la posición 86 y S en una posición que corresponde a la posición 88; N en una posición que corresponde a la posición 95 y S en una posición que corresponde a la posición 97; N en una posición que corresponde a la posición 114; N en una posición que corresponde a la posición 119 y S en una posición que corresponde a la posición 121; S en una posición que corresponde a la posición 122; N en una posición que corresponde a la posición 215 y S en una posición que corresponde a la posición 217; N en una posición que corresponde a la posición 243 y S en una posición que

5 corresponde a la posición 245; N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que corresponde a la posición 266; N en una posición que corresponde a la posición 293 y S en una posición que corresponde a la posición 295; N en una posición que corresponde a la posición 388; N en una posición que corresponde a la posición 389 y S en una posición que corresponde a la posición 391; N en una posición que
 10 corresponde a la posición 428 y S en una posición que corresponde a la posición 430; o N en una posición que corresponde a la posición 429 y S en una posición que corresponde a la posición 431, con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la(s) misma(s) sustitución(ones) en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar.

10 Por ejemplo, se describen en el presente documento los polipéptidos de FX que contienen una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con: N en una posición que corresponde a la posición 119, S en una posición que corresponde a la posición 121, S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que corresponde a la posición 211 y H en una posición que corresponde a la posición 219; N en una posición que corresponde a la posición 114, S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que corresponde a la posición 211 y H en una
 15 posición que corresponde a la posición 219; N en una posición que corresponde a la posición 114, N en una posición que corresponde a la posición 119, S en una posición que corresponde a la posición 121, S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que corresponde a la posición 211 y H en una posición que corresponde a la posición 219; S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que
 20 corresponde a la posición 211, H en una posición que corresponde a la posición 219, N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que corresponde a la posición 266; N en una posición que corresponde a la posición 119, S en una posición que corresponde a la posición 121, S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que
 25 corresponde a la posición 211, H en una posición que corresponde a la posición 219, N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que corresponde a la posición 266; N en una posición que corresponde a la posición 114, S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que corresponde a la posición 211, H en una posición que
 30 corresponde a la posición 219, N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que corresponde a la posición 266; N en una posición que corresponde a la posición 119, S en una posición que corresponde a la posición 121, S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que
 35 corresponde a la posición 211, H en una posición que corresponde a la posición 219 y N en una posición que corresponde a la posición 388; N en una posición que corresponde a la posición 114, S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que corresponde a la posición 211, H en una posición que
 corresponde a la posición 219 y N en una posición que corresponde a la posición 388; o S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que corresponde a la posición 211, H en una posición que
 corresponde a la posición 219, N en una posición que corresponde a la posición 264, S en una posición que
 corresponde a la posición 266 y N en una posición que corresponde a la posición 388.

Se describen en el presente documento polipéptidos de FX modificados que contienen una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) que altera(n) la glicosilación mediante la introducción de un sitio de glicosilación no nativo, manteniendo a la vez o presentando actividad catalítica dependiente de FVa. Por ejemplo, se proporcionan en el
 40 presente documento polipéptidos de FX modificados que contienen un sitio de glicosilación no nativo que se introduce mediante la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con: N en una posición que corresponde a la posición 51; N en una posición que corresponde a la posición 56 y S en una posición que corresponde a la posición 58; N en una posición que corresponde a la posición 62 y S en una posición que corresponde a la posición 64; N en una posición que corresponde a la posición 65 y S en una posición que corresponde a la posición 67; N en una posición
 45 que corresponde a la posición 67; N en una posición que corresponde a la posición 73 y S en una posición que corresponde a la posición 75; N en una posición que corresponde a la posición 75 y S en una posición que corresponde a la posición 77; N en una posición que corresponde a la posición 77 y S en una posición que corresponde a la posición 79; N en una posición que corresponde a la posición 78 y S en una posición que
 50 corresponde a la posición 80; S en una posición que corresponde a la posición 82; N en una posición que corresponde a la posición 83; N en una posición que corresponde a la posición 82 y S en una posición que corresponde a la posición 84; N en una posición que corresponde a la posición 85 y S en una posición que
 55 corresponde a la posición 87; N en una posición que corresponde a la posición 86 y S en una posición que corresponde a la posición 88; N en una posición que corresponde a la posición 95 y S en una posición que
 60 corresponde a la posición 97; N en una posición que corresponde a la posición 114; N en una posición que
 65 corresponde a la posición 119 y S en una posición que corresponde a la posición 121; S en una posición que corresponde a la posición 122; N en una posición que corresponde a la posición 215 y S en una posición que
 corresponde a la posición 217; N en una posición que corresponde a la posición 243 y S en una posición que
 corresponde a la posición 245; N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que
 corresponde a la posición 266; N en una posición que corresponde a la posición 293 y S en una posición que
 corresponde a la posición 295; N en una posición que corresponde a la posición 388; N en una posición que
 corresponde a la posición 389 y S en una posición que corresponde a la posición 391; N en una posición que
 corresponde a la posición 428 y S en una posición que corresponde a la posición 430; o N en una posición que
 corresponde a la posición 429 y S en una posición que corresponde a la posición 431, con referencia a las
 posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la(s) misma(s) sustitución(ones) en un resto de
 aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar.

Entre los polipéptidos de FX modificados, que incluyen cualesquiera formas aisladas o sustancialmente purificadas, las descritas en el presente documento incluyen aquellas que contienen solo una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, o veinte sustituciones de aminoácidos. En un ejemplo, se describe en el presente documento un polipéptido de FX modificado que tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOS: 164, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213, 259-261 y 263-265 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 % de identidad de la secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se muestran en cualquiera de las SEQ ID NOS: 164, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213, 259-261 y 263-265 y que contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s). En otro ejemplo, se describe en el presente documento un polipéptido de FX modificado que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 143-448 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 164, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213, 259-261 y 263-265, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 % de identidad la secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos que contienen una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 143-448 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 164, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213, 259-261 y 263-265 y que contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s). En un ejemplo adicional, se describe en el presente documento un polipéptido de FX modificado que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 164, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213, 259-261 y 263-265, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 % de identidad la secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos que contienen una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 164, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213, 259-261 y 263-265 y que contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s). En un Ejemplo adicional, Se describe en el presente documento un polipéptido de FX modificado que es una forma catalíticamente activa de cualquiera de los anteriores polipéptidos y que incluye la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) y presenta actividad catalítica.

En cualquiera de los ejemplos proporcionados en el presente documento, los polipéptidos de FX modificados de acuerdo con las presentes reivindicaciones incluyen aquellos que, cuando están en una forma FXa o un fragmento catalíticamente activo de la misma, presenta una dependencia del cofactor de FVa aumentada en comparación con el mismo polipéptido de FXa, pero que no contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s). la dependencia del cofactor está aumentada al menos 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 1200 veces o 1500 veces.

En cualquiera de los ejemplos en el presente documento, los polipéptidos de FX modificados incluyen aquellos que, cuando están en la forma activa de FX (FXa) o uno de sus fragmentos catalíticamente activos, presentan una resistencia aumentada a un inhibidor, tal como antitrombina III (AT-III) o TFPI, en comparación con el mismo polipéptido de FXa, pero que no contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s). La resistencia al inhibidor está aumentada al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 1500 veces, 2000 veces, 2500 veces, 3000 veces, 3500 veces, 4000 veces, 4500 veces, 5000 veces, 5500 veces o 6000 veces.

En cualquiera de los ejemplos en el presente documento, los polipéptidos de FX modificados incluyen aquellos que, cuando están en la forma activa de FX (FXa) o uno de sus fragmentos catalíticamente activos, presenta al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o más actividad catalítica de la misma FXa, pero que no contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s). En un ejemplo, la actividad catalítica está en presencia de FVa. En otro ejemplo, la actividad catalítica está en ausencia de FVa.

En cualquiera de los polipéptidos de FX modificados o los polipéptidos de FX modificados aislados proporcionados en el presente documento, el polipéptido de FX modificado puede contener además una sustitución con leucina (L) en una posición que corresponde a la posición 195 con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la(s) misma(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FX sin modificar.

En cualquiera de los polipéptidos de FX modificados o los polipéptidos de FX modificados aislados proporcionados en el presente documento, el polipéptido modificado puede ser un polipéptido humano o puede ser un polipéptido no humano. En algunos ejemplos, el polipéptido de FX modificado es un polipéptido zimógeno. En otros ejemplos, el polipéptido de FX modificado está activo o está activado, por ejemplo, el polipéptido de FX modificado carece o no contiene un péptido de activación en la cadena pesada. En dichos ejemplos, la activación puede efectuarse mediante escisión proteolítica por los complejos TF/FVIIa o FVIIIa/FIXa tenasa o el activador FX del veneno de víbora de Russell. En algunos ejemplos, el polipéptido de FX modificado es un polipéptido bicatenario. En otros

ejemplos, el polipéptido de FX modificado es un polipéptido monocatenario.

En los ejemplos de polipéptidos de FX modificados o de polipéptidos de FX modificados aislados proporcionados en el presente documento, solo la secuencia primaria está modificada. En otros ejemplos de cualesquiera polipéptidos de FX modificados o polipéptidos de FX modificados aislados proporcionados en el presente documento, el polipéptido puede contener además una modificación química o una modificación posterior a la traducción. Por ejemplo, el polipéptido de FX modificado está glicosilado, carboxilado, hidroxilado, sulfatado, fosforilado, albuminado, o conjugado a un resto de polietilenglicol (PEG). En ejemplos adicionales de polipéptidos de FX modificados o los polipéptidos de FX modificados aislados proporcionados en el presente documento, el polipéptido es una proteína química o de fusión.

Se proporcionan en el presente documento moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, incluyendo cualquiera descrito anteriormente o en otra parte en el presente documento. Se proporcionan también vectores que contienen dichas moléculas de ácido nucleico. El vector puede ser un vector procariota, un vector vírico, o un vector eucariota. El vector puede ser un vector de mamífero. En los ejemplos donde el vector es un vector vírico este puede ser un adenovirus, un virus adenoasociado, un retrovirus, un virus del herpes, un lentivirus, un virus de la viruela, o un vector de citomegalovirus.

Se proporcionan también en el presente documento células aisladas que contienen cualquiera de las anteriores moléculas o vectores de ácido nucleico. La célula puede ser una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero. Las células de mamífero pueden ser células de riñón de crías de e hámster (BHK-21) o células 293 o células CHO. La célula puede expresar el polipéptido de FX modificado. Por lo tanto, se proporcionan también en el presente documento polipéptidos de FX modificados que son producidos por células proporcionadas en el presente documento.

Se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que contienen cualquiera de los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, los ácidos nucleicos proporcionados en el presente documento o los vectores proporcionados en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede formularse para la administración local, sistémica o tópica. Por ejemplo, la formulación se formula para la administración oral, nasal, pulmonar bucal, transdérmica, subcutánea, intraduodenal, entérica, parenteral, intravenosa, o intramuscular. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica puede ser una composición formulada para la liberación controlada. En otros ejemplos, las composiciones se formulan para una administración monodosis. Las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen cualquiera en la que el polipéptido de FX modificado contiene sustituciones de aminoácidos, es decir, un FXa activo y no comprende el polipéptido de activación. Las composiciones pueden ser una composición farmacéutica.

Se describen en el presente documento métodos para generar un polipéptido de Factor X activo modificado (FXa) a) proporcionando una composición que contiene un zimógeno de FX que contiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos 1-139 que se muestra en la SEQ ID NO:134, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 % de identidad de la secuencia con la secuencia de aminoácidos 1-139 de cualquiera de las SEQ ID NOS:134 y que contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácidos 143-448 de las SEQ ID NOS: 136-265, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 % de identidad de la secuencia con la secuencia de aminoácidos 143-448 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 136-265 y que contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) en comparación con un polipéptido de FX sin modificar; y b) eliminar el péptido de activación por el polipéptido mediante la activación por escisión del zimógeno, generando por tanto un polipéptido de FXa modificado. El zimógeno de FX utilizado en los métodos incluye zimógenos de FX modificados que se producen mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-133 o 136-265 y 417-546, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad de la secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-133 o 136-265 y 417-546 y que contiene una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) en comparación con un polipéptido de FX sin modificar. En los métodos descritos en el presente documento, la activación por escisión mediante la eliminación del péptido de activación puede efectuarse *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, la activación por escisión puede efectuarse mediante un activador seleccionado entre los complejos TF/FVIIa o FVIIIa/FIXa tenasa o el activador FX de Russell del veneno de víbora. Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir una etapa de eliminación del activador de la composición. Los métodos en el presente documento también pueden incluir una etapa de eliminar el péptido de activación de la composición.

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FXa modificados o polipéptidos de FX modificados para su uso en un método para tratar una enfermedad o dolencia que es un trastorno hemorrágico administrando a un sujeto cualquiera de los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento o cualquiera de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento. El polipéptido de FX modificado utilizado en el método puede ser un zimógeno, FXa o porción catalíticamente activa del mismo que contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s). En los métodos en el presente documento, el tratamiento con el polipéptido o la composición farmacéutica mejora o alivia los síntomas asociados con la enfermedad o dolencia. Los métodos descritos en el presente documento incluyen también controlar al sujeto para los cambios en los síntomas asociados

con el trastorno hemorrágico.

5 En cualquiera de los ejemplos en el presente documento de polipéptidos de FXa modificados o polipéptidos de FX modificados para su uso en los métodos para tratar un trastorno hemorrágico, el método puede incluir también administrar uno o más factores de coagulación adicionales. Por ejemplo, el uno o más factores de coagulación adicionales pueden ser factores de coagulación purificados en plasma o recombinantes, procoagulantes, tales como vitamina K, derivados de la vitamina K e inhibidores de la proteína C, plasma, plaquetas, glóbulos rojos de la sangre o corticoesteroides.

10 Se proporcionan en el presente documento usos médicos de cualquiera de los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento. En un ejemplo, se proporcionan en el presente documento cualquiera de los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento para su uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico. En otro ejemplo, se describen en el presente documento los usos de una composición farmacéutica que contiene cualquiera de los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno hemorrágico. En los usos médicos proporcionados en el presente documento, el polipéptido de FX es un zimógeno, FXa o una forma catalíticamente activa del mismo que contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s).

20 En cualquiera de los polipéptidos para su uso para el tratamiento de un trastorno hemorrágico proporcionado en el presente documento, el trastorno hemorrágico es un trastorno hemorrágico congénito o un trastorno hemorrágico adquirido. Por ejemplo, el trastorno hemorrágico puede ser un trastorno debido a una deficiencia de un factor de coagulación, un trastorno debido a la presencia de inhibidores adquiridos de un factor de coagulación, un trastorno hematológico, un trastorno hemorrágico, una enfermedad de Von Willebrand, un trastorno que es el resultado de una terapia anticoagulante con un antagonista de la vitamina K, trastornos plaquetarios hereditarios, deficiencia de vitamina K epóxido reductasa C1, deficiencia de gamma-carboxilasa, hemorragia asociada con trauma, lesión, trombotosis, trombocitopenia, ictus, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada (DIC), síndrome de Bernard Soulier, tromblastemia de Glanzman o deficiencia de almacenamiento del combinado plaquetario. En los ejemplos donde el trastorno hemorrágico es debido a una deficiencia de un factor de coagulación o debida a la presencia de inhibidores adquiridos de un factor de coagulación, el factor de coagulación es el factor VII, factor IX, factor X, factor XI, factor V, factor XII, factor II o factor de von Willebrand. En los ejemplos donde el trastorno hemorrágico es debido a una deficiencia de un factor de coagulación, el factor de coagulación puede ser el factor VII, factor VIII, factor IX, factor XI. Por ejemplo, el trastorno hemorrágico es hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

35 En los ejemplos de polipéptidos para su uso para tratar un trastorno hemorrágico proporcionado en el presente documento, donde el trastorno hemorrágico es debido a una deficiencia de un factor de coagulación, el trastorno es una deficiencia del factor de coagulación múltiple familiar (FMFD). En los ejemplos en el presente documento donde el trastorno hemorrágico es debido a la presencia de inhibidores adquiridos de un factor de coagulación, el factor de coagulación es el factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, y factor XII. En dichos ejemplos, los inhibidores adquiridos son autoanticuerpos. Por ejemplo, el trastorno hemorrágico es hemofilia adquirida. En los ejemplos de usos o polipéptidos para su uso proporcionados en el presente documento donde el trastorno hemorrágico es un trastorno plaquetario hereditario este puede ser un síndrome de Chediak-Higashi, síndromes de Hermansky-Pudlak, disfunción del tromboxano A2, tromblastemia de Glanzmann, y síndrome de Bernard-Soulier. En otros ejemplos en el presente documento, donde el trastorno es el resultado de una terapia anticoagulante con un antagonista de la vitamina K, el antagonista de la vitamina K puede ser heparina, un pentasacárido, warfarina, antitrombóticos de molécula pequeña e inhibidores de FXa.

50 En otros ejemplos de los polipéptidos para su uso para el tratamiento de un trastorno hemorrágico proporcionado en el presente documento, el trastorno es trombotosis, trombocitopenia, ictus y coagulopatía. En otros ejemplos, el trastorno hemorrágico es el resultado de un trauma, cirugía o una herida. En dichos ejemplos, por ejemplo, la hemorragia se manifiesta como hemartrosis aguda, artropatía hemofílica crónica, hematomas, hematuria, hemorragias del sistema nervioso central, hemorragias gastrointestinales, o hemorragia cerebral. En otros ejemplos, la hemorragia es debida a la extracción dental. En otros ejemplos en el presente documento, donde el trastorno hemorrágico es debido a cirugía, la cirugía es cirugía cardiaca, angioplastia, cirugía pulmonar, cirugía abdominal, cirugía espinal, cirugía cerebral, cirugía vascular, cirugía dental, o cirugía de trasplante de órganos. Por ejemplo, la cirugía es cirugía de trasplante, mediante el trasplante de médula ósea, corazón, pulmón, páncreas, o hígado.

60 En cualquiera de los ejemplos en el presente documento de los polipéptidos para su uso para el tratamiento de un trastorno hemorrágico proporcionado en el presente documento, el polipéptido de FX modificado puede presentar semivida aumentada en comparación con el polipéptido de FX sin modificar. Por ejemplo, la semivida aumentada se efectúa por una resistencia aumentada a AT-III o por una hiperglicosilación debida a la glicosilación de los sitios de glicosilación no nativos introducidos.

65 Se describe en el presente documento un artículo de fabricación que contiene un material de envase y cualquiera de las composiciones farmacéuticas que contienen cualquiera de los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento contenidos en el material de envase. En los ejemplos del artículo de fabricación descrito en el presente documento, el polipéptido de FX modificado es eficaz para el tratamiento de un trastorno hemorrágico, y el

material de envase incluye una marca que indica el polipéptido de FX modificado se usa para el tratamiento de un trastorno hemorrágico. Se describe también en el presente documento un kit, que contiene cualquiera de las composiciones farmacéuticas del presente documento, un dispositivo para la administración de la composición y, opcionalmente, instrucciones para la administración.

5

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** es una representación gráfica estructural de una forma zimógena del Factor X que contiene una cadena ligera y una cadena pesada unidas mediante un enlace disulfuro (adaptado de Venkateswarlu et al., Biophysical Journal 82:1190-1206 (2002)). Están resaltados los restos de aminoácidos dirigidos para la mutagénesis.

10

Con referencia al zimógeno humano maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134, la cadena ligera tiene 130 aminoácidos (que corresponden a los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134) y la cadena pesada tiene 306 aminoácidos (que corresponden a los restos 143-448 de la SEQ ID NO: 134). La cadena ligera contiene ácido un dominio rico en ácido γ -carboxiglutámico (GLA) (que corresponde a los restos 1-39 de la SEQ ID NO: 134), seguido por un apilamiento pequeño hidrófobo (que corresponde a los restos 40-45 de la SEQ ID NO:134) y dos dominios análogos al factor de crecimiento epidérmico (EGF): EGF1 (que corresponde a los aminoácidos 46-84 de la SEQ ID NO:134) y EGF2 (que corresponde a los aminoácidos 85-128 de la SEQ ID NO:134). La cadena pesada contiene una activación de 52 restos de aminoácidos en el extremo amino de la cadena pesada. La cadena pesada contiene también el dominio catalítico que comienza con el resto que corresponde a Ile 195 de la SEQ ID NO:134. Las cadenas ligera y pesada de FX permanecen unidas por un enlace disulfuro entre Cys 132 (de la cadena ligera) y Cys 302 (de la cadena pesada) con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO: 134.

15

20

La forma del Factor X activo (FXa) contiene las características estructurales de la forma zimógena del Factor X, excepto que la porción de la cadena pesada carece del péptido de activación y contiene por tanto solo el dominio catalítico (denominado también el dominio de la serina proteasa análogo a quimotripsina; que corresponde a los restos 195-448 de la SEQ ID NO:134) que comienza en el extremo N nuevo que corresponde a los restos hidrófobos Ile195-G198 en el Factor X maduro que se muestra en la SEQ ID NO: 134. La conformación de FXa difiere también del zimógeno de FX debido a la formación de un puente salino entre el grupo α -NH₂ de Ile 195 y Asp378 en el interior del dominio catalítico que corresponde a los restos que se muestran en la SEQ ID NO:134. La formación del puente salino se asocia con numerosos cambios en la estructura del dominio catalítico que incluyen redistribuciones de los dominios de activación, la formación del orificio oxianiónico requerido para la catálisis y la formación de un sitio de unión a sustrato (S1-S4). Se exponen también los restos en regiones de exositos que contribuyen a una especificidad extendida del sustrato. Los restos catalíticos His236, Asp282, y Ser379 constituyen la tríada catalítica de sitio activo de la proteasa activa. El cambio conformacional que reordena los restos expone también los restos de unión a heparina que se unen a la heparina y facilitan el reconocimiento por el inhibidor AT-III.

25

30

La **Figura 2** representa gráficamente la cascada de coagulación. La **Figura 2A** muestra la ruta intrínseca y la ruta extrínseca de la coagulación para la producción independiente de FXa y la convergencia de las rutas hacia una ruta común para generar trombina y fibrina para la formación de un coágulo. Estas rutas están interconectadas. La figura representa gráficamente el orden de las moléculas implicadas en la cascada de activación en la que un zimógeno se convierte en una proteasa activada mediante la escisión de uno o más enlaces peptídicos. La proteasa activada sirve a continuación como la proteasa de activación para la siguiente molécula de zimógeno en la cascada, dando como resultado en última instancia la formación del coágulo. La Figura muestra que la actividad de FXa está regulada por la presencia de FVa para la generación en última instancia de trombina y fibrina (actividad dependiente de FVa). FXa solo es capaz también de bajos niveles de activación de la trombina (actividad independiente de FVa). La Figura 2A representa gráficamente además otras actividades de FXa fuera de la ruta de coagulación que pueden de forma independiente de FVa. La **Figura 2B** representa gráficamente la misma ruta, pero representa gráficamente además los reguladores de la ruta, incluyendo la antitrombina (AT-III), que puede inhibir la coagulación.

35

40

45

La **Figura 3** representa gráficamente las alineaciones ilustrativas del FX humano maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 con otros polipéptidos de FX. A "*" significa que los restos alineados son idénticos, a ":" significa que los restos alineados no son idénticos, pero son similares y contienen restos de aminoácidos conservativos en la posición alineada y a "." significa que los restos alineados son similares y contienen restos de aminoácidos semiconservativos en la posición alineada. De forma ilustrativa, aunque no limitativa, las posiciones correspondientes para las sustituciones de aminoácidos están indicadas por subrayados. Por ejemplo, La **Figura 3A** representa gráficamente la alineación de un FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 con la de un gibón de mejillas blancas que se muestra en la SEQ ID NO:404. La **Figura 3B** representa gráficamente la alineación de un FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 con la de un FX de babuino que se muestra en la SEQ ID NO:405. La **Figura 3C** representa gráficamente la alineación de un FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 con la de un FX de macaco que se muestra en la SEQ ID NO:406. La **Figura 3D** representa gráficamente la alineación de un FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 con la de un FX de un mono títí oscuro que se muestra en la SEQ ID NO:407. La **Figura 3E** representa gráficamente la alineación de un FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 con la de un FX de elefante que se muestra en la SEQ ID NO:408. La **Figura 3F** representa gráficamente la alineación de un FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 con la de un FX de elefante que se muestra en la SEQ ID NO:409. La **Figura 3G** representa gráficamente la alineación de un FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 con la de un FX de conejo que se muestra en la SEQ ID NO:410. La **Figura 3H** representa gráficamente la alineación de un FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 con la de un FX de rata que se muestra en la SEQ ID NO:411. La **Figura 3I** representa gráficamente la alineación de un FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 con la de un FX de perro que se muestra en la SEQ ID NO:412. La **Figura 3J** representa gráficamente la

50

55

60

65

alineación de un FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 con la de una variante I195L de FX que se muestra en la SEQ ID NO:135. La **Figura 3K** representa gráficamente la alineación de un FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 con la de un péptido de activación de la variante FX (Ap) 152T que se muestra como los restos de aminoácidos 41-488 de la SEQ ID NO:549.

5

Descripción detallada

Esquema

10

- A. Definiciones
- B. Función hemostática y Factor X

- 1. Ruta de coagulación

15

- a. Ruta de coagulación del Factor Tisular (Extrínseco)
- b. Ruta de coagulación intrínseca
- c. Ruta común

20

- 2. Actividad independiente del Factor V

- a. Activación de la trombina
- b. Inflamación y proliferación celular

25

- i. Receptor 1 de la proteasa de células efectoras (EPR-1)
- ii. Receptores activados de la proteasa (PAR)

- 3. Inhibidores del Factor X

30

- C. Estructura y activación del Factor X

- 1. Procesamiento y Estructura
- 2. Activación
- 3. Factor X y XA como una sustancia biofarmacéutica

35

- D. Polipéptidos con Factor X modificados
- E. Producción de polipéptidos de Factor X

- 1. Vectores y células
- 2. Sistemas de expresión

40

- a. Expresión procariota
- b. Levaduras
- c. Insectos y células de insectos
- d. Células de mamíferos
- e. Plantas

45

- 2. Purificación
- 3. Proteínas de fusión
- 4. Modificaciones de polipéptidos
- 5. Secuencias de nucleótidos

50

- F. Evaluación de las actividades del Factor X modificado

55

- 1. Ensayos *in vitro*
- 2. Modelos de animales no humanos
- 3. Ensayos clínicos

- G. Formulaciones y administración

60

- 1. Formulaciones
 - a. Dosificaciones
 - b. Formas farmacéuticas

65

- 2. Administración de polipéptidos FVX modificados
- 3. Administración de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de FVX modificados (terapia génica)

- H. Usos terapéuticos
- I. Tratamientos combinados
- J. Artículos de fabricación y kits
- K. Ejemplos

5

A. Definiciones

10 A no ser que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la cual pertenece la presente invención. En el caso de que exista una pluralidad de definiciones para los términos en el presente documento, prevalecerán aquellas de esta sección. Cuando se haga referencia a URL u otro de dicho identificador o seña, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y la información concreta en Internet puede aparecer y desaparecer, pero se puede encontrar información equivalente buscando en Internet. La referencia a la misma evidencia la disponibilidad y la difusión pública de dicha información.

15

20 Tal como se usa en el presente documento, la ruta de coagulación o la cascada de coagulación se refiere a la serie de eventos de activación que conduce a la formación de un coágulo de fibrina insoluble. En la cascada o ruta de coagulación, una proteína inactiva de una serina proteasa (denominada también un zimógeno) se convierte en una proteasa activa mediante la escisión de uno o más enlaces peptídicos, que sirve a continuación como la proteasa de activación para la siguiente molécula de zimógeno en la cascada. En la etapa proteolítica final de la cascada, el fibrinógeno se escinde proteolíticamente por trombina a fibrina, que a continuación se reticula en el sitio de la lesión para formar un coágulo.

25 Tal como se usa en el presente documento, "hemostasia" se refiere a la detención de la hemorragia o del flujo de sangre en un órgano o parte del cuerpo. el término hemostasia puede abarcar el proceso completo de coagulación de la sangre para evitar la pérdida de sangre tras la lesión en un vaso sanguíneo para la disolución posterior del coágulo de sangre tras la reparación del tejido.

30 Tal como se usa en el presente documento, "que coagula" o "coagulación"-se refiere a la formación de un coágulo de fibrina insoluble, o el proceso por el cual los factores de coagulación de la sangre interactúan en la cascada de coagulación, dando como resultado en última instancia la formación de un coágulo de fibrina insoluble.

35 Tal como se usa en el presente documento, una "proteasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos covalentes. Estas designaciones incluyen formas zimógenas y formas monocatenarias, bicatenarias y multicatenarias activadas de las mismas. Por claridad, la referencia a las proteasas se refiere a todas las formas. Las proteasas incluyen, por ejemplo, serina proteasas, cisteína proteasas, proteasas aspárticas, treonina y metaloproteasas que dependen de la actividad catalítica de su sitio activo y el mecanismo de escindir los enlaces peptídicos de un sustrato diana.

40 Tal como se usa en el presente documento, las serina proteasas o las serina endopeptidasas se refieren a una clase de peptidasas, que se caracterizan por la presencia de un resto de serina en el sitio activo de la enzima. Las serina proteasas participan en una amplia gama de funciones en el cuerpo, incluyendo la coagulación de la sangre y la inflamación, así como el funcionamiento como enzimas digestivas en procarionotas y eucariotas. el mecanismo de escisión por las serina proteasas se basa en el ataque nucleofílico de un enlace peptídico dirigido por una serina. 45 Cisteína, treonina o moléculas de agua asociadas con aspartato o metales pueden también jugar este papel. Las cadenas secundarias alineadas de la serina, histidina y aspartato forman una tríada catalítica común a la mayoría de las serina proteasas. El sitio activo de las serina proteasas está conformado como una llave donde se une el sustrato polipeptídico.

50 Tal como se usa en el presente documento, El Factor X (FX) o el polipéptido de FX se refiere a un polipéptido de serina proteasa que presenta actividad catalítica contra la protrombina (es decir, actividad protrombogénica) cuando está en forma activa. FX es una serina proteasa que es parte de la ruta de coagulación, y específicamente es la primera serina proteasa en la ruta de coagulación común. FX se procesa en células a partir de un polipéptido precursor (por ejemplo, se muestra en la SEQ ID NO:2) para dar como resultado un polipéptido que contiene una región propeptídica, que se escinde eventualmente para generar un polipéptido maduro que carece de la secuencia y del propéptido de señalización (por ejemplo, se muestra en la SEQ ID NO: 134). El polipéptido de FX secretado es un polipéptido bicatenario. Los polipéptidos de FX incluyen zimógenos inactivos o un Factor X activo (FXa). El FXa activo carece del péptido de activación. FXa es la forma activa de FX que presenta actividad catalítica, que se aumenta mucho tras la unión de FX activo (FXa) a su cofactor del Factor Va. La actividad de FXa está también 60 potenciada por la inclusión de Ca⁺⁺ y el fosfolípido. Como se proporciona en el presente documento, se pueden introducir mutaciones que den como resultado cambios conformacionales de una forma FXa a una forma de tipo zimógeno, que cuando está en forma completamente activa en presencia del cofactor de FVa, presenta actividad catalítica frente a la protrombina. Por lo tanto, la referencia a FX o a los polipéptidos de FX en el presente documento incluye todas las formas, que incluyen el precursor, una única forma monocatenaria y formas bicatenarias de los mismos, incluyendo formas maduras, formas zimógenas, formas FXa, incluyendo formas de tipo 65 zimógeno, o porciones catalíticamente activas de los mismos.

La referencia a FX incluye polipéptidos de FX humanos, incluyendo el polipéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:2 y una forma monocatenaria y formas bicatenarias, incluyendo formas maduras, formas zimógenas, formas FXa, incluyendo formas de tipo zimógeno, o formas catalíticamente activas de los mismos. Por ejemplo, el FX maduro carece de la secuencia de señalización y la región propeptídica se muestra en la SEQ ID NO:134. La forma zimógena del mismo es una forma bicatenaria que contiene una cadena ligera de 130 aminoácidos (que corresponde a los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134) y una cadena pesada de 306 aminoácidos (que corresponde a los restos 143-448 de la SEQ ID NO:134). La forma FXa del mismo es una forma bicatenaria que contiene una cadena pesada de 130 aminoácidos (que corresponde a los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134) y una cadena pesada (que corresponde a los restos de aminoácidos 194-448 de la SEQ ID NO:134), o a las formas catalíticamente activas de los mismos. Como se ha indicado, FX incluye también formas modificadas de los mismos, incluyendo FXa, que son de tipo zimógeno en ausencia del cofactor de FVa.

La referencia a FX incluye también variantes del mismo, tales como variantes alélicas y variantes de especies, variantes codificadas por variantes de corte y empalme, y otras variantes, incluyendo polipéptidos que tienen al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de la secuencia con el polipéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 2 o la forma madura, la forma zimógena o las formas FXa del mismo. Dichas variantes incluyen cualquiera donde la forma FXa, o la porción catalíticamente activa del mismo, presenta una o más actividades de FX que incluyen, aunque no de forma limitativa, la unión de FVa, la actividad catalítica, la unión de la protrombina, la actividad protrombinasa y/o la actividad coagulante. La actividad puede reducirse o aumentarse en comparación con la actividad de un Factor X nativo o natural. Por ejemplo, los polipéptidos de FX incluyen polipéptidos donde la forma FXa de los mismos, o la porción catalíticamente activa, presenta al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 90 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 % o más de actividad del polipéptido nativo o natural. Las variantes ilustrativas incluyen especies variantes que incluyen, aunque no de forma limitativa, la humana (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 2 y se codifica por la SEQ ID NO: 1; y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:134), el gibón de mejillas blancas occidental (prepropéptido precursor que se muestra en las SEQ ID NOS: 393 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:404), el babuino verde oliva (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:394 y la forma madura de la SEQ ID NO: 405), el macaco (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 395 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:406), el mono tití oscuro (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 396 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:407), el elefante africano (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:397 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:408), ratón (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 398 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:409), conejo (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 399 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:410), rata (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:400 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:411), perro (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:401 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:412), cerdo (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:402 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:413), y bovino (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:403 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:414). Las variantes ilustrativas incluyen también las variantes alélicas de FX humano, incluidas, aunque no de forma limitativa, las variantes que se muestran en las SEQ ID NOS:547-552 (Cargill et al. (1999) Nat. Gen., 22:231-238).

Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido precursor de FX se refiere a una forma no secretada de un polipéptido de FX que contiene un péptido de señalización en el extremo N que se dirige a la proteína para la secreción y un propéptido. El péptido de señalización se elimina por escisión en el retículo endoplásmico. Ilustrativo de un polipéptido precursor FX es el polipéptido que se muestra en la SEQ ID NO:2, o una variante alélica o de especie del mismo u otras variantes, tales como cualquiera de las que se muestran en las SEQ ID NOS: 393-403 o 547-552.

Tal como se usa en el presente documento, una "prorregión", "propéptido", o "prosecuencia", se refiere a una región o un segmento que se escinde para producir una proteína madura. Una prorregión es una secuencia de aminoácidos situada en el extremo amino de un polipéptido maduro biológicamente activo y puede ser tan pequeña como unos pocos aminoácidos o puede ser una estructura multidominio. Para los polipéptidos de FX, la región propeptídica tiene generalmente aproximadamente 9 aminoácidos, pero puede variar (por ejemplo, más largo o más corto) dependiendo de la especie. Para FX, la secuencia propeptídica funciona en la modificación posterior a la traducción de la proteína y se escinde antes de la secreción de la proteína procedente de la célula. Por ejemplo, el propéptido es el elemento de reconocimiento para la γ -carboxilación por la carboxilasa dependiente de la vitamina K en el retículo endoplásmico. La reacción se produce por conversión de los restos de ácido glutámico en el dominio Gla a ácido γ -carboxiglutámico (Gla). Esta modificación se requiere para la activación óptima mediada por Ca^{2+} del zimógeno en la sangre. Por ejemplo, Los restos Gla permiten al factor X/Xa unirse al fosfolípido (es decir, a las superficies celulares) de una manera dependiente del calcio, que es un requerimiento para el ensamblaje del complejo de la protrombinasa. Un propéptido o prorregión ilustrativa corresponde a los aminoácidos 32-40 de la SEQ ID NO:2.

Tal como se usa en el presente documento, una forma propeptídica de FX es una proteína que carece del péptido de señalización, pero que retiene el propéptido. Por ejemplo, Con referencia al FX humano que se muestra en la SEQ

ID NO:2, el propéptido es un propéptido de 9 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 32-40 de la SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, una forma propeptídica ilustrativa de FX es FX humano que se muestra como los aminoácidos 32-488 de la SEQ ID NO:2, o las variantes del mismo, incluyendo las variantes alélicas y de especie.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, un "polipéptido de FX maduro" se refiere a un polipéptido de FX que carece de una secuencia de señalización y una secuencia propeptídica. El propéptido se elimina mediante escisión proteolítica en el aparato trans-Golgi antes de la secreción del polipéptido. Se muestra un polipéptido de FX maduro ilustrativo en la SEQ ID NO: 134, en incluye también las variantes del mismo tales como las variantes de especie y alélicas. Por ejemplo, ilustrativas de dichas variantes están cualquiera de las que se muestran en cualquiera de las
- 10 SEQ ID NOS: 404-414. El polipéptido de FX maduro se refiere generalmente a una forma monocatenaria de FX antes de la proteólisis intracadena para generar un polipéptido bicatenario.

Tal como se usa en el presente documento, un zimógeno se refiere a la forma bicatenaria inactiva del polipéptido de FX que se presenta normalmente en plasma. La forma bicatenaria se genera mediante escisión intracadena para eliminar los restos Arg140-Arg142 (que corresponden a los restos que se muestran en la SEQ ID NO: 134) entre la

15 cadena pesada y la cadena ligera, de tal manera que la cadena ligera se escinde de la cadena pesada. Esto se produce durante o después de la secreción en la circulación. El zimógeno es más grande que la forma activa debido a la presencia del péptido de activación en el extremo N de la cadena pesada. Para FX, el zimógeno contiene una cadena ligera que contiene un dominio rico en un ácido γ -carboxiglutámico (GLA) y dos dominios análogos al factor de crecimiento epidérmico (EGF). La cadena pesada se une a la cadena ligera mediante un enlace disulfuro entre los aminoácidos (por ejemplo, Cys132 y Cys302 en la SEQ ID NO: 134). La cadena pesada contiene un péptido de activación de 52 restos de aminoácidos en su extremo N (por ejemplo, los restos de aminoácidos Ser143 a Arg194 en la SEQ ID NO:134). La cadena pesada contiene también el dominio de la serina proteasa (por ejemplo, los restos Ile195 a Lys448 de SEQ ID NO: 134), que contiene el dominio de la serina proteasa que tiene una tríada catalítica

20 (por ejemplo, His²³⁶, Asp²⁸² y Ser³⁷⁹ en la SEQ ID NO:134, y que corresponde a His⁵⁷, Asp¹⁰² y Ser¹⁹⁵ mediante numeración de la quimotripsina). La forma zimógena generalmente es inactiva y puede convertirse en un polipéptido activo mediante escisión catalítica para eliminar el segmento del péptido de activación. Un zimógeno, por tanto, es una proteína enzimáticamente inactiva que se convierte en una enzima proteolítica por la acción de un activador.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, un péptido de activación se refiere a un segmento presente en el extremo N de la cadena pesada de FX que funciona para suprimir la actividad proteolítica enmascarando la maquinaria catalítica y evitando por tanto la formación del intermedio catalítico (es decir, ocluyendo conformacionalmente el sitio de unión al sustrato). Ilustrativo de un péptido de activación FX es el péptido de activación de 52 restos de aminoácidos en el extremo N de la cadena pesada del polipéptido de FX maduro que
- 35 corresponde a los restos de aminoácidos Ser143 a Arg194 en la SEQ ID NO:134.

Tal como se usa en el presente documento, un péptido de activación modificado se refiere a un péptido de activación que no es nativo al polipéptido de FX, por ejemplo, debido a la presencia de una o más diferencias de aminoácidos en comparación con el péptido de activación de un polipéptido de factor X sin modificar o polipéptido de factor X

40 nativo. La una o más diferencias de aminoácidos pueden ser mutaciones de aminoácidos tales como una o más sustituciones de aminoácidos (sustituciones), inserciones o deleciones, o pueden ser inserciones o deleciones, y cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, un péptido de activación modificado es uno que puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más diferencias de aminoácidos en comparación con el péptido de activación de un polipéptido de FX sin modificar o nativo (por ejemplo, en

45 comparación con la secuencia de restos de aminoácidos que se muestra como Ser143 a Arg194 en la SEQ ID NO:134). Ilustrativas de las modificaciones de aminoácidos están las modificaciones que dan como resultado un sitio de procesamiento de la proteasa que no está presente en el polipéptido de FX sin modificar o nativo (por ejemplo, natural). Por ejemplo, las modificaciones incluyen la sustitución de un polipéptido de FX nativo o natural con un péptido de activación heterólogo procedente de otra proteasa.

50 Tal como se usa en el presente documento, la referencia a un polipéptido de FX modificado que no contiene un péptido de activación modificado significa que el péptido de activación del polipéptido no difiere en comparación con el péptido de activación de un polipéptido de factor X sin modificar o un polipéptido de factor X nativo. Por ejemplo, en las realizaciones donde el polipéptido de FX modificado incluye un péptido de activación, este contiene un péptido

55 de activación nativo o natural. Por lo tanto, la referencia a un polipéptido de FX modificado en el presente documento que no contiene un péptido de activación modificado significa que las modificaciones (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos) en el anterior están en la cadena ligera del dominio de la proteasa de la cadena pesada solo, y normalmente solo en el dominio de la proteasa de la cadena pesada.

- 60 Tal como se usa en el presente documento, un FX activo (FXa) o FX activado se refiere a una forma bicatenaria de un polipéptido de FX, por lo cual la cadena pesada no contiene un péptido de activación en el extremo N. FXa está activado por escisión de la cadena pesada para eliminar el péptido de activación. Por lo tanto, FXa es un heterodímero que está compuesto por 2 cadenas unidas por un enlace disulfuro. Para FX humanos, la cadena ligera tiene un peso molecular de aproximadamente 16.000 daltons y está compuesta por la secuencia de aminoácidos 1-
- 65 139 de la SEQ ID NO:134, y la cadena pesada tiene un peso molecular de aproximadamente 38.000 daltons y está compuesta de los restos de aminoácidos Ile195 a Lys448 de la SEQ ID NO: 134 que constituyen el dominio de la

serina proteasa. La activación de FX se produce por la escisión del enlace Arg194-Ile195, que libera el péptido de activación. La activación se consigue mediante el complejo del factor Xasa extrínseco complejo del factor VIIa/TF) o el complejo del Factor Xasa intrínseco (complejo FIXa/FVIIIa). La activación requiere generalmente la presencia de fosfolípidos e iones calcio. La activación puede conseguirse también mediante el veneno de víbora de Russell (RVV-X). FXa presenta actividad catalítica, la unión de FVa, la unión de la heparina, la unión de la protrombina, la actividad protrombinasa y/o la actividad coagulante. Para los fines del presente documento, la referencia a FXa se refiere a cualquier forma bicatenaria de FX que carezca del péptido de activación y que sea capaz de presentar actividades de FXa tales como actividad catalítica, la unión de FVa, la unión de la heparina, la unión de la protrombina, la actividad protrombinasa y/o la actividad coagulante. Por lo tanto, la referencia a FXa incluye los polipéptidos de FXa análogos a zimógeno que, en presencia de concentraciones de saturación de FVa, presentan actividades FXa.

Tal como se usa en el presente documento, una "porción catalíticamente activa" de un polipéptido de FXa se refiere a un polipéptido de FXa activo que contiene una porción contigua de aminoácidos de la cadena pesada que incluye los restos de la tríada catalítica (por ejemplo, His²³⁶, Asp²⁸² y Ser³⁷⁹ en la SEQ ID NO:134, y que corresponde a His⁵⁷, Asp¹⁰² y Ser¹⁹⁵ mediante numeración de la quimotripsina), pero no incluye la secuencia completa de la cadena pesada que corresponde a los restos de aminoácidos Ile195 a Lys448 de la SEQ ID NO:134. La porción catalíticamente activa puede contener también toda o una porción de la cadena ligera de FXa. La porción catalíticamente activa de un polipéptido de FXa presenta al menos un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o más de la actividad, tal como al menos 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más de la actividad, en comparación con el FXa de longitud completa. Se entiende que la referencia en el presente documento a un FXa modificado o una porción catalíticamente activa del mismo significa que la porción catalíticamente activa contiene la(s) modificación(ones) (por ejemplo, la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s)).

Tal como se usa en el presente documento, el veneno de víbora de Russell (RVV-X) se refiere a una metaloproteasa venenosa de *Vipera russelli* (víbora de Russell) que activa específicamente el factor X (Takeya et al. (1992) J Biol. Chem., 267:14109-14117. RVV-X tiene un peso molecular de aproximadamente 79.000 daltons y contiene una cadena pesada y ligera unidas por disulfuro. RVV-X no requiere fosfolípidos para la activación del factor X, pero requiere Ca²⁺ exógeno y la presencia del dominio Gla del extremo amino para la activación potenciada. La actividad de RVV-X se inhibe en presencia de EDTA. Las preparaciones purificadas de la proteasa del veneno de serpiente se conocen y está disponibles (véase, por ejemplo, n.º de Catálogo RVVX-2010, Haematologic Technologies, Inc.; n.º de catálogo ab62233; Abcam, Cambridge, MA), y su secuencia conocida (véase, por ejemplo, Takeya et al. (1992) J Biol. Chem., 267:14109-14117 y Uniprot n.º Q7LZ61, Q4PRD1 y Q4PRD2).

Tal como se usa en el presente documento, una proteína o polipéptido "análogo a zimógeno" se refiere a una proteína que se ha activado mediante escisión proteolítica, pero en ausencia de cofactor presenta todavía propiedades que se asocian con un zimógeno, tal como, por ejemplo, con actividad baja o sin actividad, o una conformación o actividad resultante que se asemeja a la conformación o actividad resultante de la forma zimógena de la proteína. Por ejemplo, para los polipéptidos de FXa modificados proporcionados en el presente documento, cuando no se une al cofactor de FVa, la forma activada bicatenaria de FXa es una proteína análoga a zimógeno; presenta actividad muy baja. Tras la unión a FVa, la forma activada bicatenaria de FXa experimenta un cambio conformacional o un desplazamiento en el "equilibrio conformacional" y adquiere su actividad completa como un factor de coagulación.

Tal como se usa en el presente documento, "natural" o "nativo" con referencia a FX se refiere a un polipéptido de FX codificado por un gen FX que se produce de forma nativa o natural, incluyendo las variantes alélicas, que está presente en un organismo, incluyendo un ser humano y otros animales, en la naturaleza. Cuando se hace referencia a un polipéptido de FXa natural o nativo, se entiende que es la porción activa o catalíticamente activa del polipéptido de FXa. La referencia al factor X natural con referencia a una especie se pretende que abarque cualquier especie de un factor X natural. Incluidos entre los polipéptidos de FX naturales están los polipéptidos precursores codificados, los fragmentos de los mismos, y las formas procesadas de los mismos, tales como una forma madura que carece del péptido de señalización y del propéptido, así como cualquier forma procesada o modificada previa a la traducción o posterior a la traducción. Incluidos también entre los polipéptidos de FX nativos están aquellos que están modificados de forma posterior a la traducción, que incluyen, aunque no de forma limitativa, modificación mediante glicosilación, carboxilación e hidroxilación. Los polipéptidos de FX nativos incluyen también formas secretadas bicatenarias, incluyendo las formas zimógenas y activas, así como cualesquiera formas o isoformas procesadas de las mismas. Por ejemplo, los seres humanos expresan FX nativo. La secuencia de aminoácidos del FX humano natural se muestra en las SEQ ID NOS: 2, e incluye las formas maduras, zimógenas, activas y catalíticamente activas de las mismas como se describe en el presente documento, y las variantes alélicas que se muestran en las SEQ ID NOS: 547-552 y las formas maduras, zimógenas, activas y catalíticamente activas de las mismas. el gibón de mejillas blancas occidental (prepropéptido precursor que se muestra en las SEQ ID NOS: 393 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:404), el babuino verde oliva (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:394 y la forma madura de la SEQ ID NO: 405), el macaco (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 395 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:406), el mono tití oscuro (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 396 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:407), el elefante africano (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:397 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID

- NO:408), ratón (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 398 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:409), conejo (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 399 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:410), rata (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:400 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:411), perro (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:401 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:412), cerdo (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:402 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:413), y bovino (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:403 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:414).
- 5
- Tal como se usa en el presente documento, las variantes de especies se refieren a variantes en los polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo diferentes especies de mamíferos, tales como ratón y ser humano.
- 10
- Tal como se usa en el presente documento, las variantes alélicas se refieren a variaciones en las proteínas entre miembros de la misma especie.
- 15
- Tal como se usa en el presente documento, una variante de corte y empalme se refiere a una variante producida mediante procesamiento diferencial de un transcrito primario de ADN genómico que da como resultado más de un tipo de ARNm.
- 20
- Tal como se usa en el presente documento, Los restos correspondientes se refieren a los restos que se producen en loci alineados. Los polipéptidos relacionados o variantes se alinean mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia. Dichos métodos maximizan normalmente las correspondencias, e incluyen métodos tales como la utilización de alineaciones manuales y la utilización de numerosos programas de alineación disponibles (por ejemplo, BLASTP) y otros conocidos por los expertos en la materia. Alineando las secuencias de los polipéptidos de FX, una persona experta en la materia puede identificar los restos correspondientes, utilizando restos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. En general, la enumeración de que los aminoácidos de un polipéptido corresponden a los aminoácidos en una secuencia divulgada se refiere a los aminoácidos identificados tras la alineación del polipéptido con la secuencia divulgada para maximizar la identidad u homología (cuando los aminoácidos conservados se alinean) utilizando un algoritmo de alineación normalizado, tal como el algoritmo GAP.
- 25
- Por ejemplo, con referencia a las alineaciones que se muestran en la Figura 3, el resto de aminoácido His8 en la cadena ligera del FX humano maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 corresponde a Asn8 en la del babuino de mejillas blancas que se muestra en la SEQ ID NO:404. En otro ejemplo, Asp164 en la cadena pesada del FX humano maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134 corresponde a Asp161 en el FX de rata que se muestra en la SEQ ID NO: 411.
- 30
- 35
- Tal como se usa en el presente documento, el dominio (normalmente una secuencia de tres o más, generalmente 5 o 7 o más aminoácidos) se refiere a una porción de una molécula, tal como proteínas o los ácidos nucleicos codificantes, que es estructural y/o funcionalmente distinta de otras porciones de la molécula y es identificable. Por ejemplo, los dominios incluyen aquellas porciones de una cadena polipeptídica que pueden formar una estructura plegada de forma independiente en una proteína constituida por uno o más motivos estructurales y/o que se reconoce en virtud de una actividad funcional, tal como una actividad proteolítica. Una proteína puede tener uno, o más de uno, dominios distintos. Por ejemplo, un dominio puede identificarse, definirse o distinguirse mediante homología de la secuencia anterior con los miembros de la familia relacionada, tal como homología con los motivos que definen un dominio de la proteasa o un dominio gla. En otro ejemplo, un dominio puede distinguirse por su función, tal como por la actividad proteolítica, o una capacidad de interactuar con una biomolécula, tal como la unión del ADN, la unión del ligando, y la dimerización. un dominio puede presentar de forma independiente una función o actividad biológica de tal manera que el dominio, de forma independiente o fusionado con otra molécula puede llevar a cabo una actividad, tal como, por ejemplo, la actividad proteolítica o la unión al ligando. Un dominio puede ser una secuencia lineal de aminoácidos o una secuencia no lineal de aminoácidos. Muchos polipéptidos contienen una pluralidad de dominios. Dichos dominios se conocen, y se pueden identificar por los expertos en la materia. Para la ilustración del presente documento, se proporcionan definiciones, pero se entiende que está también comprendido en los conocimientos de los expertos en la materia reconocer los dominios concretos por el nombre. Si es necesario, se puede emplear un software adecuado para identificar los dominios.
- 40
- 45
- 50
- 55
- Tal como se usa en el presente documento, un dominio de la proteasa o un dominio catalíticamente activo es el dominio que confiere actividad catalítica. La referencia a un dominio de la proteasa de una proteasa incluye las formas monocatenarias, bicatenarias y multicatenarias de estas proteínas. Un dominio de la proteasa de una proteína contiene todas las propiedades necesarias de esta proteína requeridas para su actividad proteolítica, tales como por ejemplo, el centro catalítico. En referencia a FX, el dominio de la proteasa comparte homología y características estructurales con los dominios de las proteasas de la familia quimotripsina/tripsina, incluyendo la tríada catalítica. Por ejemplo, en el polipéptido de FX que se muestra en la SEQ ID NO:134, el dominio de la proteasa corresponde a las posiciones de aminoácidos Ile195 a Lys448 de la SEQ ID NO:134 e incluye los restos de la tríada catalítica (por ejemplo, His²³⁶, Asp²⁸² y Ser³⁷⁹ en la SEQ ID NO:134, y que corresponde a His⁵⁷, Asp¹⁰² y Ser¹⁹⁵ mediante numeración de la quimotripsina).
- 60
- 65
- Tal como se usa en el presente documento, un dominio de gamma-carboxiglutamato (Gla) se refiere a la porción de una proteína, por ejemplo, una proteína dependiente de la vitamina K, que contiene modificaciones posteriores a la

traducción de los restos de glutamato, generalmente la mayoría, pero no todos los restos de glutamato, mediante carboxilación dependiente de la vitamina K para formar Gla. El dominio Gla es responsable de la unión de alta afinidad de los iones calcio y de la unión a los fosfolípidos cargados negativamente. Típicamente, el dominio Gla comienza al final del extremo N de la forma madura de las proteínas dependientes de la vitamina K y los extremos con un resto aromático conservado. tras la escisión de las dos cadenas, el dominio Gla está en la cadena ligera. Con referencia a FX maduro, el dominio Gla corresponde a las posiciones de los aminoácidos 1 a 39 del polipéptido ilustrativo que se muestra en la SEQ ID NO: 134. Los dominios Gla de las diversas proteínas dependientes e la vitamina K comparten la secuencia, la homología estructural y funcional, incluyendo la agrupación de los restos hidrófobos del extremo N en una almohadilla hidrófoba que media la interacción con fosfolípidos cargados negativamente sobre la membrana de la superficie celular. Otros polipéptidos ilustrativos que contienen Gla incluyen, aunque no de forma limitativa, FIX, FVII, protrombina, proteína C, proteína S, osteocalcina, proteína Gla de la matriz, proteína 6 específica de la detención del crecimiento (Gas6), y proteína Z.

Tal como se usa en el presente documento, un dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (EGF-1 o EGF-2) se refiere a la porción de una proteína que comparte la homología de la secuencia con una porción específica de 30 a 40 aminoácidos de la secuencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El dominio EGF incluye seis restos de cisteína que se han mostrado (en EGF) que va a estar implicado en enlaces disulfuro. La estructura principal de un dominio EGF es una beta lámina bicatenaria seguida por un bucle a una lámina bicatenaria corta en el extremo C. FX contiene dos dominios EGF: EGF-1 y EGF-2. Estos dominios corresponden a las posiciones de aminoácidos 46-84, y 85-128, respectivamente, del polipéptido de FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134. Cuando se escinde en una forma bicatenaria, los dominios EGF están en la cadena ligera.

Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido sin modificar" o "FX sin modificar" y sus variaciones gramaticales se refiere a un polipéptido de partida que se selecciona para la modificación como se proporciona en el presente documento. El polipéptido de partida puede ser uno que se produce naturalmente, la forma natural de un polipéptido. Ilustrativo de un polipéptido de FX sin modificar es un FX humano que se muestra en la SEQ ID NO: 134, y sus formas zimógena o bicatenaria de FXa. Además, el polipéptido de partida puede estar alterado o mutado, de tal manera que difiere de la isoforma natural nativa pero en cualquier caso se cita en el presente documento como un polipéptido sin modificar de partida relativo a los polipéptidos modificados posteriormente producidos en el presente documento. Por lo tanto, existen proteínas conocidas en la materia que se han modificado para tener un aumento o disminución deseado en una actividad o propiedad concreta en comparación con una proteína de referencia sin modificar que se pueden seleccionar y usarse como el polipéptido de partida sin modificar. Por ejemplo, una proteína que se ha modificado a partir de su forma nativa mediante uno o más cambios de aminoácidos individuales y posee tanto un aumento como una disminución en la propiedad deseada, tal como un cambio en un resto o restos de aminoácidos para alterar la glicosilación, puede ser una proteína dirigida, citada en el presente documento como sin modificar, para una modificación adicional tanto de la misma como de una propiedad diferente.

Tal como se usa en el presente documento, "polipéptidos de Factor X modificados" y "factor X modificado" se refiere a polipéptidos de FX, que incluyen cualquier forma de los mismos tales como un zimógeno de FX o FXa, que tiene una o más diferencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido de factor X sin modificar. La una o más diferencias de aminoácidos pueden ser mutaciones de aminoácidos tales como una o más sustituciones de aminoácidos (sustituciones), inserciones o deleciones, o pueden ser inserciones o deleciones, y cualquier combinación de las mismas. Típicamente, un polipéptido de FX modificado tiene una o más modificaciones en la secuencia primaria en comparación con un polipéptido de FX sin modificar. Por ejemplo, un polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más diferencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido de FX sin modificar. Se contempla cualquier modificación siempre que el polipéptido resultante presente al menos una actividad de FX asociada con un polipéptido de FX nativo, tal como, por ejemplo, la actividad catalítica, la actividad proteolítica, la actividad protrombótica o la actividad de coagulación.

Tal como se usa en el presente documento, una "propiedad" de un polipéptido de FX se refiere a una propiedad física o estructural, tal como una estructura tridimensional, pl, semivida, conformación y otras de las mencionadas características físicas.

Tal como se usa en el presente documento, una "actividad" de un polipéptido de FX o "actividad de FX" o "actividad de FXa" se refiere a cualquier actividad presentada por la forma activa del Factor Xa del polipéptido. Dichas actividades pueden ensayarse *in vitro* y/o *in vivo* e incluyen, aunque no de forma limitativa, actividad de coagulación o coagulante, actividad procoagulante, actividad proteolítica o catalítica tal como una activación del efecto de la protrombina; antigenicidad (capacidad de unirse a o competir con un polipéptido para la unión a un anticuerpo dirigido contra FX); capacidad de unirse a FVa, protrombina, heparina y/o capacidad de unirse a fosfolípidos. Se puede evaluar la actividad *in vitro* o *in vivo* utilizando ensayos reconocidos, por ejemplo, midiendo la coagulación *in vitro* o *in vivo*. Los resultados de dichos ensayos indican que un polipéptido presenta una actividad que puede estar correlacionada con la actividad del polipéptido *in vivo*, en el que la actividad *in vivo* puede citarse como actividad biológica. Son conocidos por los expertos en la materia los ensayos para determinar la funcionalidad o actividad de las formas modificadas de FX. Los ensayos ilustrativos para evaluar la actividad de un polipéptido de FX incluyen el

ensayo del tiempo de la protromboplastina (PT) o el ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) para evaluar la actividad coagulante, o los ensayos cromógenos usando sustratos sintéticos, tales como los descritos en los Ejemplos, a continuación, para evaluar la actividad catalítica o proteolítica.

5 Tal como se usa en el presente documento, "presenta al menos una actividad" o "retiene al menos una actividad" se refiere a la actividad FX presentada por un polipéptido de FX modificado en comparación con un polipéptido de FX sin modificar de la misma forma y en las mismas condiciones. En general, la actividad es la actividad de la forma FXa del polipéptido, o de una porción catalíticamente activa del mismo. Por ejemplo, una actividad de un polipéptido de FXa modificado en forma bicatenaria se compara con un polipéptido de FXa sin modificar en forma bicatenaria,
 10 en las mismas condiciones experimentales, donde la única diferencia entre los dos polipéptidos es la modificación bajo estudio. Típicamente, un polipéptido de FX modificado que retiene o presenta al menos una actividad de un polipéptido de FX sin modificar de la misma forma retiene una cantidad suficiente de la actividad de tal manera que, cuando se administra *in vivo*, el polipéptido de FX modificado es terapéuticamente eficaz como una sustancia terapéutica procoagulante. Un polipéptido de FX modificado puede presentar actividad aumentada o disminuida en comparación con el polipéptido de FX sin modificar en la misma forma. En general, un polipéptido de FX modificado presenta una actividad si este presenta 0,5 % a 500 % de la actividad del polipéptido de FX sin modificar, tal como al menos, o aproximadamente al menos o 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más de la actividad de un polipéptido de FX sin modificar de la misma forma que presenta eficacia terapéutica como un procoagulante. La cantidad de actividad que se requiere para mantener la eficacia terapéutica como un procoagulante puede determinarse empíricamente, si fuera necesario. Típicamente, una retención de 0,5 % al 20 %, 0,5 % al 10 %, 0,5 % al 5 % de una actividad es suficiente para retener la eficacia terapéutica como un procoagulante *in vivo*. El nivel particular que se va a retener es una función del uso previsto del polipéptido y puede determinarse empíricamente. se puede medir la actividad, por ejemplo, usando ensayos *in vitro* o *in vivo* tales como los descritos en el presente documento o en los Ejemplos siguientes.

Tal como se usa en el presente documento, "actividad catalítica" o "actividad proteolítica" con referencia a FX se refiere a la capacidad de la forma FXa, o una porción catalíticamente activa de la mismas, de catalizar la escisión proteolítica de un sustrato. Se conocen en la técnica ensayos para evaluar dichas actividades. Los ensayos incluyen aquellos que controlan o evalúan la formación de intermedios estables de acil-enzima con sustrato, ensayos que evalúan la unión a inhibidores de FXa que se correlacionan con la actividad catalítica y ensayos que evalúan directamente la escisión de un sustrato FXa (por ejemplo, protrombina) o un sustrato sintético. Por ejemplo, se puede medir la actividad proteolítica de FX usando sustratos cromógenos o fluorógenos tales como fluoresceína-mono-*p'*-guanidinobenzoato (FMGB) o Espectrozima FXa (Acetato de metoxicarbonil-D-ciclohexilglicil-gilcil-arginina-para-nitroanilida), usando un inhibidor reversible de unión estrecha tal como ecotina, o usando la protrombina del sustrato FXa. La evaluación de la actividad catalítica puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, se puede evaluar la actividad catalítica controlando la escisión de las actividades posteriores de un sustrato FXa como se ilustra en el Ejemplo 4 en el presente documento, por lo cual, se controla la actividad de la trombina activada por su sustrato sintético Pefalfluor TH (H-D-CHA-Ala-Arg-AMC. Se representan gráficamente los ensayos ilustrativos en los Ejemplos. Se pueden llevar a cabo ensayos para evaluar la actividad catalítica en presencia o ausencia de FVa y también en presencia o ausencia de fosfolípidos o Ca²⁺. Se puede representar la actividad catalítica como la eficacia catalítica o kcat/km, que es una medida de la eficacia con la que una proteasa escinde un sustrato y se mide en condiciones en estado estacionario como es bien conocido por los expertos en la materia.

45 Tal como se usa en el presente documento, "actividad de coagulación" o "actividad coagulante" o "actividad procoagulante" se refiere a la capacidad de un polipéptido de efectuar la coagulación. Los expertos en la materia conocen los ensayos para evaluar la actividad coagulante, e incluyen el ensayo del tiempo de la protromboplastina (PT) o el ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT).

50 Tal como se usa en el presente documento, la actividad de la protrombinasa se refiere a una actividad catalítica específica de la protrombina del sustrato y es la actividad para convertir la protrombina (Factor II) en trombina (Factor IIa). Se puede evaluar la actividad directamente, por ejemplo, por el análisis de proteínas de los productos resueltos mediante SDS-PAGE de las reacciones de escisión. Se puede evaluar también la actividad usando sustratos sintéticos por los cual los restos liberados cromógena o fluorogénicamente se controlan tras la escisión. Se puede evaluar también la actividad indirectamente controlando la actividad de la trombina por su sustrato o un sustrato sintético (por ejemplo, Pefalfluor TH (H-D-CHA-Ala-Arg-AMC). Se pueden llevar a cabo ensayos para evaluar la actividad protrombinasa en presencia o ausencia de FVa y también en presencia o ausencia de fosfolípidos o Ca²⁺.

60 Tal como se usa en el presente documento, "inhibidores de la coagulación" se refiere a proteínas o moléculas que actúan para inhibir o evitar la coagulación o la formación del coágulo. La inhibición o prevención de la coagulación puede observarse *in vivo* o *in vitro*, y puede evaluarse usando cualquier método conocido en la técnica incluyendo, aunque no de forma limitativa, el ensayo del tiempo de tromboplastina (PT) o el ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT).

65 Tal como se usa en el presente documento, la antitrombina III (AT o AT-III) es un inhibidor de la serina proteasa

(serpina). AT-III se sintetiza como una proteína precursora que contiene 464 restos de aminoácidos (SEQ ID NO:553) que se escinde durante la secreción para liberar una antitrombina madura de 432 aminoácidos (SEQ ID NO:554).

5 Tal como se usa en el presente documento, "efecto inhibidor de AT-III" o "inhibición mediante AT-III" se refiere a la capacidad de la antitrombina III (AT o AT-III) de inhibir la actividad catalítica o coagulante de la forma FXa de un polipéptido de FX, o de una forma catalíticamente activa o análoga a zimógeno del mismo. Se puede evaluar la inhibición por AT-III evaluando la unión de un polipéptido de FX o un polipéptido de FX modificado al inhibidor. Se conocen en la técnica los ensayos para determinar la unión de un polipéptido a un inhibidor. Además, la resonancia de plasmón superficial, tal como en un instrumento biosensor BIAcore, se puede usar también para medir la unión de los polipéptidos de FX a AT-III u otros inhibidores. Sin embargo, para los inhibidores covalentes tales como AT-III, solo se puede medir la constante de asociación usando BIAcore. Se puede evaluar también la actividad inhibidora evaluando la actividad catalítica o la actividad coagulante de FXa en presencia de AT-III. Para los inhibidores covalentes, tales como, por ejemplo, AT-III, se puede medir también una constante de velocidad de segundo orden para la inhibición. Por ejemplo, se puede evaluar también la inhibición por AT-III determinando la constante de velocidad de segundo orden (k_{app}) para la inhibición de FXa. Las reacciones de inhibición se llevan a cabo generalmente en presencia de heparina, que se requiere para la actividad completa de AT-III. Por ejemplo, generalmente AT-III presenta un efecto inhibidor si su $K_{0.5}$ (es decir, la concentración molar de AT-III que se requiere para la inhibición del 50 % de la actividad catalítica de FXa) es menor de 80 nM, y generalmente menor de 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o menos. Por ejemplo, AT-III presenta una $K_{0.5}$ de aproximadamente 2 nM para FXa en plasma y FXa natural. En otro ejemplo, AT-III presenta un efecto inhibidor si la k_{app} ($M^{-1}s^{-1}$) es mayor de $1,0 \times 10^6$, y generalmente mayor de $2,0 \times 10^6$, $3,0 \times 10^6$, $4,0 \times 10^6$, $5,0 \times 10^6$, $6,0 \times 10^6$, $7,0 \times 10^6$, $8,0 \times 10^6$, $9,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $2,0 \times 10^7$, o más. Por ejemplo, AT-III presenta una k_{app} de aproximadamente $1,4 \times 10^7$ y $9,7 \times 10^6$ para FXa en plasma y FXa natural, respectivamente.

25 Tal como se usa en el presente documento, un aumento de la resistencia a los inhibidores, tal como un "aumento de la resistencia a AT-III" o un "aumento de la resistencia a TFPI", se refiere a cualquier cantidad de sensibilidad disminuida de un polipéptido a los efectos inhibidores de un inhibidor, tales como AT-III, TFPI u otro inhibidor, en comparación con un polipéptido de referencia, tal como un polipéptido de FX sin modificar. Se pueden llevar a cabo ensayos para determinar el efecto inhibidor de un inhibidor, por ejemplo, AT-III o TFPI, en un polipéptido de FX modificado en presencia del inhibidor (por ejemplo, AT-III o TFPI) y la actividad inhibidora en comparación con el efecto inhibidor del mismo inhibidor (por ejemplo, AT-III o TFPI) en una referencia o polipéptido de FX sin modificar. Por ejemplo, la capacidad de un polipéptido de FX modificado para escindir su protrombina del sustrato en presencia o ausencia de AT-III se puede medir, y el grado al cual AT-III inhibe la reacción determinada. Esto se puede comparar con la capacidad de un polipéptido de FX sin modificar de escindir la protrombina en presencia o ausencia de AT-III. Se pueden llevar a cabo ensayos similares con TFPI. Un polipéptido modificado que presenta resistencia aumentada a un inhibidor presenta, por ejemplo, un aumento del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más resistencia a los efectos de un inhibidor en comparación con un polipéptido sin modificar. Se puede determinar la resistencia a la inhibición como una relación de la actividad inhibidora del polipéptido de FX modificado al polipéptido de FX sin modificar. Por ejemplo, se puede determinar la $K_{0.5}$ y una representación de la extensión de la resistencia al inhibidor (por ejemplo, resistencia a AT-III o resistencia a TFPI) del polipéptido de FX modificado en comparación con el FXa natural expresado como una relación de sus valores $K_{0.5}$ ($K_{0.5}$ variante/ $K_{0.5}$ natural). Una relación de más de 1,0 significa que el polipéptido de FX modificado presenta una resistencia aumentada al inhibidor (por ejemplo AT-III o TFPI). En otro ejemplo, se puede determinar la k_{app} y una representación de la extensión de la resistencia al inhibidor (por ejemplo, resistencia a AT-III o resistencia a TFPI) del polipéptido de FX modificado en comparación con el FXa natural expresado como una relación de sus valores k_{app} (k_{app} natural/ k_{app} variante). Una relación de más de 1,0 significa que el polipéptido de FX modificado presenta una resistencia aumentada a un inhibidor, tal como AT-III y/o TFPI.

50 Tal como se usa en el presente documento, los cofactores se refieren a las proteínas o moléculas que se unen a otras proteínas o moléculas específicas para formar un complejo activo. En algunos ejemplos, se requiere la unión a un cofactor para la actividad proteolítica óptima. Por ejemplo, el factor Va (FVa) es un cofactor de FXa. La unión de FXa o las formas análogas a zimógeno de FXa a FVa induce cambios conformacionales que dan como resultado una actividad proteolítica aumentada de FXa por sus sustratos.

60 Tal como se usa en el presente documento, El Factor Va (FVa) se refiere a un factor de coagulación no enzimáticamente activo que funciona como un cofactor de FXa. El Factor V es un polipéptido monocatenario que se activa por trombina sobre la superficie de las plaquetas activadas para dar como resultado FVa, que es un polipéptido bicatenario unido no covalentemente entre sí por calcio. FVa se une a FXa para formar el complejo de la protrombina, que en presencia de fosfolípidos y Ca^{2+} , convierte la protrombina en trombina. *In vivo*, esto se produce generalmente sobre la superficie de la célula. FVa es un cofactor de FXa debido a que la actividad de FXa para activar la trombina está muy aumentada en presencia de FVa.

65 Tal como se usa en el presente documento, "actividad independiente de FVa" se refiere a la actividad de FXa en ausencia de FVa.

Tal como se usa en el presente documento, "actividad dependiente de FVa" se refiere a la actividad de FXa en presencia de FVa.

5 Tal como se usa en el presente documento, "dependencia del cofactor" o "dependencia relativa del cofactor" se refiere a la mayor actividad de FXa que se produce en presencia de FVa en comparación con su ausencia, y puede representarse gráficamente como una relación de la actividad dependiente de FVa a la actividad independiente de FVa. En general, FXa presenta una actividad significativamente mayor en presencia de cofactor que en su ausencia, de tal manera que su actividad completa es dependiente de la presencia de cofactor. Por ejemplo, la asociación de FXa activo con su cofactor activado, FVa, da como resultado más de 2.000 veces de aumento en la actividad (por ejemplo, la actividad catalítica) en comparación con la ausencia de cofactor.

15 Tal como se usa en el presente documento, el aumento de la dependencia del cofactor se refiere a cualquier cantidad de aumento de dependencia del cofactor de un polipéptido de FX modificado en comparación con un polipéptido de referencia, tal como un polipéptido de FX sin modificar. Un polipéptido modificado que presenta un aumento de dependencia del cofactor presenta, por ejemplo, un aumento del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más de aumento de la dependencia sobre el cofactor en comparación con un polipéptido sin modificar. Se puede determinar el aumento en la dependencia del cofactor como una relación de la dependencia del cofactor (actividad dependiente de FVa/actividad independiente de FVa) del polipéptido de FX modificado a un polipéptido de FX de referencia o sin modificar que no contiene la(s) modificación(ones). Por ejemplo, un polipéptido de FX modificado presenta un aumento en la dependencia del cofactor si presenta al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces o más aumento en la dependencia del cofactor en comparación con el polipéptido de FX sin modificar.

30 Tal como se usa en el presente documento, un sitio de glicosilación se refiere a una posición amino en un polipéptido a la cual se puede unir un resto de hidrato de carbono. Típicamente, una proteína glicosilada contiene uno o más restos de aminoácidos, tales como asparagina o serina, para la unión de los restos de hidratos de carbono.

35 Tal como se usa en el presente documento, un sitio de glicosilación nativo se refiere a una posición amino a la cual un resto de hidrato de carbono se une en un polipéptido natural. Existen cuatro sitios de glicosilación nativos en FX: dos sitios de glicosilación unidos a O y dos sitios de glicosilación unidos a N que corresponden a los restos Thr159, Thr171, Asn181 y Asn191 con referencia a la SEQ ID NO:134.

40 Tal como se usa en el presente documento, un sitio de glicosilación no nativo se refiere a una posición amino a la cual el resto de hidrato de carbono se une en un polipéptido modificado que no está presente en un polipéptido natural. Se pueden introducir sitios de glicosilación no nativos en un polipéptido de FX mediante sustitución de aminoácidos. Se pueden crear sitios de glicosilación en O, por ejemplo, mediante sustitución del aminoácido de un resto nativo con una serina o treonina. Se pueden crear sitios de glicosilación en N, por ejemplo, estableciendo el motivo Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, donde Xaa no es prolina. La creación de esta secuencia consenso por la modificación del aminoácido puede implicar, por ejemplo, una única sustitución de aminoácido de un resto de aminoácido nativo con una asparagina, una única sustitución de aminoácido de un resto de aminoácido nativo con una serina, treonina o cisteína, o una doble sustitución de aminoácidos que implica una primera sustitución de aminoácido de un resto nativo con una asparagina y una segunda sustitución de aminoácido de un resto nativo con una serina, treonina o cisteína.

50 Tal como se usa en el presente documento, "nivel de glicosilación" se refiere al número de sitios de glicosilación capaces de ocuparse por un glicano, por ejemplo, tras la expresión en una célula hospedadora capaz de glicosilación.

55 Tal como se usa en el presente documento, el aumento con referencia al nivel de glicosilación significa que existe un mayor número de sitios de glicosilación capaces de ocuparse por un glicano con referencia a un polipéptido de FX sin modificar o natural. Un polipéptido modificado que presenta un aumento en el nivel de glicosilación puede estar hiperglicosilado se existe un mayor número de sitios de glicosilación ocupados por un glicano en comparación con el polipéptido de FX sin modificar o natural.

60 Tal como se usa en el presente documento, "actividad biológica" se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o a las respuestas fisiológicas que se dan como resultado tras la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por tanto, abarca los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de dichos compuestos, composiciones y mezclas. Se pueden observar actividades biológicas en sistemas *in vitro* diseñados para ensayar o usar dichas actividades. Por lo tanto, para los fines en el presente documento, una actividad biológica de un polipéptido de FX abarca la actividad coagulante.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término "evaluar", y sus variaciones gramaticales, se pretende que

incluya la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto de la actividad de un polipéptido, y también de obtener un índice, relación, porcentaje, visual u otro valor indicativo del nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la detección de la escisión de un sustrato por un polipéptido puede ser una medición directa del producto, o puede medirse de forma indirecta determinando la actividad resultante del sustrato escindido.

Tal como se usa en el presente documento, "numeración madura" o "numeración convencional" se refiere a la numeración de los restos en un orden basado en el polipéptido de FX maduro. Para los fines del presente documento, la numeración madura se basa en la numeración de los restos de FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134.

Tal como se usa en el presente documento, "numeración de la quimotripsina" se refiere a la numeración de los restos de aminoácidos basada en la numeración del polipéptido de quimotripsina maduro de la SEQ ID NO:556. Alineación de un dominio de la proteasa de otra serina proteasa, tal como, por ejemplo, el dominio de la proteasa del factor X, se realiza con quimotripsina basándose en los modelos de correspondencia de secuencias derivados de la modelización tridimensional y del solapamiento de estructuras de serina proteasas comunes (véase por ejemplo Greer, J., Proteins Struct. Funct. Genet. 7 (1990) 317-334). En dicho caso, los aminoácidos del factor X que corresponden a los aminoácidos de la quimotripsina están proporcionando la numeración de los aminoácidos de la quimotripsina. En la Tabla 1 se proporcionan los números de la quimotripsina correspondientes de las posiciones de aminoácidos 195 a 448, que corresponden al dominio de la proteasa de la cadena pesada del polipéptido de FX que se muestra en la SEQ ID NO:134. Las posiciones de aminoácidos relativas a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO:134 están en fuente normal, los restos de aminoácidos en aquellas posiciones están en negrita, y los números de la quimotripsina correspondientes están en cursiva. Por ejemplo, tras la alineación del factor FX maduro (SEQ ID NO:134) con la quimotripsina madura (SEQ ID NO:556), la isoleucina (I) en la posición de aminoácido 195 en el factor X está proporcionando la numeración de la quimotripsina de I16. Los aminoácidos posteriores se numeran de acuerdo con ello. Cuando un resto existe en una proteasa, pero no está presente en la quimotripsina, el resto de aminoácido se proporciona con una notación con letra (por ejemplo, el resto 330 en la numeración madura es el resto 146A en la numeración de la quimotripsina).

Tabla 1. Numeración de la quimotripsina del Factor X

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 |
| I | V | G | G | Q | E | C | K | D | G | E | C | P | W | Q |
| <i>16</i> | <i>17</i> | <i>18</i> | <i>19</i> | <i>20</i> | <i>21</i> | <i>22</i> | <i>23</i> | <i>24</i> | <i>25</i> | <i>26</i> | <i>27</i> | <i>28</i> | <i>29</i> | <i>30</i> |
| 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 |
| A | L | L | I | N | E | E | N | E | G | F | C | G | G | T |
| <i>31</i> | <i>32</i> | <i>33</i> | <i>34</i> | <i>35</i> | <i>36</i> | <i>37</i> | <i>38</i> | <i>39</i> | <i>40</i> | <i>41</i> | <i>42</i> | <i>43</i> | <i>44</i> | <i>45</i> |
| 225 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 |
| I | L | S | E | F | Y | I | L | T | A | A | H | C | L | Y |
| <i>46</i> | <i>47</i> | <i>48</i> | <i>49</i> | <i>50</i> | <i>51</i> | <i>52</i> | <i>53</i> | <i>54</i> | <i>55</i> | <i>56</i> | <i>57</i> | <i>58</i> | <i>59</i> | <i>60</i> |
| 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 254 |
| Q | A | K | R | F | K | V | R | V | G | D | R | N | T | E |
| <i>61</i> | <i>61A</i> | <i>62</i> | <i>63</i> | <i>64</i> | <i>65</i> | <i>66</i> | <i>67</i> | <i>68</i> | <i>69</i> | <i>70</i> | <i>71</i> | <i>72</i> | <i>73</i> | <i>73A</i> |
| 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 |
| Q | E | E | G | G | E | A | V | H | E | V | E | V | V | I |
| <i>74</i> | <i>75</i> | <i>77</i> | <i>78</i> | <i>79</i> | <i>80</i> | <i>81</i> | <i>82</i> | <i>83</i> | <i>84</i> | <i>85</i> | <i>86</i> | <i>87</i> | <i>88</i> | <i>89</i> |
| 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 |

ES 2 704 083 T3

| | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| K | H | N | R | F | T | K | E | T | Y | D | F | D | I | A |
| 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 |
| V | L | R | L | K | T | P | I | T | F | R | M | N | V | A |
| 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 300 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 |
| P | A | C | L | P | E | R | D | W | A | E | S | T | L | M |
| 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 124A | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 129A | 130 | 131 | 132 |
| 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 | 326 | 327 | 328 | 329 |
| T | Q | K | T | G | I | V | S | G | F | G | R | T | H | E |
| 133 | 133A | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 |
| K | G | R | Q | S | T | R | L | K | M | L | E | V | P | Y |
| 146A | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 |
| V | D | R | N | S | C | K | L | S | S | S | F | I | I | T |
| 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 |
| Q | N | M | F | C | A | G | Y | D | T | K | Q | E | D | A |
| 178A | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 185A | 185B | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 375 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 |
| C | Q | G | D | S | G | G | P | H | V | T | R | F | K | D |
| 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 | 401 | 402 | 403 | 404 |
| T | Y | F | V | T | G | I | V | S | W | G | E | G | C | A |
| 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 220 | 221 |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 |
| R | K | G | K | Y | G | I | Y | T | K | V | T | A | F | L |
| 222 | 223 | 223A | 224 | 225 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 | 426 | 427 | 428 | 429 | 430 | 431 | 432 | 433 | 434 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| K | W | I | D | R | S | M | K | T | R | G | L | P | K | A |
| 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 |
| 435 | 436 | 437 | 438 | 439 | 440 | 441 | 442 | 443 | 444 | 445 | 446 | 447 | 448 | |
| K | S | H | A | P | E | V | I | T | S | S | P | L | K | |
| 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | |

- Tal como se usa en el presente documento, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y sus análogos, incluyendo ácidos nucleicos peptídicos (ANP) y sus mezclas. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Cuando se refieren a sondas o cebadores, que están opcionalmente marcados, tales como con una marca detectable, tal como una marca fluorescente o una radiomarca, se contemplan moléculas monocatenarias. Dichas moléculas son normalmente de una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de un número bajo de copias (normalmente menos de 5, generalmente menos de 3) para el sondeo o el cebado de una biblioteca. Generalmente una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria a o idénticos a un gen de interés. Las sondas y cebadores pueden 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de longitud.
- 5 Tal como se usa en el presente documento, un péptido se refiere a un polipéptido que tiene de 2 a 40 aminoácidos de longitud.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, los aminoácidos que se producen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento se identifican de acuerdo con sus tres letras o abreviaturas de una letra conocidas (Tabla 2). Los nucleótidos que se producen en los diversos fragmentos de ácidos nucleico se designan con las designaciones de letra única convencionales utilizadas de forma rutinaria en la técnica.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, un "aminoácido" es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo de ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para los fines del presente documento, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos de origen natural, los aminoácidos no naturales y los análogos de aminoácidos (es decir, los aminoácidos en los que el carbono α tiene una cadena secundaria).
- 25 En el mantenimiento de la nomenclatura polipeptídica convencional descrita en J. Biol. Chem., 243: 3557-3559 (1968), y adoptada en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, las abreviaturas para los restos de aminoácidos se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2 - Tabla de Correspondencias

| SÍMBOLO | | AMINOÁCIDO |
|-------------------|-------------------|--------------|
| Código de 1 letra | Código de 3 letra | |
| Y | Tyr | Tirosina |
| G | Gly | Glicina |
| F | Phe | Fenilalanina |
| M | Met | Metionina |
| A | Ala | Alanina |
| S | Ser | Serina |
| I | Ile | Isoleucina |
| L | Leu | Leucina |
| T | Thr | Treonina |
| V | Val | Valina |
| P | Pro | prolina |
| K | Lys | Lisina |
| H | His | Histidina |

| SÍMBOLO | | |
|-------------------|-------------------|--------------------|
| Código de 1 letra | Código de 3 letra | AMINOÁCIDO |
| Q | Gln | Glutamina |
| E | Glu | Ácido glutámico |
| Z | Glx | Glu y/o Gln |
| W | Trp | Triptófano |
| R | Arg | Arginina |
| D | Asp | Ácido aspártico |
| N | Asn | Asparaginas |
| B | Asx | Asn y/o Asp |
| C | Cys | Cisteína |
| X | Xaa | Desconocido u otro |

- Debe señalarse que todas las secuencias de restos de aminoácidos representadas en el presente documento por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxilo. Además, la frase "resto de aminoácido" se define ampliamente para incluir los aminoácidos relacionados en la Tabla de Correspondencias (Tabla 2) y los aminoácidos modificados e inusuales, tales como los citados en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822. Además, debe señalarse que una línea al comienzo o al final de una secuencia de resto de aminoácido indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más restos de aminoácidos, en un grupo del extremo amino tal como NH₂ o un grupo del extremo carboxilo tal como COOH.
- 5 Tal como se usa en el presente documento, un "aminoácido hidrófobo" incluye uno cualquiera de los aminoácidos determinados para ser hidrófobos usando la escala consenso de hidrofobicidad de Eisenberg. Ilustrativos son los aminoácidos hidrófobos que se producen naturalmente, tales como isoleucina, fenilalanina, valina, leucina, triptófano, metionina, alanina, glicina, cisteína y tirosina (Eisenberg et al., (1982) Faraday Symp. Chem. Soc. 17:109-120). Se incluyen también los aminoácidos hidrófobos que no se producen naturalmente.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, un "aminoácido ácido" incluye entre los aminoácidos de origen natural restos de ácido aspártico y ácido glutámico. Se incluyen también los aminoácidos ácidos que no se producen naturalmente.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, un "aminoácido polar" se refiere a un aminoácido que es hidrófilo, de tal manera que las cadenas secundarias prefieren residir en un entorno acuoso (es decir, agua). Dichos aminoácidos se localizan generalmente sobre la superficie de una proteína. Dichos aminoácidos se clasifican generalmente si incluyen aquellos con cadenas secundarias polares que tienen un grupo funcional tal como un ácido, amida, alcohol o amina que contiene átomos de oxígeno o nitrógeno que pueden participar en el enlace de hidrógeno con agua. Ilustrativos de dichos aminoácidos son la Arg (R), Asn (N), Asp (D), Glu (E), Gln (Q), His (H), Lys (K), Ser (S), Thr (T), y Tyr (Y). Cys (C) y Trp (W) se consideran también por ser débilmente polares.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, un aminoácido polar y neutro es un aminoácido polar que contiene una cadena secundaria neutra. Ilustrativos de dichos restos de aminoácidos para la sustitución son Asn (N), Gln (Q), Ser (S), Thr (T), Cys (C) o Tyr (Y).
- 25 Tal como se usa en el presente documento, "aminoácidos de origen natural" se refieren a los 20 L-aminoácidos que se producen en los polipéptidos.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo de ácido carboxílico que no es uno de los aminoácidos de origen natural relacionados en la Tabla 2. Los aminoácidos de origen no natural incluyen por tanto, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos de origen natural e incluyen, aunque no de forma limitativa, los D-isoestereómeros de los aminoácidos. Los expertos en la materia conocen los aminoácidos no naturales ilustrativos y pueden incluirse en un polipéptido de factor VII modificado.
- 35 Tal como se usa en el presente documento, los expertos en esta materia conocen las sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas y se pueden realizar generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos únicas en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo,
- 40
- 45

Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4ª Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., pág. 224). Dichas sustituciones pueden realizarse de acuerdo con aquellas que se muestran en la TABLA 3 del siguiente modo:

TABLA 3

| Resto original | Sustitución conservativa ilustrativa |
|----------------|--------------------------------------|
| Ala (A) | Gly; Ser |
| Arg (R) | Lys |
| Asn (N) | Gln; His |
| Cys (C) | Ser |
| Gln (Q) | Asn |
| Glu (E) | Asp |
| Gly (G) | Ala; Pro |
| His (H) | Asn; Gln |
| Ile (I) | Leu; Val |
| Leu (L) | Ile; Val |
| Lys (K) | Arg; Gln; Glu |
| Met (M) | Leu; Tyr; Ile |
| Phe (F) | Met; Leu; Tyr |
| Ser (S) | Thr |
| Thr (T) | Ser |
| Trp (W) | Tyr |
| Tyr (Y) | Trp; Phe |
| Val (V) | Ile; Leu |

5 Son también permisibles otras sustituciones y se pueden determinar empíricamente o de acuerdo con sustituciones conservativas conocidas.

10 Tal como se usa en el presente documento, una construcción de ADN es una molécula de ADN lineal o circular monocatenaria o bicatenaria que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera que no se encuentra en la naturaleza. Las construcciones de ADN existen como resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

15 Tal como se usa en el presente documento, un segmento de ADN es una porción de una molécula de ADN más grande que tiene atributos especificados. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido especificado es una porción de una molécula de ADN más grande, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, que, cuando se lee desde la dirección 5' a 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificados.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término polinucleótido significa un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o bases de ribonucleótidos que se leen desde el extremo 5' a 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar a partir de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro*, o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se proporciona en el presente documento en términos de nucleótidos (abreviado "nt") o pares de bases (abreviado "pb"). el término nucleótidos se usa para moléculas monocatenarias y bicatenaria cuando el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, se usa para denotar la longitud global y se entenderá que es equivalente al término pares de bases. Los expertos en la técnica reconocerán que dos hebras de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en la longitud y que los extremos de las mismas se pueden escalonar; por tanto, todos los nucleótidos en una molécula de polinucleótido bicatenaria pueden no estar emparejados. Dichos extremos sin emparejar no excederán en general de 20 nucleótidos de longitud.

30 Tal como se usa en el presente documento, "secuencia primaria" se refiere a la secuencia de restos de aminoácidos en un polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la

capacidad de relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud puede estar basada en el grado de identidad y/o la homología de las secuencias de los restos y los restos contenidos en las anteriores. Los expertos en la materia conocen los métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, en un método para evaluar la similitud de la secuencia, dos aminoácidos o secuencias de nucleótidos se alinean de una manera que da como resultado un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "Identidad" se refiere a la extensión en la cual las secuencias de aminoácidos o nucleótidos son invariantes. La alineación de las secuencias de aminoácidos, y, en alguna extensión las secuencias de nucleótidos, puede también tener en cuenta las diferencias conservativas y/o las sustituciones frecuentes en los aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservativas son aquellas que preservan las propiedades fisicoquímicas de los restos implicados. Las alineaciones pueden ser globales (alineación de las secuencias comparadas sobre la longitud completa de las secuencias y que incluye todos los restos) o local (la alineación de una porción de las secuencias que incluye solo la región o regiones más similar o similares).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "homología" e "identidad" se utilizan indistintamente, pero la homología de las proteínas puede incluir cambios de aminoácidos conservativos. En general, para identificar las posiciones que corresponden, las secuencias de aminoácidos se alinean de tal manera que se obtiene la correspondencia de orden mayor (véase, por ejemplo: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Parte I*, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carillo et al. (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073).

Tal como se usa en el presente documento, "identidad de la secuencia" se refiere al número de aminoácidos idénticos (o bases de nucleótidos) en una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de ensayo y uno de referencia. polipéptidos homólogos se refiere a un número predeterminado de restos de aminoácidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones conservativas de aminoácidos así como restos idénticos. Se puede determinar la identidad de la secuencia mediante programas de algoritmos de alineación normalizados utilizados con penalizaciones por defecto establecidas por cada suministrador. Las moléculas de ácidos nucleicos homólogos se refieren a un número predeterminado de nucleótidos idénticos u homólogos. La homología incluye sustituciones de tal manera que no cambien los aminoácidos codificados (es decir, "sustituciones silenciosas" así como restos idénticos. Las moléculas de ácidos nucleicos sustancialmente homólogas se hibridan todas normalmente con una restricción moderada o una restricción alta en toda la longitud del ácido nucleico o a lo largo de aproximadamente 70 %, 80 % o 90 % de la molécula de ácido nucleico de longitud completa de interés. Se contemplan también moléculas de ácidos nucleicos que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula de ácido nucleico que se hibrida. (Para la determinación de la homología de las proteínas, se pueden alinear los aminoácidos conservativos así como los aminoácidos idénticos; en este caso, el porcentaje de identidad y el porcentaje de homología varía). Si cualquiera de las dos moléculas de ácido nucleico tienen secuencias de nucleótidos (o cualquiera de dos polipéptidos tienen secuencias de aminoácidos) se puede determinar que son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % "idénticas" utilizando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa "FAST A", utilizando, por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:(1988) 2444 (otros programas incluyen el paquete informático GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., et al., *J. Molec. Biol.* 215:403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994), y Carillo et al. *SIAM J Applied Math* 48: 1073 (1988)). Por ejemplo, se puede usar la función BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information para determinar la identidad. Otros programas comercial o públicamente disponibles incluyen el programa DNASTar "MegAlign" (Madison, Wis.) y el programa "Gap" del grupo de genética informatizada de la Universidad de Wisconsin (UWG) (Madison Wis.). Se puede determinar el porcentaje de homología o identidad de las moléculas de proteínas y/o ácidos nucleicos, por ejemplo, comparando la información de la secuencia usando un programa informático GAP (por ejemplo, Needleman et al. *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), como se revisó por Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)). En resumen, un programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, dividido por el número total de símbolos en la parte más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para las identidades y 0 para las no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov et al. *Nucl. Acids Res.* 14: 6745 (1986), como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para los huecos de los extremos.

Por lo tanto, como se utiliza en el presente documento, el término "identidad" representa una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de ensayo y un polipéptido o polinucleótido de referencia. En un ejemplo no limitante, "al menos un 90 % idéntico a" se refiere al porcentaje de identidades entre 90 a 100 % con respecto a los polipéptidos de referencia. La identidad a un nivel del 90 % o más es indicativa del hecho que, suponiendo objetivos ilustrativos se compara la longitud de 100 aminoácidos de un polinucleótido de ensayo y un polinucleótido de referencia, no más de un 10 % (i.e., 10 de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de ensayo difieren de los de los polipéptidos de referencia. Se pueden realizar comparaciones similares entre unos polinucleótidos de ensayo y referencia. Se

pueden representar dichas diferencias como mutaciones puntuales distribuidas aleatoriamente sobre la longitud completa de una secuencia de aminoácidos o se pueden agrupar en una o más localizaciones de longitud variable hasta el máximo permitido, por ejemplo, una diferencia de 10/100 aminoácidos (aproximadamente una identidad del 90 %). Se definen las diferencias como sustituciones, inserciones o deleciones de ácidos nucleicos o aminoácidos.

5 Al nivel de homologías o identidades por encima de aproximadamente 85-90 %, El resultado debe ser independiente de la configuración de los parámetros del programa y los parámetros de huecos; se pueden evaluar fácilmente los mencionados niveles de identidad, a menudo sin basarse en el software.

10 Tal como se usa en el presente documento, Se entiende también que las expresiones "sustancialmente idéntico" o "similar" varían con el contexto como se entiende por los expertos en la técnica relevante, pero que los expertos pueden evaluar como tales.

15 Tal como se usa en el presente documento, una secuencia alineada se refiere al uso de la homología (similitud y/o identidad) para alinear las posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Típicamente, dos o más secuencias que están relacionadas en un 50 % o más de identidad están alineada. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que están alineadas en las posiciones correspondientes y pueden incluir la alineación de las secuencias derivadas de los ARN, tales como los EST y otros ADNc, alineado con la secuencia de ADN genómico.

20 Tal como se usa en el presente documento, "se hibrida específicamente" se refiere a la hibridación, mediante emparejamiento de bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) con una molécula de ácido nucleico diana. Los expertos en la materia están familiarizados con los parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan a la hibridación específica, tales como la longitud y la composición de la molécula concreta. Los parámetros particularmente relevantes para la hibridación *in vitro* incluyen además la hibridación y la temperatura de lavado, la composición del tampón y la concentración salina. Las condiciones de lavado ilustrativas para eliminar las moléculas de ácido nucleico no unidas específicamente con una restricción alta son 0,1 x SSPE, SDS al 0,1 %, 65 °C, y a restricción media son 0,2 x SSPE, SDS al 0,1 %, 50 °C. Se conocen en la técnica condiciones de restricción equivalentes. La persona experta puede ajustar fácilmente estos parámetros para conseguir la hibridación específica de una molécula de ácido nucleico con una molécula de ácido nucleico diana adecuada para una aplicación concreta.

35 Tal como se usa en el presente documento, La referencia a una proteína aislada o proteína purificada o proteína catalíticamente activa de la misma significa que está sustancialmente exenta de material celular u otras proteínas contaminantes procedentes de las células o tejidos a partir de la cual se deriva la proteína, o sustancialmente exenta de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Se puede determinar que las preparaciones estén sustancialmente exentas si aparecen exentas de impurezas fácilmente detectables como se determina mediante los métodos de análisis convencionales, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), utilizados por los expertos en la materia para evaluar dicha pureza, o suficientemente puros de tal manera que la purificación adicional no alteraría de forma detectable las propiedades físicas y químicas, tal como las actividades proteolíticas y biológicas, de la sustancia. Los expertos en la materia conocen los métodos para la purificación de las proteínas producen polipéptidos sustancialmente puros.

45 La expresión sustancialmente exento de material celular incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células a partir de los cuales se aísla o se produce de forma recombinante. En una realización, la expresión sustancialmente exento del material celular incluye preparaciones de proteínas proteasas que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de proteínas no proteasas citadas también en el presente documento como proteínas contaminantes), generalmente menos de aproximadamente 20 % de proteínas no de proteasas o 10% de proteínas no de proteasas o menos de aproximadamente 5 % de proteínas no proteasas. Cuando la proteína de proteasa o una porción activa de la misma se produce de forma recombinante, está también sustancialmente exenta de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de, aproximadamente, o igual al 20 %, 10 % o 5 % del volumen de preparación de la proteína de proteasa.

55 Tal como se usa en el presente documento, la expresión sustancialmente exento de precursores químicos u otras sustancias químicas incluye preparaciones de proteínas de proteasas en las que la proteína se separa de los precursores químicos u otras sustancias químicas que están implicadas en la síntesis de la proteína. La expresión incluye preparaciones de proteínas de proteasas que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso en seco), 20 %, 10 %, 5 % o menos de precursores químicos o sustancias o componentes químicos no de proteasas.

60 Tal como se usa en el presente documento, la producción mediante métodos recombinantes utilizando métodos de ADN recombinante se refiere al uso de métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.

65 Tal como se usa en el presente documento, el vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se utilizan para introducir ácidos nucleicos heterólogos en células para cualquier expresión o replicación de los mismos. Los vectores siguen siendo normalmente episómicos, pero se pueden diseñar para efectuar la integración de un gen o

porción del mismo en un cromosoma del genoma. Se contemplan también vectores que son cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levaduras y cromosomas artificiales de mamíferos. La selección y el uso de dichos vehículos son bien conocidos de los expertos en la materia.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión se refiere al proceso por el cual se transcribe el ácido nucleico en ARNm y se traduce en péptidos, polipéptidos, o proteínas. Si el ácido nucleico se deriva de ADN genómico, la expresión puede, si se selecciona una célula u organismo hospedador eucariota adecuado, incluye el procesamiento, tal como el corte y empalme del ARNm.

10 Tal como se usa en el presente documento, un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que está unido operativamente con secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de dichos fragmentos de ADN. Dichos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y opcionalmente puede incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, y similares. Los vectores de expresión se derivan generalmente de ADN plásmido o vírico o pueden contener elementos de ambos. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula hospedadora adecuada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen aquellos que son replicables en células eucariotas y/o células procariontes y aquellos que siguen siendo episómicos o aquellos que se integran en el genoma de la célula hospedadora.

25 Tal como se usa en el presente documento, vector incluye también "vectores de virus" o "vectores víricos". Los vectores víricos son virus diseñados mediante ingeniería genética que están unidos operativamente a genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos en células.

30 Tal como se usa en el presente documento, un adenovirus se refiere a cualquiera de un grupo de virus que contienen ADN que producen conjuntivitis e infecciones del tracto respiratorio superior en seres humanos.

35 Tal como se usa en el presente documento, ADN puro se refiere a ADN exento de histona que se puede usar para vacunas y terapia génica. El ADN puro es el material genético que se pasa de célula a célula durante una transferencia génica procesada denominada transformación o transfección. En la transformación o transfección, el ADN purificado o pro que es capturado por la célula receptora proporcionará a la célula receptora una nueva característica o fenotipo.

40 Tal como se usa en el presente documento, unido de forma operable u operativa, cuando se refiere a segmentos de ADN, significa que los segmentos se disponen de tal manera que funcionan en concierto para sus fines previstos, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y continúa a través del segmento codificante hasta el terminador.

45 Tal como se usa en el presente documento, un agente que modula la actividad de una proteína o la expresión de un gen o ácido nucleico tanto disminuye como aumenta o altera de otra forma la actividad de la proteína o, de alguna manera, regula en exceso o por defecto o altera de otra forma la expresión del ácido nucleico en una célula.

50 Tal como se usa en el presente documento, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido unido operativamente a un polipéptido diferente. Una proteína quimérica o de fusión proporcionada en el presente documento puede incluir uno o más polipéptidos de FX modificados, o una parte de los mismos, y uno o más polipéptidos diferentes para una cualquiera o más de unas señales de control de la transcripción /traducción, secuencias de señalización, una etiqueta para la localización, una etiqueta para la purificación, parte de un dominio de una inmunoglobulina G, y/o un agente de direccionamiento. Un polipéptido de FX quimérico incluye también aquellos que tienen sus dominios o regiones endógenas del polipéptido intercambiadas con otro polipéptido. Estas proteínas quiméricas o de fusión incluyen aquellas producidas por medios recombinantes como las proteínas de fusión, aquellas producidas por medios químicos, tales como mediante acoplamiento químico, mediante, por ejemplo, acoplamiento con grupos sulfhidrilo, y aquellos producidos por cualquier otro método por el cual al menos un polipéptido (es decir, FX), o una porción del mismo, se une, directa o indirectamente mediante enlazador(es) con otro polipéptido.

55 Tal como se usa en el presente documento, unido operativamente, cuando se refiere a una proteína de fusión se refiere a un polipéptido de proteasa y un polipéptido no de proteasa que se fusionan en marco entre sí. El polipéptido no de proteasa se puede fusionar al extremo N o al extremo C del péptido de proteasa.

60 Tal como se usa en el presente documento, un resto de direccionamiento, es cualquier resto, tal como una proteína o una porción eficaz de la misma, que proporciona unión específica a una molécula en la superficie de una célula, tal como un receptor superficial celular, que en algunos casos puede internalizar un conjugado unido o porción del mismo. Un agente de direccionamiento también puede ser uno que promueve o facilita, por ejemplo, el aislamiento por afinidad o la purificación del conjugado; la unión del conjugado a una superficie; o la detección del conjugado o los complejos que contienen el conjugado.

Tal como se usa en el presente documento, un derivado o análogo de una molécula se refiere a una porción derivada de o una versión modificada de la molécula.

5 Tal como se usa en el presente documento, "enfermedad o trastorno" se refiere a una dolencia patológica en un organismo resultante de una causa o dolencia que incluye, aunque no de forma limitativa, infecciones, dolencias adquiridas, dolencias genéticas, y se caracteriza por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés en el presente documento son aquellas que implican la coagulación, incluyendo aquellas mediadas por las proteínas de la coagulación y aquellas en las que las proteínas de la coagulación juegan un papel en la etiología o patología. Las enfermedades y trastornos incluyen también aquellos que están producidos por la ausencia de una proteína tal como en la hemofilia, y de particular interés en el presente documento son aquellos trastornos donde no se produce la coagulación debido a una deficiencia o defecto en la proteína de la coagulación.

15 Tal como se usa en el presente documento, "procoagulante" se refiere a cualquier sustancia que promueve la coagulación de la sangre.

Tal como se usa en el presente documento, "anticoagulante" se refiere a cualquier sustancia que inhibe la coagulación de la sangre.

20 Tal como se usa en el presente documento, "hemofilia" se refiere a un trastorno hemorrágico producido por una deficiencia en los factores de coagulación de la sangre. La hemofilia puede ser el resultado, por ejemplo, de la ausencia, la expresión reducida, o la función reducida de un factor de coagulación. El tipo más común de hemofilia es la hemofilia A, que es el resultado de una deficiencia en el factor VIII. El segundo tipo más común de hemofilia es la hemofilia B, que es el resultado de una deficiencia en el factor IX. La hemofilia C, denominada también deficiencia FXI, es la forma más leve y menos común de la hemofilia.

25 Tal como se usa en el presente documento, "hemofilia congénita" se refiere a los tipos de hemofilia que son heredados. La hemofilia congénita es el resultado de una mutación, delección, inserción u otra modificación de un gen del factor de regulación en el que la producción del factor de coagulación está ausente, es reducida o no funcional. Por ejemplo, mutaciones hereditarias en los genes de los factores de coagulación, tales como el factor VIII y el factor IX dan como resultado hemofilias congénitas, Hemofilia A y B, respectivamente.

30 Tal como se usa en el presente documento, "hemofilia adquirida" se refiere a un tipo de hemofilia que se desarrolla a la edad adulta a partir de la producción de autoanticuerpos que inactivan FVIII.

35 Tal como se usa en el presente documento, "trastorno hemorrágico" se refiere a una dolencia en la que el sujeto tiene una capacidad disminuida de controlar la hemorragia debido a una mala coagulación de la sangre. Los trastornos hemorrágicos pueden ser heredados o adquiridos y pueden ser el resultado de, por ejemplo, defectos o deficiencias en la ruta de la coagulación, defectos o deficiencias en la actividad plaquetaria, o defectos vasculares.

40 Tal como se usa en el presente documento, "trastorno hemorrágico adquirido" se refiere a trastornos hemorrágicos que son el resultado de deficiencias en la coagulación producidas por dolencias tales como enfermedades hepáticas, deficiencia de vitamina K, o cumadina (warfarina) u otra terapia anticoagulante.

45 Tal como se usa en el presente documento, "tratar" un sujeto que tiene una enfermedad o dolencia significa que un polipéptido, composición u otro producto proporcionado en el presente documento se administra al sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, un agente terapéutico, régimen terapéutico, radioprotector, o sustancia quimioterapéutica significa fármacos convencionales y terapias farmacológicas, incluyendo vacunas, que son conocidas por los expertos en la materia. Son bien conocidos en la técnica los agentes radioterapéuticos.

50 Tal como se usa en el presente documento, tratamiento significa cualquier manera en la que los síntomas de una dolencia, trastorno o enfermedad se mejoran o se alteran beneficiosamente de otra forma. por tanto, el tratamiento abarca la profilaxis, la terapia y/o la cura. El tratamiento abarca también cualquier uso farmacéutico de las composiciones del presente documento. El tratamiento abarca también cualquier uso farmacéutico de un FX modificado y las composiciones proporcionadas en el presente documento.

55 Tal como se usa en el presente documento, la mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno concreto mediante un tratamiento, tal como mediante la administración de una composición farmacéutica u otra sustancia terapéutica, se refiere a cualquier disminución, tanto permanente como temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que pueden atribuirse a o asociarse con la administración de la composición o sustancia terapéutica.

60 Tal como se usa en el presente documento, la prevención o la profilaxis se refiere a los métodos en los que se reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad o dolencia. La profilaxis incluye la reducción en el riesgo de desarrollar una enfermedad o dolencia y/o una prevención del empeoramiento de los síntomas o una progresión de una enfermedad o reducción en el riesgo de empeoramiento de los síntomas o progresión de una enfermedad.

65 Tal como se usa en el presente documento, una cantidad eficaz de un compuesto o composición para tratar una

5 enfermedad concreta es una cantidad que es suficiente para mejorar, o en alguna manera reducir los síntomas asociados con la enfermedad. Dicha cantidad puede administrarse como una única dosificación o puede administrarse de acuerdo con un régimen, por lo cual es eficaz. La cantidad puede curar la enfermedad pero, típicamente, se administra a fin de mejorar los síntomas de la enfermedad. Típicamente, se requiere la administración repetida para conseguir la mejora deseada de los síntomas.

10 Tal como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Una cantidad eficaz es la cantidad de agente terapéutico necesaria para prevenir, curar, mejorar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

15 Tal como se usa en el presente documento, "paciente" o "sujeto" que se va a tratar incluye animales humanos o animales no humanos, incluyendo mamíferos. Los mamíferos incluyen primates, tales como seres humanos, chimpancés, gorilas y monos; animales domesticados, tales como perros, caballos, gatos, cerdos, cabras, vacas; y roedores tales como ratones, ratas, hámsteres, y jerbos.

Tal como se usa en el presente documento, Una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o entre más elementos. La asociación puede ser espacial o referirse al uso de dos o más elementos para un fin común.

20 Tal como se usa en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos o compuestos (por ejemplo, agentes, moduladores, reguladores, etc.). Este puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, formulaciones acuosas o no acuosas o cualquier combinación de las mismas.

25 Tal como se usa en el presente documento, un "artículo de fabricación es un producto que se hace y se vende. Como se usa a lo largo de esta solicitud, se pretende que la expresión abarque polipéptidos de proteasas modificados y ácidos nucleicos contenidos en artículos de embalaje.

30 Tal como se usa en el presente documento, fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Los fluidos abarcan por tanto composiciones que están en la forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras de las mencionadas composiciones.

35 Tal como se usa en el presente documento, un "kit" se refiere a una combinación embalada, que incluye opcionalmente reactivos y otros productos y/o componentes para practicar los métodos usando los elementos de la combinación. Por ejemplo, se proporcionan kits que contienen un polipéptido de proteasa modificado o una molécula de ácido nucleico proporcionada en el presente documento y otro elemento para un fin que incluye, aunque no de forma limitativa, la administración, el diagnóstico, y la evaluación de una actividad o propiedad biológica. Los kits incluyen opcionalmente instrucciones para su uso.

40 Tal como se usa en el presente documento, animal incluye cualquier animal, tal como, aunque no de forma limitativa; primates, incluyendo seres humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves, tales como gallinas; rumiantes, tales como cabras, vacas, ciervos, ovejas; ovinos, tales como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen seres humanos como el animal contemplado. Las proteasas proporcionadas en el presente documento son de cualquier fuente, animal, vegetal, procariota y fúngica.

45 Tal como se usa en el presente documento, la terapia génica implica la transferencia de ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, en determinadas células, células diana, de un mamífero, concretamente un ser humano, con un trastorno o dolencia para el cual se busca dicha terapia. Para los fines del presente documento, la terapia génica implica la transferencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento. El ácido nucleico, tal como ADN, se introduce en las células diana seleccionadas, tal como directamente o en un vector u otro vehículo de administración, de una manera tal que el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, se expresa, y se produce por tanto un producto terapéutico codificado. Como alternativa, el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, puede de alguna manera mediar en la expresión del ADN que codifica el producto terapéutico, o puede codificar un producto, tal como un péptido o un ARN que en alguna manera media, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. Se puede usar también la terapia génica para administrar un ácido nucleico que codifica un producto génico que sustituye un gen defectivo o suplementa un producto génico producido por el mamífero o la célula en la que se introduce. El ácido nucleico introducido puede codificar un compuesto terapéutico, tal como una proteasa o proteasa modificada, que no se produce normalmente en el mamífero hospedador o que no se produce en cantidades terapéuticamente eficaces o en un tiempo terapéuticamente útil. El ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, que codifica el producto terapéutico puede modificarse antes de la introducción en las células del hospedador afectado a fin de potenciar o alterar de otra forma el producto o la expresión del mismo. La terapia genética puede implicar también la administración de un inhibidor o represor u otro modulador de la expresión génica.

65 Tal como se usa en el presente documento, un producto terapéuticamente eficaz para la terapia génica es un producto que está codificado por un ácido nucleico heterólogo, típicamente ADN, que, tras la introducción del ácido nucleico en un hospedador, expresa un producto que mejora o elimina los síntomas, manifestaciones o

enfermedades heredadas o adquiridas o que cura la enfermedad. Se incluyen también moléculas de ácido nucleico biológicamente activas, tales como ARNi y ARN de sentido contrario.

5 Tal como se usa en el presente documento, la enumeración de que un polipéptido "consiste esencialmente" de una secuencia enumerada de aminoácidos significa que solo está presente la porción enumerada, o un fragmento de la misma, del polipéptido de longitud completa. el polipéptido puede opcionalmente, y generalmente incluirá aminoácidos adicionales procedentes de otra fuente o se pueden insertar en otro polipéptido.

10 Tal como se usa en el presente documento, las formas en singular "un/una", "uno" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia al compuesto, que comprende "un dominio extracelular" incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

15 Tal como se usa en el presente documento, los intervalos y cantidades pueden expresarse como "aproximadamente" un valor o intervalo concreto. Aproximadamente incluye también la cantidad exacta. Por tanto "aproximadamente 5 bases" significa "aproximadamente 5 bases" y también "5 bases".

20 Tal como se usa en el presente documento, "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia posteriormente descrito se produce o no se produce, y que la descripción incluye ejemplos donde dicho evento o circunstancia se produce y eventos donde no se produce. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo no está sustituido o está sustituido.

25 Tal como se usa en el presente documento, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácidos y otros compuestos, están, a menos que se indique lo contrario, de acuerdo con su utilización común, las abreviaturas reconocidas, o la Comisión de la IUPAC-IUB sobre la nomenclatura bioquímica (véase, (1972) *Biochem. 11:1726*).

B. Hemostasia y Factor X

30 Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de Factor X (FX) modificados, que incluyen polipéptidos con factor X activado modificados (FXa) y fragmentos de los mismos catalíticamente activos. Como la primera enzima en la ruta común de formación del trombo, FX ocupa una única e importante posición en la cascada de coagulación. Deficiencias en los factores de coagulación IX o VIII, antes de FX, conducen a una producción inadecuada de FXa. La consecuencia de una FXa inadecuada son los niveles reducidos de trombina y fibrina formadora de coágulos, que dan como resultado hemofilia (Roberts et al. (2006). *Hemophilia A and hemophilia B*. En MA Lichtman et al., eds., Williams Hematology, 7ª ed., págs. 1867-1886. Nueva York: McGraw-Hill). Por lo tanto, FX es una terapéutica atractiva para derivar deficiencias en los factores de coagulación posteriores, y podría ser también útil en otros, independientes de hemofilia, aplicaciones médicas, tales como promover la coagulación de la sangre durante o después de procedimientos quirúrgicos.

40 Aunque FXa tiene el potencial para servir como procoagulante terapéutico que deriva las deficiencias en otros factores de coagulación en la cascada, el uso de FX completamente funcional como una sustancia terapéutica ha demostrado ser impracticable debido a la excesiva activación de la coagulación sistémica. mientras que la asociación de FXa activo con su cofactor activado, FVa, para formar el complejo de la protrombina de como resultado un aumento mayor de 100.000 veces en la activación de la trombina, FXa solo es capaz de bajos niveles de activación de la trombina (Nesheim et al. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254:10952-10962). Por lo tanto, la infusión de FXa puede dar como resultado una estimulación indeseable de la coagulación. De hecho, la administración de FXa produce la generación de trombina *in vivo* y se usa para inducir la coagulación intravascular diseminada (DIC) en modelos animales (Kruithof et al. (1997) *Thrombosis and Haemostasis* 77(2):308-311; Giles et al. (1984) *J. Clin. Invest.* 74(6):2219-2225). Por lo tanto, el uso de FXa como sustancia terapéutica está limitado debido a los riesgos de que dichas preparaciones farmacéuticas sea trombogénicas y pudieran dar lugar a la coagulación intravascular diseminada. Por consiguiente, la investigación para el uso de FX como una sustancia terapéutica se ha centrado sobre el uso del FX zimógeno inactivo (véase por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.501.731). Los polipéptidos de FX modificados, incluyendo los polipéptidos de FXa modificados, proporcionados en el presente documento superan estos problemas.

55 Otra limitación del uso de FXa como sustancia terapéutica reside en la corta semivida de FXa en circulación debido a la rápida inactivación del mismo por los inhibidores de la proteasa en plasma, tales como antitrombina (AT) III y proteína C (Gitel et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259(11):6890-6895; Giles et al. (1988) *Br. J. Haematol.* 69(4):491-497).

60 Las actividades indeseables de FXa no se limitan a aquellas de la ruta de coagulación. FXa juega también un papel bien documentado en la activación de las rutas inmunitaria, inflamatoria y de la mitogénesis a una respuesta a la lesión (Altieri (1993) *Blood* 81:569-579; Altieri (1995) *FASEB J.* 9:860-865; Cirino et al. (1997) *J. Clin. Invest.* 99(10):2446-2451; Leadley et al. (2001) *Curr. Opin. Pharmacol.* 1(2): 169-175). La activación mediada por FXa de las rutas inmunitaria, inflamatoria y de la mitogénesis, pueden dar como resultados efectos indeseados tales como edema (Cirino et al. (1997) *J. Clin. Invest.* 99(10):2446-2451). Estas actividades de FXa se producen de forma independiente al Factor V, y se describen con más detalle a continuación.

65

De forma importante, la conformación del zimógeno del Factor X (descrita a continuación) no es capaz de activar las rutas anteriormente mencionadas (Ambrosini et al. (1997) J. Biol. Chem. 272(13):8340-8345). Por lo tanto, para superar las dificultades de utilizar FXa como sustancia terapéutica descritas anteriormente, los polipéptidos de FXa proporcionados en el presente documento se modifican para alterar las capacidades estructurales del polipéptido de tal manera que los polipéptidos imitan la conformación del zimógeno y presenta baja a nula actividad en ausencia de FVa. en presencia de niveles de saturación de FVa, sin embargo, la actividad de los mutantes de FXa se restaura completamente una vez ensamblados en el complejo de la protrombinasa. Como se demuestra en el presente documento, las formas de FXa de FX modificado proporcionadas en el presente documento incluyen aquellas que presentan una dependencia relativa del cofactor como una relación de la actividad catalítica en presencia de FVa en comparación con su ausencia de más de o igual a 150.000 o más, y generalmente más de o igual a 300.000 o más, que es aproximadamente 50 veces a 100 veces o más de la presentada por FXa natural.

Los mutantes de FXa existentes en la técnica que están indicados para presentar actividad análoga al zimógeno, tales como el mutante I195L (que corresponde a I16L en la numeración de la quimotripsina, véanse Ivanciu et al. (2011) Nature Biotechnology, 29:1028-1033 y Bunce et al. (2011) Blood, 117:290-8), retienen todavía la actividad sustancial en ausencia de FVa. Esto puede limitar las aplicaciones terapéuticas de determinados mutantes de FXa análogos a zimógeno. Se encuentra en el presente documento que los polipéptidos análogos a zimógeno de FXa modificados que presentan una dependencia muy aumentada del cofactor presentan ventajas terapéuticas que facilitan la coagulación sin conferir la toxicidad asociada con trombosis o inflamación. Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento dichos polipéptidos de FXa modificados. Además, los polipéptidos de FXa proporcionados en el presente documento incluyen también aquellos que resisten la inactivación por los inhibidores de la proteasa en plasma, tales como ATIII, y de otra forma, presentan semivida en circulación aumentada o mejorada.

Las siguientes secciones y subsecciones describen la ruta de coagulación, la estructura, el procesamiento y la regulación de las formas FX (por ejemplo, formas zimógenas y de FXa), y la función de FX en la ruta de coagulación. Se describen también a continuación la estructura, la función, y la regulación de las actividades dependientes e independientes de FV.

1. Ruta de coagulación

La coagulación es un proceso complejo por el cual la sangre forma coágulos. Es una parte importante de la hemostasia, el cese de la pérdida de sangre desde un vaso dañado, en el que la pared de un vaso sanguíneo dañado se cubre por un coágulo que contiene plaquetas y fibrina detiene la hemorragia y comienza a reparar el vaso dañado. Los trastornos de la coagulación pueden conducir a un riesgo aumentado de sangrado (hemorragia) o a una coagulación obstructiva (trombosis). La ruta de la coagulación está muy conservada e implica componentes celulares (plaquetas) y proteínas (factores de coagulación). En la fase primaria de la coagulación, las plaquetas se activan para formar un tapón hemostático en el sitio de la lesión. Sigue una hemostasia secundaria, que implica factores de coagulación plasmáticos, que actúan en una cascada proteolítica dando como resultado la formación de hebras de fibrina que refuerzan el tapón plaquetario.

La cascada proteolítica, que conduce al refuerzo del tapón plaquetario, se produce por una serie de reacciones, en las que un zimógeno en circulación (precursor enzimático inactivo) de una serina proteasa y su glicoproteína cofactora se activan para volverse componentes activos que a continuación catalizan la siguiente reacción en la cascada, dando como resultado en última instancia fibrina reticulada. Los factores de coagulación se indican generalmente por números romanos (por ejemplo, factor X). Una "a" en minúscula añadida al número romano indica una forma activa (por ejemplo, factor Xa).

La cascada de coagulación está clásicamente dividida en tres rutas: la ruta extrínseca (o Factor Tisular), la ruta intrínseca (o activación por contacto) y la ruta común (véase la Figura 2). Las rutas intrínseca y extrínseca se producen en paralelo, y converge en el factor X para formar la ruta común, que da como resultado la formación de un coágulo de fibrina (Mann et al. (1990) Blood, 76(1):1-16).

a. Ruta de coagulación del Factor Tisular (Extrínseco)

La coagulación se inicia casi instantáneamente tras una lesión en el vaso sanguíneo que ha dañado el revestimiento del endotelio del vaso. La ruta primaria para el inicio de la coagulación de la sangre es la ruta del Factor Tisular. El Factor Tisular (TF) es una proteína transmembrana, expresada sobre la superficie de las células normalmente no expuestas al flujo de la sangre. Tras la exposición a la sangre, TF se asocia con la serina proteasa del Factor VII en circulación (FVII), que conduce a la activación del Factor VII (FVIIa) en la superficie de la membrana. El complejo TF/FVIIa (denominado también tenasa) cataliza a continuación la conversión del Factor X (FX) en circulación inactivo en la serina proteasa activa (FXa) sobre la superficie de la célula que transporta TF.

b. Ruta de coagulación intrínseca

La ruta de coagulación intrínseca implica enzimas que están intrínsecamente presentes en plasma y comienza con la formación de un complejo de proteínas, que incluye el Factor XII (FXII), sobre colágeno expuesto después que la

integridad de un vaso sanguíneo está comprometida. Entre otros eventos, FXII se activa a FXIIa para iniciar la cascada de las proteasas. FXIIa convierte (Factor XI) FXI en FXIa. El Factor XIa activa el Factor IX (FIX) a FIXa. FIXa forma a continuación un complejo tenasa con su glicoproteína cofactora, FVIIIa, que activa FX a FXa sobre la superficie de las plaquetas activadas.

5

c. Ruta común

Las rutas extrínseca e intrínseca convergen tras la escisión de la forma zimógena de FX por los complejos TF/FVIIa y FVIIIa/FIXa tenasa, y por tanto, la activación de FX, para formar FX activo (FXa) (Figura 2). La interacción de FXa con su cofactor activado, Factor V (FVa), en una estequiometría 1:1, en presencia de Ca^{2+} conduce a la formación del complejo de la protrombinasa asociado a membrana. El complejo de la protrombinasa se forma en la superficie de la membrana por asociación de FXa con su cofactor de FVa, protrombina del sustrato y un fosfolípido superficial. La protrombinasa actúa escindiendo la protrombina (denominada también FII) en Arg 323-Ile324, seguido por la escisión en Arg 274-Thr275 para dar como resultado la serina proteasa activa, trombina (denominada también FIIa) (Krishnaswamy et al. (1986) J. Biol. Chem., 261:8977-8984; Krishnaswamy et al. (1987) J. Biol. Chem., 262:3291-3299). A continuación, la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina, que conduce a un coágulo en el sitio de la lesión tras la reticulación de las proteínas de la fibrina por la transglutaminasa del Factor XIII activado.

10

15

Además de convertir fibrinógeno en fibrina, la trombina activada por FXa está implicada en la amplificación y propagación de la coagulación mediante retroalimentación para activar además la ruta de la coagulación intrínseca escindiendo directamente, y escindiendo por tanto, diversos componentes de la ruta de coagulación intrínseca (por ejemplo, convirtiendo el Factor XI en Factor XIa y convirtiendo el Factor VIII en Factor VIIIa). La trombina propaga también la coagulación y el trombo activando el Factor V de la ruta común y activando las plaquetas.

20

Además de su papel en el complejo de la protrombinasa, FXa es capaz de actividad de retroalimentación activando los factores de coagulación, Además de la trombina, incluyendo FV, FVIII, y FVII y puede jugar un papel en la activación de los receptores activados por las proteasas (PAR) (Foster et al. (1983) J. Biol. Chem., 258(22):13970-13977; Eaton et al. (1986) Biochemistry, 25(2):505-512; Butenas y Mann (1996) Biochemistry, 35(6):1904-1910).

25

30 2. Actividad independiente del Factor V

En ausencia del Factor V/Va, FXa es capaz de bajos niveles de activación de la trombina y funciona también en eventos celulares no hemostáticos, incluyendo la mediación de las respuestas inflamatorias, la expresión génica, y la proliferación celular (Camerer et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:32225-32233; Cirino et al. (1997) J. Clin. Invest. 99(10):2446-2451; Gajdusek et al. (1986) J. Cell Biol. 103:419-428; Gasic et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:2317-2320; Herbert et al. (1998) J. Clin. Invest. 101:993-1000; Ko et al. (1996) J. Clin. Invest. 98:1493-1501; Papapetropoulos et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4738-4742; Senden et al. (1998) J. Immunol 161:4318-4324). Estas actividades independientes de FV/FVa s describen con detalle a continuación.

35

40 a. Activación de la trombina

En ausencia de su cofactor del Factor Va, FXa mantiene alguna actividad catalítica, conduciendo a la activación de la protrombina, aunque reducida significativamente (Nesheim et al. (1979) J. Biol. Chem., 254:10952-10962). Las rutas de activación de la protrombina son distintas dependiendo de si FXa está en solución o incorporado en el complejo de la protrombinasa con FVa sobre la superficie de los fosfolípidos. En solución, la activación de la protrombina continúa mediante una escisión inicial de la protrombina en Arg274, generando pretrombina y un fragmento 1.2, seguido por una segunda escisión en el fragmento de pretrombina en Arg323 para dar como resultado las cadenas A y B unidas mediante disulfuro de la trombina- α (Mann et al. (1981) Methods Enzymol., 80:286-302).

45

50

Por el contrario, cuando se activa la protrombina unida a membrana por la protrombinasa unida a membrana, la activación de la protrombina continúa mediante la escisión de Arg323 en primer lugar, dando como resultado cadenas unidas a disulfuro de meizotrombina como un producto intermedio, seguido por la escisión de meizotrombina en Arg274 para generar una trombina- α y la activación del fragmento peptídico 1.2 (Krishnaswamy et al. (1986) J Biol. Chem. 261(19) 8977-8984).

55

El intermedio de meizotrombina es por sí mismo una serina proteasa competente que sirve como un potente vasoconstrictor (Thompson et al. (1987) Blood, 70:410a. (Abstract 1494); Thompson et al. (1990) J. Vasc. Med. Biol., 1:348; Doyle y Mann (1990) J. Biol. Chem., 265(18):10693-10701) y puede actuar como un elemento regulador en la coagulación de la sangre activando la proteína C anticoagulante (se describe a continuación) cuando se une a la trombomodulina (Mann et al. (1990) Blood, 76(1):1-16).

60

b. Inflamación y proliferación celular

Además de su papel en la ruta de la coagulación, FXa contribuye a otros mecanismos fisiológicos que incluyen la inflamación y la mitogénesis (Leadley et al. (2001) Curr. Opin. Pharmacol. 1(2):169-175). FXa inicia estas rutas de

65

señalización en diversas células uniendo principalmente el receptor de la proteasa de células efectoras (EPR-1) o mediante la activación proteolítica de los receptores activados de las proteasas (PAR).

i. Receptor 1 de la proteasa de células efectoras (EPR-1)

5 Se ha identificado el receptor-1 (EPR-1) de la proteasa de células efectoras como un receptor para FXa sobre la superficie de los monocitos, leucocitos, células endoteliales vasculares, y células del músculo liso (Altieri (1995) FASEB J 9:860-865; Nicholson et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:28407-28413; Bono et al. (1997) J. Cell. Physiol. 172:36-43). La unión de FXa a EPR-1 da como resultado la activación de los leucocitos (Altieri (1995) J. Leukocyte Biol. 58:120-127), la formación de la trombina (Bouchard et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:9244-9251; Ambrosini y Altieri (1996) J. Biol. Chem. 271:1243-1248), y la proliferación celular (Nicholson et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:28407-28413). La activación de los leucocitos está acompañada por la síntesis de citoquinas y la expresión de moléculas de adhesión que conducen a la vasodilatación y a la inflamación como parte de la respuesta inmunitaria.

15 La secuencia LFTRKL de FXa (SEQ ID NO: 555), localizada en las posiciones 83-88 de la secuencia FX madura, es el sitio de reconocimiento para EPR-1 (Ambrosini et al. (1997) J. Biol. Chem. 272(13): 8340-8345; Cirino et al. (1997) J. Clin. Invest. 99(10):2446-2451). No se requiere la actividad enzimática de FXa para la unión de EPR-1 (Herbert et al. (1998) J. Clin. Invest. 101:993-1000; Ambrosini et al. (1997) J. Biol. Chem. 272(13): 8340-8345). Sin embargo, se requiere la activación de FX para la unión de EPR-1, debido a que la conformación del zimógeno del Factor X evita el acceso al motivo de unión de EPR-1. La transición conformacional en la cadena ligera de FXa desenmascara el dominio de interacción, permitiendo la unión de EPR-1 seguida por la transducción de la señal.

ii. Receptores activados de la proteasa (PAR)

25 FXa es capaz también de iniciar la señalización celular mediante la activación proteolítica de los receptores activados de las proteasas (PAR). Los PAR son receptores acoplados a la proteína G, muy expresados en plaquetas, células endoteliales, miocitos y neuronas (Macfarlane et al. (2001) Pharmacol. Rev. 53(2):245-282). En particular, FXa escinde el receptor-1 activado de la proteasa (PAR-1) y el receptor-2 activado por proteasa (PAR-2) para liberar un péptido en el extremo N que actúa a su vez como un ligando atado, dando lugar a la activación (McLean et al. (2001) Thrombosis Research 103:281-297). La activación de PAR-1 y PAR-2 da como resultado una proliferación celular aumentada, mediada por la señalización acoplada a la proteína-G (Macfarlane et al. (2001) Pharmacol. Rev. 53(2):245-282), la producción aumentada de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión (McLean et al. (2001) Thrombosis Research 103:281-297; Senden et al. (1998) J. Immunol 161:4318-4324; Papapetropoulos et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4738-4742), y la producción aumentada de Factor Tisular protrombótico (TF) (McLean et al. (2001) Thrombosis Research 103:281-297). Se requiere la actividad enzimática de FXa para activar la señalización de PAR (McLean et al. (2001) Thrombosis Research 103:281-297).

3. Inhibidores del Factor X

40 La actividad del Factor X se inhibió por tres sistemas principales de proteínas anticoagulantes en la sangre: antitrombina III (AT-III)/heparina, Proteína C/Proteína S, e inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI). Los tres sistemas juegan papeles distintos y complementarios en la inhibición de la actividad del Factor X, inhibiendo por tanto la ruta de coagulación.

45 La antitrombina (AT-III) inhibe la actividad de la serina proteasa del Factor Xa atrapando la enzima en una etapa intermedia del proceso proteolítico a medida que el Factor X inicia un ataque sobre el enlace reactivo en el bucle del sitio reactivo en AT-III. La heparina ayuda a la inhibición del Factor Xa induciendo un cambio conformacional en el bucle del sitio reactivo de AT-III para facilitar la entrada en el sitio activo del Factor Xa e interactuando directamente con restos básicos sobre la superficie del factor Xa para la formación de un complejo ternario inactivo estable (Rezaie, AR, (2000) J. Biol. Chem., 275(5):3320-3327; Langdown et al. (2004) J. Biol. Chem., 279(45): 47288-47297).

55 En la ruta de la proteína C, la proteína C, otro zimógeno de serina proteasa dependiente de la vitamina K que circula en plasma, se convierte mediante proeolisis limitada en la proteína C activada (APC) por el complejo receptor de la proteína C endotelial -trombomodulina-trombina en superficies endoteliales tras la formación de trombina como resultado de la ruta de la coagulación (Esmon y Owen (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2249-2252). La proteína C activa (APC) inhibe a continuación la actividad del Factor Xa inactivando el Factor Va (FVa) mediante escisión proteolítica. La digestión de APC de FVa está facilitada por la proteína S que cataliza la escisión de la proteína C de FVa y mediante la unión de FXa para inhibir la activación de la proteína C (Mosnier y Griffin JH (2006) Front. Biosci., 11: 2381-2399).

65 El inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI) inhibe el Factor Xa uniendo directamente el Factor Xa, pero no el zimógeno del Factor X, en o próximo al sitio activo (Broze et al. (1988) Blood, 71(2): 335-343; Broze et al. (1990) Biochemistry, 7539-7546). A diferencia de AT- III, descrito anteriormente, la inhibición de TFPI de FXa se acelera en presencia de heparina. El complejo FXa-TFPI inhibe a continuación la ruta de coagulación del Factor Tisular (y la activación de FX adicional) uniendo e inhibiendo el complejo de la tenasa del FVIIa-Factor Tisular.

C. Estructura y activación del Factor X

El Factor X, al igual que otras enzimas de coagulación, circula en la sangre como un precursor inactivo, denominado zimógeno, que requiere la escisión proteolítica para la activación. Los zimógenos poseen aproximadamente 10.000 veces o menos actividad proteolítica cuando se comparan con la serina proteasa producida tras la activación. El inicio de la coagulación en el sitio del daño vascular, como se ha descrito anteriormente, conduce a una serie de reacciones en las que un zimógeno se convierte en una proteasa activa mediante la escisión proteolítica específica para generar una enzima activa para la reacción sucesiva. FXa se genera tras la escisión proteolítica del zimógeno de FX por los complejos TF/FVIIa y FVIIIa/FIXa tenasas (véase la Figura 2). Esto culmina en la activación de las células de la sangre y la conversión del fibrinógeno soluble en fibrina insoluble y por tanto, la formación del coágulo. Se eliminan las proteasas en exceso mediante reacción con los inhibidores de las proteasas en circulación que actúan como sustratos "suicidas" o aquellos que reconocen las enzimas activas. Por lo tanto, la activación proteolítica de los zimógenos de la coagulación es una característica reguladora clave de la cascada de coagulación.

El ADNc del Factor X se ha clonado a partir de numerosas especies de mamíferos. Los polipéptidos de FX ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, la humana (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 2 y se codifica por la SEQ ID NO: 1; y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:134), el gibón de mejillas blancas occidental (prepropéptido precursor que se muestra en las SEQ ID NOS: 393 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:404), el babuino verde oliva (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:394 y la forma madura de la SEQ ID NO: 405), el macaco (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 395 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:406), el mono tití oscuro (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 396 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:407), el elefante africano (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:397 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:408), ratón (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 398 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:409), conejo (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO: 399 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:410), rata (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:400 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:411), perro (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:401 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:412), cerdo (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:402 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:413), y bovino (prepropéptido precursor que se muestra en la SEQ ID NO:403 y la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:414). Se han identificado también algunas variantes alélicas de FX humano (Cargill et al. (1999) Nat. Gen., 22:231-238; SEQ ID NOS: 547-552).

Los procesos y características estructurales que regulan el procesamiento del zimógeno precursor de FX inactivo tras la secreción en el torrente sanguíneo, que dan como resultado la generación de la enzima activa de FXa funcional, se reseñan a continuación con la ilustración del zimógeno de FX humano maduro, y los polipéptidos de FXa. Basándose en dicha descripción, un experto en la materia conoce o puede determinarlos el zimógeno maduro correspondiente, FXa y las formas catalíticamente activas de los mismos en otros polipéptidos de FX, incluyendo las variantes alélicas o de especie de los mismos. Por ejemplo, se entiende que la forma zimógena incluye la forma bicatenaria de cualquiera de las anteriores formas maduras monocatenarias, por lo cual, los restos de aminoácidos se escinden debido a la proteólisis intracadena del FX monocatenario de tal manera que el polipéptido contiene una cadena ligera y una cadena pesada unidas por un enlace disulfuro. Además, los FXa de las variantes de especie y alélicas y otras variantes existe generalmente como una forma bicatenaria de los mismos que carece además del péptido de activación. A la vista de la descripción en el presente documento ilustrada con respecto a FX humano y el conocimiento en las técnicas de las variantes de especie y alélicas del mismo, un experto en la materia está familiarizado con y puede identificar los restos que corresponden a dichas formas en las variantes alélicas y de especie identificadas y otras variantes conocidas en la técnica.

1. Procesamiento de FX, Modificación posterior a la traducción y secreción de zimógeno

El Factor X es una serina endoproteinasa y un miembro de la familia de la peptidasa S1 de las proteasas que transporta un pliegue de tipo quimotripsina. el gen humano que codifica el Factor X se localiza en el brazo largo del cromosoma 13 (13q34). Está compuesto de 8 exones y tiene aproximadamente 33 kilobases de longitud, y se expresa predominantemente en el hígado. El transcrito de FX humano tiene 1560 nucleótidos de longitud, que incluyen una región 5' corta sin traducir, y un marco de lectura abierto (incluyendo un codón de detención) de 1467 nucleótidos, y una región 3' sin traducir. El marco de lectura abierto de 1467 nucleótidos (o el ARNm de FX; SEQ ID NO: 1) codifica un prepropéptido de 488 aminoácidos (Swiss-Prot n.º de registro P00742; SEQ ID NO: 2).

El Factor X se sintetiza en el hígado como una proteína precursora monocatenaria denominada un prepropéptido. El prepropéptido FX se procesa a medida que este viaja a través de la ruta secretora de los hepatocitos. Con la ilustración de un FX humano, el prepropéptido contiene un péptido de señalización en el extremo N de 31 aminoácidos (aminoácidos 1-31 de la SEQ ID NO: 2) que se dirige al polipéptido del Factor X en la ruta secretora de los hepatocitos por medio de translocación en el retículo endoplásmico (RE). El péptido de señalización se escinde a continuación mediante la peptidasa de señalización, dejando un propéptido de 9 aminoácidos (aa 32-40 de la SEQ ID NO: 2) en el nuevo extremo amino para generar una forma propeptídica de FX. A medida que el polipéptido se pliega en su estructura terciaria en la luz del RE, se forman 12 enlaces disulfuro. Con referencia a FX humano, estos

enlaces se forman entre los restos de cisteína en las posiciones 17 y 22, 50 y 61, 55 y 70, 72 y 81, 89 y 100, 96 y 109, 111 y 124, 132 y 302, 201 y 206, 221 y 237, 350 y 364, 375 y 403 que corresponden a los restos que se muestran en la SEQ ID NO: 134 (Véase la Figura 1).

5 El polipéptido resultante se modifica a continuación de forma posterior a la traducción en la luz del RE. El propéptido del extremo N sirve como el elemento de reconocimiento que conduce a la conversión de algunos restos de ácido glutámico (que corresponden a los aminoácidos 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 32, y 39 del polipéptido de FX que se muestra en la SEQ ID NO: 134) el ácido γ -carboxiglutámico (Gla) por la carboxilasa dependiente de la vitamina K (Furie y Furie (1988) Cell, 53:505-518). Esta etapa de γ -carboxilación juega un papel en el tráfico del precursor de FX entre el RE y el aparato de Golgi (Stanton y Wallin (1992) Biochem. J., 284:25-31), y está implicado en la activación óptima mediada por Ca^{2+} del zimógeno de FX maduro en circulación. El polipéptido de FX se modifica además de forma posterior a la traducción en el compartimento trans-Golgi mediante β -hidroxilación y glicosilación. Los estudios han mostrado que la glicosilación de estos restos es importante para el reconocimiento del zimógeno del Factor X por sus activadores fisiológicos (Yang et al. (2009) J. Thromb. Haemost., 7(10):1696-1702). Por ejemplo, con referencia a FX humano, la hidroxilación se produce en un resto de ácido aspártico que corresponde a la posición 63 del polipéptido de FX que se muestra en la SEQ ID NO:134) (McMullen et al. (1983) Biochemistry, 22:2875-2884) y la glicosilación se produce en los restos de treonina en las posiciones que corresponde a los restos 159 y 171 y en los restos de asparagina en las posiciones que corresponde a los restos 181 y 191 del polipéptido de FX que se muestra en la SEQ ID NO: 134) (Inoue y Morita (1993) Eur. J. Biochem, 218:153-163).

20 El propéptido se elimina mediante escisión proteolítica en el aparato trans-Golgi para generar una forma madura que carece del propéptido (que se muestra en la SEQ ID NO:134), que se produce antes de la secreción del zimógeno en el torrente sanguíneo. Además, la proteólisis intracadena del FX maduro monocatenario se produce también en el compartimento trans-Golgi, que puede preceder o seguir a la escisión del propéptido (Stanton y Wallin (1992) Biochem. J. 284:25-31). Esto da como resultado la eliminación de los aminoácidos 140-142 que corresponden a los restos que se muestran en la SEQ ID NO:134, y a la generación de un polipéptido bicatenario. Por lo tanto, el zimógeno de FX secretado resultante existe como una cadena ligera y una cadena pesada unidas por un enlace disulfuro. Por ejemplo, con referencia a la forma monocatenaria madura que se muestra en la SEQ ID NO:134, la cadena ligera tiene 130 aminoácidos (que corresponden a los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134) y la cadena pesada tiene 306 aminoácidos (que corresponden a los restos 143-448 de la SEQ ID NO: 134). El zimógeno secretado existe como una forma bicatenaria debido a la escisión de los aminoácidos 140-142 de la SEQ ID NO: 134, por lo cual, las cadenas ligera y pesada de FX permanecen unidas por un enlace disulfuro entre Cys 132 (de la cadena ligera) y Cys 302 (de la cadena pesada) con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO: 134.(Di Scipio et al. (1977) Biochemistry, 16:698-706).

35 La forma inactiva del zimógeno bicatenario secretado, que contiene una cadena ligera y una cadena pesada, contiene un péptido de activación en el extremo N de la cadena pesada que debe eliminarse para la activación de la enzima (véase la Figura 2). Con respecto al FX humano que se muestra en la SEQ ID NO:134, el zimógeno de FXa natural tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 1-139 de la SEQ ID NO: 134 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 143-448, por lo cual, el péptido de activación está constituida por 52 restos de aminoácidos en el extremo amino de la cadena pesada. El FX activo (FXa) se genera mediante escisión proteolítica para eliminar el péptido de activación, que se describe adicionalmente a continuación. Las cadenas ligera y pesada de FXa permanecen unidas por un enlace disulfuro entre Cys 132 (de la cadena ligera) y Cys 302 (de la cadena pesada) con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO: 134.

50 Antes de la escisión del péptido de activación (descrita a continuación), la forma zimógena en circulación del Factor X existe en una conformación estructural que es estructuralmente distinta de FXa con respecto a los cuatro segmentos mayores. Estos segmentos, denominados en su conjunto el "dominio de activación", son el extremo N de la cadena pesada (el péptido de activación más los restos 195-198 de la SEQ ID NO: 134) y los restos 325-334, 365-377, y 400-406 (que corresponden a los restos que se muestra en la SEQ ID NO:134). El péptido de activación en el extremo N de la cadena pesada bloquea conformacionalmente los segmentos del dominio de activación de FX. En el zimógeno inactivo, el dominio de activación cubre una porción del bolsillo de unión al sustrato (el sitio S1), restringiendo por tanto el acceso al sustrato y permitiendo poca actividad catalítica.

55 2. Activación y generación del Factor X activado (FXa)

La activación por escisión de la forma zimógena, y generalmente la liberación de un péptido de activación, se requiere para generar una serina proteasa activa. En general, para las serina proteasas, la conversión del zimógeno en la serina proteasa activa requiere la escisión tras Arg¹⁵ (normalmente el enlace entre Arg¹⁵ e Ile¹⁶), en la numeración de la quimotripsina. Esto puede dar como resultado la eliminación de un péptido de activación y expone un extremo N nuevo en el dominio catalítico que comienza con Ile¹⁶. Por ejemplo, con respecto a FX, FX activado (FXa) se genera a partir del zimógeno de FX mediante la eliminación del péptido de activación, que se produce tras la escisión proteolítica entre los aminoácidos 194-195 que corresponde a los restos que se muestran en la SEQ ID NO: 134. Para FX, se inicia la escisión proteolítica *in vivo* por las serina proteasas activadas antes de la ruta de la coagulación, concretamente los complejos de las TF/FVIIa y FVIIIa/FIXa tenasas. Se puede inducir también la

activación mediante escisión proteolítica *in vitro*, por ejemplo, utilizando el activador de FX del veneno de víbora de Russell como se describe en el presente documento en los Ejemplos.

5 El procesamiento proteolítico, para eliminar el péptido de activación, desenmascara un nuevo extremo N de la cadena pesada, que corresponde a los restos hidrófobos Ile195-Gly198 en FX maduro que se muestran en la SEQ ID NO: 134. El FXa resultante contiene una cadena pesada catalíticamente activa, unida a la cadena ligera por un enlace disulfuro. Con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:134, FXa natural tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de restos de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 1-139 de la SEQ ID NO: 134 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los
10 restos de aminoácidos 195-448 de la SEQ ID NO: 134. Las cadenas ligera y pesada de FXa permanecen unidas por un enlace disulfuro entre Cys 132 (de la cadena ligera) y Cys 302 (de la cadena pesada) con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO: 134.

15 La nueva secuencia del extremo N expuesta de la cadena pesada se pliega posteriormente en el dominio catalítico y se inserta en la llave de unión del extremo de una manera específica de secuencia. La inserción del extremo N conduce a la formación de un puente salino entre el grupo α -NH₂ de Ile 16 y Asp194 en el interior del dominio catalítico, en la numeración de la quimotripsina (que corresponde a Ile195 y Asp378 en la numeración de FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO:134). La formación del puente salino se asocia con numerosos cambios en la estructura del dominio catalítico que incluyen redistribuciones de los dominios de activación, la formación del orificio oxianiónico requerido para la catálisis y la formación de un sitio de unión a sustrato. Estos cambios conducen a la maduración de la serina proteasa activa. Por ejemplo, la redistribución de la estructura terciaria para acomodar la formación de un puente salino soterrado entre el extremo N expuesto recientemente con Asp378 en el núcleo hidrófobo conduce a un cambio conformacional en el dominio de activación que ordena el subsitio S1 y da como resultado una proteasa activa.
20

25 Los restos de la cadena pesada 195-448 de la SEQ ID NO: 134 caracterizan el dominio de la serina proteasa análogo a quimotripsina. Al igual que otros miembros de la familia de las serina proteasas análogos a tripsina, el dominio de la proteasa de FX contiene dos subdominios de barril- β en forma de greca que convergen en el sitio catalítico activo. Los restos His236, Asp282, y Ser379 constituyen la tríada catalítica de sitio activo de la proteasa activa. La autoproteólisis adicional de FXa tras Arg429 de la SEQ ID NO: 134 convierte la forma- α de FXa en la forma- β (Mertens y Bertina, Biochem. J. (1980) 185:647-658). Sin embargo, estas dos formas de FXa son funcionalmente indistinguibles (Prydzial y Kessler, J. Biol. Chem. (1996) 271:16621-16626).
30

35 El sitio activo del dominio de la proteasa se divide en cuatro (4) sub-bolsillos, numerados S1-S4. El bolsillo S1 está localizado próximo a la tríada catalítica en la estructura tridimensional, y es el determinante mayor de la especificidad y unión al sustrato. El bolsillo S1 está formado por los bucles formados por los restos 398-403 y 373-379 de la SEQ ID NO:134, que se unen por un enlace disulfuro Cys403-Cys375, y los restos 409-412 de la SEQ ID NO: 134. En el bolsillo S1, Asp373, Gly400, y Gly410 son restos clave para la selectividad de unión al sustrato. El sitio S2 es un bolsillo pequeño, poco profundo, formado por el bucle que corresponde a los restos 270-279 de la SEQ ID NO:134 (Rai et al., Curr. Med. Chem. (2001) 8(2):101-119). Una Tyr que corresponde a Tyr279 de la SEQ ID NO: 134 es importante para la especificidad de la enzima en el subsitio S2 (Rezaie, J. Biol. Chem. (1996) 271(39):23807-23814). El área S3 de FXa se localiza en el borde del bolsillo S1, está expuesta al disolvente, y confiere poca especificidad de unión. El subsitio S4 se forma entre el bucle que contiene los aminoácidos 270-279 y 350-359 de la SEQ ID NO: 134 y contiene 3 dominios de unión a ligando: la "secuencia hidrófoba" (formada por los restos Tyr279, Phe356 y Trp399 de la SEQ ID NO: 134), el "orificio catiónico" (formado por la cadena secundaria de Glu277 y la estructura principal de K276 de la SEQ ID NO: 134), y el sitio del agua (formado por los restos Thr278, Ile357, y Thr359 de la SEQ ID NO: 134) (Rai et al., Curr. Med. Chem. (2001) 8(2):101-119).
40
45

50 La cadena ligera de FXa y las formas zimógenas tienen tres dominios estructurales característicos, cada uno de los cuales posee distintas propiedades funcionales (Leytus et al., Biochemistry. (1986) 25:5098-5102; Padmanabhan et al., J. Mol. Biol. (1993) 232:947-966). El dominio rico en ácido γ -carboxiglutámico (GLA) (restos 1-39 de la SEQ ID NO: 134) contiene los 11 restos GLA mencionados anteriormente, y es importante para la asociación de FX dependiente de Ca²⁺ con membranas celulares: un requerimiento para el ensamblaje del complejo de la protrombinasa (Morita y Jackson, J. Biol. Chem. (1986) 261(9):4015-4023). el dominio GLA está seguido por un apilamiento pequeño hidrófobo (que corresponde a los restos 40-45 de la SEQ ID NO:134 y dos dominios análogos al factor de crecimiento epidérmico (EGF): EGF1 (que corresponde a los aminoácidos 46-84 de la SEQ ID NO:134) y EGF2 (que corresponde a los aminoácidos 85-128 de la SEQ ID NO:134), que están implicados en las interacciones proteína-proteína y, en el caso de EGF1, la unión de Ca²⁺, implica los restos Gly47, Gly64, Gln49, Asp/Hya63, y Asp46 (Selander-Sunnerhagen et al., J. Biol. Chem. (1992) 267(27):19642-19649).
55
60

Aunque FXa posee un sitio activo completamente funcional y contiene la maquinaria catalítica para la escisión de la protrombina a trombina, es un mal catalizador de esta reacción aunque esté presente alguna actividad. La actividad independiente de este cofactor representa algunos de los efectos secundarios perjudiciales asociados con la infusión de FXa como se ha descrito anteriormente. En general, la actividad completa mediante una escisión eficaz de los sustratos biológicos requiere el Factor Va (FVa) como un cofactor. FVa, presente en las membranas plaquetarias, se une a FXa, dando como resultado una afinidad aumentada de FXa por los fosfolípidos y un aumento en la actividad
65

catalítica (véase, por ejemplo, Segers et al. (2007) *Thromb. Haemost.*, 98:530-542). Por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos, FXa natural presenta generalmente más de 3000 de actividad catalítica aumentada por su sustrato en presencia de FVa que en su ausencia. Los epítomos que se unen al núcleo del cofactor en FXa son Arg347, Lys351 y Lys414 que corresponden a los restos que se muestran en la SEQ ID NO: 134 (véase, por ejemplo, Rudolph et al. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:5123-5128).

D. POLIPÉPTIDOS CON FACTOR X MODIFICADOS

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de Factor X (FX) variantes o modificados, incluyendo los polipéptidos de la proteasa del zimógeno de FX y los polipéptidos de la proteasa con FX activo (FXa), que presentan actividades o propiedades alteradas o mejoradas en comparación con la forma correspondiente del polipéptido de FX que no contiene la(s) modificación(ones). En particular, dichas actividades o propiedades alteradas o mejoradas son evidentes cuando se activa el polipéptido de FX o cuando este existe como un polipéptido de FXa modificado. Las actividades o propiedades que están alteradas en los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento incluyen una dependencia del cofactor de FVa aumentada, un aumento de la resistencia a los inhibidores, un nivel o extensión aumentada de la glicosilación, una semivida aumentada y/o una actividad catalítica aumentada. Por ejemplo, la resistencia aumentada a los inhibidores puede manifestarse como una resistencia aumentada a uno o a ambos inhibidores de la ruta del factor tisular (TFPI) o la antitrombina III (AT-III). Las formas activas de los polipéptidos de FX modificados proporcionadas en el presente documento presentan actividad catalítica, incluyendo la presencia de FVa, y por tanto, actividad procoagulante. Dichos polipéptidos de FX modificados pueden usarse en el tratamiento de enfermedades o dolencias para proporcionar actividad coagulante derivando mientras tanto al mismo tiempo los requerimientos para las enzimas que actúan inicialmente en la cascada de coagulación, tales como FVIII y FIXa.

En particular, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FX modificados, incluyendo el zimógeno del Factor X y polipéptidos de FXa, cuando están presentes en su forma FXa activa, mantienen o presentan actividad local mejorada en el sitio de la herida, pero presentan poca o ninguna actividad sistémica en ausencia del cofactor. Este resultado es debido a la(s) modificación(ones) en el presente documento que da(n) como resultado un aumento de la dependencia del cofactor en comparación con el FXa natural o cualquier variante de FXa existente en la técnica. Por lo tanto, las proteasas modificadas proporcionadas en el presente documento como polipéptidos de FXa activos presentan mucha más potencia que FXa natural, pero pueden presentar un aumento de la seguridad debido a que la forma libre en circulación puede sola presentar una fuerte actividad (es decir, comparable a FXa natural) cuando se une al cofactor de FVa en el sitio de una herida. Los polipéptidos de FX modificados, incluyendo las formas zimógenas de FX y FXa, proporcionadas en el presente documento se pueden usar en aplicaciones terapéuticas para tratar sujetos que tienen hemofilia (hemofilia A o B), así como en otras aplicaciones para controlar la hemostasia, tales como cirugía o otros traumas.

Incluidos también entre los polipéptidos de FX modificados, se incluyen el zimógeno del Factor X y las formas FXa, que presentan semivida aumentada. Un problema con el uso del Factor X/zimógeno del Factor Xa/proteasas como sustancias terapéuticas para el tratamiento de la hemofilia es su corta semivida. Por ejemplo, El Factor X presenta una semivida de 24 a 40 horas. Para el tratamiento a largo plazo de pacientes con hemofilia que presentan defectos o deficiencias en la ruta de coagulación, es ventajosa una semivida más larga para evitar la repetición de la dosificación a una frecuencia que es inconveniente e indeseada. Factor X/zimógeno del Factor Xa/ proteasas modificadas proporcionadas en el presente documento presentan una semivida alterada en virtud de un nivel alterado y/o tipo de glicosilación. La glicosilación puede aumentar la semivida en suero de los polipéptidos aumentando la estabilidad, solubilidad, y reduciendo la inmunogenicidad de una proteína. Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, se incluyen el zimógeno del Factor X y las formas FXa, presentan también una semivida aumentada cuando están en forma activa debido a una resistencia aumentada a los inhibidores, tales como ATIII y otros inhibidores.

La(s) modificación(ones) en un polipéptido de FX puede(n) realizarse para cualquier forma de un polipéptido de FX, siempre que la forma, cuando se expresa, purificada y procesada (*in vitro* o *in vivo*) pueda dar como resultado un FXa que contenga una cadena ligera y una cadena pesada que carezca del péptido de activación. Para los fines del presente documento, la referencia a la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) en un polipéptido de FX en el presente documento es con respecto a los restos en la forma madura que se muestra en la SEQ ID NO:134, que contiene la cadena ligera (que corresponde a los restos de aminoácidos 1-139) y la cadena pesada (que corresponde a los restos de aminoácidos 140-448), por lo cual, la cadena pesada contiene los restos de aminoácidos 140-142 y un péptido de activación de 52 aminoácidos que no están normalmente presentes en una forma FXa. Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento formas maduras modificadas de FX. Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos en los restos correspondiente de cualquier forma FX o de cualquier FX variante conocida en la mediante la alineación con el polipéptido maduro que se muestra en la SEQ ID NO: 134 véase, por ejemplo, la Figura 1). Por lo tanto, se proporcionan también en el presente documento polipéptidos de FX modificados que son formas zimógenas bicatenarias que carecen de restos de aminoácidos correspondientes a los restos de aminoácidos 140-142 de la SEQ ID NO: 134, que contiene una cadena pesada y una cadena ligera unidas mediante un enlace disulfuro, y que contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con referencia a la numeración que se muestra en la SEQ ID NO: 134. Se proporcionan además en el presente documento formas FXa que son formas bicatenarias de

la SEQ ID NO:134 que carecen de restos de aminoácidos que corresponden a los restos de aminoácidos 140-142, que carecen del péptido de activación en la cadena pesada, que contiene una cadena pesada y una cadena ligera unida por un enlace disulfuro, y que contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) con referencia a la numeración que se muestra en la SEQ ID NO:134. Los restos correspondientes en otras formas de FX o en otros polipéptidos de FX diferentes de la SEQ ID NO: 134 se pueden identificar mediante alineación con la SEQ ID NO:134.

Se hace también referencia a través de la aplicación a la numeración de la quimotripsina, que es un esquema de numeración común utilizado para numerar restos de aminoácidos en cualquier serina proteasa (Greer (1990) Proteins:Structure, Function and Genetics, 7:317-334). Se proporciona en el presente documento en la Tabla 1 un esquema de numeración correspondiente para la numeración de FX basado en la secuencia madura que se muestra en la SEQ ID NO: 134 y la quimotripsina. Por lo tanto, está también comprendido en el nivel de conocimientos de un experto en la materia generar una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) proporcionada(s) en el presente documento en cualquier variante de FX conocida en la materia con referencia a la numeración de la quimotripsina.

Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FX modificados que contienen modificaciones en un FX maduro que se muestra en la SEQ ID NO: 134 o en un zimógeno, una forma activa o catalíticamente activa del mismo que incluye la(s) modificación(ones), o una variante del mismo que presenta al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de la secuencia con la SEQ ID NO:134 o un zimógeno, las formas activas o catalíticamente activas del mismo que incluyen la(s) modificación(ones). Por ejemplo, las modificaciones pueden realizarse con referencia a cualquier variante alélica o de especie conocida en la técnica, tales como cualquiera de las que se muestran en cualquiera de las SEQ ID NOS: 393-414 o 547-552, u otras variantes conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la Sección D.5), o los zimógenos, las formas activas o catalíticamente activas de los mismos.

El polipéptido de FX modificado resultante puede ser una forma monocatenaria o puede contener dos o más cadenas. Típicamente, el polipéptido de FX modificado es un zimógeno bicatenario o es un FXa activo bicatenario. Se entiende que cualquier polipéptido modificado proporcionado en el presente documento como un polipéptido monocatenario puede autoactivarse o activarse para generar una forma bicatenaria. Además, cualquier polipéptido modificado en el presente documento en forma zimógena que contiene un péptido de activación, puede activarse mediante activadores conocidos (por ejemplo, otros complejos del factor de coagulación o RVV) para generar una forma bicatenaria de FXa modificado. Las etapas de activación pueden llevarse a cabo *in vitro* o pueden efectuarse tras la administración *in vivo*, por ejemplo, la administración *in vivo* de la forma zimógena. Por ejemplo, cuando la activación se lleva a cabo *in vitro*, el péptido de activación u otras secuencias peptídicas escindidas pueden purificarse a partir de la forma FXa final, tal como se conoce en la técnica y se describe en otra parte en el presente documento incluyendo en los Ejemplos. Las actividades de un polipéptido de FX modificado se presentan normalmente en su forma FXa activa bicatenaria.

Por ejemplo, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento incluyen formas bicatenarias que tienen una cadena ligera y una cadena pesada unidas mediante al menos un enlace disulfuro. En particular, las modificaciones en un polipéptido de FX está en forma de zimógeno bicatenario que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 1-139 de la SEQ ID NO: 134 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 143-448, o en una de sus variantes que es un zimógeno y que presenta al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de la secuencia con un FX que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 1-139 de la SEQ ID NO: 134 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 143-448. En otros ejemplos, la(s) modificación(ones) en el polipéptido de FX están en forma de un FXa bicatenario que carece del péptido de activación. Por ejemplo, la(s) modificación(ones) en un polipéptido de FX están en FXa que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los restos de aminoácidos 1-139 de la SEQ ID NO:134 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 195-448 de la SEQ ID NO: 134 o una de sus variantes que tiene actividad catalítica y que presenta al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de la secuencia con un FXa que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los restos de aminoácidos 1-139 de la SEQ ID NO:134 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 195-448 de la SEQ ID NO:134, o a una porción catalíticamente activa del mismo.

Las modificaciones proporcionadas en el presente documento de un polipéptido de referencia de partida, sin modificar incluyen sustituciones o sustitución de aminoácidos, adiciones o deleciones de aminoácidos, o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, los polipéptidos de FX modificados incluyen aquellos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más posiciones modificadas. Se proporcionan también en el presente documentos polipéptidos de FX modificados con dos o más modificaciones en comparación con un polipéptido de FX de referencia de partida. Los polipéptidos de FX modificados incluyen aquellos con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más posiciones modificadas.

La(s) modificación(ones) proporcionada(s) en el presente documento pueden incluir una cualquiera o más

modificaciones que alteran una actividad o propiedad de una forma FXa de un polipéptido de FX, por ejemplo, para aumentar la dependencia del cofactor, aumentar la resistencia a los inhibidores, tras la glicosilación, y/o el aumento de la semivida en comparación con la forma FXa que no contiene la(s) modificación(ones). Por ejemplo, Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento puede incluir modificaciones que

5 aumentan la dependencia del cofactor. En dichos ejemplos, la dependencia del cofactor puede aumentarse disminuyendo la actividad catalítica en ausencia de FVa (actividad catalítica independiente de FVa) y/o disminuyendo la afinidad por el sustrato (por ejemplo, por la protrombina) en ausencia del cofactor de FVa. En otro ejemplo, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento pueden incluir modificaciones que aumentan la semivida. En dichos ejemplos, se puede efectuar el aumento de la semivida en virtud de una o más

10 modificaciones que aumenta la resistencia a un inhibidor, tal como TFPI o AT-III. En otros ejemplos, se puede efectuar el aumento de la semivida en virtud de una o más modificaciones que dan como resultado la adición de nuevos sitios de glicosilación de tal manera que el polipéptido de FX modificado está glicosilado o hiperglicosilado. En los ejemplos concretos del presente documento, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento pueden incluir modificación(ones) que aumentan la dependencia del cofactor y aumentan la

15 semivida en comparación con el FX que no contiene modificaciones. En algunos ejemplos, una única modificación, tal como una única sustitución o reemplazamiento de aminoácido, altera 2, 3, 4 o más propiedades o actividades de un polipéptido de FX. Los polipéptidos de FX modificados y generalmente las formas FXa de los mismos, proporcionadas en el presente documento pueden evaluarse para cada propiedad y actividad para identificar la gama de efectos de una modificación. Se conocen dichas evaluaciones en la técnica y se describen a continuación.

Los polipéptidos de FX modificados resultantes proporcionados en el presente documento, cuando están en forma bicatenaria activa como un FXa modificado, presentan una actividad de la coagulación dependiente de FVa. Cuando están en forma activa, se preserva la actividad dependiente de FVa, es decir, se retiene o aumenta, en comparación con el FXa que no contiene las modificaciones. Por ejemplo, la actividad es al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o más de la actividad dependiente de FVa del FXa que no contiene las modificaciones.

Cualquier modificación proporcionada en el presente documento se puede combinar con cualquier otra modificación conocida por un experto en la materia (por ejemplo, cualquiera que se muestre en la Sección D.5) siempre que el polipéptido de FX modificado resultante presente un aumento en la dependencia del cofactor, un aumento de la resistencia a los inhibidores, glicosilación alterada (por ejemplo, hiperglicosilación) y/o semivida aumentada y preserve la actividad de coagulación dependiente de FVa en comparación con el polipéptido de FX que no contiene las modificaciones cuando cada una está en su forma activa bicatenaria.

Otras modificaciones que están o no están en la secuencia primaria del polipéptido se pueden incluir también en un polipéptido de FX modificado, que incluyen, aunque no de forma limitativa, la adición de un resto de hidrato de carbono, la adición de un resto de polietilenglicol (PEG), la adición de un dominio Fc, etc. Por ejemplo, dichas modificaciones adicionales pueden realizarse para aumentar la estabilidad o la semivida de la proteína. Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento incluyen también polipéptido que están

40 adicionalmente modificados por la maquinaria celular e incluyen, por ejemplo, polipéptidos glicosilados, γ -carboxilados y β -hidroxilados.

Se proporcionan también en el presente documento moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento. En ejemplos particulares, la secuencia de ácido nucleico puede ser un codón optimizado, por ejemplo, para aumentar los niveles de expresión de la secuencia codificada. La utilización del codón particular es dependiente del organismo hospedador en el que se expresa el polipéptido modificado. Un experto en la materia está familiarizado con los codones óptimos para la expresión en células de mamífero o de ser humano, bacterias o levaduras, incluyendo por ejemplo *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. Por ejemplo, está disponible la información de utilización del codón a partir de la base de datos de utilización de codones en kazusa.or.jp/codon (véase por ejemplo Richmond (2000) *Genome Biology*, 1:241 para una descripción de la base de datos). Véase también, Forsburg (2004) *Yeast*, 10:1045-1047; Brown et al. (1991) *Nucleic Acids Research*, 19:4298; Sharp et al. (1988) *Nucleic Acids Res.*, 12:8207-8211; Sharp et al. (1991) *Yeast*, 657-78).

En algunos ejemplos, las moléculas de ácido nucleico codificantes también se pueden modificar para contener una secuencia heteróloga que altera el procesamiento del polipéptido. Por ejemplo, el ácido nucleico puede contener un ácido nucleico que codifica una secuencia de señalización heteróloga, prepropéptido (que contiene la secuencia de señalización y el propéptido) o el propéptido a fin de aumentar la secreción o la producción del polipéptido o de otra forma, mejorar la producción funcional de la proteína. En ejemplos particulares, el ácido nucleico puede contener ácido nucleico que codifica un prepropéptido o propéptido de una proteína dependiente de vitamina K que presenta una afinidad alterada (por ejemplo, reducida) por la gamma-carboxilasa que el propéptido del Factor X. La gamma-carboxilasa es la enzima que cataliza la modificación del glutamato (Glu) a ácido gamma carboxil glutámico (Gla), que se requiere para la actividad del Factor X. La afinidad del propéptido del Factor X tiene la afinidad más alta por la gamma-carboxilasa que otros polipéptidos dependientes de la vitamina K, tales como el factor VII, proteína S, factor IX, la proteína C y la protrombina (Camire et al. (2000) *Biochemistry*, 39:14322-9). Modificar el ácido nucleico codificante para contener una forma prepropeptídica o propeptídica de otro polipéptido dependiente de vitamina K que presenta afinidad reducida por la gamma-carboxilasa potencia la gamma-carboxilación permitiendo una

renovación mayor del sustrato, que a su vez mejora la producción de proteína dando como resultado un porcentaje aumentado de proteína total producida que está gamma-carboxilada. Por ejemplo, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de FX modificado que contiene una secuencia heteróloga que codifica el propéptido de la protrombina (que se muestra como los restos de aminoácidos 1-43 de cualquiera de las SEQ ID NO:415-546).

5 Como se describe en otra parte en el presente documento, se pueden producir también ácidos nucleicos codificantes en las células transfectadas con vitamina K epóxido reductasa (VKOR) a fin de aumentar adicionalmente la fracción de factor X carboxilado (véase, por ejemplo, Sun et al. (2005) Blood, 106:3811-3815).

10 Los polipéptidos modificados y las moléculas de ácido nucleico codificantes proporcionadas en el presente documento pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinantes normalizadas conocidas por los expertos en la materia. Se puede utilizar cualquier método conocido en la materia para llevar a cabo la mutación de uno cualquiera o más aminoácidos de una proteína diana. Los métodos incluyen la mutagénesis dirigida a sitio convencional o mutagénesis aleatoria de las moléculas de ácido nucleico codificante, o los métodos de síntesis de polipéptidos en fase sólida. En particular, se pueden emplear métodos de síntesis química total, incluyendo la síntesis de péptidos seguida por la ligadura de péptidos. Las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de FX se pueden someter a mutagénesis, tal como mutagénesis aleatoria del ácido nucleico codificante, PCR propensa a errores, mutagénesis dirigida a sitio (usando por ejemplo, un kit, tal como un kit como QuikChange disponible de Stratagene), PCR con solapamiento, transposición de genes, u otros métodos recombinantes. El ácido nucleico que codifica los polipéptidos se puede introducir a continuación en una célula hospedadora para expresarse de forma heteróloga. En algunos ejemplos, los polipéptidos de FX modificados se producen de forma sintética, tal como utilizando una síntesis química total, síntesis de péptidos en fase sólida o en fase de soluciones.

25 En las subsecciones siguientes, se describen el polipéptido de FX modificado ilustrativo proporcionado en el presente documento que presentan propiedades y actividades alteradas, incluyendo el zimógeno de FX modificado o formas FXa y moléculas de ácido nucleico codificantes. La descripción siguiente se organiza basándose en una o más propiedades o actividades entre el aumento en la dependencia del cofactor, aumento en la resistencia a los inhibidores (por ejemplo, AT-III) y glicosilación alterada. Se entiende que estas propiedades y actividades no son mutuamente exclusivas, de tal manera que uno o más de los polipéptidos modificados en el presente documento pueden presentar una, dos o todas las propiedades o actividades anteriormente identificadas.

30 Además, en algunos ejemplos en el presente documento a continuación de los polipéptidos FX modificados que contienen una modificación en la posición 195 de Val, Ala, Ser o Thr y/o en la posición 196 de Ile, Ala, Ser o Thr con referencia a las posiciones que se muestran en la SEQ ID NO: 134 (que corresponden a los restos 16 y 17 mediante numeración de la quimotripsina), el polipéptido de FX modificado no contiene un péptido de activación heterólogo de otra serina proteasa para dar como resultado un sitio de procesamiento de la proteasa que no está presente en el factor X natural. En un ejemplo, como precursor, la forma madura o zimógeno, un polipéptido con factor X modificado proporcionado en el presente documento que contiene una sustitución de aminoácido en la posición 195 y/o 196 (por ejemplo, con Ile, Val, Ala, Ser o Thr) contiene Arg194 (Arg15 mediante numeración de la quimotripsina) como parte del sitio de escisión de la proteasa. En ejemplos particulares, un precursor, una forma madura o zimógeno de un polipéptido de factor X proporcionado en el presente documento contiene un péptido de activación FX que corresponde a los restos de aminoácidos 143-194 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:134. En los ejemplos en el presente documento, los polipéptidos de FXa modificados proporcionados en forma activa que contienen una modificación en la posición 195 y/o 196 (por ejemplo, con Ile, Val, Ala, Ser o Thr) se vuelven activos mediante activación por escisión y procesamiento de un zimógeno de FX modificado que contiene un péptido de activación que corresponde a los restos de aminoácidos 143-194 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 134.

1. Glicosilación alterada

50 Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FX modificados, incluyendo un zimógeno de FX modificado y polipéptidos de FXa modificados, que contienen una o más modificaciones en un polipéptido FX de tal manera que se altera la glicosilación del polipéptido. Las modificaciones pueden ser inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En particular, las modificaciones son sustituciones de aminoácidos. Los sitios de glicosilación proporcionan un sitio para la unión de monosacáridos y oligosacáridos a un polipéptido mediante un enlace glicosídico, de tal manera que cuando se produce el polipéptido en una célula eucariota capaz de glicosilación, se glicosila. Los dos tipos principales de glicosilación son la glicosilación unida a N, donde las unidades de azúcar se unen mediante el nitrógeno de la amida de un resto de asparagina y la glicosilación unida a O, donde las unidades de azúcar se unen mediante el grupo hidroxilo de los restos de serina, treonina, hidroxilina o hidroxiprolina. Otras formas más menores de enlaces glicosídicos incluyen el enlace S a la cisteína y el enlace C al triptófano. La glicosilación unida a N se produce en las asparaginas en la secuencia consenso -Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys donde Xaa no es prolina. No existe motivo conocido para la glicosilación en O, aunque la glicosilación en O es más probable en secuencias con una alta proporción de restos de serina, treonina y prolina. La presencia de un sitio de glicosilación potencial no asegura, sin embargo, que el sitio se glicosilará durante el procesamiento posterior a la traducción en el RE. Además, el nivel de glicosilación puede variar en un sitio dado, y un sitio puede tener muchas estructuras de glicano diferentes.

FX es generalmente una proteína glicosilada con dos sitios de glicosilación unidos a O y dos sitios de glicosilación unidos a N presentes en la porción del péptido de activación del polipéptido (que corresponde a los restos Thr159, Thr171, Asn181 y Asn191 con referencia a la SEQ ID NO:134). Se requieren estos restos de glicosilación para la activación del zimógeno por activadores fisiológicos (véase, por ejemplo, Yang et al. (2009) J. Thromb. Haemost., 7:1696-1702).

Se encuentra en el presente documento que se pueden introducir sitios de glicosilación adicionales en FX, que pueden alterar la función y la actividad del polipéptido. En general, la función y la actividad del polipéptido se mejora o aumenta mediante la adición de sitios de glicosilación adicionales, proporcionando por tanto un beneficio terapéutico. Por ejemplo, La glicosilación puede aumentar la semivida en suero de los polipéptidos aumentando la estabilidad, solubilidad, y reduciendo la inmunogenicidad de una proteína. La glicosilación puede aumentar la estabilidad de las proteínas reduciendo la proteólisis de las proteínas y puede proteger las proteínas de la degradación térmica, la exposición a agentes desnaturizantes, el daño por radicales exentos de oxígeno, y los cambios en el pH. La glicosilación puede permitir también que la proteína diana evada los mecanismos de aclaramiento que pueden implicar la unión a otras proteínas, incluyendo los receptores de la superficie celular. Los restos de hidratos de carbono que contienen ácido siálico pueden alterar la solubilidad de una proteína. Los restos de ácido siálico son muy hidrófilos y pueden proteger restos hidrófobos de la proteína diana. Esto disminuye la agregación y la precipitación de la proteína diana. La disminución de la agregación ayuda también en la prevención de la respuesta inmunitaria contra la proteína diana. Los hidratos de carbono pueden proteger además las secuencias inmunógenas procedentes del sistema inmunitario. El volumen de espacio ocupado por los restos de hidratos de carbono puede disminuir el área superficial disponible que es examinada por el sistema inmunitario. Estas propiedades conducen a la reducción en la inmunogenicidad de la proteína diana.

Por lo tanto, Los polipéptidos de FX proporcionados en el presente documento que presentan glicosilación alterada pueden presentar unas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas mejoradas, incluyendo la semivida aumentada en la sangre. Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento que presentan glicosilación alterada también pueden presentar otras actividades y propiedades alteradas tales como una actividad catalítica aumentada y/o una resistencia aumentada a los inhibidores. En particular, Incluidos entre los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento están aquellos que presentan glicosilación alterada, y los uno o ambos que presentan un aumento en la dependencia del cofactor (véase, por ejemplo, Sección D.2) o un aumento en la resistencia a los inhibidores, tales como TFPI o AT-III (véase, por ejemplo, la Sección D.3).

Incluidos entre los polipéptidos de FX proporcionados en el presente documento están aquellos que se han modificado alterando el nivel y/o el tipo de glicosilación en comparación con un polipéptido de FX sin modificar. La glicosilación puede aumentarse o disminuirse en comparación con el polipéptido de FX sin modificar. En algunos casos, el nivel o extensión de la glicosilación está aumentado, dando como resultado un polipéptido de FX hiperglicosilado. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la incorporación de al menos un sitio de glicosilación no nativo que no se encuentra en el polipéptido de FX sin modificar al cual se une un hidrato de carbono. Los polipéptidos de FX hiperglicosilados se pueden generar también mediante el enlace de un resto de hidrato de carbono a al menos un sitio de glicosilación nativo que se encuentra, pero que no se glicosila en el polipéptido de FX sin modificar.

Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento puede contener sitios alterados, tales como nuevos, de glicosilación unida a O, glicosilación unida a N o glicosilación unida a O y glicosilación unida a N. En algunos ejemplos, un polipéptido de FX modificado incluye 1, 2, 3, 4, 5 o más restos de hidratos de carbono, unidos cada uno a diferentes sitios de glicosilación. El(los) sitio(s) de glicosilación puede(n) ser un(os) sitio(s) de glicosilación nativo(s) y/o un(os) sitio(s) de glicosilación no nativos(s). En algunos ejemplos, el polipéptido de FX modificado está glicosilado en más de un sitio de glicosilación no nativo. Por ejemplo, un polipéptido de FX modificado puede estar modificado para introducir 1, 2, 3, 4, 5 o más sitios de glicosilación no nativos.

Se pueden introducir sitios de glicosilación no nativos mediante sustitución de aminoácidos. se pueden crear sitios de glicosilación en O, por ejemplo, mediante sustitución del aminoácido de un resto nativo con una serina o treonina. se pueden crear sitios de glicosilación unidos a N creando el motivo Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, donde Xaa no es prolina. La creación de esta secuencia consenso por la modificación del aminoácido podría implicar la sustitución de un resto de aminoácido nativo con una asparagina, la sustitución de un resto de aminoácido nativo con una serina, treonina o cisteína, o la de un resto de aminoácido nativo con una asparagina y la sustitución del aminoácido de un resto nativo con una serina, treonina o cisteína. Se pueden crear sitios de glicosilación no nativos en cualquier región en el polipéptido FX. Por ejemplo, se pueden introducir uno o más sitios de glicosilación en la cadena ligera y/o la cadena pesada. En algunos ejemplos, se introducen uno o más sitios de glicosilación en un dominio EGF1 de la cadena ligera. En otros ejemplos, se introducen sitios de glicosilación no nativos en la región del dominio de la proteasa de la cadena pesada. El nivel de glicosilación (por ejemplo, el número de sitios de glicosilación no nativos introducidos) puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con el nivel de glicosilación del polipéptido de FX sin modificar o natural.

La(s) modificación(ones) ilustrativa(s) proporcionada(s) en el presente documento incluye(n) una glicosilación no

nativa mediante modificación con una o más sustituciones de aminoácidos que incluye(n), aunque no de forma limitativa, sustitución(ones) de aminoácido(s) en un polipéptido de FX sin modificar con: N en una posición que corresponde a la posición 51; N en una posición que corresponde a la posición 56 y S en una posición que corresponde a la posición 58; N en una posición que corresponde a la posición 62 y S en una posición que corresponde a la posición 64; N en una posición que corresponde a la posición 65 y S en una posición que corresponde a la posición 67; N en una posición que corresponde a la posición 67; N en una posición que corresponde a la posición 73 y S en una posición que corresponde a la posición 75; N en una posición que corresponde a la posición 75 y S en una posición que corresponde a la posición 77; N en una posición que corresponde a la posición 77 y S en una posición que corresponde a la posición 79; N en una posición que corresponde a la posición 78 y S en una posición que corresponde a la posición 80; S en una posición que corresponde a la posición 82; N en una posición que corresponde a la posición 83; N en una posición que corresponde a la posición 82 y S en una posición que corresponde a la posición 84; N en una posición que corresponde a la posición 85 y S en una posición que corresponde a la posición 87; N en una posición que corresponde a la posición 86 y S en una posición que corresponde a la posición 88; N en una posición que corresponde a la posición 95 y S en una posición que corresponde a la posición 97; N en una posición que corresponde a la posición 114; N en una posición que corresponde a la posición 119 y S en una posición que corresponde a la posición 121; S en una posición que corresponde a la posición 122; N en una posición que corresponde a la posición 215 y S en una posición que corresponde a la posición 217; N en una posición que corresponde a la posición 243 y S en una posición que corresponde a la posición 245; N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que corresponde a la posición 266; N en una posición que corresponde a la posición 293 y S en una posición que corresponde a la posición 295; N en una posición que corresponde a la posición 388; N en una posición que corresponde a la posición 389 y S en una posición que corresponde a la posición 391; N es una posición que corresponde a la posición 428 y S en una posición que corresponde a la posición 430 y/o N en una posición que corresponde a la posición 429 y S en una posición que corresponde a la posición 431, cada una en referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134. Con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, se muestran en las Tablas 4 las sustituciones de aminoácidos no limitantes en un polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento para introducir un sitio de glicosilación no nativo.

| | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| E51N | Q56N/Q58S | K62N/G64S | L65N/E67S |
| E67N | L73N/G75S | G75N/E77S | E77N/K79S |
| G78N/N80S | E82S | L83N | E82N/F84S |
| T85N/K87S | R86N/I88S | D95N/D97S | G114N |
| D119N/G121S | K122S | R243N/K245S | E264N/E266S |
| T293N/R295S | K388N | D389N/Y391S | T428N/G430S |
| R429N/I431S | E215N/N217S | | |

Típicamente, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento que tiene alterada la glicosilación retienen al menos una actividad de FX. En algunos casos, los niveles de glicosilación alterados o los cambios en el tipo de glicosilación presentes en un polipéptido de FX modificado en comparación con un polipéptido de FX sin modificar pueden manifestarse como una actividad catalítica aumentada y/o un aumento en la resistencia a los inhibidores, tales como AT-III. El aumento de la actividad puede ser en virtud de la glicosilación añadida, o puede ser en virtud de las modificaciones de aminoácidos secundarias que actúan de forma independiente o en concierto con la glicosilación alterada para efectuar los cambios en la actividad. La Sección D.2 y la Sección D.3 describen modificaciones ilustrativas que se pueden combinar con cualquiera de las modificaciones proporcionadas en el presente documento para alterar la glicosilación.

Por ejemplo, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento que tienen alterada la glicosilación presentan, cuando están en forma activa, semivida aumentada, aumento de la actividad catalítica y/o aumento de la actividad coagulante en comparación con un FX sin modificar. La semivida de los polipéptidos de FX modificados con glicosilación alterada puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación en comparación con la semivida I polipéptido de FX sin modificar o natural. Se puede determinar la semivida utilizándola como se mide en los ensayos conocidos en la técnica, tal como llevando a cabo los estudios de la farmacocinética (PK) o aclaramiento como se describe en el presente documento (por ejemplo, Ejemplo 7). La actividad catalítica de los polipéptidos de FX modificados con glicosilación alterada puede estar aumentada en al menos o aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o más en comparación con la actividad catalítica del polipéptido de FX sin modificar o natural como se midió en los ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*. El

aumento en la actividad catalítica puede ser dependiente de FVa y/o independiente de FVa. Típicamente, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento que tienen la glicosilación alterada retienen la actividad catalítica dependiente de FVa o presentan un aumento en la actividad dependiente de FVa de tal manera que los polipéptidos modificados presentan un aumento en la dependencia del cofactor. Ilustrativos de dichos polipéptidos de FX modificados son los que se muestran en la Sección D.2.

En otros ejemplos, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento que tienen alterada la glicosilación presentan, cuando están en forma activa, un aumento de la resistencia a los inhibidores, tal como una resistencia aumentada a AT-III en comparación con un FX sin modificar. La resistencia a los inhibidores, tales como AT-III, de los polipéptidos de FX modificados con glicosilación alterada puede ser al menos de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 1500 veces, 2000 veces, 2500 veces, 3000 veces, 3500 veces, 4000 veces, 4500 veces, 5000 veces, 5500 veces, 6000 veces o más de aumento. Por lo tanto, cuando se evalúan en un ensayo adecuado *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*, los polipéptidos de FX modificados que tiene la glicosilación alterada puede presentar un aumento de la resistencia a AT-III en comparación con el del aumento de los polipéptidos de FX sin modificar. Ilustrativos de dichos polipéptidos de FX modificados son los que se muestran en la Sección D.3.

2. Aumento en la dependencia del cofactor

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FX modificados, incluyendo un zimógeno de FX modificado y polipéptidos de FXa modificados, que contienen una o más modificaciones en un polipéptido FX y que, cuando está en una forma activa de FXa, presenta mayor actividad catalítica en presencia del cofactor de FVa (actividad dependiente de FVa) en comparación con la ausencia de FVa (actividad independiente de FVa). Las modificaciones pueden ser inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos. En particular, las modificaciones son sustituciones de aminoácidos. Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, cuando están en forma activa, presenta un aumento en la dependencia del cofactor como una relación de actividad catalítica en presencia de FVa a la de en ausencia de FVa en comparación con el FXa que no contiene las modificaciones.

Aunque FVa actúa para aumentar sustancialmente la actividad de FXa, FXa natural presenta alguna actividad incluso en ausencia de FVa. Por ejemplo, como se ilustra en los Ejemplos en el presente documento, la dependencia del cofactor del FXa natural (por ejemplo, derivado en plasma o producido de forma recombinante) es aproximadamente de 3.000. Como se ha descrito anteriormente, la actividad independiente de FVa puede dar como resultado actividades no deseadas que limitan el uso de FXa como una sustancia terapéutica. Se encuentra en el presente documento que limitar o reducir la actividad independiente de FVa puede llevarse a cabo reteniendo a la vez las actividades dependientes de FVa. Los cambios en la actividad catalítica en presencia de FVa pueden manifestarse como un aumento de la actividad coagulante dependiente de FVa. Por lo tanto, se pueden reducir, minimizar o eliminar las actividades no deseadas, manteniendo a la vez la actividad de la protrombina en las superficies de la membrana para efectuar la formación del coágulo requerido para las aplicaciones terapéuticas. Las proteasas modificadas proporcionadas en el presente documento, como polipéptidos de FXa activos, presentan mucha más potencia que el FXa natural, pero puede ser mucho más seguro debido a que la forma libre en circulación puede sola presentar una actividad cuando se une al cofactor de FVa en el sitio de una herida.

El aumento de la dependencia del cofactor se consigue por la modificación de uno o más restos de aminoácidos en la cadena pesada de FX que se asocia(n) con el cambio de conformación del zimógeno de FX a FXa. Normalmente, FX existe en un equilibrio de formas conformacionales desde zimógeno a la proteasa activa, que favorece a la forma zimógena antes de la activación y favorece la forma de FXa después de la activación. En la forma zimógena, el bolsillo con especificidad primaria (por ejemplo, el sitio de unión de S1) y el orificio oxianiónico no están presentes o están estabilizados en sus "conformaciones activas", que vuelven inactiva la forma zimógena. Además, los sitios extendidos de especificidad del sustrato (exositos) y sitios de unión a FVa no están adecuadamente formados o estabilizados en "conformaciones activas". Se puede cambiar la transición al estado activo alterado tras la escisión del enlace entre Arg194-Ile195 (Arg15-Ile16 en la numeración de la quimotripsina), que da como resultado la creación de un extremo N nuevo que está implicado en la formación de un puente salino con Asp378 (Asp194 en la numeración de la quimotripsina). La transición a un estado de proteasa puede también producirse sin escisión del enlace mediante la presencia de interacciones estabilizantes con la forma de FXa. Por ejemplo, el cofactor de FVa proporciona una fuerte interacción estabilizante con FXa y desplaza el equilibrio a la forma de FXa.

Tras la escisión del enlace, esta transición del zimógeno a enzima activa se asocia también con otros cambios de conformación de la proteasa para producir una enzima activa. Por ejemplo, cambios de conformación en el dominio de activación, que corresponde a los restos 195-198, 325-334, 366-377 y 400-406 en la numeración madura con referencia a la SEQ ID NO:134 (que corresponde a los restos 16-19, 142-152, 184-193 y 216-223 mediante numeración de la quimotripsina), reordena y estabiliza el bolsillo de especificidad primaria o el sitio de unión al sustrato y el orificio oxianiónico (Toso et al. (2008) J. Biol. Chem., 283:18627-18635). Además, el exosito 1 formado por bucles que contienen los restos 213-219 y 249-259 (que corresponden a los restos 34-40 y 70-80 mediante numeración de la quimotripsina), que está implicado en la unión de la protrombina y la catálisis, existe en un estado

de proexosito y se expresa solo en una configuración activa con los cambios de conformación que acompañan a la transición (Bock et al. (2007) *J. Thromb. Haemost.*, 5:81-94). El cambio de conformación del zimógeno a la enzima activa conduce también a la expresión del sitio de unión a FVa que incluye Arg347, Lys351 y Lys414 en el exosito 2 que forma el epítipo de unión al núcleo del cofactor (véase también Bianchini (2004) *J Biol. Chem.*, 279:3671-3679). La conformación de la enzima activa se estabiliza también tras la unión del sustrato.

El equilibrio de conformación de las proteínas de FX puede desplazarse mediante la modificación de los restos de aminoácidos que se asocian con el zimógeno para la transición de la enzima activa. La modificación en estos restos puede desplazar el equilibrio a un estado análogo a zimógeno. Los restos asociados con el zimógeno para la transición de la enzima activa incluyen los restos en el extremo N nuevo, tales como los restos de aminoácidos 195-198 (que corresponden a los restos 16-19 mediante numeración de la quimotripsina). Otros restos asociados con la transición del zimógeno incluyen los restos en el dominio de activación y los exositos (que se muestran anteriormente) que juegan de forma directa un papel en el cambio de conformación o están energéticamente unidos de otra forma. La mutación de los restos en estas regiones puede dar como resultado perturbaciones estructurales del dominio de activación y/o los exositos de la enzima activada en el proceso de transición, alterando por tanto la unión del sustrato y/o la catálisis que da como resultado una actividad análoga a zimógeno. Por ejemplo, parte del dominio de activación es el bucle de autólisis (que corresponde a los restos 142-152 mediante numeración de la quimotripsina), que si se altera estructuralmente puede dar como resultado una proteólisis reducida del sustrato. Por lo tanto, las mutaciones en estas regiones pueden desestabilizar adicionalmente la forma de FXa, dando como resultado un desplazamiento en el equilibrio en favor de un estado análogo a zimógeno. Se encuentra en el presente documento que la modificación de los restos asociados con o en estrecha proximidad a los dominios anteriores puede también modificarse y afectar a la actividad independiente de FV dando como resultado proteasas que presentan una dependencia del cofactor sustancialmente aumentada. Los restos de la tríada catalítica no están dirigidos para la mutagénesis (por ejemplo His236, Asp282 y Ser379 con referencia a la SEQ ID NO:134), debido a que se requieren para la actividad catalítica.

En particular, las modificaciones se realizan en restos en el segmento peptídico del extremo N que inicia la transición a FXa tras la escisión del enlace a fin de alterar la formación de o desestabilizar el puente salino intermolecular u otros cambios de conformación "acoplados" que se producen durante la transición del zimógeno a enzima activa descrita anteriormente. Por ejemplo, Ile195 y también en alguna extensión Va1196 en FXa están soterrados con el resto de la proteína, por lo cual, un grupo α -amonió de Ile 195 y el grupo carboxilato de la cadena secundaria de Asp378 forman un puente salino interno. Este puente salino estabiliza la enzima activa. La alteración del puente salino, mediante modificación, por ejemplo, de los restos de aminoácidos en las posiciones 195, 196 y/o 378, se encuentra que dan como resultado una transformación de la estructura de la enzima activa hacia una estructura análoga a zimógeno. La modificación de los restos adyacentes 197 y 198 también son objetivos de modificación para transformar la enzima en una estructura análoga a zimógeno.

Además, las modificaciones proporcionadas en el presente documento incluyen aquellas en los restos de la tríada del zimógeno que se sabe que estabilizan el estado del zimógeno en algunas serina proteasas. Por ejemplo, en la estructura del zimógeno del quimotripsinógeno y el tripsinógeno, la cadena secundaria que corresponde a Asp378 (Asp194 mediante numeración de la quimotripsina) es estabiliza mediante un par de iones con una histidina soterrada en la posición 211 (His40 mediante numeración de la quimotripsina), que también forma un enlace de hidrógeno con la posición 219 (Ser32 mediante numeración de la quimotripsina) (Madison et al. (1993) *Science*, 262:419-421). Esta tríada de zimógenos (Asp194-His40-Ser32, mediante numeración de la quimotripsina) estabiliza la forma zimógena. La tríada de zimógenos correspondiente no está presente en FX, debido a que una leucina (L) está presente en la posición 211 (correspondiente a la posición 32 mediante numeración de la quimotripsina) y una glicina (G) está presente en la posición 219 (que corresponde a la posición 40 mediante numeración de la quimotripsina). Por lo tanto, las modificaciones en el presente documento incluyen aquellas en que una tríada de zimógenos correspondiente (Asp194-His40-Ser32, mediante numeración de la quimotripsina) se forma en FX.

Al igual que la forma zimógena de FX, un polipéptido de FXa en un estado de conformación análogo a zimógeno presenta poca actividad catalítica. Como se ha descrito anteriormente, la actividad puede estar regulada por el cofactor de FVa. Las formas zimógenas de FX, y las formas análogas a zimógeno de FXa, presentan generalmente afinidad reducida por FVa, debido de forma presumible a que se requiere la activación de la conformación del dominio de la proteasa para exponer el sitio de unión de FVa. No obstante, debido a que FVa es tal como un estabilizante fuerte, el equilibrio del estado de conformación análogo a zimógeno a FXa puede rescatarse en presencia de una fuerte estabilización del cofactor FVa en exceso. Por lo tanto, en los ejemplos en el presente documento, las variantes análogas a zimógeno presentan poca actividad en ausencia de FVa, pero pueden presentar sustancial actividad en presencia de FVa. Los polipéptidos de FX resultantes, cuando están en forma activa, presentan una relación de actividad catalítica en presencia de FVa en comparación con en ausencia de FVa (denominada también la dependencia relativa del cofactor) que está aumentada en comparación con el FXa que no contiene las modificaciones. El aumento en la dependencia del cofactor puede ser debido a una disminución en la actividad catalítica en ausencia de FVa y/o un aumento en la actividad catalítica en presencia de FVa.

Por ejemplo, Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, cuando está en una forma activa de FXa, presentan una dependencia relativa del cofactor de más de 5000, tal como más de 10.000;

20.000; 30.000; 40.000; 50.000; 100.000; 200.000; 300.000; 400.000; 500.000; 600.000; 700.000; 800.000; 900.000; 1.000.000; 2.000.000; 3.000.000; 4.000.000; 5.000.000; 6.000.000; 7.000.000; 8.000.000; 9.000.000; 10.000.000; 15.000.000; 20.000.000; 25.000.000; 30.000.000; 35.000.000; 40.000.000; 45.000.000; 50.000.000 o más. En comparación con FXa que no contiene las modificaciones, la dependencia relativa del cofactor está aumentada al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 1500 veces, 2000 veces, 2500 veces, 3000 veces, 4000 veces, 4500 veces, 5000 veces, 6000fold, 7000 veces, 8000 veces, 9000 veces, 10000 veces, 15000 veces, 20000 veces o más. Por lo tanto, cuando se evalúan en un ensayo adecuado *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*, los polipéptidos de FX modificados pueden presentar un aumento en la dependencia del cofactor en comparación con el de los polipéptidos de FX sin modificar.

Incluidos entre dichos polipéptidos FX modificados están aquellos que contienen una(s) modificación(ones) en la(s) posición(ones) de aminoácido(s) 195, 196, 197, 198, 200, 202, 211, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 273, 276, 306, 326, 327, 332, 334, 336, 338, 378, 420 y/o 424 en la cadena pesada de un FX que corresponde a las posiciones que se muestran en la SEQ ID NO:134. Por ejemplo, los polipéptidos de FX modificados que se proporcionan en el presente documento incluyen aquellos que contienen una(s) modificación(ones) en una(s) posición de aminoácido(s) 198, 202, 211, 214, 217, 219, 327 y/o 338. En general, la modificación es una sustitución de aminoácido. La sustitución de aminoácido puede ser en cualquiera de los otros 19 aminoácidos en esta posición siempre que el polipéptido de FX modificado resultante, cuando está en forma activa, presente un aumento en la dependencia del cofactor en comparación con el FXa que no contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) y retenga la actividad catalítica dependiente de FVa.

En un ejemplo, los polipéptidos de FX modificados contienen al menos una(s) modificaciones de aminoácido(s), de tal manera que al menos una(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) en la posición correspondiente a 195, 196, 197, o 198, por ejemplo, al menos en la posición 196, como se muestra en la SEQ ID NO: 134 (posición 16-19 mediante numeración de la quimotripsina). Estos restos de aminoácidos corresponden a los restos hidrófobos en el extremo N nuevo que está expuesto tras la activación por escisión del zimógeno de FX. Como se describe en otra parte del presente documento, los restos hidrófobos en el extremo N forman un puente salino con el resto Asp378 (Asp194 mediante numeración de la quimotripsina) que es necesario para la transición desde el estado inactivo al estado activo. Por ejemplo, el resto Val que está presente en la posición 196 con referencia a la numeración del polipéptido FX ilustrativo que se muestra en la SEQ ID NO: 134 es hidrófobo y es adecuado para esta interacción. Se encuentra en el presente documento que la modificación de los restos de aminoácidos 195, 196, 197 y/o 198 en el extremo N (que corresponden a los restos 16-19 mediante numeración de la quimotripsina) a un resto de aminoácido hidrófilo neutro que contiene un grupo R polar actúa particularmente para alterar o desestabilizar la formación del puente salino. Ilustrativos de dichos restos de aminoácidos para la sustitución son Asn (N), Gln (Q), Ser (S), Thr (T), Cys (C) o Tyr (Y).

Las modificaciones ilustrativas proporcionadas en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, la sustitución de aminoácidos en un polipéptido FX no modificado con: I en una posición que corresponde a la posición 196; S en una posición que corresponde a la posición 196; L en una posición que corresponde a la posición 196; T en una posición que corresponde a la posición 196; S en una posición que corresponde a la posición 197; S en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 200; V en una posición que corresponde a la posición 200; S en una posición que corresponde a la posición 202; S en una posición que corresponde a la posición 211; D en una posición que corresponde a la posición 214; A en una posición que corresponde a la posición 214; S en una posición que corresponde a la posición 214; N en una posición que corresponde a la posición 215; R en una posición que corresponde a la posición 216; K en una posición que corresponde a la posición 216; A en una posición que corresponde a la posición 216; S en una posición que corresponde a la posición 216; S en una posición que corresponde a la posición 217; R en una posición que corresponde a la posición 218; K en una posición que corresponde a la posición 218; A en una posición que corresponde a la posición 218; H en una posición que corresponde a la posición 219; A en una posición que corresponde a la posición 273; E en una posición que corresponde a la posición 273; A en una posición que corresponde a la posición 276; E en una posición que corresponde a la posición 276; E en una posición que corresponde a la posición 306; S en una posición que corresponde a la posición 326; T en una posición que corresponde a la posición 326; V en una posición que corresponde a la posición 326; Q en una posición que corresponde a la posición 326; N en una posición que corresponde a la posición 326; M en una posición que corresponde a la posición 326; K en una posición que corresponde a la posición 326; Y en una posición que corresponde a la posición 326; E en una posición que corresponde a la posición 326; D en una posición que corresponde a la posición 326; A en una posición que corresponde a la posición 327; L en una posición que corresponde a la posición 327; A en una posición que corresponde a la posición 332; D en una posición que corresponde a la posición 332; E en una posición que corresponde a la posición 332; S en una posición que corresponde a la posición 332; G en una posición que corresponde a la posición 332; A en una posición que corresponde a la posición 334; T en una posición que corresponde a la posición 334; E en una posición que corresponde a la posición 334; N en una posición que corresponde a la posición 338; S en una posición que corresponde a la posición 338; A en una posición que corresponde a la posición 338; N en una posición que

- corresponde a la posición 338; V en una posición que corresponde a la posición 338; Y en una posición que corresponde a la posición 338; M en una posición que corresponde a la posición 338; A en una posición que corresponde a la posición 420; E en una posición que corresponde a la posición 420; A en una posición que corresponde a la posición 424; y/o E en una posición que corresponde a la posición 424, cada una con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134. El polipéptido de FX modificado puede contener uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de cualquiera de las anteriores sustituciones de aminoácidos, donde cada sustitución se realiza en una posición diferente, siempre que el polipéptido de FX modificado resultante, cuando está en forma activa, presenta un aumento en la dependencia del cofactor y retiene una actividad catalítica dependiente de FVa. Dichos polipéptidos de FX modificados incluyen aquellos que presenta al menos un aumento de 2 veces en la dependencia del cofactor, cuando está en forma activa, en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene la una o varias modificaciones. Con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, se muestran en las Tablas 5 y 6 dichas sustituciones de aminoácidos no limitantes en un polipéptido de FX proporcionado en e presente documento.

| Tabla 5 | | | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|--|--|
| | V196S | V196L | V196T | G197S | G197A | E200A | | | |
| V196I | V196S | V196L | V196T | G197S | G197A | E200A | | | |
| E200V | K202S | L211S/G219H | N214D | N214A | N214S | E215N | | | |
| E216R | E216K | E216A | E216S | N217S | E218R | E218K | | | |
| E218A | T327A/K338A | R273A | R273E | K276A | K276E | R306E | | | |
| R326S | R326T | R326V | R326Q | R326N | R326M | R326K | | | |
| R326Y | R326E | R326D | T327A | T327L | R332A | R332D | | | |
| R332G | S334A | S334T | S334N | R336E | K338A | K338S | | | |
| K338N | K338R | K338V | K338Y | K338M | K420A | K420E | | | |
| K424A | K424E | E200V/T327L/K338M | E220V/T327L/S334A/K338M | V196S/I211S/G219H | G197A/I211S/G219H | I195L/I211S/G219H | | | |
| V196S/E216K | V196S/E216A | V196S/E216S | V196S/E218R | V196S/E218K | V196S/E218A | V196S/R332A | | | |
| V196S/R332D | V196S/R332E | V196S/R332S | V196S/R332G | V196S/R326D | V196S/R326M | V196S/R326N | | | |
| V196S/R326Q | V196S/R273E | V196S/R273A | V196S/R424E | V196S/K420A | V196S/K420E | V196S/R306E | | | |
| V196S/N214D | V196S/N214A | V196S/N214S | V196S/E216R | V196S/K276A | V196S/K276E | V196S/K420E/R424E | | | |
| V196S/K338A | V196S/K338S | T327A/K338A | | | | | | | |

Pueden estar también incluidas sustituciones de aminoácidos adicionales en los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento y pueden ser cualquiera de otras sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento o conocidas en la materia, siempre que los polipéptidos de FX modificados resultantes presenten al menos un aumento de 2 veces en la dependencia del cofactor, cuando está en forma activa, en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene las modificaciones y que retiene la actividad catalítica dependiente de FVa. Por ejemplo, las modificaciones adicionales incluyen cualesquiera modificaciones adicionales descritas en el presente documento para aumentar la resistencia a los inhibidores, tales como AT-III (por ejemplo, Sección D.3) y/o para alterar la glicosilación (por ejemplo, Sección D.1). Las sustituciones ilustrativas de aminoácidos para introducir un sitio de glicosilación no nativo incluyen, aunque no de forma limitativa, sustitución(ones) de aminoácido(s) en un polipéptido de FX sin modificar con: N en una posición que corresponde a la posición 51; N en una posición que corresponde a la posición 56 y S en una posición que corresponde a la posición 58; N en una posición que corresponde a la posición 62 y S en una posición que corresponde a la posición 64; N en una posición que corresponde a la posición 65 y S en una posición que corresponde a la posición 67; N en una posición que corresponde a la posición 67; N en una posición que corresponde a la posición 73 y S en una posición que corresponde a la posición 75; N en una posición que corresponde a la posición 75 y S en una posición que corresponde a la posición 77; N en una posición que corresponde a la posición 77 y S en una posición que corresponde a la posición 79; N en una posición que corresponde a la posición 78 y S en una posición que corresponde a la posición 80; S en una posición que corresponde a la posición 82; N en una posición que corresponde a la posición 83; N en una posición que corresponde a la posición 82 y S en una posición que corresponde a la posición 84; N en una posición que corresponde a la posición 85 y S en una posición que corresponde a la posición 87; N en una posición que corresponde a la posición 86 y S en una posición que corresponde a la posición 88; N en una posición que corresponde a la posición 95 y S en una posición que corresponde a la posición 97; N en una posición que corresponde a la posición 114; N en una posición que corresponde a la posición 119 y S en una posición que corresponde a la posición 121; S en una posición que corresponde a la posición 122; N en una posición que corresponde a la posición 215 y S en una posición que corresponde a la posición 217; N en una posición que corresponde a la posición 243 y S en una posición que corresponde a la posición 245; N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que corresponde a la posición 266; N en una posición que corresponde a la posición 293 y S en una posición que corresponde a la posición 295; N en una posición que corresponde a la posición 388; N en una posición que corresponde a la posición 389 y S en una posición que corresponde a la posición 391; N es una posición que corresponde a la posición 428 y S en una posición que corresponde a la posición 430 y/o N en una posición que corresponde a la posición 429 y S en una posición que corresponde a la posición 431, cada una en referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134. Con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, se muestran en la Tabla 6 las sustituciones de aminoácidos no limitantes en un polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento.

| | | | | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------|
| L73N/G75S/V196S | G75N/E77S/V196S | R86N/I88S/V196S | G114N/V196S | D95N/D97S/V196S | E82SN196S |
| G78N/N80S/V196S | E77N/K79S/V196S | D119N/G121S/V196S | L83N/V196S | K122SN196S | E51NN196S |
| G114N/D119N/G121SN196S | D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/K388N | T85N/K87S/V196S | Q56N/Q58S/V196S | K62N/G64S/V196S | D119N/G121S/V196S/I211S/G219H |
| G114N/D119N/G121SN196S/L211S/G219H | L65N/E67SV196S | E67NN196S | V196S/E215N/N217S | V196S/E264N/E266S | G114N/V196S/L211SG219H/K388N |
| D119N/G121S/V196S/E264N/E266S | G114N/V196S/E264N/E266S | V196S/R429N/L431S | V196S/R243N/K245S | V196S/T293N/R295S | V196S/D389N/Y391S |
| D119N/G121S/V196S/K388N | V196S/T428N/G430S | V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | G114N/V196S/L211S/G219H/E264N/E266S | V196S/E264N/E266S/K388N |
| E82N/F84S/V196S | Q58N/K60S/V196S | G114N/V196S/L211S/G219H | V196S/I211S/G219H/E264N/E266S/K388N | V196S/K388N | |

En ejemplos particulares, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento incluyen al menos una modificación que es, aunque no de forma limitativa, la sustitución de aminoácidos en un polipéptido FX no modificado con: S en una posición que corresponde a la posición 196; T en una posición que corresponde a la posición 196; S en una posición que corresponde a la posición 197; S en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 200; V en una posición que corresponde a la posición 200; S en una posición que corresponde a la posición 202; S en una posición que corresponde a la posición 211; D en una posición que corresponde a la posición 214; A en una posición que corresponde a la posición 214; S en una posición que corresponde a la posición 214; N en una posición que corresponde a la posición 215; R en una posición que corresponde a la posición 216; A en una posición que corresponde a la posición 216; S en una posición que corresponde a la posición 216; S en una posición que corresponde a la posición 217; R en una posición que corresponde a la posición 218; A en una posición que corresponde a la posición 218; H en una posición que corresponde a la posición 219; E en una posición que corresponde a la posición 273; E en una posición que corresponde a la posición 276; E en una posición que corresponde a la posición 306; S en una posición que corresponde a la posición 326; T en una posición que corresponde a la posición 326; V en una posición que corresponde a la posición 326; N en una posición que corresponde a la posición 326; M en una posición que corresponde a la posición 326; K en una posición que corresponde a la posición 326; Y en una posición que corresponde a la posición 326; E en una posición que corresponde a la posición 326; D en una posición que corresponde a la posición 326; A en una posición que corresponde a la posición 327; L en una posición que corresponde a la posición 327; D en una posición que corresponde a la posición 332; E en una posición que corresponde a la posición 332; S en una posición que corresponde a la posición 332; G en una posición que corresponde a la posición 332; A en una posición que corresponde a la posición 334; T en una posición que corresponde a la posición 334; N en una posición que corresponde a la posición 334; E en una posición que corresponde a la posición 336; A en una posición que corresponde a la posición 338; S en una posición que corresponde a la posición 338; N en una posición que corresponde a la posición 338; R en una posición que corresponde a la posición 338; V en una posición que corresponde a la posición 338; Y en una posición que corresponde a la posición 338; M en una posición que corresponde a la posición 338; E en una posición que corresponde a la posición 420; y/o E en una posición que corresponde a la posición 424, cada una en referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134.

En los ejemplos en el presente documento, Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, incluido el FX zimógeno modificado o FXa, tienen al menos una sustitución de aminoácido en un polipéptido de FX sin modificar que es una sustitución con S en una posición que corresponde a la posición 211 o una sustitución con H en una posición que corresponde a la posición 219 con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134. El polipéptido de FX modificado puede contener dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más sustituciones de aminoácidos, donde cada sustitución se realiza en una posición diferente, siempre que el polipéptido de FX modificado resultante, cuando está en forma activa, presenta un aumento en la dependencia del cofactor y retiene una actividad catalítica dependiente de FVa. Por ejemplo, Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, incluido el FX zimógeno modificado o FXa, tienen al menos dos sustituciones de aminoácidos en un polipéptido de FX sin modificar que es una sustitución con S en una posición que corresponde a la posición 211 o una sustitución con H en una posición que corresponde a la posición 219 con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134. Otras sustitución(ones) de aminoácidos pueden ser cualquier otra sustitución de aminoácidos descrita en el presente documento o conocida en la materia. En un ejemplo concreto, una sustitución de aminoácidos adicional se realiza en la posición 195, 196, 197 o 198. Ilustrativos de dichas sustituciones de aminoácidos incluyen, aunque no de forma limitativa, la sustitución con: L en una posición que corresponde a la posición 195; la sustitución con V en una posición que corresponde a la posición 195; la sustitución con S en una posición que corresponde a la posición 195; la sustitución con T en una posición que corresponde a la posición 195; la sustitución con I en una posición que corresponde a la posición 195; la sustitución con A en una posición que corresponde a la posición 195; la sustitución con D en una posición que corresponde a la posición 195; la sustitución con G en una posición que corresponde a la posición 195; la sustitución con I en una posición que corresponde a la posición 196; la sustitución con A en una posición que corresponde a la posición 196; la sustitución con S en una posición que corresponde a la posición 196; la sustitución con L en una posición que corresponde a la posición 196; la sustitución con F en una posición que corresponde a la posición 196; la sustitución con I en una posición que corresponde a la posición 196; la sustitución con T en una posición que corresponde a la posición 196; la sustitución con G en una posición que corresponde a la posición 196; S en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 197; N en una posición que corresponde a la posición 197; H en una posición que corresponde a la posición 197; y R en una posición que corresponde a la posición 197. En otros ejemplos, las modificaciones adicionales incluyen cualesquiera modificaciones adicionales descritas en el presente documento para aumentar la resistencia a los inhibidores, tales como AT-III (Sección D.3) y/o para aumentar la alteración de la glicosilación (Sección D.1). Dichos polipéptidos de FX modificados incluyen aquellos que presenta al menos un aumento de 2 veces en la dependencia del cofactor, cuando está en forma activa, en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene la una o varias modificaciones. Con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, se muestran en la Tabla 7 las sustituciones de aminoácidos no limitantes en un polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento.

Tabla 7

| | | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|---|------------------------------------|
| L211S/G219H | V196L/I211S/G219H | G197A/I211S/G219H | 1195L/I211S/G219H |
| D119N/G121S/V196S/I211S/G219H | G114N/V196S/I211S/G219H | G114N/D119N/G121 S/V 196S/I211S/G219H | G114N/V196S/I211S G219H/K388N |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S/K388N | V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | G114NN196S/I211S/G219H/E264N/E266S |
| D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/K388N | | | |

En los ejemplos concretos del presente documento, Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, incluido el FX zimógeno modificado o FXa, tienen al menos una sustitución de aminoácido en un polipéptido de FX sin modificar que es una sustitución con S en una posición que corresponde a la posición 196; L en una posición que corresponde a la posición 196; T en una posición que corresponde a la posición 196; S en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 200; V en una posición que corresponde a la posición 200; S en una posición que corresponde a la posición 202; A en una posición que corresponde a la posición 338; S en una posición que corresponde a la posición 338; o V en una posición que corresponde a la posición 338, cada una en referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134. El polipéptido de FX modificado puede contener dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más sustituciones de aminoácidos, donde cada sustitución se realiza en una posición diferente, siempre que el polipéptido de FX modificado resultante, cuando está en forma activa, presenta un aumento en la dependencia del cofactor y retiene una actividad catalítica dependiente de FVa. Otras sustitución(ones) de aminoácidos pueden ser cualquier otra sustitución de aminoácidos descrita en el presente documento o conocida en la materia. Por ejemplo, las modificaciones adicionales incluyen cualesquiera modificaciones adicionales descritas en el presente documento que aumentan la independencia del cofactor, cualquiera que aumente la resistencia a los inhibidores, tales como AT-III (Sección D.3) y/o para alterar la glicosilación (Sección D.1). Dichos polipéptidos de FX modificados incluyen aquellos que presenta al menos un aumento de 10 veces en la dependencia del cofactor, cuando está en forma activa, en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene la una o varias modificaciones. Con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, se muestran en la Tabla 8 y la Tabla 9 dichas sustituciones de aminoácidos no limitantes en un polipéptido de FX proporcionado en el presente documento.

Tabla 8

| | | | | |
|-------------------------|------------------|-------|-------|-------------|
| V196S | V196T | V196L | V196T | G197S |
| K202S | K338A | K338S | K338V | T327A/K338A |
| E200V/T327L/S334A/K338M | G197A/I211/G219H | | | |

En ejemplos particulares, Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, incluido el FX zimógeno modificado o FXa, que presentan un aumento en la dependencia del cofactor en su forma activa tienen al menos una sustitución de aminoácido en un polipéptido de FX sin modificar en la posición de aminoácido 196 de un resto de aminoácido no polar, neutro o hidrófilo. Por lo tanto, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento contienen al menos una modificación de aminoácido, tal como al menos la sustitución de un aminoácido, que es una sustitución con N, Q, S, T, W, C, o Y en una posición que corresponde a la posición 196 con referencia a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 134. Dichos polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento incluyen aquellos que presentan al menos un aumento de 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, y generalmente al menos 50 veces, tal como al menos 100 veces o más, de aumento en la dependencia del cofactor, cuando está en forma activa, en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene la una o varias modificaciones. Ilustrativo de dicho polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento es un polipéptido de FX, incluyendo un zimógeno de FX modificado o FXa, que contiene al menos una sustitución de aminoácido que es una sustitución con S en una posición que corresponde a la posición 196. El polipéptido de FX modificado puede contener dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más sustituciones de aminoácidos, donde cada sustitución se realiza en una posición diferente, siempre que el polipéptido de FX modificado resultante, cuando está en forma activa, presenta al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, y generalmente al menos 50 veces, tal como al menos 100 veces o más, de aumento en la dependencia del cofactor y retiene una actividad catalítica dependiente de FVa. Otras sustitución(ones) de aminoácidos pueden ser cualquier otra sustitución de aminoácidos descrita en el presente documento o conocida en la materia. Por ejemplo, las modificaciones adicionales incluyen cualesquiera modificaciones adicionales descritas en el presente documento que aumentan la independencia del cofactor, cualquiera que aumente la resistencia a los inhibidores, tales como AT-III (Sección D.3) y/o cualquiera para alterar la glicosilación (Sección D.1). Con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, se muestran en la Tabla 9 las sustituciones de aminoácidos no limitantes en un polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento.

50

Tabla 9

| | | | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| V196S | V196S/I211S/G219H | V196S/N214D | V196S/N214A | V196S/N214S |
| V196S/E216R | V196S/E216K | V196S/E216A | V196S/E216S | V196S/E216S |
| V196S/E218R | V196S/E218K | V196S/E218A | V196S/R332A | V196S/R332D |
| V196S/R332E | V196S/R332S | V196S/R332G | V196S/R326D | V196S/R326M |
| V196S/R326N | V196S/R326Q | V196S/R273E | V196S/R273A | V196S/R424A |
| V196S/R424E | V196S/K420A | V196S/K420E | V196S/R306E | V196S/K276A |
| V196S/K276E | V196S/K338A | V196S/K338S | E82SA/196S | E82N/F84SA/196S |
| L73N/G75S/V196S | G75N/E77S/V196S | R86N/I88SA/196S | G114NA/196S | D95N/D97SA/196S |
| G78N/N80S/V196S | E77N/K79SA/196S | D119N/G121SA/196S | L83NA/196S | K122SA/196S |
| E51N/V196S | Q58N/K60S/V196S | G114N/D119N/G121SA/196S | D119N/G121SA/196S/I211S/G219H/K388N | T85N/K87SA/196S |
| Q56N/Q58S/V196S | K62N/G64S/V196S | D119N/G121SA/196S/I211S/G219H | G114NA/196S/L211S/G219H | G114N/D119N/G121SA/196S/I211S/G219H |
| L65N/E67S/V196S | E67NA/196S | V196S/E215N/N217S | V196S/E264N/E266S | G114N/V196S/I211S/G219H/K388N |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S/K388N | D119N/G121SA/196S/E264N/E266S | G114NA/196S/E264N/E266S | V196S/R429N/I431S | V196S/R243N/K245S |
| V196S/T293N/R295S | V196S/D389N/Y391S | V196S/K388N | D119N/G121SA/196S/K388N | V196S/T428N/G430S |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | D119N/G121SA/196S/I211S/G219H/E266S | G114NA/196S/I211S/G219H/E266S | V196S/E264N/E266S/K388N | V196S/K420E/R424E |
| V196S/E215N/N217S | | | | |

3. Resistencia aumentada a los inhibidores

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos de FX modificados, incluyendo un zimógeno de FX modificado y polipéptidos de FXa modificados, que contienen una o más modificaciones en un polipéptido FX y que, cuando está en una forma activa de FXa, presentan una resistencia aumentada a la inhibición mediante un inhibidor de FX. Los inhibidores de FX incluyen, por ejemplo, el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI) y la antitrombina III (AT-III). Las modificaciones pueden ser inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. En particular, las modificaciones son sustituciones de aminoácidos.

TFPI es un inhibidor de tipo Kunitz. TFPI tiene una secuencia precursora de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:557 y tiene una secuencia madura que corresponde a los restos que se muestran como 29-304 de la SEQ ID NO: 557. TFPI es trivalente y contiene tres dominios de tipo Kunitz. TFPI inhibe directamente FXa a través de su segundo dominio de Kunitz (que corresponde a los restos 125-175 de la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO:557). TFPI es también capaz de inhibir el complejo del factor VIIa/tejido (TF), después que FXa se une, mediante su primer dominio de Kunitz (que corresponde a los restos 54-104 en la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO:557). La inhibición por TFPI es mayor en presencia de fosfolípidos y FVa. Al igual que ATIII a continuación, la actividad de TFPI está mediada por las interacciones de unión a sitio activo con FXa. Incluidos entre los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, tales como los polipéptidos de FX que son polipéptidos análogos a zimógeno, están aquellos que presentan una resistencia aumentada a TFPI debido a que las interacciones de unión están alteradas y/o no son accesibles a la inhibición por TFPI.

AT-III es un anticoagulante de serpina (inhibidor de la serina proteasa). AT-III se sintetiza como una proteína precursora que contiene 464 restos de aminoácidos (véase la SEQ ID NO:553). En el curso de la secreción, un péptido de señalización de 32 restos se escindió para generar una antitrombina humana madura de 432 aminoácidos (SEQ ID NO:554). La glicoproteína AT-III de 58 kDa circula en la sangre y funciona como un inhibidor de la serina proteasa (serpina) para inhibir un gran número de serina proteasa del sistema de coagulación. Los objetivos principales de AT-III son la trombina y el factor Xa, aunque se ha mostrado también que AT-III muestra inhibir las actividades de FIXa, FXIa, FXIIa y, en una menor medida, FVIIa (véase, por ejemplo, la Figura 2).

La acción de AT-III está muy potenciada por los glicosaminoglicanos, tal como el sulfato de heparán que se produce naturalmente o las diversas heparinas derivadas de tejidos que se usan ampliamente como anticoagulantes en la práctica clínica. AT-III se une de una manera muy específica a una única secuencia de pentasacárido en la heparina que induce un cambio de conformación en el bucle del centro reactivo (RCL). En dicha conformación, el bucle del centro reactivo de AT-III puede interactuar más eficazmente con el sitio reactivo de la serina proteasa, y efectuar la inhibición. Esta "activación" del ATIII RCL se puede inducir por el propio pentasacárido específico así como por otras formas de "bajo peso molecular" de la heparina y también por las formas de alto peso molecular de la heparina. La heparina de cadena larga (o heparina de "alto peso molecular"), que tiene sitios de unión en AT-III y FXa, actúa también como un molde para AT-III y FXa, poniéndolos por tanto en estrecha proximidad y facilitando además la interacción inhibitoria. En ausencia de heparina, AT-III es un inhibidor relativamente ineficaz de FXa (Quinsey et al. (2002) J. Biol. Chem., 277:15971-15978).

AT-III interactúa de forma específica con FXa y no con la forma zimógena de FX. El cambio de conformación que se produce tras la escisión del enlace Arg194-Ile195 (Arg15-Ile16 en la numeración de la quimotripsina) expone estructuralmente los exositos requeridos para AT-III y las interacciones de la heparina. La interacción de AT-III con FXa está mediada o potenciada por los restos extendidos en el sitio de unión a sustrato en el exosito 1, y específicamente los restos de ácido glutámico 215, 216 y 219 mediante la numeración madura (que corresponde a los sitios 36, 37 y 39 en la numeración de la quimotripsina (véase, por ejemplo, Quinsey *et al.* (2002) y Bianchini et al. (2004) J. Biol. Chem., 279:3671-3679). El exosito de unión a heparina de FXa está topológicamente localizado en el lado opuesto del exosito 1, e incluye los restos Arg273, Lys 276, Arg306, Arg347, Lys351, Lys420 y Arg424 en la numeración madura que se muestra en la SEQ ID NO:134 (que corresponde a Arg93, Lys96, Arg125, Arg165, Lys169, Lys236 y Arg240, en la numeración de la quimotripsina) (véase, por ejemplo, Rezaie (2000) J. Biol. Chem., 275:3320-7). Además, los restos básicos del bucle de la autólisis 326-336 (que corresponden a los restos 143-154 mediante numeración de la quimotripsina) juegan también un papel en el reconocimiento de la conformación activada por heparina de AT-III por FXa (Rezaie et al. (2005) J. Biol. Chem., 280:32722-32728; Bianchini *et al.* (2004)).

Se puede conseguir el aumento de la resistencia a los inhibidores, incluyendo TFPI o AT-III modificando uno o más restos en un polipéptido de FX asociado con una interacción inhibitoria (por ejemplo, AT-III o TFPI). Asimismo, se puede conseguir un aumento de la resistencia modificando uno o más restos implicados en las interacciones de la heparina. Por ejemplo, se pueden modificar uno o más restos en el exosito 1, el bucle de autólisis o en el exosito de unión a heparina. Además, las modificaciones que vuelven el polipéptido de FXa más análogo a zimógeno, alteran por tanto conformacionalmente el acceso a los sitios de unión anteriores, pueden conferir también un aumento de la resistencia a los inhibidores. Por lo tanto, las modificaciones para aumentar la resistencia a los inhibidores (por ejemplo, ATIII o TFPI) se pueden producir también en uno o más restos del dominio de activación que corresponden a los restos 195-198, 325-334, 366-377 y 400-406 en la numeración madura con referencia a la SEQ ID NO:134 (que corresponde a los restos 16-19, 142-152, 184-193 y 216-223 en la numeración de la quimotripsina) y/o los

restos 211, 219 o 378 para formar una tríada de zimógenos (véase, por ejemplo, Sección D.2 anterior).

5 Por ejemplo, Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, cuando están en una forma activa de FXa, presentan un aumento en la resistencia a los inhibidores (por ejemplo, AT-III o TFPI) en comparación con el FXa sin modificar que no contiene las modificaciones de al menos 2 veces, tal como al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 1500 veces, 2000 veces, 2500 veces, 3000 veces, 3500 veces, 4000 veces, 4500 veces, 5000 veces, 5500 veces, 6000 veces o más. Por lo tanto, cuando se evalúan en un ensayo
10 adecuado *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*, los polipéptidos de FX modificados pueden presentar un aumento en la resistencia a los inhibidores (por ejemplo, AT-III o TFPI) en comparación con el de los polipéptidos de FX sin modificar.

15 Incluidos entre dichos polipéptidos de FX modificados están aquellos que contienen una(s) modificación(ones) en el(los) resto(s) de aminoácido(s) 196, 197, 200, 202, 211, 214, 216, 218, 219, 273, 276, 306, 326, 327, 332, 334, 336, 338, 420 y/o 424 en la cadena pesada de un FX que corresponde a los restos que se muestran en la SEQ ID NO:134. En general, la modificación es una sustitución de aminoácido. La sustitución de aminoácido puede ser en cualquiera de los otros 19 aminoácidos en esta posición siempre que el polipéptido de FX modificado resultante, cuando está en forma activa, presenta un aumento en la resistencia a los inhibidores (por ejemplo, AT-III o TFPI) en
20 comparación con el FXa que no contiene la(s) sustitución(ones) de aminoácido(s) y retiene la actividad catalítica dependiente de FVa.

25 En ejemplos particulares, Las modificaciones para efectuar la resistencia a los inhibidores pueden ser modificaciones que vuelven el polipéptido de FXa más análogo a zimógeno, reduciendo por tanto de velocidad de unión del inhibidor (por ejemplo, unión de AT-III o unión de TFI). Por ejemplo, los polipéptidos de FX modificados que presentan un aumento de la resistencia a los inhibidores (por ejemplo, AT-III o TFPI) pueden contener al menos una(s) modificación(ones) de aminoácido(s), tal como al menos una(s) sustitución(ones) de aminoácido(S), en una posición que corresponde a la posición 195, 196, 197, o 198 con referencia a las posiciones que se muestran en la SEQ ID NO:134 (posición 16-19 en la numeración de la quimotripsina). Estos restos de aminoácidos corresponden a los
30 restos hidrófobos en el extremo N nuevo que se crea tras la activación por escisión del zimógeno de FX. Como se describe en otra parte del presente documento, tras la "activación por escisión" de los restos hidrófobos en la inserción del extremo N en el bolsillo de activación" y el α -amonió nuevo de Ile195 forma un puente salino con el resto Asp378 (que corresponde a Asp194 en la numeración de la quimotripsina) que es necesario para la transición desde el estado inactivo al estado activo. Por ejemplo, el resto Val que está presente en el polipéptido de FX ilustrativo que se muestra en la SEQ ID NO:134 es hidrófobo y es adecuado para la interacción óptima con el bolsillo
35 de interacción. En ejemplos particulares, la modificación mediante sustituciones de aminoácidos de los restos de aminoácidos 195, 196, 197 y/o 198 en el extremo N (que corresponden a los restos 16-19 en la numeración de la quimotripsina) a un resto de aminoácido hidrófilo neutro que contiene un grupo R polar altera o desestabiliza esta formación del puente salino α u otros cambios de conformación "acoplados" descritos anteriormente, manteniendo todavía la actividad de retención. Ilustrativos de dichos restos de aminoácidos son Asn (N), Gln (Q), Ser (S), Thr (T), Cys (C) o Tyr (Y).
40

45 En los ejemplos en el presente documento, las modificaciones proporcionadas en el presente documento que confieren un aumento de la resistencia a los inhibidores (por ejemplo AT-III o TFPI) incluyen, aunque no de forma limitativa, la sustitución de aminoácidos en un polipéptido FX no modificado con: I en una posición que corresponde a la posición 196; S en una posición que corresponde a la posición 196; L en una posición que corresponde a la posición 196; T en una posición que corresponde a la posición 196; S en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 200; V en una posición que corresponde a la posición 200; S en una posición que corresponde a la posición 200; S en una posición que corresponde a la posición 202; S en una posición que corresponde a la posición 211; D en una posición que corresponde a la posición 214; A en una posición que corresponde a la posición 214; S en una posición que
50 corresponde a la posición 214; R en una posición que corresponde a la posición 216; K en una posición que corresponde a la posición 216; A en una posición que corresponde a la posición 216; S en una posición que corresponde a la posición 216; R en una posición que corresponde a la posición 218; K en una posición que corresponde a la posición 218; A en una posición que corresponde a la posición 218; H en una posición que corresponde a la posición 219; A en una posición que corresponde a la posición 273; E en una posición que corresponde a la posición 273; A en una posición que corresponde a la posición 276; E en una posición que corresponde a la posición 276; E en una posición que corresponde a la posición 306; A en una posición que corresponde a la posición 326; S en una posición que corresponde a la posición 326; T en una posición que
55 corresponde a la posición 326; V en una posición que corresponde a la posición 326; Q en una posición que corresponde a la posición 326; N en una posición que corresponde a la posición 326; M en una posición que corresponde a la posición 326; K en una posición que corresponde a la posición 326; Y en una posición que corresponde a la posición 326; E en una posición que corresponde a la posición 326; D en una posición que corresponde a la posición 326; A en una posición que corresponde a la posición 327; L en una posición que
60 corresponde a la posición 327; A en una posición que corresponde a la posición 332; D en una posición que corresponde a la posición 332; E en una posición que corresponde a la posición 332; S en una posición que
65

5 corresponde a la posición 332; G en una posición que corresponde a la posición 332; A en una posición que
 corresponde a la posición 334; T en una posición que corresponde a la posición 334; N en una posición que
 corresponde a la posición 334; E en una posición que corresponde a la posición 336; A en una posición que
 corresponde a la posición 338; S en una posición que corresponde a la posición 338; N en una posición que
 10 corresponde a la posición 338; R en una posición que corresponde a la posición 338; V en una posición que
 corresponde a la posición 338; Y en una posición que corresponde a la posición 338; M en una posición que
 corresponde a la posición 338; A en una posición que corresponde a la posición 420; E en una posición que
 corresponde a la posición 420; A en una posición que corresponde a la posición 424; y/o E en una posición que
 15 corresponde a la posición 424, cada una con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ
 ID NO:134. El polipéptido de FX modificado puede contener uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve,
 diez o más de cualquiera de las anteriores sustituciones de aminoácidos, donde cada sustitución se realiza en una
 posición diferente, siempre que el polipéptido de FX modificado resultante, cuando está en forma activa, presentan
 un aumento de la resistencia a los inhibidores (por ejemplo, resistencia a AT-III y/p resistencia a TFPI) y retiene la
 20 actividad catalítica dependiente de FVa. Dichos polipéptidos de FX modificados incluyen aquellos que presentan al
 menos un aumento en la resistencia a los inhibidores de 2 veces (por ejemplo, resistencia a AT-III y/o resistencia a
 TFPI), cuando está en forma activa, en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene la una o
 varias modificaciones. Con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, Se
 muestran en las Tablas 10-13 dichas sustituciones de aminoácidos no limitantes en un polipéptido de FX modificado
 proporcionado en el presente documento.

Tabla 10

| | | | | | | |
|-------------------|-------------------|-------------|-------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
| V196I | V196S | V196L | V196T | G197S | E200A | E200V |
| K202S | L211S/G219H | R326Y | R326A | R326T | R326V | R326Q |
| R326N | R326M | R326K | T327A | T327L | S334A | S334T |
| S334N | R336E | K338A | K338S | K338N | K338R | K338V |
| K338Y | K338M | T327A/K338A | T327L/K338M | E200V/T327L/K338M | E220V/T327L/S334A/K338M | V196S/I211S/G219H |
| G197A/I211S/G219H | I195L/I211S/G219H | V196S/N214D | V196S/N214A | V196S/N214S | V196S/E216R | |
| V196S/E21 6K | V196S/E216A | V196S/E216S | V196S/E218R | V196S/E218K | V196S/E218A | V196S/R332A |
| V196S/R33 2D | V196S/R332E | V196S/R332S | V196S/R332G | V196S/R326D | V196S/R326M | V196S/R326N |
| V196S/R32 6Q | V196S/R273E | V196S/R273A | V196S/R424E | V196S/K420A | V196S/K420E | V196S/R306E |
| V196S/R42 4A | V196S/K338A | V196S/K338S | V196S/K276A | V196S/K276E | V196S/K420E/R424E | |

Pueden estar también incluidas sustituciones de aminoácidos adicionales en los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento y pueden ser cualquiera de otras sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento o conocidas en la materia, siempre que los polipéptidos de FX modificados resultantes presenten al menos un aumento en la resistencia a los inhibidores de 2 veces (por ejemplo, resistencia a AT-III y/o resistencia a TFPI), cuando está en forma activa, en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene las modificaciones y que retiene la actividad catalítica dependiente de FVa. Por ejemplo, las modificaciones adicionales incluyen cualesquiera modificaciones adicionales descritas en el presente documento para aumentar la dependencia del cofactor (por ejemplo, Sección D.2) y/o para alterar la glicosilación (por ejemplo, Sección D.1). Las sustituciones ilustrativas de aminoácidos para introducir un sitio de glicosilación no nativo incluyen, aunque no de forma limitativa, sustitución(ones) de aminoácido(s) en un polipéptido de FX sin modificar con: N en una posición que corresponde a la posición 51; N en una posición que corresponde a la posición 56 y S en una posición que corresponde a la posición 58; N en una posición que corresponde a la posición 62 y S en una posición que corresponde a la posición 64; N en una posición que corresponde a la posición 65 y S en una posición que corresponde a la posición 67; N en una posición que corresponde a la posición 67; N en una posición que corresponde a la posición 73 y S en una posición que corresponde a la posición 75; N en una posición que corresponde a la posición 75 y S en una posición que corresponde a la posición 77; N en una posición que corresponde a la posición 77 y S en una posición que corresponde a la posición 79; N en una posición que corresponde a la posición 78 y S en una posición que corresponde a la posición 80; S en una posición que corresponde a la posición 82; N en una posición que corresponde a la posición 83; N en una posición que corresponde a la posición 82 y S en una posición que corresponde a la posición 84; N en una posición que corresponde a la posición 85 y S en una posición que corresponde a la posición 87; N en una posición que corresponde a la posición 86 y S en una posición que corresponde a la posición 88; N en una posición que corresponde a la posición 95 y S en una posición que corresponde a la posición 97; N en una posición que corresponde a la posición 114; N en una posición que corresponde a la posición 119 y S en una posición que corresponde a la posición 121; S en una posición que corresponde a la posición 122; N en una posición que corresponde a la posición 215 y S en una posición que corresponde a la posición 217; N en una posición que corresponde a la posición 243 y S en una posición que corresponde a la posición 245; N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que corresponde a la posición 266; N en una posición que corresponde a la posición 293 y S en una posición que corresponde a la posición 295; N en una posición que corresponde a la posición 388; N en una posición que corresponde a la posición 389 y S en una posición que corresponde a la posición 391; N es una posición que corresponde a la posición 428 y S en una posición que corresponde a la posición 430 y/o N en una posición que corresponde a la posición 429 y S en una posición que corresponde a la posición 431, cada una en referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134. Con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, se muestran en la Tabla 11 las sustituciones de aminoácidos no limitantes en un polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento.

Tabla 11

| | | | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---|
| T85N/K87S/V196S | Q56N/Q58S/V196S | K62N/G64S/V196S | L65N/E67S/V196S | E67NN196S | L73N/G75S/V196S |
| G75N/E77S/V196S | R86N/I88S/V196S | G114NN196S | D95N/D97S/V196S | E82SN196S | E82N/F84S/V196S |
| G78N/N80S/V196S | E77N/K79S/V196S | D119N/G121S/V196S | L83N/V196S | K122S/V196S | E51N/V196S |
| Q58N/K60S/V196S | G114N/D119N/G121S/N196S | D119N/G121S/V196S/I211S/G219H | G114N/V196S/I211S/G219H | G114N/D119N/G121S/V196S/I211S/G219H | V196S/E215N/N217S |
| V196S/E264N/E266S | D119N/G121 S/ V196S/E264N/E266S | G114N/V196S/E264N/E266S | V196S/R429N/I431S | V196S/R243N/K245S | V196S/T239N/R295S |
| V196S/D388N/Y391S | V196S/K388N | D119N/G121S/V196S/K388N | V196S/T428N/G430S | V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S |
| G114N/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | V196S/E264N/E266S/K388N | D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/K388N | G114N/V196S/I211 S/G219H/K388N | V196S/I211S/G219H/E264N/E266S/ K388N | |

- En ejemplos particulares, las modificaciones proporcionadas en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, la sustitución de aminoácidos en un polipéptido FX no modificado con: S en una posición que corresponde a la posición 196; T en una posición que corresponde a la posición 196; S en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que
- 5 corresponde a la posición 200; V en una posición que corresponde a la posición 200; S en una posición que corresponde a la posición 200; S en una posición que corresponde a la posición 202; S en una posición que corresponde a la posición 211; D en una posición que corresponde a la posición 214; A en una posición que
- 10 corresponde a la posición 214; S en una posición que corresponde a la posición 214; R en una posición que corresponde a la posición 216; K en una posición que corresponde a la posición 216; A en una posición que corresponde a la posición 216; S en una posición que corresponde a la posición 216; R en una posición que
- 15 corresponde a la posición 218; A en una posición que corresponde a la posición 218; H en una posición que corresponde a la posición 219; E en una posición que corresponde a la posición 273; E en una posición que corresponde a la posición 276; E en una posición que corresponde a la posición 306; S en una posición que
- 20 corresponde a la posición 326; T en una posición que corresponde a la posición 326; V en una posición que corresponde a la posición 326; N en una posición que corresponde a la posición 326; M en una posición que corresponde a la posición 326; K en una posición que corresponde a la posición 326; Y en una posición que
- 25 corresponde a la posición 326; E en una posición que corresponde a la posición 326; D en una posición que corresponde a la posición 326; A en una posición que corresponde a la posición 327; L en una posición que corresponde a la posición 327; D en una posición que corresponde a la posición 332; E en una posición que
- 30 corresponde a la posición 332; S en una posición que corresponde a la posición 332; G en una posición que corresponde a la posición 332; A en una posición que corresponde a la posición 334; T en una posición que corresponde a la posición 334; N en una posición que corresponde a la posición 334; E en una posición que
- 35 corresponde a la posición 336; A en una posición que corresponde a la posición 338; S en una posición que corresponde a la posición 338; N en una posición que corresponde a la posición 338; R en una posición que corresponde a la posición 338; V en una posición que corresponde a la posición 338; Y en una posición que
- 40 corresponde a la posición 338; M en una posición que corresponde a la posición 338; E en una posición que corresponde a la posición 420; y/o E en una posición que corresponde a la posición 424, cada una en referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134.
- 30 En los ejemplos del presente documento, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, incluido el FX zimógeno modificado o FXa, tienen al menos una sustitución de aminoácidos en un polipéptido de FX sin modificar que es la sustitución por S en una posición que corresponde a la posición 211 o una
- 35 sustitución por H en una posición que corresponde a la posición 219 con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134. El polipéptido de FX modificado puede contener dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más sustituciones de aminoácidos, donde cada sustitución se realiza en una posición diferente, siempre que el polipéptido de FX modificado resultante, cuando está en forma activa, muestra una
- 40 resistencia aumentada al inhibidor (por ejemplo, AT-III o TFPI) y retiene la actividad catalítica dependiente de FVa. Por ejemplo, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, incluido el FX zimógeno modificado o FXa, tienen al menos dos sustituciones de aminoácidos en un polipéptido de FX sin modificar que es la
- 45 sustitución por S en una posición que corresponde a la posición 211 y una sustitución por H en una posición que corresponde a la posición 219 con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134. Otras sustitución(ones) de aminoácidos pueden ser cualquier otra sustitución de aminoácidos descrita en el presente documento o conocida en la materia. En ejemplos particulares, una sustitución de aminoácidos adicional se
- 50 realiza en la posición 195, 196, 197 o 198. Ilustrativos de dichas sustituciones de aminoácidos incluyen, aunque no de forma limitativa, sustitución por: L en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por V en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por S en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por T en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por I en una posición que
- 55 corresponde a la posición 195; sustitución por A en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por F en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por D en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por G en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por I en una posición que
- 60 corresponde a la posición 196; sustitución por A en una posición que corresponde a la posición 196; sustitución por S en una posición que corresponde a la posición 196; sustitución por L en una posición que corresponde a la posición 196; sustitución por F en una posición que corresponde a la posición 196; sustitución por I en una posición que
- 65 corresponde a la posición 196; sustitución por T en una posición que corresponde a la posición 196; sustitución por G en una posición que corresponde a la posición 196; S en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 197; N en una posición que corresponde a la posición 197; H en una posición que corresponde a la posición 197; y/o R en una posición que corresponde a la posición 197. En otros ejemplos, otras modificaciones incluyen cualesquiera modificación(ones) adicionales descritas en el presente documento para aumentar la dependencia del cofactor (por ejemplo, la Sección D.2) y/o para alterar la glicosilación (por ejemplo, la Sección D.1). Dichos polipéptidos de FX modificados incluyen aquellos que presentan una resistencia aumentada a los inhibidores de al menos 2 veces al inhibidor y/o una dependencia aumentada del cofactor, cuando está en forma activa, en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene la una o varias modificaciones. Con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, dichas una o más sustituciones no limitantes en un polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento se muestran en la Tabla 12.

| | | | | | | |
|-------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|--|
| Tabla 12 | | | | | | |
| V196S/I211S/G219H | G197A/I211S/G219H | I195L/I211S/G219H | D119N/G121S/V196S/I211S/G219H | G114NA/196S/I211S/G219H | G114N/D119N/G121S/V196S/I211S/G219H | |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | G114N/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/K388N | G114NA/196S/I211S/G219H/K388N | V196S/I211S/G219H/E264N/E266S/ K388N | |

En los ejemplos concretos del presente documento, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, incluido el FX zimógeno modificado o FXa, que muestran una resistencia aumentada a inhibidores (por ejemplo, resistencia a AT-III y/o resistencia a TFPI) en su forma activa tienen al menos una sustitución de aminoácido en un polipéptido de FX sin modificar que es la sustitución por S en una posición que
 5 corresponde a la posición 196; L en una posición que corresponde a la posición 196; T en una posición que corresponde a la posición 196; S en una posición que corresponde a la posición 197; N en una posición que corresponde a la posición 326; A en una posición que corresponde a la posición 334; T en una posición que corresponde a la posición 334; A en una posición que corresponde a la posición 338; S en una posición que
 10 corresponde a la posición 338; o V en una posición que corresponde a la posición 338, cada una en referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134. El polipéptido de FX modificado puede contener una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más sustituciones de aminoácidos, donde cada sustitución se realiza en una posición diferente, siempre que el polipéptido de FX modificado resultante, cuando está en forma activa, presentan un aumento de la resistencia a los inhibidores (por ejemplo, resistencia a AT-III y/p
 15 resistencia a TFPI) y retiene la actividad catalítica dependiente de FVa. Otras sustitución(ones) de aminoácidos pueden ser cualquier otra sustitución de aminoácidos descrita en el presente documento o conocida en la materia. Por ejemplo, otras modificaciones incluyen cualesquiera modificaciones adicionales descritas en el presente documento por encima de dicho aumento de la independencia del cofactor (por ejemplo, la Sección D.2) y/o cualquiera que altere la glicosilación (Sección D.1). Dichos polipéptidos de FX modificados incluyen aquellos que presentan una dependencia aumentada del cofactor de al menos 5 veces, tal como al menos 10 veces, 20 veces, 30
 20 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o más de aumento en la dependencia del cofactor cuando está en forma activa, en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene la una o varias modificaciones.

En ejemplos particulares, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, incluido el
 25 FX zimógeno modificado o FXa, que muestran una resistencia aumentada a inhibidores (por ejemplo, resistencia a AT-III y/o resistencia a TFPI) en su forma activa tienen al menos una sustitución de aminoácido en un polipéptido de FX sin modificar, donde una sustitución se realiza en la posición de aminoácido 195, 196, 197 o 198 y la otra sustitución es una sustitución correspondiente a una o más de las posiciones 273, 276, 306, 326, 332, 338, 420 y/o
 30 424. La sustitución puede ser cualquiera de los otros 19 aminoácidos en la posición. Una sustitución ilustrativa no limitativa en la posición de aminoácido 195, 196, 197 o 198 es un resto de aminoácido no polar, neutro o hidrófilo, tal como una sustitución en la posición 195 o 196 con Asn (N), Gln (Q), Ser (S), Thr (T), Cys (C), o Tyr (Y), por ejemplo sustitución por S o T. Una sustitución ilustrativa no limitativa en una posición correspondiente a una o más de las
 35 posiciones 273, 276, 306, 326, 332, 338, 420 y/o 424 es un resto de aminoácido ácido o neutro, tal como a Asp (D), Glu (E), Ala (A), Gly (G), Ser (S), Cys (C), Asn (N), Gln (Q), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Pro (P), Thr (T), Trp (W), Tyr (Y) o Val (V), por ejemplo sustituciones por A o E. Dichos polipéptidos de FX modificados que contienen al menos dos sustituciones en la posición 195, 196, 197 y/o 198 y en una o más posiciones 273, 276, 306, 326, 332,
 40 338, 420 y/o 424 incluye la que presentan al menos 2 veces, 4 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, y en particular al menos 500 veces de aumento de resistencia al inhibidor (por ejemplo, resistencia a AT-III y/o resistencia a TFPI), cuando está en forma activa, en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene la una o varias modificaciones.

En ejemplos particulares, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, incluido el
 FX zimógeno modificado o FXa que tiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en un polipéptido de FX sin
 45 modificar donde:

1) al menos una es la sustitución correspondiente a la sustitución por: L en una posición que corresponde a la
 50 posición 195; sustitución por V en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por S en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por T en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por I en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por A en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por F en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por D en una posición
 55 que corresponde a la posición 195; sustitución por G en una posición que corresponde a la posición 195; sustitución por I en una posición que corresponde a la posición 196; sustitución por A en una posición que corresponde a la posición 196; sustitución por S en una posición que corresponde a la posición 196; sustitución por L en una posición que corresponde a la posición 196; sustitución por F en una posición que corresponde a la posición 196; sustitución por I en una posición que corresponde a la posición 196; sustitución por T en una posición que corresponde a la
 60 posición 196; sustitución por G en una posición que corresponde a la posición 196; S en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 197; A en una posición que corresponde a la posición 197; N en una posición que corresponde a la posición 197; H en una posición que
 65 corresponde a la posición 197; y/o R en una posición que corresponde a la posición 197; y

2) al menos una es la sustitución correspondiente a la sustitución por: A en una posición que corresponde a la
 60 posición 273; E en una posición que corresponde a la posición 273; A en una posición que corresponde a la posición 276; E en una posición que corresponde a la posición 276; E en una posición que corresponde a la posición 306; A en una posición que corresponde a la posición 326; S en una posición que corresponde a la posición 326; T en una
 65 posición que corresponde a la posición 326; V en una posición que corresponde a la posición 326; Q en una posición que corresponde a la posición 326; N en una posición que corresponde a la posición 326; M en una posición que corresponde a la posición 326; K en una posición que corresponde a la posición 326; Y en una posición que
 corresponde a la posición 326; E en una posición que corresponde a la posición 326; D en una posición que

5 corresponde a la posición 326; A en una posición que corresponde a la posición 332; D en una posición que
 corresponde a la posición 332; E en una posición que corresponde a la posición 332; S en una posición que
 corresponde a la posición 332; G en una posición que corresponde a la posición 332; A en una posición que
 corresponde a la posición 338; S en una posición que corresponde a la posición 338; N en una posición que
 10 corresponde a la posición 338; R en una posición que corresponde a la posición 338; V en una posición que
 corresponde a la posición 338; Y en una posición que corresponde a la posición 338; M en una posición que
 corresponde a la posición 338; A en una posición que corresponde a la posición 420; E en una posición que
 corresponde a la posición 420; A en una posición que corresponde a la posición 424; y/o E en una posición que
 corresponde a la posición 424, cada una en referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ
 ID NO:134. Con referencia a los restos de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, dichas una o más
 sustituciones no limitantes en un polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento se muestran
 en la Tabla 13.

| | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|
| V196S/R332D | V196S/R332E | V196S/R332S | V196S/R332G | V196S/R326D | V196S/R326M |
| V196S/R326Q | V196S/R273E | V196S/R273A | V196S/R424E | V196S/K420A | V196S/K420E |
| V196S/R424A | V196S/K338A | V196S/K338S | V196S/K276A | V196S/K276E | V196S/K420E/R424E |
| V196S/R326N | V196S/R306E | V196S/R332A | | | |

15 **4. Polipéptidos de FX modificados ilustrativos**

En el presente documento se proporcionan polipéptidos de FX modificados que contienen una o varias sustituciones
 de aminoácidos en un polipéptido de FX precursor definido en la SEQ ID NO:2, o en una variante de la misma que
 presenta al menos una identidad de secuencia del 75 % con la misma. Por ejemplo, el polipéptido de FX modificado
 20 contiene una o más sustituciones de aminoácidos en un polipéptido de FX que presenta al menos un 80 %, 85 %,
 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de la
 secuencia con la SEQ ID NO:2. Son ilustrativas de dichos polipéptidos de FX modificados los polipéptidos de FX que
 tienen la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-133, o la secuencia de
 aminoácidos que muestra al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de la secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-133. En
 25 ejemplos particulares, los polipéptidos de FX modificados los polipéptidos de FX que tienen la secuencia de
 aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOS: 5-25, 32, 37, 41, 42, 44, 45, 47-49, 51-58, 60-71,
 73-77, 81-111 y 114-133 o la secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de la secuencia con
 30 cualquiera de las SEQ ID NOS: 5-25, 32, 37, 41, 42, 44, 45, 47-49, 51-58, 60-71, 73-77, 81-111 y 114-133.

En el presente documento se proporcionan polipéptidos de FX modificados que contienen una o varias sustituciones
 de aminoácidos en un polipéptido de FX precursor que contiene una secuencia señal heteróloga. Por ejemplo, la
 secuencia señal heteróloga procede de trombina (por ejemplo correspondiente a los aminoácidos 1-43 de la SEQ ID
 35 NO:415). Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan polipéptidos de FX modificados que contienen una
 o varias sustituciones de aminoácidos en el polipéptido de FX definido en la SEQ ID NO:415, o en una variante de la
 misma que presenta al menos una identidad de secuencia del 75 % con la misma. Por ejemplo, el polipéptido de FX
 modificado contiene una o más sustituciones de aminoácidos en un polipéptido de FX que presenta al menos un
 40 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más
 identidad de la secuencia con la SEQ ID NO:415. Son ilustrativas de dichos polipéptidos de FX modificados los
 polipéptidos de FX que tienen la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOS: 417-
 546, o la secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de la secuencia con cualquiera de las SEQ
 ID NOS: 417-546. En ejemplos particulares, los polipéptidos de FX modificados los polipéptidos de FX que tienen la
 45 secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOS: 418-438, 445, 450, 454, 455, 457,
 458, 460-462, 464-471, 473-484, 486-490, 494-524 y 527-546 o la secuencia de aminoácidos que muestra al menos
 un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o
 más identidad de la secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 418-438, 445, 450, 454, 455, 457, 458, 460-462,
 464-471, 473-484, 486-490, 494-524 y 527-546.

En el presente documento se proporcionan polipéptidos de FX modificados que contienen una o varias sustituciones
 de aminoácidos en un polipéptido de FX maduro definido en la SEQ ID NO:134, o en una variante de la misma que
 presenta al menos una identidad de secuencia del 75 % con la misma. Por ejemplo, el polipéptido de FX modificado
 55 contiene una o más sustituciones de aminoácidos en un polipéptido de FX que presenta al menos un 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de la
 secuencia con la SEQ ID NO:134. Son ilustrativas de dichos polipéptidos de FX modificados los polipéptidos de FX
 que tienen la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOS: 136-265, o la secuencia

de aminoácidos que muestra al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de la secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 136-265. En ejemplos particulares, los polipéptidos de FX modificados los polipéptidos de FX que tienen la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 164, 169, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213-243 y 246-265 o la secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de la secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 164, 169, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213-243 y 246-265.

En el presente documento se proporcionan también formas zimógenas, activas, o catalíticamente activas de cualquiera de las SEQ ID NOS:136-265, o de la secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de la secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 136-265. En ejemplos particulares, se trata de formas zimógenas, activas o catalíticamente activas de cualquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 164, 169, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213-243 y 246-265. Son ilustrativas de dichas formas las formas bicatenarias que tienen una cadenas ligera y pesada unidas por un enlace disulfuro. La una o más sustituciones de aminoácidos son en la cadena pesada.

Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan polipéptidos de FX modificados que son formas zimógenas de FX que contienen sustitución(ones) de aminoácidos en un polipéptido de FX que contiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos 1-139 de la SEQ ID NO:134 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos 143-448 del SEQ ID NO:134, o en una variante que contiene una cadena pesada que muestra al menos un 75 % de identidad de secuencia: con a cadena ligera o la cadena pesada. Por ejemplo, el polipéptido de FX modificado es un FX zimógeno modificado que contiene sustitución(ones) de aminoácidos en un polipéptido de FX zimógeno que contiene una cadena ligera que presenta al menos un 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el polipéptido de la cadena ligera del FX zimógeno que tiene la secuencia de aminoácidos 1-139 de la SEQ ID NO:134 y/o una cadena pesada que presenta al menos un 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el polipéptido de la cadena pesada del FX zimógeno que tiene la secuencia de aminoácidos 143-448 de la SEQ ID NO:134. Ejemplos de dichos polipéptidos de FX zimógenos modificados los polipéptidos de FX que contienen una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos 1-139 mostrada en la ID NO:134 (es decir, correspondiente a los aminoácidos 1-139 de cualesquiera de las SEQ ID NOS: 136-265) o una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con los aminoácidos 1-139 que se muestran en cualesquiera de las SEQ ID NOS: 134; y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos 143-448 de cualesquiera de las SEQ ID NOS: 136-265, o un polipéptido que contiene una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con los aminoácidos 143-448 que se muestran en cualesquiera de las SEQ ID NOS: 136-265. En ejemplos particulares, los polipéptidos de FX zimógenos modificados los polipéptidos de FX que contienen una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos 1-139 mostrada en la ID NO:134 (es decir, correspondiente a los aminoácidos 1-139 de cualesquiera de las SEQ ID NOS: 136-265) o una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con los aminoácidos 1-139 que se muestran en cualesquiera de las SEQ ID NOS: 134; y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos 143-448 de cualesquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 164, 169, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213-243 y 246-265, o un polipéptido que contiene una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con los aminoácidos 143-448 que se muestran en cualesquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 164, 169, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213-243 y 246-265.

En el presente documento se proporcionan polipéptidos de FX modificados que son formas de FXa que contienen sustitución(ones) de aminoácidos en un polipéptido de FX que contiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos 1-139 de la SEQ ID NO:134 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos 195-448 del SEQ ID NO:134, o en una variante de la misma que muestra al menos un 75 % de identidad de secuencia: con a cadena ligera o la cadena pesada. Por ejemplo, el polipéptido de FX modificado es un FXa modificado que contiene sustitución(ones) de aminoácidos en un polipéptido de FXa que contiene una cadena ligera que presenta al menos un 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con un polipéptido de la cadena ligera de FXa que tiene la secuencia de aminoácidos 1-139 de la SEQ ID NO:134 y/o una cadena pesada que presenta al menos un 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el polipéptido de la cadena pesada de un FXa que tiene la secuencia de aminoácidos 195-448 de la SEQ ID NO:134. Ejemplos de dichos polipéptidos de FXa modificados los polipéptidos de FX que contienen una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos 1-139 mostrada en la ID NO:134 (es decir, correspondiente a los aminoácidos 1-139 de cualesquiera de las SEQ ID NOS: 136-265), o una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que

- 5 presenta al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con los aminoácidos 1-139 que se muestran en cualesquiera de las SEQ ID NOS: 134; y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos 195-448 de cualesquiera de las SEQ ID NOS: 136-265, o un polipéptido que contiene una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos
- 10 que presenta al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con los aminoácidos 195-448 que se muestran en cualesquiera de las SEQ ID NOS: 136-265. En ejemplos particulares, los polipéptidos de FXa modificados son polipéptidos de FX que contienen una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos 1-139 mostrada en la ID NO:134 (es decir, correspondiente a los aminoácidos 1-139 de cualesquiera de las SEQ ID NOS: 136-265), o una cadena ligera que
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con los aminoácidos 1-139 que se muestran en cualesquiera de las SEQ ID NOS: 134; y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos 195-448 de cualesquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 164, 169, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213-243 y 246-265, o un polipéptido que contiene una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con los aminoácidos 195-448 que se muestran en cualesquiera de las SEQ ID NOS: 137-157, 164, 169, 173, 174, 176, 177, 179-181, 183-190, 192-203, 205-209, 213-243 y 246-265.
- 20 La Tabla 14 resume polipéptidos de FX modificados ilustrativos proporcionados en el presente documento.

TABLA 14

| Péptido | SEQ ID NO. Prepropeptido FX | SEQ ID NO. híbrido trombina- FX | SEQ ID NO. FX maduro | LC FX zimógeno: aa 1-139; HC:aa 143-448 de la SEQ ID NO. | LC FX activado (FXa): aa 1- 139; HC: aa 195-448 de la SEQ ID NO. |
|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|--|--|
| V196I | 4 | 417 | 136 | 136 | 136 |
| V196S | 5 | 418 | 137 | 137 | 137 |
| T85N/K87S/V196S | 6 | 419 | 138 | 138 | 138 |
| Q56N/Q58S/V196S | 7 | 420 | 139 | 139 | 139 |
| K62N/G64S/V196S | 8 | 421 | 140 | 140 | 140 |
| L65N/E67S/V196S | 9 | 422 | 141 | 141 | 141 |
| E67N/V196S | 10 | 423 | 142 | 142 | 142 |
| L73N/G75S/V196S | 11 | 424 | 143 | 143 | 143 |
| G75N/E77SN196S | 12 | 425 | 144 | 144 | 144 |
| R86N/I88S/V196S | 13 | 426 | 145 | 145 | 145 |
| G114N/V196S | 14 | 427 | 146 | 146 | 146 |
| D95N/D97SN196S | 15 | 428 | 147 | 147 | 147 |
| E82SN196S | 16 | 429 | 148 | 148 | 148 |
| E82N/F84S/V196S | 17 | 430 | 149 | 149 | 149 |
| G78N/N80S/V196S | 18 | 431 | 150 | 150 | 150 |
| E77N/K79S/V196S | 19 | 432 | 151 | 151 | 151 |
| D119N/G121SN196S | 20 | 433 | 152 | 152 | 152 |
| L83N/V196S | 21 | 434 | 153 | 153 | 153 |
| K122S/V196S | 22 | 435 | 154 | 154 | 154 |
| E51N/V196S | 23 | 436 | 155 | 155 | 155 |
| Q58N/K60SN196S | 24 | 437 | 156 | 156 | 156 |
| G114N/D119N/G121S/V196S | 25 | 438 | 157 | 157 | 157 |
| G198A | 26 | 439 | 158 | 158 | 158 |

TABLA 14

| Péptido | SEQ ID NO. Prepropéptido FX | SEQ ID NO. híbrido trombina- FX | SEQ ID NO. FX maduro | LC FX zimógeno: aa 1-139; HC:aa 143-448 de la SEQ ID NO. | LC FX activado (FXa): aa 1- 139; HC: aa 195-448 de la SEQ ID NO. |
|-------------|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|--|--|
| G198V | 27 | 440 | 159 | 159 | 159 |
| G198R | 28 | 441 | 160 | 160 | 160 |
| G198K | 29 | 442 | 161 | 161 | 161 |
| G198P | 30 | 443 | 162 | 162 | 162 |
| G198H | 31 | 444 | 163 | 163 | 163 |
| L211S/G219H | 32 | 445 | 164 | 164 | 164 |
| G197P | 33 | 446 | 165 | 165 | 165 |
| D378N | 34 | 447 | 166 | 166 | 166 |
| D378S | 35 | 448 | 167 | 167 | 167 |
| V196L | 36 | 449 | 168 | 168 | 168 |
| V196T | 37 | 450 | 169 | 169 | 169 |
| V196P | 38 | 451 | 170 | 170 | 170 |
| G197V | 39 | 452 | 171 | 171 | 171 |
| G197T | 40 | 453 | 172 | 172 | 172 |
| G197S | 41 | 454 | 173 | 173 | 173 |
| E200A | 42 | 455 | 174 | 174 | 174 |
| E200S | 43 | 456 | 175 | 175 | 175 |
| E200V | 44 | 457 | 176 | 176 | 176 |
| K202S | 45 | 458 | 177 | 177 | 177 |
| R326A | 46 | 459 | 178 | 178 | 178 |
| R326S | 47 | 460 | 179 | 179 | 179 |
| R326T | 48 | 461 | 180 | 180 | 180 |
| R326V | 49 | 462 | 181 | 181 | 181 |

TABLA 14

| Péptido | SEQ ID NO. Prepropeptido FX | SEQ ID NO. hibrido trombina- FX | SEQ ID NO. FX maduro | LC FX zimógeno: aa 1-139; HC:aa 143-448 de la SEQ ID NO. | LC FX activado (FXa): aa 1- 139; HC: aa 195-448 de la SEQ ID NO. |
|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|--|--|
| R326Q | 50 | 463 | 182 | 182 | 182 |
| R326N | 51 | 464 | 183 | 183 | 183 |
| R326M | 52 | 465 | 184 | 184 | 184 |
| R326K | 53 | 466 | 185 | 185 | 185 |
| R326Y | 54 | 467 | 186 | 186 | 186 |
| T327A | 55 | 468 | 187 | 187 | 187 |
| T327L | 56 | 469 | 188 | 188 | 188 |
| S334A | 57 | 470 | 189 | 189 | 189 |
| S334T | 58 | 471 | 190 | 190 | 190 |
| S334N | 59 | 472 | 191 | 191 | 191 |
| R336E | 60 | 473 | 192 | 192 | 192 |
| K338A | 61 | 474 | 193 | 193 | 193 |
| K338S | 62 | 475 | 194 | 194 | 194 |
| K338N | 63 | 476 | 195 | 195 | 195 |
| K338R | 64 | 477 | 196 | 196 | 196 |
| K338V | 65 | 478 | 197 | 197 | 197 |
| K338Y | 66 | 479 | 198 | 198 | 198 |
| K338M | 67 | 480 | 199 | 199 | 199 |
| T327A/K338A | 68 | 481 | 200 | 200 | 200 |
| T327L/K338M | 69 | 482 | 201 | 201 | 201 |
| E200WT327L/K338M | 70 | 483 | 202 | 202 | 202 |
| E200V/T327L/S334A/K338M | 71 | 484 | 203 | 203 | 203 |
| V196S/G197A | 72 | 485 | 204 | 204 | 204 |

TABLA 14

| Péptido | SEQ ID NO. Prepropeptido FX | SEQ ID NO. hibrido trombina- FX | SEQ ID NO. FX maduro | LC FX zimógeno: aa 1-139; HC:aa 143-448 de la SEQ ID NO. | LC FX activado (FXa): aa 1- 139; HC: aa 195-448 de la SEQ ID NO. |
|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|--|--|
| V196S/I211S/G219H | 73 | 486 | 205 | 205 | 205 |
| D119N/G121S/V196S/I211S/G219H | 74 | 487 | 206 | 206 | 206 |
| G114N/V196S/I211S/G219H | 75 | 488 | 207 | 207 | 207 |
| G114N/D119N/G121S/V196S/I211S/G219H | 76 | 489 | 208 | 208 | 208 |
| G197A/I211S/G219H | 77 | 490 | 209 | 209 | 209 |
| V196S/G197A/I211S/G219H | 78 | 491 | 210 | 210 | 210 |
| I195L/V196S | 79 | 492 | 211 | 211 | 211 |
| I195L/G197A | 80 | 493 | 212 | 212 | 212 |
| I195L/I211S/G219H | 81 | 494 | 213 | 213 | 213 |
| V196S/N214D | 82 | 495 | 214 | 214 | 214 |
| V196S/N214A | 83 | 496 | 215 | 215 | 215 |
| V196S/N214S | 84 | 497 | 216 | 216 | 216 |
| V 196S/E216R | 85 | 498 | 217 | 217 | 217 |
| V196S/E216K | 86 | 499 | 218 | 218 | 218 |
| V196S/E216A | 87 | 500 | 219 | 219 | 219 |
| V196S/E216S | 88 | 501 | 220 | 220 | 220 |
| V196S/E218R | 89 | 502 | 221 | 221 | 221 |
| V196S/E218K | 90 | 503 | 222 | 222 | 222 |
| V196S/E218A | 91 | 504 | 223 | 223 | 223 |
| V196S/R332A | 92 | 505 | 224 | 224 | 224 |
| V196S/R332D | 93 | 506 | 225 | 225 | 225 |
| V196S/R332E | 94 | 507 | 226 | 226 | 226 |
| V196S/R332S | 95 | 508 | 227 | 227 | 227 |

TABLA 14

| Péptido | SEQ ID NO. Prepropeptido FX | SEQ ID NO. híbrido trombina- FX | SEQ ID NO. FX maduro | LC FX zimógeno: aa 1-139; HC:aa 143-448 de la SEQ ID NO. | LC FX activado (FXa): aa 1- 139; HC: aa 195-448 de la SEQ ID NO. |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|--|--|
| V196S/R332G | 96 | 509 | 228 | 228 | 228 |
| V196S/R326E | 97 | 510 | 229 | 229 | 229 |
| V196S/R326D | 98 | 511 | 230 | 230 | 230 |
| V196S/R326M | 99 | 512 | 231 | 231 | 231 |
| V196S/R326N | 100 | 513 | 232 | 232 | 232 |
| V196S/R326Q | 101 | 514 | 233 | 233 | 233 |
| V196S/R273E | 102 | 515 | 234 | 234 | 234 |
| V196S/R273A | 103 | 516 | 235 | 235 | 235 |
| V196S/R424A | 104 | 517 | 236 | 236 | 236 |
| V196S/R424E | 105 | 518 | 237 | 237 | 237 |
| V196S/K420A | 106 | 519 | 238 | 238 | 238 |
| V196S/K420E | 107 | 520 | 239 | 239 | 239 |
| V196S/R306E | 108 | 521 | 240 | 240 | 240 |
| V196S/K276A | 109 | 522 | 241 | 241 | 241 |
| V196S/K276E | 110 | 523 | 242 | 242 | 242 |
| V196S/K420E/R424E | 111 | 524 | 243 | 243 | 243 |
| V196S/R273E/K420E/R424E | 112 | 525 | 244 | 244 | 244 |
| V196S/R273E/R306 E/K420E/R424E | 113 | 526 | 245 | 245 | 245 |
| V196S/K338A | 114 | 527 | 246 | 246 | 246 |
| V196S/K338S | 115 | 528 | 247 | 247 | 247 |
| V196S/E215N/N217S | 116 | 529 | 248 | 248 | 248 |
| V196S/E264N/E266S | 117 | 530 | 249 | 249 | 249 |
| D119N/G121S/V196S/E264N/E266S | 118 | 531 | 250 | 250 | 250 |

TABLA 14

| Péptido | SEQ ID NO. Prepropeptido FX | SEQ ID NO. híbrido trombina-FX | SEQ ID NO. FX maduro | LC FX zimógeno: aa 1-139; HC:aa 143-448 de la SEQ ID NO. | LC FX activado (FXa): aa 1-139; HC: aa 195-448 de la SEQ ID NO. |
|---|-----------------------------|--------------------------------|----------------------|--|---|
| G114N/V196S/E264N/E266S | 119 | 532 | 251 | 251 | 251 |
| V196S/R429N/I431S | 120 | 533 | 252 | 252 | 252 |
| V196S/R243N/K245S | 121 | 534 | 253 | 253 | 253 |
| V196S/T293N/R295S | 122 | 535 | 254 | 254 | 254 |
| V196S/D389N/Y391S | 123 | 536 | 255 | 255 | 255 |
| V196S/K388N | 124 | 537 | 256 | 256 | 256 |
| D119N/G121S/V196S/K388N | 125 | 538 | 257 | 257 | 257 |
| V196S/T428N/G430S | 126 | 539 | 258 | 258 | 258 |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | 127 | 540 | 259 | 259 | 259 |
| D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | 128 | 541 | 260 | 260 | 260 |
| G114N/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | 129 | 542 | 261 | 261 | 261 |
| V196S/E264N/E266S/K388N | 130 | 543 | 262 | 262 | 262 |
| D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/K388N | 131 | 544 | 263 | 263 | 263 |
| G114N/V196S/I211S/G219H/K388N | 132 | 545 | 264 | 264 | 264 |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S/K388N | 133 | 546 | 265 | 265 | 265 |

5. Modificaciones adicionales

Se pueden hacer modificaciones adicionales a cualquiera de los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento. La una o varias modificaciones adicionales pueden ser inserciones, delecciones, sustituciones, modificaciones químicas y/o modificaciones posteriores a la traducción de los aminoácidos. Por ejemplo, una o varias modificaciones adicionales se pueden realizar en un polipéptido de FX modificado para proporcionar un sitio de unión para un resto químico (por ejemplo, un resto polimérico), para introducir uno o varios sitios de glicosilación no naturales, y/o para mejorar o alterar la actividad u otras propiedades del polipéptido. Los ejemplos de propiedades o actividades que se pueden alterar incluyen, aunque no de forma limitativa, solubilidad, estabilidad, actividad catalítica (por ejemplo actividad protrombinasa), unión a cofactores (por ejemplo FVa), especificidad por el sustrato, selectividad de sustrato, y/o unión a inhibidores (por ejemplo ATIII).

Dicha una o varias modificaciones son bien conocidas del experto en la materia (véanse por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.990.079; 6.017.882; 6.573.071; 6.562.598; 6.660.492; 6.670.147; 6.958.322, 7.078.508; 7.220.569; 7.645.602; 8.048.990; solicitudes publicadas de Estados Unidos con números: US20030207402; US2006-0148038; US20090053185; US20090175828; US20090175931; US20100125052; US20100255000; US2010-0285568; 2011-0015128; 2011-0293597; solicitudes internacionales PCT publicadas con números: WO1998039456 y WO2005023308; y en Uprichard y Perry, *Blood Rev* 16: 97-110 (2002); Venkateswarlu et al., *Biophys J* 82(3):1190-1206 (2002); Vianello et al., *Thromb. Res.* 107:51-54 (2002); Vianello et al. *Thromb. Res.* 104:257-264 (2001); Vianello et al., *Blood Coagul. Fibrinolysis* 14:401-405 (2003); Wallmark et al., *Blood* 78(supl. 1): 60 (1991); Wallmark et al., *Thromb Haemost.* 65:1263 (1991); Wang et al., *Haemophilia*. 11(1):31-37 (2005); Wang et al., *Haematologica*. 90(12):1659-1664 (2005); Watzke et al., *J. Biol. Chem.* 265:11982-11989 (1990); Watzke et al., *J Clin Invest.* 88(5):1685-1689 (1991); Watzke et al., *Thromb Haemost* 69:1452 (1993); Whinna et al., *J. Thromb Haemost* 2(7): 1127-1134; Yang et al., *Biochemistry* 47(22):5976-5985 (2008); y Zama et al., *Br. J. Haematol.* 106:809-811 (1999).

Por ejemplo, un polipéptido de FX modificado se puede modificar para convertir el polipéptido en susceptible a la conjugación con un polímero. Los polímeros ilustrativos incluyen, por ejemplo, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona o poliprolina (Abuchowski *et al.* (1981); Newmark *et al.* (1982); y Katre *et al.* (1987)). Un polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento se puede modificar con uno o más restos de polietilenglicol (PEGilado). Los derivados de PEG activados se pueden usar para interactuar directamente con los polipéptidos de FX, e incluyen ésteres activos de ácido carboxílico o derivados de carbonato, especialmente en los que los grupos salientes son N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenol, imidazol o 1-hidroxi-2-nitrobenzeno-4-sulfonato. Los derivados de PEG que contienen grupos maleimido o haloacetilo se pueden usar para la modificación de los grupos sulfhidrilo, y los reactivos de PEG que contienen grupos hidrazina o hidrazida se pueden usar para modificar los aldehídos generados mediante la oxidación con periodato de los grupos carbohidrato.

También se contemplan secuencias de polipéptidos de FX modificados que tienen restos de aminoácidos fosforilados, *tales como* fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina. Las modificaciones adicionales de los polipéptidos proporcionados en el presente documento incluyen la derivatización química de los polipéptidos, incluidos, aunque no de forma limitativa, acetilación y carboxilación. Por ejemplo, se han producido variantes aciladas inactivas de FX, que se deacilan lentamente tras su inyección en el plasma sanguíneo, generando de esta forma el factor X activado con el tiempo (Wolf et al. (1995) *Blood*. 86, pp 4153-4157).

Otras modificaciones adicionales adecuadas de un polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento son polipéptidos que se han modificado usando técnicas convencionales químicas y/o métodos de ácido nucleico recombinante para aumentar su resistencia a la degradación proteolítica, para optimizar las propiedades de solubilidad y/o para convertirlos en más adecuados como agente terapéutico. Por ejemplo, la cadena principal del péptido se puede ciclar para mejorar la estabilidad (véase, por tanto, Friedler et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:23783-23789). Se pueden usar análogos que incluyen restos de aminoácidos que no sean los L-aminoácidos de origen natural, *tal como*, D-aminoácidos, o aminoácidos sintéticos de origen no natural.

Modificaciones adicionales incluyen modificaciones que alteran, aumentan o mejoran el procesamiento celular y/o las modificaciones posteriores a la traducción del polipéptido. Por ejemplo, las modificaciones adicionales incluyen las incluidas en la región del sitio de escisión del propéptido (por ejemplo Thr39) para mejorar la eficacia del procesamiento del propéptido en el cultivo de células (Rudolph et al. (1997) *Prot. Express y Puri.*, 10: 373-378). En otros ejemplos, y como se describe en otra parte del presente documento, se puede conseguir un alto grado de carboxilación gamma sustituyendo el prepropéptido del factor X por el de la trombina (véase, por ejemplo, Camire et al. (2000) *Biochemistry*. 39 pp. 14322-14329).

Otras modificaciones adicionales ilustrativas incluyen una o varias sustituciones de aminoácidos para alterar una o más propiedades o actividades de los polipéptidos. Por ejemplo, las modificaciones incluyen las que alteran la dependencia de la vitamina K, que es necesaria para su síntesis, por ejemplo, mediante modificación de los restos del dominio Gla incluidos, aunque no de forma limitativa, la sustitución de aminoácidos en las posiciones 10, 11, 12, 28, 29, 32, 33, 34 o 35 correspondientes a los restos mostrados en la ID NO:134 (véanse, por ejemplo las patentes

de Estados Unidos con números 6.017.882 y 8.048.990). También se pueden realizar modificaciones que potencian la capacidad de FX para activarse, tal como mediante una o varias sustituciones de restos en el péptido de activación por restos heterólogos de otra serina proteasa o de otro péptido o proteína (véanse por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 6.958.322 y 6.573.071); las solicitudes de patente internacional PCT números WO 98/38317, WO 03/035861, WO 2004/005347; solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2006/0148038; Himmelsbach et al. *Thromb. Res.*, 97, 51-67 (2000); Wolf et al. (1991) *JBC*. 266, n.º 21. pp. 13726-13730; Volkel et al (2005), *Mol. Biotechnol.*, 29 (1):19-30. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones para eliminar el péptido de activación de forma que el polipéptido de FX se autoactive de forma independiente del cofactor (Rudolph et al., (2002) *Thromb Haemost.*, 88:756-62). Otras modificaciones incluyen modificaciones que alteran o modifican la activación del sitio de escisión, de forma que otras proteasas que no activan FX de forma natural puedan escindir y activar FX (véanse por ejemplo, los documentos WO 98/38317; WO 98/38318; WO 01/10896).

Se pueden preparar proteínas quiméricas de un FX modificado proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, una porción de la cadena ligera (por ejemplo, el dominio Gla y/o dominio(s) EGF) se puede sustituir por la correspondiente porción de otra proteasa de coagulación, tal como FIX, para generar quimeras que interactúan de forma productiva con complejos del factor de coagulación en la ruta, tal como el complejo TF/FVIIa (Thiec et al. (2003) *JBC*, 12: 10393-10399)

E. Producción de polipéptidos de FX

Los polipéptidos FX, incluidos los polipéptidos de FX modificados, se pueden obtener por métodos bien conocidos en la materia para la purificación de proteínas y la expresión de proteínas recombinantes. Se puede usar cualquier método conocido del experto en la materia para la identificación de ácidos nucleicos que codifican los genes deseados. Se puede usar cualquier método disponible en la materia para obtener un ADNc de longitud completa (es decir, que abarca toda la región codificante) o bien un clon de ADN genómico que codifica un polipéptido de FX, tal como procedente de una célula o tejido, tal como por ejemplo del hígado. El ADNc también se puede obtener comercialmente (por ejemplo Origene, Rockville, MD) o por métodos sintéticos. Los polipéptidos de FX modificados se pueden diseñar mediante ingeniería genética tal como se describe en el presente documento, tal como mediante la mutagénesis dirigida al sitio.

FX se puede clonar o aislar usando cualesquiera métodos disponibles conocidos en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácidos nucleicos. Dichos métodos incluyen la amplificación mediante PCR de los ácidos nucleicos y el cribado de bibliotecas, incluido el cribado con hibridación de ácidos nucleicos, cribado basado en anticuerpos y cribado basado en actividad.

Se pueden utilizar métodos para amplificar ácidos nucleicos para aislar las moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de FX, incluidos, por ejemplo, métodos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se puede usar material que contiene ácido nucleico como material de partida a partir del cual se puede aislar una molécula de ácido nucleico que codifica FX. Por ejemplo, preparaciones de ADN y ARNm, extractos celulares, extractos tisulares (por ejemplo, del hígado), muestras de fluidos (por ejemplo, sangre, suero, saliva), muestras procedentes de sujetos sanos y/o enfermos que se pueden usar en los métodos de amplificación. Las bibliotecas de ácido nucleico también se pueden usar como fuente de materiales de partida. Los cebadores se pueden diseñar para amplificar una molécula que codifica FX. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñar basándose en las secuencias expresadas a partir de las que se genera un FX. Los cebadores se pueden diseñar basándose en una contratraducción de una secuencia de aminoácidos de FX. Las moléculas de ácidos nucleicos generadas mediante amplificación se pueden secuenciar y confirmar que codifican un polipéptido de FX.

Secuencias de nucleótidos adicionales se pueden unir a una molécula de ácido nucleico que codifica un FX, incluidas las secuencias enlazadoras que contienen sitios de restricción de endonucleasa con el fin de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteína o un vector diseñado para la amplificación de la proteína nuclear que codifica las secuencias de ADN. Además, las secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos del ADN funcionales se pueden unir de manera operativa a una molécula de ácido nucleico que codifica un FX. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen, aunque no de forma limitativa, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión intracelular de la proteína, y secuencias de secreción diseñadas para facilitar la secreción de la proteína. Secuencias de nucleótidos adicionales, tales como secuencias que especifican regiones de unión a proteínas, también se pueden unir a las moléculas de ácidos nucleicos que codifican FX. Dichas regiones incluyen, aunque no de forma limitativa, secuencias para facilitar la absorción de Fx en células diana específicas, o bien, mejorar la farmacocinética del gen sintético.

Los ácidos nucleicos identificados y aislados se pueden insertar a continuación en un vector de clonación adecuado. Se puede usar un gran número de sistemas de vector-hospedador conocidos en la materia. Los vectores posibles incluyen, aunque no de forma limitativa, plásmidos o virus modificados, pero el sistema vector debe ser compatible con la célula hospedadora utilizada. Dichos vectores incluyen, aunque no de forma limitativa, bacteriófagos tales como derivados lambda, o plásmidos tales como pBR322 o derivados plásmidos de pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). La inserción en un vector de clonación puede, por ejemplo, llevarse a cabo mediante ligadura del fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene términos cohesivos complementarios. La

inserción se puede realizar usando vectores de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presente en el vector de clonación, los extremos de las moléculas ADN pueden modificarse enzimáticamente. Como alternativa, cualquier sitio deseado se puede producir ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) a los extremos del ADN; estos enlazadores ligados
 5 pueden contener oligonucleótidos específicos químicamente sintetizados que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen de la proteína FX se pueden modificar mediante prolongación homopolimérica. Las moléculas recombinantes se pueden introducir en las células hospedadoras mediante, por ejemplo, transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de forma que se generan muchas copias de la secuencia génica.

10 Se puede utilizar cualquier método conocido en la materia para llevar a cabo la mutación de uno cualquiera o más aminoácidos de una proteína diana. Los métodos incluyen la mutagénesis dirigida a sitio convencional o mutagénesis aleatoria de las moléculas de ácido nucleico codificante, o los métodos de síntesis de polipéptidos en fase sólida. Por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de FX se pueden someter a mutagénesis, tal como mutagénesis aleatoria del ácido nucleico codificante, PCR propensa a errores, mutagénesis dirigida al sitio (usando, por ejemplo, un kit, tal como un kit como QuikChange disponible de Stratagene), PCR con solapamiento, transposición de genes, u otros métodos recombinantes. El ácido nucleico que codifica los polipéptidos se puede introducir a continuación en una célula hospedadora para expresarse de forma heteróloga. En algunos ejemplos, los polipéptidos de FX modificados se producen de forma sintética, tal como mediante el uso de
 15 síntesis de péptidos en fase sólida o en fase de solución.

20 En realizaciones específicas, la transformación de las células hospedadoras con las moléculas de ADN recombinante que incorporan secuencias del gen de la proteína FX aislado, ADNc o ADN sintético permite la generación de múltiples copias del gen. Por lo tanto, el gen se puede obtener en grandes cantidades mediante transformantes en crecimiento, aislamiento de las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperar el gen insertado del ADN recombinante aislado.

1. Vectores y células

30 Para la expresión recombinante de una o más proteínas FX, el ácido nucleico que contiene todo o una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína FX se puede introducir en un vector de expresión adecuado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia de codificación de proteína introducida. Los ejemplos de dicho vector es cualquier Vector de expresión de mamífero tal como, por ejemplo, pCMV. Análogamente, las necesarias señales de transcripción y traducción se pueden suministrar mediante el promotor nativo de los genes FX, y/o sus regiones flanqueantes.

35 También se proporcionan vectores que contienen ácido nucleico que codifica el FX o FX modificado. También se proporcionan células que contienen los vectores. Las células incluyen células eucariotas y procariotas, y los vectores son cualesquiera adecuados para su uso en dicho método.

40 Se proporcionan células procariotas y eucariotas, incluidas las células endoteliales, que contienen los vectores. Dichas células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, Archea, células de plantas, células de insecto, y células de animales. Las células se utilizan para producir un polipéptido de FX o un polipéptido de FX modificado del mismo haciendo crecer las células anteriormente descritas en condiciones en las que la proteína FX codificada se expresa por la célula, y recuperar la proteína FX expresada. Para los fines del presente documento, el FX se puede secretar al medio.

45 En una realización, se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad Fx y contiene todo o una parte del polipéptido de FX, o múltiples copias del mismo. Los vectores se pueden seleccionar para la expresión del polipéptido de FX o del polipéptido de FX modificado del mismo en una célula de tal forma que la proteína FX se expresa como proteína secretada. Cuando el FX se expresa, el ácido nucleico se une al ácido nucleico que codifica una señal de secreción, tal como el factor de correspondencia α de *Saccharomyces cerevisiae* o una porción del mismo, o la secuencia señal natural.

50 Se puede usar una variedad de sistemas hospedador-vector para expresar la secuencia codificante de la proteína. Estas incluyen, aunque no de forma limitativa, sistemas de células de mamífero infectadas con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus y otros virus); sistemas de células de insectos infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plásmido, o ADN cósmido. Los elementos de expresión de los vectores varían en sus fortalezas y especificidades. Dependiendo del sistema hospedador-vector utilizado, se puede usar uno cualquiera de
 55 numerosos elementos de transcripción y traducción adecuados.

60 Cualesquiera métodos conocidos de los expertos en la materia para la inserción de fragmentos de ADN en un vector se puede usar para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico que contiene señales de control de transcripción/traducción adecuados y secuencias de codificación de proteínas. Estos métodos pueden incluir técnicas sintéticas y de ADN recombinante *in vitro* y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión
 65

de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de FX o un polipéptido de FX modificado, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos, se puede regular mediante una segunda secuencia de ácidos nucleicos de tal forma que los genes o fragmentos de los mismos se expresan en un hospedador transformado con la(s) molécula(s) ADN de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas se puede controlar mediante cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En una realización específica, el promotor es no nativo respecto de los genes de una proteína FX. Los promotores que se pueden utilizar incluyen, aunque no de forma limitativa, el promotor temprano del SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al. Cell 22:787-797 (1980)), el promotor de la timidina quinasa del herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster et al., Nature 296:39-42 (1982)); vectores de expresión en procariotas tal como el promotor de la β -lactamasa (Jay et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543) o el promotor *tac* (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242:79-94 (1980)); vectores de expresión en plantas que contienen el promotor de la nopalina sintetasa (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213 (1984)) o el promotor del ARN de 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner et al., Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., Nature 310:115-120 (1984)); elementos promotores derivados de levaduras y otros hongos tal como el promotor de Gal4, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de la fosfoglicerol quinasa, el promotor de la fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de control de la transcripción de origen animal que presentan especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: región de control del gen de la elastasa I que está activo en las células acinares pancreáticas (Swift et al., Cell 38:639-646 (1984); Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7:425-515 (1987)); región de control del gen de la insulina que está activo en las células beta pancreáticas (Hanahan et al., Nature 315:115-122 (1985)), región de control del gen de la inmunoglobulina que está activo en las células linfoides (Swift et al., Cell 38:647-658 (1984); Adams et al., Nature 318:533-538 (1985); Alexander et al., Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987)), región control del virus del tumor de mama de ratón que está activo en células de testículo, mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., Cell 45:485-495 (1986)), región de control del gen de la albúmina que está activo en el hígado (Pinckert et al., Genes y Devel. 1:268-276 (1987)), región de control del gen de la alfa-fetoproteína que está activo en el hígado (Krumlauf et al., Mol. Cell Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer et al., Science 235:53-58 (1987)), región de control del gen de la alfa-1-antitripsina que está activo en el hígado (Kelsey et al., Genes y Devel. 1:161-171 (1987)), región de control del gen de la beta-globina que está activo en células mieloides (Magram et al., Nature 315:338-340 (1985); Kollias et al., Cell 46:89-94 (1986)), región de control del gen de proteína mielina básica que está activo en los oligodendrocitos del cerebro (Readhead et al., Cell 48:703-712 (1987)), región de control del gen de la cadena ligera 2 de la miosina que está activo en el músculo esquelético (Shani, Nature 314:283-286 (1985)), y región de control del gen de la hormona de liberación gonadotrófica que está activo en las células gonadotrofas del hipotálamo (Mason et al., Science 234:1372-1378 (1986)).

En una realización específica, se usa un vector que contiene promotor unido operativamente a ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de FX o un polipéptido de FX modificado, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo, de los mismos, uno o más orígenes de la replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Los vectores y sistemas para la expresión de los polipéptidos de FX incluyen los bien conocidos vectores *Pichia* (disponibles, por ejemplo, de Invitrogen, San Diego, CA), especialmente los diseñados para la secreción de las proteínas codificadas. Los vectores plásmidos ilustrativos para su expresión en células de mamífero incluyen, por ejemplo, pCMV, pFUSE (InvivoGen) y muchos otros vectores bien conocidos por los expertos en la materia. Los vectores plásmidos ilustrativos para la transformación de células *E.coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; véase también la bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen el promotor T5 de fago (que reconoce la ARN polimerasa de *E. coli*) y un módulo doble de represión del operador lac para proporcionar un fuerte nivel de expresión estrechamente regulado de las proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión a ribosomas sintético (RBS II) para la traducción eficaz, una secuencia de codificación de etiqueta 6xHis, t_0 y terminadores de la transcripción T1, origen de replicación ColE1, y un gen de la beta-lactamasa para transmitir resistencia a ampicilina. Los vectores pQE permite la introducción de una etiqueta 6xHis en el extremo N o C de la proteína recombinante. Dichos plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30, y pQE 31 que proporcionan múltiples sitios de clonación para los tres marcos de lectura y proporcionar la expresión de las proteínas marcadas con 6xHis en el extremo N. Otros vectores plásmidos ilustrativos para la transformación de células de *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la patente de Estados Unidos 4.952.496; disponible de NOVAGEN, Madison, WI; véase, también la bibliografía publicada por Novagen que describe el sistema). Dichos plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T7lac, el terminador T7, el operador lac inducible en *E. coli*, y el gen represor de lac; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, el terminador T7, y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (NOVAGEN, Madison, WI), que contiene una secuencia líder His-Tag™ para su uso en la purificación, que es una columna His y un sitio de escisión de protrombina que permite la escisión tras la purificación en la columna, la región del promotor T7-lac y el terminador T7.

2. Sistemas de expresión

Los polipéptidos de FX (modificados y sin modificar) se pueden producir por cualesquiera métodos conocidos en la

materia para la producción de proteínas, incluidos los métodos *in vitro* e *in vivo* tales como, por ejemplo, la introducción de moléculas de ácidos nucleicos que codifican FX en una célula hospedadora, animal hospedador, y la expresión a partir de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican FX *in vitro*. FX y los polipéptidos de FX modificados se pueden expresar en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades necesarias y las formar del polipéptido de FX necesarias para la administración y el tratamiento. Los hospedadores de expresión incluyen organismos procariotas y eucariotas tales como *E. coli*, levaduras, plantas, células de insecto, células de mamíferos, incluidas línea de células humanas y animales transgénicos no humanos. Los hospedadores de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteínas, así como en los tipos de modificaciones posteriores a la traducción que están presentes sobre las proteínas expresadas. La selección del hospedador de expresión se puede realizar dependiendo de estos y otros factores, tales como consideraciones de normativa y seguridad, costes de producción, y la necesidad y los métodos de purificación.

La expresión en hospedadores eucariotas puede incluir la expresión en levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, células de insecto tales como células de *Drosophila* y de lepidópteros, plantas y células vegetales, tales como tabaco, maíz, arroz, algas, y Lemna. Las células eucariotas para expresión también incluyen líneas de células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), o células de riñón de cría de hámster (BHK). Los hospedadores de expresión en eucariotas también incluyen la producción en animales transgénicos no humanos, por ejemplo, incluidas la producción en suero, leche y huevos.

Muchos vectores de expresión están disponibles y son conocidos por los expertos en la materia por la expresión de FX. La selección del vector de expresión está afectada por la selección del sistema de expresión del hospedador. Dicha selección está entre las habilidades de los expertos en la materia. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores y opcionalmente potenciadores de la transcripción, señales de traducción, y señales de finalización de la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión que se usan para la transformación estable tienen de forma típica un marcador seleccionable que permite la selección y el mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, se puede usar un origen de replicación para amplificar el número de copias de los vectores en las células.

FX o los polipéptidos de FX modificados también se pueden utilizar o expresar como fusiones de proteínas. Por ejemplo, se puede generar una fusión para añadir funcionalidad adicional a un polipéptido. Los ejemplos de proteínas de fusión incluyen, aunque no de forma limitativa, fusiones de una secuencia señal, una etiqueta tal como para la localización, por ejemplo una etiqueta his₆ o una etiqueta myc, o una etiqueta para la purificación, por ejemplo, una fusión GST, y una secuencia para dirigir la secreción de la proteína y/o la asociación con la membrana.

En una realización, la proteasa se expresa en una forma inactiva zimógena. En otra realización, el polipéptido de FX o los polipéptidos de FX modificados se pueden generar para estar en una forma activa, donde la activación se consigue mediante la reacción con el activador de FX de veneno de la víbora de Russell (Haematologic Technologies) tras la expresión, secreción y purificación de la forma de FX zimógena del polipéptido. En dicho ejemplo, el activador se puede eliminar de la preparación purificada resultante por diálisis o por medio de una columna de afinidad compatible con el activador (por ejemplo biotina-estreptavidina).

En algunos casos, la forma del polipéptido de FX inactivada se retira de la forma de FXa activada durante la preparación. Por ejemplo, como FXa está alterada conformacionalmente, presenta la capacidad de unirse a la heparina. Por lo tanto, FXa se puede purificar a partir de las preparaciones que también contienen una forma zimógena mediante cromatografía utilizando una columna de heparina. Esto se ilustra en el Ejemplo 2 del presente documento. En general, en los ejemplos de la presente memoria, el polipéptido de FXa presenta una pureza de al menos un 70 %, y generalmente de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor. Generalmente, las preparaciones de FXa están prácticamente exentas de otras proteínas contaminantes, incluidas las formas de FX zimógenas.

a. Expresión procariota

Los procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de FX (véanse, por ejemplo, Platis et al. (2003) Protein Exp. Purif. 31(2): 222-30; y Khalilzadeh et al. (2004) J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31(2): 63-69). La transformación de *E. coli* es una técnica sencilla y rápida bien conocida por los expertos en la materia. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles que son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteínas y para expresar proteínas que presentan cierta toxicidad para las células hospedadoras. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor lac, el promotor trp, el promotor tac híbrido, los promotores T7 y ARN de SP6 y el promotor λP_L regulado por la temperatura.

FX se puede expresarse en el ambiente citoplásmico de *E. coli*. El citoplasma es un ambiente reducir y, para algunas moléculas, esto puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Los agentes reductores como ditiotretitol y β -mercaptoetanol y desnaturalizantes (por ejemplo, como guanidina-HCl y urea) se pueden usar para resolubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de FX en el espacio periplásmico de bacterias, lo que proporciona un ambiente oxidante e isomerasas análogas a chaperonina y disulfuro isomerasas llevan a la producción de la proteína soluble. Típicamente, una secuencia líder se fusiona con la proteína a expresar,

lo que dirige la proteína al periplasma. A continuación se elimina el líder por las peptidasas señal dentro del periplasma. Los ejemplos de secuencias líderes que dirigen al periplasma incluyen el líder pelB del gen de la peptidato liasa y el líder derivado del gen de la fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la salida de la proteína expresada hacia el medio de cultivo. La secreción de las proteínas permite la purificación rápida y simple a partir del sobrenadante del cultivo. Las proteínas que no se secreta se pueden obtener a partir del periplasma mediante lisis osmótica. Análogamente a la expresión citoplásmica, en algunos casos, las proteínas pueden volverse insolubles y desnaturalizantes, y se pueden usar agentes reductores para facilitar la solubilización y el repliegado. La temperatura de inducción y crecimiento también puede alterar los niveles de expresión y la solubilidad. Típicamente, se usan temperaturas entre 25 °C y 37 °C. También se pueden usar mutaciones para aumentar la solubilidad de las proteínas expresadas. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por lo tanto, si las proteínas requieren glicosilación para funcionar, la glicosilación se puede añadir *in vitro* tras la purificación a partir de las células hospedadoras.

b. Levaduras

Las levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, y *Pichia pastoris* son hospedadores de expresión útiles para FX (véase, por ejemplo, Skoko et al. (2003) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38(Pt3):257-65). Las levaduras se pueden transformar con vectores de replicación episómicos o mediante integración cromosómica estable mediante recombinación homóloga. Típicamente, se usan promotores inducibles para regular la expresión génica. Los ejemplos de dichos promotores incluyen GAL1, GAL7, e GAL5 y promotores de la metalotioneína tales como CUP1. Los vectores de expresión frecuentemente incluyen un marcador seleccionable tal como LEU2, TRP1, HIS3, y URA3 para la selección y el mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en las levaduras frecuentemente son solubles y la expresión simultánea con chaperoninas, tales como BIp y proteína disulfuro isomerasa, puede mejorar los niveles de expresión y la solubilidad. Adicionalmente, las proteínas expresadas en levadura pueden dirigirse a secreción usando fusiones del péptido señal de secreción tal como la señal de secreción del factor de emparejamiento de levadura de tipo alfa derivado de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de la superficie celular de levadura tales como el receptor de adhesión de emparejamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adenivorans*. Un sitio de escisión de la proteasa (por ejemplo, la proteasa Kex-2) se puede diseñar mediante ingeniería genética para eliminar las secuencias fusionadas de los polipéptidos a medida que salen de la ruta de secreción. La levadura también es capaz de glicosilación en motivos Asn-X-Ser/Thr.

c. Insectos y células de insectos

Insectos y células de insectos, especialmente mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tales como FX o formas modificadas del mismo (véase, por ejemplo, Muneta et al. (2003) *J. Vet. Med. Sci.* 65(2):219-23). Las células de insecto, y larvas de insectos, incluida la expresión en la hemolinfa, expresan elevados niveles de proteínas y son capaces de la mayoría de las modificaciones posteriores a la traducción utilizadas por los eucariotas superiores. Los baculovirus tienen una gama de hospedadores restringida que mejora la seguridad y reduce los problemas normativos de la expresión en eucariotas. Típicamente, los vectores de expresión usan un promotor tal como el promotor de la polihedrina de baculovirus para una expresión de alto nivel. Los sistemas de baculovirus habitualmente utilizados incluyen baculovirus tales como el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), y el virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyxmori* (BmNPV) y una línea de células de insecto tal como la Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para un alto nivel de expresión, la secuencia de nucleótidos de la molécula a expresar se fusiona inmediatamente después del codón de iniciación de la polihedrina del virus. Las señales de secreción en mamíferos se procesan con precisión en células de insecto, y se pueden usar para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Además, las líneas celulares *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a los sistemas de células de mamíferos.

Un sistema de expresión alternativo en células de insectos es el uso de células transformadas de forma estable. Las líneas de células como las células Schnieder 2 (S2) y las células Kc (*Drosophila melanogaster*) y las células C7 (*Aedes albopictus*) se pueden utilizar para la expresión. El promotor de la metalotioneína de *Drosophila* se puede utilizar para inducir altos niveles de expresión en la presencia de la inducción por metales pesados con cadmio o cobre. Los vectores de expresión se mantienen de forma típica mediante el uso de marcadores seleccionables tales como neomicina e higromicina.

d. Células de mamíferos

Los sistemas de expresión en mamíferos se pueden usar para expresar los polipéptidos de FX. Las construcciones de expresión se pueden transferir a las células de mamífero mediante infección con un virus, tal como con un adenovirus o mediante transferencia directa de ADN, tal como mediante liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para las células de mamífero incluyen de forma típica un sitio protegido de ARNm, una secuencia TATA, una secuencia de inicio de la traducción (secuencia consenso de Kozak) y elementos de poliadenilación. Dichos vectores

frecuentemente incluyen promotores-potenciadores de la transcripción para un alto nivel de expresión, por ejemplo, el promotor-potenciador de SV40, el promotor del citomegalovirus (CMV) humano, y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores-potenciadores están activos en muchos tipos de células. Los promotores del tipo de tejido y células y las regiones potenciadoras también se pueden usar para la expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, la de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus del tumor mamario de ratón, albúmina, alfa-fetoproteína, alfa-1-antitripsina, beta-globina, proteína básica de mielina, cadena ligera 2 de miosina, y región control del gen de la hormona de liberación gonadotrópica. Se pueden usar algunos marcadores para seleccionar y mantener las células con la construcción de expresión. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen, aunque no de forma limitativa, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforibosil transferasa, aminoglicósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa y timidina quinasa. La fusión con las moléculas de señalización de la superficie celular como TCR- ζ y Fc ϵ RI- γ pueden dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo sobre la superficie celular.

Están disponibles muchas líneas de células para la expresión en mamíferos, incluidas las de ratón, rata, ser humano, mono, y células de pollo y de hámster. Las líneas de células ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, BHK (es decir, células BHK-21), 293-F, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, ratón NS0 (no secretante) y otras líneas de células de mieloma, líneas de células de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 293T, 2B8, y células HKB. Las líneas de células también están disponibles adaptadas a medios exentos de suero que facilita la purificación de las proteínas secretadas desde la célula al medio de cultivo celular. Uno de estos ejemplos es línea de células EBNA-1 exenta de suero (Pham et al., (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 84:332-42).

e. Plantas

Las células de plantas transgénicas y de plantas se pueden usar para la expresión de FX. Las construcciones de expresión se transfieren de forma típica a plantas usando transferencia directa de ADN tal como mediante el bombardeo de microproyectiles, y la transferencia mediada con PEG a protoplastos, y con transformación mediada por *Agrobacterium*. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras y potenciadoras, elementos de terminación de la transcripción, y elementos de control de la traducción. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación se suelen dividir entre hospedadores de dicotiledóneas, como *Arabidopsis* y tabaco, y hospedadores de monocotiledóneas, como maíz y arroz. Los ejemplos de promotores vegetales usados para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de la ribosa bifosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. Marcadores seleccionables tales como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicina fosfotransferasa se utilizan a menudo para facilitar para facilitar la selección y el mantenimiento de las células transformadas. Las células vegetales transformadas se pueden mantener en cultivo como células, agregados (tejido de callo) o regenerarse a plantas completas. Puesto que las plantas tienen patrones de glicosilación diferentes a los de las células de mamíferos, esto puede influir en la elección de los hospedadores que producen FX. Las células vegetales transgénicas también pueden incluir algas genomanipuladas para producir proteínas (véase, por ejemplo, Mayfield et al. (2003) *PNAS* 100:438-442). Puesto que las plantas tienen patrones de glicosilación diferentes a los de las células de mamíferos, esto puede influir en la elección de los hospedadores que producen FX.

2. Purificación

Los métodos para purificar los polipéptidos de FX a partir de las células hospedadoras dependen de las células hospedadoras seleccionadas y de los sistemas de expresión. Para las moléculas secretadas, las proteínas generalmente se purifican del medio de cultivo tras eliminar las células. Para la expresión intracelular, las células se pueden lisar, y las proteínas purificarse del extracto. Cuando se usan para la expresión organismos transgénicos no humanos tales como plantas y animales transgénicos, los tejidos u órganos se pueden utilizar como material de partida para preparar un extracto de células lisadas. Adicionalmente, la producción en animales transgénicos no humanos puede incluir la producción de los polipéptidos en leche o huevos, que se pueden recoger, y si es necesario, adicionalmente las proteínas se pueden extraer y purificarse adicionalmente usando métodos convencionales en la técnica.

FX se puede purificar utilizando las técnicas convencionales de purificación de proteínas conocidas en la materia, que incluyendo, aunque no de forma limitativa, SDS-PAGE, fraccionamiento por tamaño y cromatografía de exclusión molecular, precipitación en sulfato amónico, cromatografía de quelatos, y cromatografía de intercambio iónico. Por ejemplo, los polipéptidos de FX se pueden purificar mediante cromatografía de intercambio aniónico. Los ejemplos de un método para purificar los polipéptidos de FX es mediante el uso de una columna de intercambio iónico, que permite la unión de cualquier polipéptido que tenga un dominio funcional Gla, seguido de elución en presencia de calcio. Las técnicas de purificación por afinidad también se pueden usar para mejorar la eficacia y la pureza de las preparaciones. Por ejemplo, anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen a FX se pueden utilizar en la purificación por afinidad. Las construcciones de expresión también se pueden diseñar mediante ingeniería genética para agregar una etiqueta de afinidad como un epítipo myc, fusión GST, o His₆ y purificarse por afinidad con anticuerpo anti-myc, resina de glutatión, y Niresin, respectivamente, para obtener una proteína. La

pureza se puede evaluar mediante cualquier método conocido en la materia, incluidas la electroforesis en gel y la tinción, así como las técnicas espectrofotométricas.

5 Como se analiza anteriormente, la proteasa de FX se puede expresar y purificar para que esté en una forma inactiva (forma zimógena) o, como alternativa, la proteasa expresada se puede purificar para obtener una forma activa. Los polipéptidos de FX zimógenos se pueden preparar en primer lugar por cualquiera de los métodos de producción descritos en el presente documento, que incluyen, aunque no de forma limitativa, la producción en células de mamíferos seguido de purificación. Los polipéptidos de FXa que se han activado mediante la eliminación del péptido de activación se pueden preparar *in vitro* (es decir FXa; forma bicatenaria). La escisión de los polipéptidos de FX a la forma de proteasa activa, FXa, se puede llevar a cabo mediante reacción con un activador (por ejemplo, el activador de FX de veneno de la víbora de Russell), eliminación del activador y posterior eliminación de la forma inactiva.

3. Proteínas de fusión

15 También se proporcionan proteínas de fusión que contienen un polipéptido de FX modificado y uno o más polipéptidos adicionales. Se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen dichas proteínas de fusión formuladas para su administración mediante una vía adecuada. Las proteínas de fusión se forman por unión en cualquier orden del polipéptido de FX modificado y un agente, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, factor de crecimiento, receptor, ligando, y otros de estos agentes con el fin de facilitar la purificación de un polipéptido de FX, alterar las propiedades farmacodinámicas de un polipéptido de FX mediante el direccionamiento, por ejemplo, mediante el direccionamiento del polipéptido a una célula o tejido diana, y/o aumentar la expresión o la secreción del polipéptido de FX. De forma típica, cualquier proteína de fusión de FX retiene al menos aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 % de la actividad catalítica, en comparación con un polipéptido de FX no de fusión, incluido un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de actividad catalítica en comparación con un polipéptido no de fusión.

30 La unión de un polipéptido de FX con otro polipéptido se puede llevar a cabo directamente, o bien indirectamente, con un enlazador. En un ejemplo, el enlazador puede ser un enlazador químico, tal como mediante agente heterobifuncionales o enlaces tiol u otros de dichos enlaces. La fusión también puede realizarse por medios recombinantes. La fusión de un polipéptido de FX con otro polipéptido puede ser hacia extremo N o el extremo C del polipéptido de FX. Los ejemplos no limitativos de los polipéptidos que se pueden usar en las proteínas de fusión con un polipéptido de FX proporcionado en el presente documento incluyen, por ejemplo, un polipéptido GST (glutión S-transferasa), dominio Fc de la inmunoglobulina G, o una secuencia señal heteróloga (por ejemplo de trombina). Las proteínas de fusión pueden contener componentes adicionales, tal como la proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli* que interviene en la captación de la proteína por las células (véase la solicitud internacional PCT n.º WO 01/32711).

40 Una proteína de fusión se puede producir por técnicas recombinantes convencionales. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptido se ligan juntos en marco de acuerdo con las técnicas convencionales, por ejemplo, empleando términos enroscados por el extremo o escalonados por el extremo para la ligadura, digestión con enzimas de restricción para proporcionar términos adecuados, rellenado de extremos cohesivos según sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable, y ligadura enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, se puede llevar a cabo la amplificación mediante la PCR de fragmentos génicos utilizando cebadores de anclaje que proporcionan un aumento de salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que se pueden hibridar posteriormente y volverse a amplificar para generar una secuencia de gen quimérico (véase, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Además, están comercialmente disponibles muchos vectores de expresión que codifica ya un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica FX se puede clonar en dicho vector de expresión de tal forma que el resto de fusión esté unido en marco a la proteína proteasa.

4. Modificación de polipéptidos

55 Se pueden preparar polipéptidos de FX modificados en forma de cadenas polipeptídicas puras o en forma de complejo. En algunas aplicaciones, puede ser deseable preparar FX modificado en una forma "pura" sin modificaciones posteriores a la traducción ni otras modificaciones químicas. Las cadenas polipeptídicas puras se pueden preparar en hospedadores adecuados que no modifican FX después de la traducción. Dichos polipéptidos también se pueden preparar en sistemas *in vitro* y utilizar la síntesis química de polipéptidos. Para otras aplicaciones, se pueden desear modificaciones especiales incluidas la pegilación, albuminación, glicosilación, carboxilación, hidroxilación, fosforilación, u otras modificaciones conocidas. Las modificaciones se pueden realizar *in vitro* o, por ejemplo, mediante la producción de FX modificado en un hospedador adecuado que produzca tales modificaciones.

65

5. Secuencias de nucleótidos

Se proporcionan en el presente documento moléculas de ácidos nucleicos que codifican FX o los polipéptidos de FX modificados. Las moléculas de ácidos nucleicos incluyen variantes alélicas o variantes de corte y empalme de cualquier polipéptido de FX codificado. Ejemplos de moléculas de ácidos nucleicos proporcionadas en el presente documento son cualquiera que codifique un polipéptido de FX modificado proporcionado en el presente documento, tal como cualquiera que codifique un polipéptido que se muestre en cualesquiera de las SEQ ID NOS: 4-133 o 417-546, o una forma madura, zimógena, activa o catalíticamente activa del mismo. En una realización, las moléculas de ácidos nucleicos proporcionadas en el presente documento tienen al menos 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, o 99 % de identidad de secuencia o que se hibridan en condiciones de alta rigurosidad del medio a lo largo de al menos un 70 % de la longitud completa de cualquier ácido nucleico que codifica un polipéptido de FX proporcionado en el presente documento. En otra realización, una molécula de ácido nucleico puede incluir aquellas con secuencias de codones degenerados que codifican cualquiera de los polipéptidos de FX proporcionados en el presente documento incluyen.

F. Evaluación de las actividades de FX modificado

Las actividades y propiedades de los polipéptidos de FX se pueden evaluar *in vitro* y/o *in vivo*. Los ensayos de dichas evaluaciones son bien conocidos por los expertos en la materia y saben correlacionar las actividades estudiadas y los resultados con las actividades terapéuticas y *in vivo*. En un ejemplo, se pueden evaluar las variantes de FX en comparación con FX sin modificar y/o natural. En otro ejemplo, la actividad de los polipéptidos de FX modificados se puede evaluar tras exposición *in vitro* o *in vivo* a AT-III y compararse con las de polipéptidos de FX modificados que no han estado expuestos a AT-III. Dichos ensayos se pueden llevar a cabo en presencia o ausencia de FVa. Los ensayos *in vitro* incluyen cualquier ensayo de laboratorio conocido del experto en la materia, tales como por ejemplo, los ensayos con células incluidos los ensayos de coagulación, ensayos de unión, ensayos con proteínas, y ensayos de biología molecular. Los ensayos *in vivo* incluyen ensayos de FX en modelos animales, así como de administración a seres humanos. En algunos casos, la actividad de FX *in vivo* se puede determinar por evaluación de la sangre, suero, u otro fluido corporal, según determinantes del ensayo. Las variantes de FX también se pueden estudiar *in vivo* para evaluar una actividad o propiedad, tal como un efecto terapéutico.

Típicamente, los ensayos se describen en el presente documento con respecto a la forma activada de FX, es decir FXa. Dichos ensayos también se pueden realizar con la forma zimógena inactiva, tal como para proporcionar un control negativo ya que dicha forma normalmente no tiene actividad proteolítica ni catalítica, necesaria para la actividad coagulante de FX. Además, dichos ensayos también se pueden llevar a cabo en presencia de cofactores, como FVa, que, en algunos casos, aumentan la actividad de FX.

1. Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* ilustrativos incluyen ensayos para evaluar la modificación y la actividad del polipéptido. Las modificaciones se pueden evaluar usando ensayos *in vitro* que evalúan la γ -carboxilación y otras modificaciones postraduccionales, ensayos de proteínas y ensayos conformacionales conocidos en la materia. Los ensayos de actividad incluyen, aunque no de forma limitativa, medición de la interacción de FXa con otros factores de coagulación, tal como el Factor Va y la protrombina, ensayos proteolítica para determinar la actividad proteolítica de los polipéptidos de FXa, los ensayos para determinar la unión y/o afinidad de los polipéptidos de FXa con fosfatidilserina y otros fosfolípidos, y ensayos con células para determinar el efecto de los polipéptidos de FXa sobre la coagulación.

Las concentraciones de los polipéptidos de FXa modificados se pueden evaluar por métodos bien conocidos en la materia, incluidos, aunque no de forma limitativa, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), SDS-PAGE; métodos de Bradford, Lowry, y del ácido bicíncónico (BCA); absorbancia UV; y otros métodos cuantificables para marcado de proteínas, tal como, aunque no de forma limitativa, métodos inmunológicos, radioactivos y fluorescentes, y métodos relacionados. La evaluación de los productos e escisión de las reacciones de proteólisis, incluida la escisión de polipéptidos de protrombina, o de productos producidos por la actividad proteasa de FXa, se puede llevar a cabo utilizando métodos incluidos, aunque no de forma limitativa, escisión de sustrato cromogénico, HPLC, análisis SDS/PAGE, ELISA, transferencia Western, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, secuenciación del extremo NH₂, y marcado de proteínas.

Las propiedades estructurales de los polipéptidos de FXa modificados también se pueden evaluar. Por ejemplo, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) y microscopía de crioelectrones (cryo-EM) de polipéptidos de FX modificados, pueden llevarse a cabo para evaluar la estructura tridimensional de los polipéptidos de FX y/u otras propiedades de los polipéptidos de FX, como unión a sustrato, Ca²⁺, o cofactor.

Adicionalmente, la presencia de una extensa degradación de FXa se puede medir por técnicas convencionales, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), y transferencia Western de las muestras que contienen FXa sometidas a electroforesis. Los polipéptidos de FXa que se han expuesto a proteasas también se pueden someter a secuenciación del extremo N para determinar la ubicación o los cambios en los sitios

de escisión de los polipéptidos de FXa modificados.

a. Modificación posterior a la traducción

5 Los polipéptidos de FX/FXa también se pueden evaluar para determinar si la presencia de modificaciones posteriores a la traducción. Dichos ensayos son conocidos en la técnica e incluyen ensayos para medir la glicosilación, hidroxilación y carboxilación. En un ensayo ilustrativo de glicosilación, se puede llevar a cabo el análisis de carbohidratos, por ejemplo, con análisis SDS page de los polipéptidos de FX/FXa expuestos a hidrazinólisis o tratamiento con endoglicosidasa. La hidrazinólisis libera glicanos unidos a N o a O desde las glicoproteínas mediante
10 incubación con una hidrazina anhidra, mientras que la liberación con endoglicosidasa implica PNGase F, que libera la mayoría de N-glicanos de las glicoproteínas. La hidrazinólisis o tratamiento con endoglicosidasa de los polipéptidos de FX/FXa genera un extremo reductor que se pueden etiquetar con una etiqueta de fluoróforo o cromóforo. Los polipéptidos de FX/FXa etiquetados se pueden analizar mediante electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE). La etiqueta fluorescente de los glicanos también se puede usar para el análisis de los monosacáridos, perfilado, o adquisición de huella dactilar de patrones de glicosilación complejos mediante HPLC. Los métodos de HPLC ilustrativos incluyen la cromatografía de interacción hidrófila, interacción electrónica, intercambio iónico, interacción hidrófoba, y cromatografía de exclusión molecular. Las sondas de glicano ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, 3-(acetilamino)-6-aminoacridina (AA-Ac) y ácido 2-aminobenzoico (2-AA). Los restos de carbohidrato también se pueden detectar mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen el
20 polipéptido de FX/FXa glicosilado.

Un ejemplo ilustrativo para medir la β -hidroxilación comprende análisis por HPLC en fase invertida de los polipéptidos de FX/FXa que se han sometido a hidrólisis alcalina (Fernlund, P y J. Stenflo (1983) J. Biol. Chem. 258(20):12509-12). La carboxilación y γ -carboxilación de los polipéptidos de FX/FXa se puede evaluar usando hidrólisis alcalina, seguida de HPL, usando una columna de intercambio catiónico, y los restos modificados se
25 pueden identificar mediante análisis de secuenciación del extremo amino con degradación de Edman (Camire et al. (2000) Biochemistry. 39(46):14322-14329). La interacción de un polipéptido de FX que contiene el propéptido (pro-FX) con la carboxilasa responsable de la modificación con γ -carboxilato posterior a la traducción también se puede evaluar. Por ejemplo, las afinidades relativas de los péptidos de FX por la carboxilasa también se pueden comparar mediante la determinación de las constantes de inhibición (K_i) frente a un sustrato de dominio Factor IX propéptido/ácido gamma-carboxiglutámico (Stanley, T. B. (1999) J. Biol. Chem. 274:16940-16944).

b. Actividad proteolítica (actividad catalítica)

35 Los polipéptidos de FXa modificados se pueden evaluar para determinar la actividad proteolítica. La actividad proteolítica de FXa se puede medir usando sustratos cromógenos como F-3301 ($\text{CH}_3\text{OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA-AcOH}$; Sigma Aldrich), S-2222 Bz-Ile-Glu(g-OR)-Gly-Arg-pNAHCl; R=H (50 %) y R=CH₃ (50 %); DiaPharma), S-2337 (benzoyl-Ile-Glu-(γ -piperidil)-Gly-Arg-p-nitroanilina; Kabi Diagnostica), CBS 39.31 (Diagnostic Stago Ltd.) o sustratos fluorógenos tales como Pefaf fluor FXa ($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-D-CHA-Gly-Arg-AMC-AcOH}$; Pentapharm). Los polipéptidos de FXa, solos o en presencia de FVA y, opcionalmente, en presencia de fosfolípidos, se incuban con
40 diferentes concentraciones de sustrato cromógeno. La escisión del sustrato puede controlarse mediante absorbancia o fluorescencia y la velocidad de hidrólisis del sustrato puede determinarse mediante regresión lineal usando un programa informático fácilmente disponible.

45 La actividad proteolítica del Factor Xa también se pueden evaluar indirectamente mediante el seguimiento de la activación de los sustratos de FXa, como la protrombina. Los polipéptidos de FXa, en presencia de fosfolípidos, con o sin preincubación con FVA, se pueden incubar con protrombina purificada (disponible comercialmente). La cantidad de trombina activa producida como consecuencia de la escisión del polipéptido de FXa de la protrombina se mide a continuación como la actividad de la trombina por un sustrato fluorogénico, tal como Pefaf fluor TH (H-D-CHA-Ala-Arg-AMC•2AcOH; Centerchem), que se supervisa mediante cambios en la fluorescencia (documento US 2005/0142032, véase también el Ejemplo 4 más adelante) o un sustrato cromogénico, como T3068 (diacetato de β -Ala-Gly-Arg p-nitroanilida; Sigma Aldrich), que se controla mediante los cambios en la absorbancia. La actividad del polipéptido del Factor Xa se deduce a continuación a partir de la actividad medida de la trombina.

55 c. Actividad de coagulación

Los polipéptidos de FX/FXa se pueden someter a un ensayo para determinar la actividad de coagulación usando ensayos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, algunos de los análisis incluyen, aunque no de forma limitativa, un ensayo de coagulación en dos etapas (Skogen et al., (1983) J. Biol. Chem. 259(4):2306-2310); el ensayo del tiempo de protrombina (PT); ensayos que son modificaciones del ensayo PT; el tiempo de tromboelastografía parcial activada (aPTT); tiempo de coagulación activado (ACT); tiempo de coagulación activado con factor X activado diluido (XACT) (Exner et al. (2000) Blood Coagul Fibrinolysis. 14(8):773-779); tiempo de coagulación activado recalcificado; el tiempo de coagulación Lee-White; tromboelastografía (TEG); o tromboelastografía rotacional (ROTEM). Por ejemplo, la actividad de coagulación de un polipéptido de FX/FXa modificado se puede terminar con un ensayo de
60 tipo PT donde FX/FXa se diluye en plasma deficiente en FX/FXa, y se mezcla con el reactivo del tiempo de protrombina (con fosfolípidos y calcio), tal como está disponible como Innovin™ de Dade Behring. La formación de

coágulos se detecta ópticamente, y el tiempo hasta la coagulación se determina y se compara con el plasma deficiente en FX en solitario.

d. Unión a y/o inhibición mediante otras proteínas y moléculas

5 Los ensayos de inhibición se pueden usar para medir la resistencia de los polipéptidos de FXa modificados a los inhibidores de FXa, tal como el complejo de antitrombina III (AT-III). La evaluación de la inhibición a otros inhibidores también se puede someter a ensayo e incluye, aunque no de forma limitativa, otros inhibidores de la serina proteasa, tal como el inhibidor de la proteasa dependiendo de la proteína Z (ZPI), y anticuerpos específicos de FXa. La inhibición se puede evaluar mediante incubación de la AT-III y heparina comercialmente disponibles con polipéptidos de FXa. A continuación, la actividad de FXa se puede medir usando uno o más de los ensayos de actividad o coagulación anteriormente descritos, y la inhibición mediante AT-III o ZPI se puede evaluar por comparación de la actividad de los polipéptidos de FXa incubados con el inhibidor, con la actividad de los polipéptidos de FXa que no se han incubado con el inhibidor.

15 Los polipéptidos de FXa se pueden someter a ensayo para determinar la unión a otros factores de coagulación e inhibidores. Por ejemplo, las interacciones directas e indirectas de FXa con cofactores, como FVa, sustratos, como protrombina, e inhibidores, tal como AT-III, ZPI, y heparina, se puede evaluar usando cualquier ensayo de unión conocido en la técnica, que incluyen, aunque no de forma limitativa, inmunoprecipitación; purificación en columna; SDS-PAGE no reductor; resonancia de plasmón superficial (SPR), incluidos los ensayos BIAcore®; transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET); polarización de la fluorescencia (FP); calorimetría de valoración isotérmica (ITC); dicroísmo circular (CD); ensayos de complementación de fragmentos de proteínas (PCA); espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN); dispersión de luz; equilibrio de sedimentación; cromatografía de filtración en gel en zona pequeña; retardo en gel; transferencia de western con proteínas no anticuerpos, polarización de la fluorescencia; huella de proteínas con radicales libres; expresión en fagos; y varios sistemas de doble híbrido. En un ejemplo, la afinidad de unión de FXa a FVa unido a fosfolípido se determinó usando FXa y FVa radiomarcados y centrifugación con aceite (Tracy et al., (1981) J. Biol. Chem. 256(2): 743-751).

e. Afinidad por fosfolípidos

30 La unión y/o la afinidad del polipéptido de FX/FXa por fosfatidilserina (PS) y otros fosfolípidos puede determinarse usando ensayos bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo Burri et al., (1987) Biochimica et Biophysica Acta. 923(2): 176-186). Los fosfolípidos muy puros (por ejemplo, concentraciones conocidas de PS de bovino y fosfatidilcolinas (PC) de huevo, que están comercialmente disponibles, como de Sigma, en disolvente orgánico, se puede usar para preparar pequeñas vesículas monolamelares de fosfolípidos. La unión del polipéptido de FX/FXa a estas vesículas de PS/PC se puede determinar mediante dispersión de luz relativa a 90° para la luz incidente. La intensidad de la dispersión de luz con PC/PS solo y con PC/PS/FX o PC/PS/FXa se mide para determinar la constante de disociación (Burri et al., (1987) Biochimica et Biophysica Acta. 923(2): 176-186). La resonancia de plasmón superficial, tal como en un instrumento biosensor BIAcore, también se puede usar para medir la afinidad de los polipéptidos de FX/FXa por las membranas de fosfolípidos (Erb et al., (2002) Eur. J. Biochem. 269(12):3041-3046).

2. Modelos de animales no humanos

45 Los modelos de animales no humanos se pueden usar para evaluar la actividad, eficacia y seguridad de los polipéptidos de FX/FXa modificados. Por ejemplo, se pueden usar animales no humanos como modelos de una enfermedad o dolencia. Los animales no humanos se pueden inyectar con enfermedad y/o sustancias inductoras de fenotipo, tal como una sobredosis de un anticoagulante terapéutico, antes de la administración de las variantes de FX/FXa, tal como cualquier variante de FX/FXa definida en la Tabla 14 y, en particular, las formas de zimógeno o FXa o catalíticamente activa de las mismas, para controlar los efectos sobre la hemostasia.

50 Los modelos genéticos también son útiles. Los animales, tal como los ratones, se pueden generar para imitar una enfermedad o dolencia mediante la expresión en exceso, expresión defectiva, o inactivación, de uno o más genes, tal como, por ejemplo, ratones inactivados génicamente para presentar la hemofilia A (Bi et al. (1995) Nat Gen 10:119-121). Se pueden generar deficiencias de otros factores de coagulación también para estudiar las variantes de FX/FXa, incluidos, aunque no de forma limitativa, deficiencia en Factor VIII; deficiencia en Factor IX (por ejemplo, modelos de la hemofilia B); deficiencia en Factor X; deficiencia en Factor XI (modelos de la hemofilia C); deficiencia en Factor XII; y los tipos I, II, IV, V, y VI de deficiencias en factor de coagulación múltiple familiar (FMFD) (véase, Roberts, HR y MD Bingham, "Other Coagulation Factor Deficiencias". Thrombosis and Hemorrhage, 2ª ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1998: 773-802). Dichos animales se pueden generar por técnicas de producción de animales transgénicos bien conocidas en la técnica, o usando cepas de origen natural o mutantes inducidos. Los ejemplos de modelos de animales no humanos útiles de las enfermedades asociadas con FX/FXa incluyen, aunque no de forma limitativa, modelos de trastornos hemorrágicos, en particular hemofilia, o enfermedad trombótica. Los modelos de animales no humanos para lesiones o traumatismos, y los modelos animales de coagulopatía hemodilucional postraumática, o coagulopatía traumática aguda, también se pueden utilizar para evaluar la actividad, tal como la actividad de coagulación, de los polipéptidos de FX/FXa. Estos modelos de animales no humanos se

pueden usar para supervisar la actividad variante de FX/FXa en comparación con un polipéptido de FX/FXa natural.

Los modelos animales también se pueden usar para supervisar la estabilidad, semivida, y aclaramiento de los polipéptidos de FX/FXa modificados. Dichos ensayos son útiles para comparar los polipéptidos de FX/FXa modificados y par calcular las dosis y los regímenes de dosis para otros animales no humanos y para ensayos clínicos. Por ejemplo, un polipéptido de FX/FXa modificado, tal como cualquier variante de FX/FXa proporcionada en el presente documento que incluye, por ejemplo, cualquiera definido en la Tabla 14 y, en particular, las porciones zimógena, FXa o catalíticamente activa de las mismas, se puede inyectar en la vena de la cola de ratones. A continuación, se extrajeron muestras de sangre en los puntos temporales después de la inyección (tal como minutos, horas y días después) y a continuación el nivel de los polipéptidos de FX/FXa modificados en las muestras corporales incluidos, aunque no de forma limitativa, suero o plasma, se pueden controlar en puntos temporales específicos, por ejemplo, mediante ELISA o radioinmunoensayo. Las muestras de sangre de diferentes puntos temporales después de la inyección de los polipéptidos de FX/FXa también se pueden analizar para determinar la actividad de coagulación usando varios métodos, tal como se descrito en el Ejemplo 8. Estos tipos de estudios farmacocinéticos pueden proporcionar información relativa a la semivida, aclaramiento y estabilidad de los polipéptidos de FX/FXa, lo que puede ayudar a determinar las dosificaciones adecuada para la administración de un procoagulante.

Los polipéptidos de FX/FXa modificados, tal como cualquiera de los definidos en la Tabla 14 y, en particular, las formas de zimógeno, FXa o catalíticamente activa de las mismas, se pueden estudiar para determinar su eficacia terapéutica usando modelos animales para la hemofilia. En un ejemplo no limitativo, se puede usar un modelo animal tal como un ratón. Los modelos de la hemofilia en ratón están disponibles en la técnica y se pueden utilizar para someter a ensayo los polipéptidos de FX/FXa modificados. Por ejemplo, un modelo de la hemofilia A en ratón se produce mediante inyección de anticuerpos contra FVIII y se puede usar para evaluar la actividad anticoagulante de los polipéptidos del factor de coagulación (por ejemplo, Tranholm et al. Blood (2003)102:3615-3620) y el ensayo de los polipéptidos de FX/FXa modificados en un modelo de hemofilia inducida se contempla. Los modelos genéticos en ratón de la hemofilia A (Bi et al. (1995) Nat Gen 10:119-121) o la hemofilia B (Margaritis et al. (2004) J Clin Invest 113:1025-1031) también se puede usar para someter a ensayo los polipéptidos de FX/FXa modificados.

Los modelos no en ratón de los trastornos hemorrágicos también existen. La actividad del polipéptido de FX/FXa también se puede evaluar en ratas con hemorragia inducida por warfarina o hemorragia inducida por melagatran (Diness et al. (1992) Thromb. Re.s 67:233-241, Elg et al. (2001) Thromb. Res. 101:145-157), y conejos con hemorragia inducida con heparina (Chan et al. (2003) J. Thromb. Haemost. 1:760-765). Los modelos de sobredosis de anticoagulantes en primates (Gruber et al., (2008) Blood 112: Abstract 3825) también se pueden estudiar para estudiar la actividad del polipéptido de FX/FX modificado. La hemofilia A endogámica, la hemofilia B y la enfermedad de Von Willebrand en perros que muestran hemorragia intensa (Brinkhous et al. (1989) PNAS 86:1382-1386) también se pueden usar en estudios con animales no humanos con polipéptidos de FX/FXa modificados. La actividad de los polipéptidos de FX/FXa modificados también se puede evaluar en un modelo hemorrágico en conejos donde la trombocitopenia se induce mediante una combinación de irradiación gamma y el uso de anticuerpos dirigidos contra plaquetas (Tranholm et al. (2003) Thromb. Res. 109:217-223).

Además de los animales con trastornos hemorrágicos generalizados, los modelos de coagulopatía adquirida por lesión y traumatismo también se pueden utilizar para evaluar la actividad de los polipéptidos de FX/FXa modificados, y su seguridad y eficacia como anticoagulante terapéutico. Los ejemplos no limitativos de dichos modelos incluyen un modelo de estenosis coronaria en conejo (Fattorutto et al. (2004) Can J Anaesth; 51:672-679), un modelo de lesión hepática de grado V en cerdos (Kopelman et al. (2000) Cryobiology; 40:210-217; Martinowitz et al. (2001) J Trauma; 50:721-729), un modelo de aortotomía en cerdos (Sondeen et al. (2004) Shock; 22:163-168), un modelo de coagulopatía aguda por traumatismo en cerdos (Harr et al., (2011) J Surg Res; 170(2):319-324); y un modelo de coagulopatía adquirida por traumatismo en cerdos (Dickneite, G. e I. Pragst, (2009) Br J Anaesth; 102(3):345-354).

3. Ensayos clínicos

Están disponibles muchos ensayos para evaluar la actividad de FX/FXa para su uso clínico. Dichos ensayos pueden incluir la evaluación de la coagulación, la estabilidad de la proteína y la semivida *in vivo*, y los ensayos fenotípicos. Los ensayos fenotípicos y los ensayos para evaluar el efecto terapéutico del tratamiento con FX/FXa incluye la evaluación de los niveles de FX/FXa en sangre (por ejemplo, la medición de FX/FXa en suero antes de la administración y en puntos temporales después de las administraciones, incluyendo, después de la primera administración, inmediatamente después de la última administración, y en puntos temporales intermedios, con corrección para el índice de masa corporal (BMI)), evaluación de la coagulación de la sangre *in vitro* usando los métodos anteriormente descritos después del tratamiento con FX/FXa (por ejemplo ensayo PT), y respuesta fenotípica al tratamiento con FX/FXa incluida la mejora de los síntomas con el tiempo, en comparación con los sujetos tratados con un FX/FXa no modificado y/o de tipo natural o bien un placebo. Los pacientes tratados con los polipéptidos de FX/FXa modificados se pueden controlar para determinar la pérdida de sangre, necesidades de transfusión, y hemoglobina. Los pacientes se pueden vigilar regularmente durante un periodo de tiempo para administraciones rutinarias o repetidas, o después de la administración en respuesta a eventos agudos, como una hemorragias, traumatismo, o procedimientos quirúrgicos.

G. Formulaciones y administración

Se proporcionan en el presente composiciones de polipéptidos de FX modificados, incluyendo un zimógeno de FX modificado y polipéptidos de FXa modificados, para su uso en el tratamiento de trastornos hemorrágicos. Dichas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un zimógeno de FX modificado o polipéptido de FXa como se describe en el presente documento. Las concentraciones eficaces de los polipéptidos de FX o de los derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se mezclan con un transportador o vehículo farmacéutico adecuado para la administración sistémica, tópica o local. Los compuestos se incluyen en una cantidad eficaz para tratar el trastorno seleccionado. La concentración del compuesto activo en la composición dependerá de las tasas de absorción, inactivación, excreción del compuesto activo, el calendario de dosificación, y la cantidad administrada así como otros factores conocidos por los expertos en la materia.

Los transportadores o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos proporcionados en el presente documento incluyen cualquiera de dichos transportadores conocidos por los expertos en la materia por ser adecuados al modo concreto de administración. Se pueden proporcionar también composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de FX descrito en el presente documento como un polvo liofilizado que se reconstituye, tal como con agua estéril, inmediatamente antes de la administración.

1. Formulaciones

Las composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido de FX modificado, incluyendo un zimógeno de FX modificado y polipéptidos de FXa modificados, puede formularse de cualquier manera convencional mezclando una cantidad seleccionada del polipéptido con uno o más transportadores o excipientes fisiológicamente aceptables. La selección del transportador o excipiente está comprendida en los conocimientos de la profesión administradora y puede depender de numerosos parámetros. Estos incluyen, por ejemplo, el modo de administración (es decir, sistémica, oral, nasal, pulmonar, local, tópica, o cualquier otro modo) y del trastorno tratado.

El compuesto puede suspenderse en forma micronizada u otra forma adecuada o puede derivatizarse para producir un producto activo más soluble. La forma de la mezcla resultante depende de numerosos factores, incluyendo el modo previsto de administración y la solubilidad del compuesto en el transportador o vehículo seleccionado. Las mezclas resultantes son soluciones, suspensiones, emulsiones y otras de las mencionadas mezclas, y se pueden formular como una mezcla no acuosa o acuosa, cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, vendajes, o cualquier otra formulación adecuada para la administración sistémica, tópica o local. Para la administración interna, tal como, administración intramuscular, parenteral o intraarticular, los polipéptidos se pueden formular como una solución de forma de suspensión en un medio basado en agua, tal como una solución salina tamponada isotónicamente o se combinan con un soporte biocompatible o bioadhesivo previsto para la administración interna.

En general, las composiciones farmacéuticamente aceptables se en vista de la aprobación por un organismo regulador o se preparan de acuerdo con la farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y en seres humanos. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir transportadores tales como un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra una isoforma. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos cuyo origen es petróleo, animal, vegetal o de origen sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es el transportador típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se pueden emplear también como transportadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener junto con un principio activo: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, o carboximetilcelulosa; un lubricante, tales como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como gelatina de goma acacia, glucosa, melazas, polivinilpirrolidona, celulosas y sus derivados, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes conocidos de los expertos en la materia. Los excipientes farmacéuticamente adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, y etanol. Una composición, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH, por ejemplo, acetato, citrato sódico, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, trietanolamina acetato de sodio, oleato de trietanolamina, y otros de los mencionados agentes. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, y formulaciones de liberación sostenida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador conteniendo una mezcla en polvo de un compuesto terapéutico y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Se puede formular una composición como un supositorio, con aglutinantes y transportadores convencionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir transportadores normalizados tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y otros de los mencionados agentes. Las preparaciones para la administración oral también pueden formularse de manera adecuada con inhibidores de la proteasa, tales como un inhibidor de Bowman-Birk, un inhibidor de Bowman-Birk conjugado, aprotinina y camostat.

Los ejemplos de transportadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, generalmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de transportador con el fin de proporcionar la forma para la administración adecuada a un sujeto o paciente.

5 La formulación debe continuar el modo de administración. Por ejemplo, las composiciones que contienen el FX modificado, incluyendo un zimógeno de FX modificado y polipéptidos de FXa modificados, se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua). Las composiciones inyectables pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una disolución en 1,4-butanodiol. Los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, que incluyen, aunque no de forma limitativa, monoglicéridos o diglicéridos sintéticos, ácidos grasos (incluyendo ácido oleico), aceites vegetales de origen natural incluyendo aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón, y otros aceites, o vehículos grasos sintéticos similares a oleato de etilo. Tampones, conservantes, antioxidantes, y los ingredientes adecuados, se pueden incorporar según se requiera, o, como alternativa, pueden comprender la formulación.

20 Los polipéptidos se pueden formular como el único principio farmacéuticamente activo en la composición o se pueden combinar con otros principios activos. Los polipéptidos se pueden dirigir para la administración, tal como mediante conjugación con un agente director, tal como un anticuerpo. Las suspensiones liposómicas, incluyendo liposomas dirigidos a tejidos, pueden ser también adecuadas como transportadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden preparar formulaciones liposómicas como se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.522.811. La administración liposómica puede incluir también formulaciones de liberación lenta, incluyendo matrices farmacéuticas tales como geles de colágeno y liposomas modificados con fibronectina (véase, por ejemplo, Weiner et al. (1985) J Pharm Sci. 74(9): 922-5). Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden contener además uno o más adyuvantes que facilitan la administración, tal como, aunque no de forma limitativa, transportadores inertes, o sistemas de dispersión coloidales. Los ejemplos representativos y no limitantes de dichos transportadores inertes pueden seleccionarse entre agua, alcohol isopropílico, fluorocarbonos gaseosos, alcohol etílico, polivinilpirrolidona, propilenglicol, un material productor de gel, alcohol estearílico, ácido esteárico, espermaceti, monooleato de sorbitán, metilcelulosa, así como las combinaciones adecuadas de dos o más de los mismos. El compuesto activo se incluye en el transportador farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios indeseables sobre el sujeto tratado. La concentración terapéuticamente eficaz se puede determinar empíricamente ensayando los compuestos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos, tales como los ensayos proporcionados en el presente documento.

a. Dosificaciones

40 Las composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido de FX modificado, incluyendo un zimógeno de FX modificado y polipéptidos de FXa modificados, proporcionados en el presente documento pueden formularse para una administración monodosis (directa), administración multidosis o para dilución u otra modificación. Las concentraciones de los compuestos en las formulaciones son eficaces para la administración de una cantidad, tras la administración, que es eficaz para el tratamiento previsto. Típicamente, las composiciones se formulan para una administración monodosis. Para formular una composición, se disuelve la fracción en peso de un compuesto o mezcla del mismo, suspendido, disperso, o mezclado de otra forma en un vehículo seleccionado en una concentración eficaz de tal manera que la dolencia tratada se alivia o mejora.

50 La cantidad precisa o dosis del agente terapéutico administrado depende del polipéptido de FX concreto (por ejemplo, zimógeno de FX o FXa y/o de la modificación particular), la ruta de administración, y otras consideraciones, tal como la gravedad de la enfermedad y el peso y el estado general del sujeto. La administración local del agente terapéutico requerirá normalmente una dosificación más pequeña que cualquier modo de administración sistémica, aunque la concentración local del agente terapéutico puede, en algunos casos, ser mayor tras la administración local que se puede conseguir con seguridad tras la administración sistémica.

55 Si es necesario, se puede determinar empíricamente o extrapolarse una dosificación y duración concreta y un protocolo de tratamiento. Por ejemplo, se pueden usar dosis ilustrativas de polipéptidos de FX recombinantes y nativos como un punto de partida para determinar las dosificaciones adecuadas. En general, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento pueden ser eficaces en cantidades y/o frecuencias de dosificación reducidas en comparación con un polipéptido de FX natural recombinante. La duración del tratamiento y el intervalo entre inyecciones variará con la gravedad de la hemorragia y la respuesta del paciente al tratamiento, y se puede ajustar de acuerdo con ello. Pueden tenerse en cuenta factores tales como el nivel de actividad y la semivida del FX modificado en comparación con el FX sin modificar cuando se realizan determinaciones de la dosis. Se pueden determinar empíricamente las dosificaciones y regímenes concretos. Por ejemplo, un polipéptido de FX modificado que presenta una semivida más larga que el polipéptido de FX sin modificar puede administrarse a dosis más bajas y/o con menos frecuencia que el polipéptido de FX sin modificar. De manera similar, las dosificaciones

requeridas para el efecto terapéutico utilizando un polipéptido de FX modificado que presenta una actividad coagulante aumentada en comparación con un polipéptido de FX sin modificar pueden reducirse en frecuencia y en cantidad. Las dosificaciones y regímenes concretos pueden determinarse empíricamente por un experto en la materia.

5 La cantidad de dosis del polipéptido de FX modificado, incluido el zimógeno de FX o FXa, puede ser una cantidad que eleve los niveles en sangre del polipéptido a entre aproximadamente 10 % a aproximadamente 400 %, 50 % a 100 % o 100 % a 250 % de la cantidad normal de la forma del polipéptido de FX. Está comprendido en el nivel de conocimientos de un experto en la materia controlar el nivel en plasma o en la sangre del polipéptido de FX administrado para controlar o ajustar el nivel de dosis.

10 La composición puede formularse con un polipéptido de FX en una cantidad que es de o está entre aproximadamente 50 Unidades/ml a 1000 Unidades/ml, tal como 50 Unidades/ml a 500 Unidades/ml, 100 Unidades/ml a 600 Unidades/ml o 400 Unidades/ml a 1000 Unidades/ml. El volumen de las composiciones puede ser de 0,5 ml a 100 ml, tal como de 0,5 ml a 5 ml, 1 ml a 10 ml, 5 ml a 50 ml o 30 ml a 60 ml.

Por ejemplo, los polipéptidos de FX proporcionados en el presente documento pueden formularse para la administración a un paciente en una dosificación de 0,01 a 1.000 mg, tal como de 0,05 a 500 mg, por ejemplo 1 mg a 500 mg. una cantidad eficaz del fármaco se suministra ordinariamente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, tal como de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día, por ejemplo, 0,01 mg/kg a 1 mg/kg, 0,05 mg/kg a 0,5 mg/kg, 0,01 mg/kg a 0,250 mg/kg, 0,01 mg/kg a 0,075 mg/kg o al menos o aproximadamente al menos 0,04 mg/kg. En general, la dosificación es al menos una vez al día, al menos hasta que se observa una mejora suficiente. La dosificación puede efectuarse mediante infusión en bolo durante el curso de varios minutos (por ejemplo, 1 a 10 minutos o 2 a 5 minutos). Como alternativa, el paciente puede recibir una infusión en bolo cada una a tres horas, o si se observa una mejora suficiente, se puede efectuar una infusión una vez al día del polipéptido. Por lo tanto, en algunos ejemplos, la dosis puede repetirse cada hora, diariamente, semanal o mensualmente. Por ejemplo, para el tratamiento de pacientes que experimentan un episodio hemorrágico, tales como pacientes que tienen una deficiencia en el factor de coagulación u otros traumas asociados, la dosis puede repetirse cada 1-24 horas, tal como cada 2-12 horas o 4-6 horas, hasta que se consigue la hemostasia.

b. Formas farmacéuticas

Los compuestos farmacéuticos terapéuticamente activos y sus derivados se formulan y administran normalmente en formas monodosis o formas multidosis. Se pueden proporcionar formulaciones para la administración a seres humanos y animales en formas farmacéuticas que incluyen, aunque no de forma limitativa, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones parenterales estériles, soluciones o suspensiones orales, y emulsiones de agua en aceite que contienen cantidades adecuadas de los compuestos o de sus derivados farmacéuticamente aceptables. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el transportador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Los ejemplos de formas monodosis incluyen ampollas y jeringuillas y comprimidos o cápsulas envasados individualmente. En algunos ejemplos, la dosis unitaria se proporciona como un polvo liofilizado que está reconstituido antes de la administración. Por ejemplo, se puede proporcionar un polipéptido de FX como un polvo liofilizado que se reconstituye con una solución adecuada para generar una solución monodosis para inyección. En algunas realizaciones, el polvo liofilizado puede contener el polipéptido de FX y componentes adicionales, tales como sales, de tal manera que la reconstitución con agua destilada estéril da como resultado un polipéptido de FX en una solución tamponada o salina. Se pueden administrar formas monodosis en fracciones o sus múltiplos. Una forma multidosis es una pluralidad de formas monodosis idénticas envasadas en un único recipiente que se van a administrar en forma monodosis segregada. Los ejemplos de formas multidosis incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o frascos de pintas o galones. Por lo tanto, la forma multidosis es una multiplicidad de dosis unitarias que no se segregan en envase.

2. Administración de polipéptidos FX modificados

55 Los polipéptidos de FX modificados, incluido el zimógeno del FX o polipéptidos de FXa, proporcionados en el presente documento (es decir, compuestos activos) se pueden administrar *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo* poniendo en contacto una mezcla, tal como un fluido corporal u otra muestra de tejido, con un polipéptido de FX modificado. Por ejemplo, cuando se administra un compuesto *ex vivo*, una muestra de fluido o de tejido corporal de un sujeto puede ponerse en contacto con los polipéptidos de FX que están revestidos sobre un tubo o filtro, tales como por ejemplo, un tubo o filtro en una máquina de derivación. Cuando se administra *in vivo*, los compuestos activos se pueden administrar por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vía oral, nasal, pulmonar, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraarticular, intracisternal, intraocular, intraventricular, intratecal, intramuscular, intraperitoneal, intratraqueal o tópica, así como cualquier combinación de dos cualesquiera o más de las mismas, en forma líquida, semilíquida o sólida, y se formulan en una forma adecuada para cada vía de administración. Los polipéptidos de FX modificados se pueden administrar una vez o más de una vez, tal como dos veces, tres veces, cuatro veces, o cualquier número de veces que sean necesarias para conseguir un efecto terapéutico. Se pueden

realizar administraciones múltiples por cualquier vía o combinación de vías, y se puede administrar de forma horaria (por ejemplo, cada 2 horas, cada tres horas, cada cuatro horas o más), diariamente, semanal o mensualmente.

5 La vía de administración más adecuada variará dependiendo de la patología a tratar, por ejemplo, la ubicación de un trastorno hemorrágico. En general, los polipéptidos de FX se administrarán mediante inyección de bolo intravenoso. El tiempo de administración (infusión) puede ser durante varios minutos, tal como de aproximadamente 1 a 10 minutos o de 2 a 5 minutos. En otros ejemplos, se pueden mantener niveles en sangre deseables de FX mediante una infusión continua del principio activo según se dilucida por los niveles plasmáticos. Se deberá indicar que el médico responsable sabría cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la terapia a una dosificación menor por 10 motivos de toxicidad, o disfunción en la médula ósea, hígado o riñón. Por el contrario, el médico tratante también sabrá cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuese adecuada (excluyendo efectos secundarios tóxicos).

15 En otros ejemplos, la situación del trastorno hemorrágico podría indicar que la formulación de FX se administre por una vía alternativa. Por ejemplo, administración local, incluida la administración al cerebro (por ejemplo, por vía intraventricular) podría llevarse a cabo cuando el paciente esté experimentando hemorragias en esta región. De manera similar, para el tratamiento de hemorragia en las articulaciones, la administración mediante inyección de agente terapéutico en la articulación (es decir, medios intraarticulares, intravenosos o subcutáneos) es algo a utilizar. En otros ejemplos, la administración tópica del agente terapéutico a la piel, por ejemplo, formulado como una crema, 20 gel, o pomada, o la administración a los pulmones por inhalación o por vía intratraqueal, podría ser apropiado cuando la hemorragia se localiza en estas zonas.

25 En los ejemplos donde los polipéptidos de FX modificados se van a formular como una preparación de depósito, las formulaciones de larga duración pueden administrarse mediante implante (por ejemplo, subcutáneo o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los compuestos terapéuticos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

30 Las composiciones, si se desea, se pueden presentar en un envase, en un kit o dispositivo dispensador, que pueden contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen el principio activo. El envase, por ejemplo, contiene una hoja metálica o de plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado por instrucciones para la administración. Las composiciones que contienen los principios activos se pueden envasar como artículos de fabricación que contienen material de envasado, un agente proporcionado en el presente documento, y una etiqueta que indica el trastorno para el que se proporciona el 35 agente.

3. Administración de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de FX modificados (terapia génica)

40 En el presente documento también se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de FX modificados y los vectores de expresión que los codifican de forma que sean adecuados para terapia génica. En lugar de administrar la proteína, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo*, tal como de forma sistémica, o por otra vía, o *ex vivo*, tal como mediante la eliminación de las células, incluidos los linfocitos, introducción de los ácidos nucleicos en los mismos, y reintroducción en el hospedador o en un receptor compatible.

45 Los polipéptidos de FX modificados se puede administrar a las células y los tejidos mediante la expresión de moléculas de ácidos nucleicos. Los polipéptidos de FX modificados se pueden administrar como moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de FX modificados, incluidas técnicas *ex vivo* y expresión directa *in vivo*. Los ácidos nucleicos se pueden administrar a las células y a los tejidos por cualquier método conocido del experto en la materia. Las secuencias de ácidos nucleicos aislados se pueden incorporar a vectores para 50 manipulación adicional. Tal como se utiliza en el presente documento, el vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se utilizan para introducir ADN heterólogo en células para cualquier expresión o replicación de los mismos. La selección y el uso de dichos vehículos está entre las habilidades de los expertos en la materia.

55 Los métodos para administrar los polipéptidos de FX modificados mediante la expresión de moléculas de ácidos nucleicos codificantes incluyen la administración de vectores recombinantes. El vector se puede diseñar para que permanezca episómico, tal como mediante la inclusión de un origen de replicación, o bien se puede diseñar para integrarse en el cromosoma de una célula. Los polipéptidos de FX modificados también se pueden usar *ex vivo* para la terapia de expresión génica usando vectores no víricos. Por ejemplo, las células se pueden diseñar mediante ingeniería genética para expresar un polipéptido de FX modificado, de tal forma que al integrar un polipéptido de FX modificado que codifica un ácido nucleico en una ubicación genómica, tanto operablemente unido a secuencias reguladoras, o de tal forma que se coloque operablemente unido a secuencias reguladoras en una ubicación 60 genómica. A continuación, dichas células se pueden administrar de forma local o sistémica a un sujeto, tal como un paciente necesitado de tratamiento.

65 Los vectores víricos incluyen, por ejemplo adenovirus, virus adenoasociados (VAA), virus de la viruela, virus del herpes, retrovirus y otros diseñados para terapia génica, son de utilidad. Los vectores pueden permanecer

episómicos o se pueden integrar en los cromosomas del sujeto tratado. Un polipéptido de FX modificado se puede expresar mediante un virus, que se administra a un sujeto que necesita tratamiento. Los vectores víricos adecuados para la terapia génica incluyen adenovirus, virus adenoasociados (VAA), retrovirus, lentivirus, virus vaccinia, y otros señalados anteriormente. Por ejemplo, la técnica de expresión en adenovirus es bien conocida en la materia, y los métodos de producción y administración de adenovirus también son bien conocidos. Los serotipos de adenovirus están disponibles, por ejemplo, se la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Los adenovirus se pueden usar *ex vivo*, por ejemplo, las células se aíslan de un paciente que necesita tratamiento, y se transducen con un vector de adenovirus que expresan el polipéptido de FX modificado. Después de un tiempo de cultivo adecuado, las células transducidas se administran a un sujeto, de forma local y/o sistémica. Como alternativa, las partículas de adenovirus que expresan el polipéptido de FX modificado se aíslan y se formulan en un transportador farmacéuticamente aceptable para la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz para prevenir, tratar o mejorar los síntomas de una enfermedad o dolencia en un sujeto. Típicamente, las partículas de adenovirus se administran a una dosis comprendida de 1 partícula a 10^{14} partículas por kilogramo de peso del sujeto, generalmente entre 10^6 o 10^8 partículas a 10^{12} partículas por kilogramo de peso del sujeto.

En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que se dirija a las células, tal como un anticuerpo específico de una proteína de membrana en la superficie celular o una célula diana, o un ligando de un receptor en una célula diana. FX también se puede dirigir para su administración a tipos celulares específicos. Por ejemplo, los vectores adenovíricos que codifican polipéptidos de FX se pueden usar para la expresión estable en células indivisas, tales como células hepáticas (Margaritis et al. (2004) J Clin Invest 113:1025-1031). En otro ejemplo, los vectores víricos o no víricos que codifican polipéptidos de FX se pueden transducir en células aisladas para la posterior administración. Los tipos de células adicionales para la expresión y administración de FX pueden incluir, aunque no de forma limitativa, fibroblastos y células endoteliales.

Las moléculas de ácidos nucleicos se pueden introducir en cromosomas artificiales y en otros vectores no víricos. Los cromosomas artificiales, tales como ACES (véase, Lindenbaum et al. (2004) Nucleic Acids Res. 32(21):e172) se pueden diseñar mediante ingeniería genética para codificar y expresar la isoforma. En resumen, los cromosomas artificiales de mamífero (MAC) proporcionan un medio de introducir grandes cargas de información genética en la célula en una forma de replicación autónoma no integradora. Único entre los MAC, la expresión del cromosoma artificial (ACE) basado en el ADN del satélite de mamífero se puede generar de forma reproducible *de novo* en líneas de células de diferentes especies y purificarse fácilmente a partir de los cromosomas de las células hospedadoras. Las ACE de mamífero purificadas se pueden reintroducir a continuación en una variedad de línea de células receptoras donde se pueden mantener de forma estable durante periodos prolongados en ausencia de presión selectiva usando un ACE System. Utilizando esta solución, la carga específica de una o dos dianas génicas se consigue en células LMTK(-) y CHO.

Otro método para introducir ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de FX modificados es una técnica de sustitución génica en dos etapas en levadura, partiendo de un genoma completo de adenovirus (Ad2; Ketner et al. (1994) PNAS 91: 6186-6190) clonado en un cromosoma artificiales de levaduras (YAC) y un plásmido que contenía secuencias de adenovirus para dirigirse a una región específica del clon YAC, un casete de expresión para el gen de interés y marcadores de selección positivos y negativos. Las YAC son de especial interés debido a que permiten la incorporación de genes más grandes. Este enfoque se puede usar para la construcción de vectores basados en adenovirus que tienen ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los polipéptidos de FX modificados descritos para la transferencia de genes a células de mamífero o a animales completos.

Los ácidos nucleicos se pueden encapsular en un vehículo, tal como un liposoma, o introducirse en células, tal como una célula bacteriana, especialmente una bacteria atenuada o introducida en un vector vírico. Por ejemplo, cuando se utilizan los liposomas, se pueden usar proteínas que se unen a una proteína en la superficie de la membrana celular asociada con endocitosis para dirigir y/o facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de la cápsida o sus fragmentos trópicos para un tipo de célula concreta, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en la ciclación, y proteínas que dirigen la localización intracelular y potencian la semivida intracelular.

Para los métodos *ex vivo* e *in vivo*, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido de FX modificado se introducen en las células que proceden de un donante adecuado o del sujeto que se va a tratar. Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico para fines de tratamiento incluyen, por ejemplo, cualquier tipo de células deseada disponible adecuada para la enfermedad o dolencia que se va a tratar, incluidas, aunque no de forma limitativa, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; varios tipos de citoblastos o células precursoras, en particular, citoblastos hematopoyéticos o células precursoras de la sangre, por ejemplo, tales como los citoblastos obtenidos de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, y otras fuentes de las mismas.

Para el tratamiento *ex vivo*, las células de un donante compatible con el sujeto que se va a tratar o del sujeto que se va a tratar, se extraen, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y las células modificadas se administran al sujeto. El tratamiento incluye la administración directa, tal como, por ejemplo, encapsulados dentro de membranas porosas, que se implantan en el paciente (véanse, por ejemplo, patentes de Estados Unidos con los

- números 4.892.538 y 5.283.187). Las técnicas adecuadas para la transferencia del ácido nucleico a células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas y lípidos catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol), electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, y métodos de precipitación con fosfato de calcio. Los métodos para la administración de ADN se pueden usar para expresar los polipéptidos de FX modificados *in vivo*.
- 5 Dichos métodos incluyen la administración de liposomas con ácidos nucleicos, y la administración de ADN puro, incluida la administración local y sistémica tal como mediante electroporación, ultrasonidos, y administración con fosfato de calcio. Otras técnicas incluyen la microinyección, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, y fusión de esferoplastos.
- 10 La expresión *in vivo* de un polipéptido de FX modificado se puede vincular a la expresión de moléculas adicionales. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido de FX modificado se puede vincular a la expresión de un producto citotóxico tal como un virus genomanipulado o expresado en un virus citotóxico. Dicho virus se puede dirigir a un tipo celular concreto que es diana de un efecto terapéutico. El polipéptido de FX modificado expresado se puede usar para potenciar la citotoxicidad del virus.
- 15 La expresión *in vivo* de un polipéptido de FX modificado puede incluir unir de manera operativa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de FX modificado a secuencias reguladoras específicas tales como un promotor específico de célula o específico de tejido. Los polipéptidos de FX modificados también se pueden expresar desde vectores que infectan y/o se replican específicamente en tipos de células y/o de tejidos diana. Se pueden usar promotores inducibles para regular selectivamente la expresión del polipéptido de FX modificado. Un sistema de regulación de la expresión ilustrativo es el sistema de expresión del gen inducible mediante doxiciclina, que se ha utilizado para regular la expresión de FX recombinante (Srour et al. (2003) *Thromb Haemost.* 90(3): 398-405).
- 20 Las moléculas de ácidos nucleicos, como ácidos nucleicos puros o en vectores, cromosomas artificiales, liposomas y otros vehículos, se pueden administrar al sujeto mediante administración sistémica, tópica, local y por otras vías de administración. Para la vía sistémica e d *in vivo*, la molécula de ácido nucleico o el vehículo que contiene la molécula de ácido nucleico se pueden dirigir a una célula.
- 25 La administración también puede ser directa, tal como mediante la administración de un vector o células que se dirigen de forma típica a una célula o tejido. Por ejemplo, las células tumorales y en proliferación pueden ser células diana para la expresión *in vivo* de los polipéptidos de FX modificados. Las células usadas para la expresión *in vivo* de un polipéptido de FX modificado también incluyen células autólogas para el paciente. Dichas células se pueden retirar de un paciente, introducirse ácidos nucleicos para la expresión de un polipéptido de FX modificado, y posteriormente administrarse a un paciente tal como mediante inyección o injerto.
- 30
- 35

H. Usos terapéuticos

- Los polipéptidos de FX/FXa modificados proporcionados en el presente documento se pueden usar en varios métodos terapéuticos, así como en métodos de diagnóstico, en los que se utiliza el FX zimógeno o FXa. Dichos métodos incluyen, aunque no de forma limitativa, métodos de tratamiento de dolencias fisiológicas y médicas descritas y relacionadas a continuación. Típicamente, dichos tratamientos incluyen aquellos casos en los que se desea un aumento en la coagulación, tal como un aumento en las respuestas hemostáticas. Por ejemplo, los polipéptidos modificados proporcionados en el presente documento se pueden usar en los tratamientos de los trastornos hemorrágicos, por ejemplo, como sucede en pacientes con hemofilia. los polipéptidos de FX/FXa son especialmente adecuados para el tratamiento de pacientes con deficiencias en factores de coagulación, incluidas, aunque no de forma limitativa, hemofilia A (deficiencia en Factor VIII), hemofilia B (deficiencia en Factor IX) o hemofilia C (deficiencia en Factor XI), debido a su papel fundamental en la ruta de la coagulación, resolviendo de esta forma la necesidad de los factores deficitarios. Los polipéptidos modificados proporcionados en el presente documento también se pueden usar junto con la cirugía u otros traumatismos.
- 40
- 45
- 50

- En los métodos en el presente documento, tanto la forma zimógena de FX como la forma FXa o un fragmento catalíticamente activo del mismo de cualquiera de los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento se pueden administrar a un sujeto. Los polipéptidos modificados proporcionados en el presente documento están diseñados para retener actividad terapéutica presentar propiedades mejoradas, especialmente un aumento en la dependencia del cofactor, aumento en la actividad catalítica, aumento de la afinidad por el sustrato, glicosilación alterada, y/o aumento de la resistencia a AT-III. Dichas propiedades modificadas, por ejemplo, pueden mejorar la eficacia terapéutica de los polipéptidos debido a la mayor actividad coagulante de los polipéptidos de FX/FXa modificados que está limitada a la presencia de cofactor. Las propiedades alteradas también pueden dar como resultado un aumento de la semivida. Los polipéptidos de FX/FXa modificados proporcionados en el presente documento pueden mostrar mejoras de las actividades *in vivo*, así como efectos terapéuticos comparados con FX/FXa natural, incluida menos dosis necesarias para conseguir el mismo efecto, y otras mejoras en la administración y el tratamiento tal como menos administraciones y/o menos frecuentes, disminución de los efectos secundarios y aumento de los efectos terapéuticos.
- 55
- 60
- 65

Por ejemplo, las limitaciones prácticas han restringido el uso clínico de los polipéptidos de FXa, incluidos los

polipéptidos de FXa no modificados, como estrategia de derivación para el tratamiento de trastornos hemorrágicos. Por ejemplo, el FXa no modificado en circulación se inactiva rápidamente por los inhibidores de proteasas endógenos en circulación, reduciendo la semivida de FX biológico de 20-40 h (Roberts et al., (1965) *Thromb Diath Haemorrh.* 13:305-313) a menos de 1-2 min (Gitel et al., (1984) *J Biol Chem.* 259:6890-6895). Además, la activación patológica de la coagulación es un problema con la administración de polipéptidos de FXa solos o en composiciones farmacéuticas (Gitel et al., (1984) *J Biol Chem.* 259:6890-6895; Lechler (1999) *Thromb Res.* 95(Supl. 1):S39-S50). Esto se evidencia por el hecho de que se puede usar la administración de polipéptidos de FXa para generar modelos animales de la coagulación intravascular diseminada (DIC) (Kruithof et al., (1997) *Thrombosis and Haemostasis.* 77(2):308-311; Giles et al., (1984) *J Clin Invest.* 74:2219-2225).

Los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento se han modificado para abordar las limitaciones del uso clínico de los polipéptidos de FXa. Par evitar la coagulación excesiva tras la administración del polipéptido de FX, los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento se modificaron para mostrar mayor dependencia del cofactor que la forma FXa (véase el Ejemplo 4) para restringir la actividad del polipéptido de FXa de tal forma que los polipéptidos de FXa presentan una actividad mínima, o ninguna actividad, salvo que esté presente el cofactor FVa activado. La limitación de la actividad del polipéptido de FXa modificado, dependiendo de la disponibilidad y de la asociación de FVa, reduce o elimina el riesgo de trombosis asociado con los tratamientos con el polipéptido de FXa sin modificar. Es importante destacar que, en presencia de FVa, sin embargo, los polipéptidos de FXa modificados descritos en el presente documento demostraron una actividad catalítica normal y, en algunos casos, superior a la normal. Los polipéptidos de FX modificados, incluyendo los polipéptidos de FXa modificados, pueden presentar en el presente documento unas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, tal como una semivida en suero mejorada, un aumento de la resistencia a los inhibidores, aumento de la actividad catalítica, y/o aumento de la actividad coagulante en comparación con los polipéptidos de FXa, mientras que la mayor dependencia del cofactor de los polipéptidos de FXa modificados descritos en el presente documento reducen o eliminan la coagulación no deseada.

En algunos ejemplos, los métodos de tratamiento de un polipéptido de FX, incluida una forma zimógena de FX o una forma de FXa, necesita una duración de la acción más prolongada para conseguir un efecto terapéutico sostenido. Esto es especialmente cierto en el tratamiento de pacientes con hemofilia y otros trastornos hemorrágicos congénitos o crónicos. Como se describe en otra parte del presente documento, la semivida de FXa es menos de 40 horas, debido en parte a la inhibición por inhibidores tal como AT-III. Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento que presentan resistencia a AT-III y/o que están hiperglicosilados mediante la introducción de sitios de glicosilación no naturales pueden mostrar una mayor semivida. Por lo tanto, dichos polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento se pueden usar para suministrar terapias más duraderas para los trastornos de la coagulación.

En particular, los polipéptidos de FX/FXa modificados están previstos para su uso en métodos terapéuticos en los que FX/FXa puede utilizarse para el tratamiento. Típicamente, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento son procoagulantes y se pueden utilizar para tratar los trastornos hemorrágicos, incluidos los trastornos hemorrágicos congénitos y los trastornos hemorrágicos adquiridos. Enfermedades y trastornos ilustrativos, tal como, aunque no de forma limitativa, trastornos de la coagulación de la sangre, trastornos hematológicos, trastornos hemorrágicos, hemofilias, deficiencias en factores de coagulación, y trastornos de la sangre adquiridos incluidas las hemorragias asociadas con traumatismos y cirugía. En algunos ejemplos, las hemorragias a tratar mediante los polipéptidos de FX/FXa se producen en órganos tales como el cerebro, región del oído interno, ojos, hígado, pulmón, tejido tumoral, tracto gastrointestinal. En otras realizaciones, la hemorragia es difusa, tal como en la gastritis hemorrágica y el sangrado uterino profuso, tal como en las mujeres después del alumbramiento.

Los pacientes con trastornos hemorrágicos, tales como por ejemplo, hemofilia A y B, frecuentemente están en riesgo de complicaciones durante la cirugía o traumatismos. Dicha hemorragia se puede manifestar como hematomas agudas (hemorragia en las articulaciones), artropatía hemofílica crónica, hematomas, (por ejemplo, muscular, retroperitoneal, sublingual y retrofaríngea), hematuria (hemorragia procedente del tracto renal), hemorragias del sistema nervioso central, hemorragia gastrointestinal (por ejemplo, sangrado UGI) y hemorragia cerebral, que también se pueden tratar con los polipéptidos de FX/FXa modificados. Adicionalmente, cualquier hemorragia asociada con un traumatismo, tal como una cirugía (por ejemplo, hepactomía) o extracción dental se puede tratar con los polipéptidos de FX/FXa modificados.

El tratamiento de enfermedades y dolencias con los polipéptidos de FX/FXa modificados se puede llevar a cabo por cualquier vía de administración adecuada usando formulaciones adecuadas como se describe en el presente documento que incluyen, aunque no de forma limitativa, inyección, administración pulmonar, oral y transdérmica. El tratamiento se realiza de forma típica mediante inyección intravenosa en bolo.

Si es necesario, se puede determinar empíricamente o extrapolarse una dosificación y duración concreta y un protocolo de tratamiento. Las dosificaciones para el zimógeno de FX natural o sin modificar o de los polipéptidos de FXa se puede usar como guía para determinar la dosificación del zimógeno de FX o de los polipéptidos de FXa modificados. Las dosificaciones del zimógeno de FX o de los polipéptidos de FXa modificados también se pueden

determinar o extrapolar a partir de los estudios con animales relevantes. Pueden tenerse en cuenta factores tales como el nivel de actividad y la semivida del FX/FXa modificado en comparación con el FX/FXa sin modificar al realizar dichas determinaciones. Las dosificaciones y regímenes concretos pueden determinarse empíricamente según una variedad de factores. Dichos factores incluyen el peso corporal del individuo, el estado de salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, sexo, dieta, momento de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la gravedad y curso de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y el criterio del médico a cargo del tratamiento. El principio activo, el polipéptido, se combina de forma típica con un transportador farmacéuticamente aceptable. La cantidad de principio activo que se puede combinar con los materiales transportadores para producir una forma farmacéutica única pueden variar dependiendo del hospedador tratado y del modo de administración concreto.

En algunos ejemplos, la forma inactiva zimógena de los polipéptidos de FX modificados se puede administrar para controlar el sangrado patológico. Por ejemplo, los polipéptidos de FX se pueden administrar a una dosificación de aproximadamente 50 a 800 unidades/ml, donde la actividad específica del zimógeno de FX es de aproximadamente 20 a 130 unidades/mg de proteína (documento US 4.501.731). En los casos en los que se administra la forma zimógena de los polipéptidos de FX modificados, los complejos de tenasa endógenos escinden el zimógeno de FX administrado, obteniendo FX activado (FXa), que transmite actividad terapéutica.

En algunos ejemplos, los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento se pueden administrar para controlar el sangrado patológico en una forma activada de FX (FXa). Por ejemplo, los polipéptidos de FX purificados se pueden activar mediante el activador de FX de veneno de víbora de Russell (Haematologic Technologies) u otros factores de coagulación, *in vitro* antes de la administración, tal como durante la purificación como se describe en el Ejemplo 2B. Los polipéptidos de FXa modificados proporcionados en el presente documento, que se han modificado para presentar una actividad análoga al zimógeno, se pueden administrar a dosis comprendidas entre 10-1000 µg/kg, tal como entre aproximadamente 10-250 µg/kg y generalmente entre 10 y 75 µg/kg, tal como con 40 µg/kg (véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos publicada n.º US20090175931).

En otros ejemplos, los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento se pueden administrar como parte de una composición terapéutica, por ejemplo, una composición que contiene o no contiene activadores de FX directos. Por ejemplo, una composición terapéutica puede contener otros factores de coagulación que no forman parte de un complejo de tenasa, tal como el Factor II y/o la protrombina. En otro ejemplo, los polipéptidos de FX modificados se pueden proporcionar en composiciones terapéuticas que opcionalmente contienen enzimas activadoras de FX en formas activa o zimógena, tal como FVII o FVIIa; FIX o FIXa. Los polipéptidos de FX se pueden administrar junto con el Factor VII activado (FVIIa), por ejemplo en una relación de 10:1, a pacientes de hemofilia con inhibidores (Shirahata et al., (2012) Haemophilia 18:94-101). En otro ejemplo, un concentrado terapéutico que contiene 0, 58 UI/ml de FX y 0,29 UI/ml de FIX se puede usar para tratar una coagulopatía inducida por una sobredosis de fármacos anticoagulantes (Olesen et al., (2009) J. Thrombosis and Haemostasis 7(S2): Resumen n.º PP-MO-386). En otros ejemplos, un concentrado de complejo de protrombina modificada se puede generar usando polipéptidos de FX modificados y los factores de coagulación de la sangre II, VII, y IX, así como la proteína C, y la proteína S.

El efecto de los polipéptidos de FX/FXa sobre el tiempo de coagulación de la sangre puede supervisarse usando cualquiera de los ensayos de coagulación conocidos en la materia incluidos, aunque no de forma limitativa, el tiempo de protrombina en sangre (PT), el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), el tiempo de coagulación activado (ACT), el tiempo de coagulación recalcificado activado, o el tiempo de coagulación Lee-White.

Tras mejoría del estado del paciente, se puede administrar una dosis de mantenimiento del compuesto o composiciones, si es necesario; y la dosis, la forma farmacéutica, o la frecuencia de administración, o una combinación de los mismos, se puede modificar. En algunos casos, un sujeto necesita un tratamiento intermitente sobre una base a largo plazo al producirse cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad o según dosificaciones programadas. En otros casos, se pueden necesitar administraciones adicionales en respuesta a episodios agudos tales como hemorragia, traumatismo, o procedimientos quirúrgicos.

Los polipéptidos de FX/FXa modificados tienen actividad terapéutica por sí solos o junto con otros agentes. Esta sección proporciona usos ilustrativos y métodos de administración. Estas terapias descritas son ilustrativas, y no limitan las aplicaciones de los polipéptidos de FX/FXa modificados. Se indican a continuación algunas dolencias ilustrativas para las que FX/FXa se puede usar como agente de tratamiento, solo o junto con otros agentes.

1. Trastornos hemorrágicos congénitos

El zimógeno de FX y los polipéptidos de FXa modificados, tales como los que se describen en el presente documento, se pueden usar para tratar trastornos hemorrágicos congénitos. Por ejemplo, FX y los polipéptidos de FXa se pueden usar para derivar cualquier factor de coagulación en las rutas de coagulación tanto intrínseca como extrínseca, y tratar las coagulopatías debidas a las deficiencias en el mismo. Los trastornos hemorrágicos resultado de una deficiencia congénita en un factor de coagulación, incluyen hemofilia A (deficiencia en factor VIII); hemofilia B (deficiencia en Factor IX); hemofilia C (deficiencia en Factor XI); deficiencia en Factor VIII; deficiencia en Factor X;

deficiencia en Factor XII; y los tipos I, II, IV, V, y VI de deficiencias en factor de coagulación múltiple familiar (FMFD) (véase, Roberts, HR y MD Bingham, "Other Coagulation Factor Deficiencies," *Thrombosis and Hemorrhage*, 2ª ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1998: 773-802). Los polipéptidos de FX/FXa modificados también se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades y trastornos hemorrágicos congénitos adicionales, tal como, aunque no de forma limitativa, la enfermedad de Von Willebrand, trastornos plaquetarios hereditarios (por ejemplo, enfermedad por defecto del almacenamiento intraplaquetario tal como los síndromes de Chediak-Higashi y Hermansky-Pudlak, disfunción del tromboxano A2, tromblastemia de Glanzmann, y síndrome de Bernard-Soulier) y telangiectasia hemorrágica hereditaria, también conocida como el síndrome de Rendu-Osler-Weber.

10 a. Hemofilia

El zimógeno de FX y los polipéptidos de FXa modificados, tales como los que se describen en el presente documento, se pueden usar para tratar trastornos hemorrágicos congénitos, tal como la hemofilia. La hemofilia es un trastorno hemorrágico producido por una deficiencia en uno o más factores de coagulación de la sangre. Se caracteriza por una disminución en la capacidad de formar coágulos sanguíneos en los puntos de daño tisular. Las hemofilias congénita ligada al cromosoma X incluyen la hemofilia A y la hemofilia B, que están causadas por una o varias mutaciones que dan como resultado deficiencias en FVIII y FIX, respectivamente. La hemofilia se da en 1 de cada 10.000 varones, mientras que la hemofilia B se da en 1 de cada 50.000 varones. La hemofilia A y B se clasifica adicionalmente como leve, moderada o grave. Un nivel plasmático del 5 %- 25 % del factor VIII o IX normalmente funcional se clasifica como leve, 1 %-5 % es moderada, y menos del 1 % es grave. La hemofilia C, frecuentemente denominada como deficiencia en FXI, es una enfermedad recesiva autosómica relativamente leve y rara, que afecta aproximadamente 1 de cada 100000 personas.

Los pacientes con hemofilia padecen hemorragias recurrentes en articulaciones y músculos, que pueden ser espontáneas o como respuesta a un traumatismo. La hemorragia puede producir dolor agudo grave, restricciones en el movimiento, y conducir a complicaciones secundarias incluida la hipertrofia sinovial. Además, la hemorragia recurrente de las articulaciones puede causar sinovitis crónica, que puede provocar daños articulares, destrucción del tejido sinovial, cartílago y el hueso. La hemorragia se trata generalmente con una transfusión de plasma fresco congelado (FFP), La terapia de sustitución de FXI, o, para tratamiento tópico, dicho tratamiento de heridas externas o extracciones dentales, cola de fibrina. El tratamiento más frecuente de la hemofilia A o B es la terapia de sustitución, en la que el paciente recibe FVIII o FIX. Las formulaciones están disponibles comercialmente como productos derivados de plasma o productos recombinantes, donde las proteínas recombinantes son actualmente el tratamiento de elección en pacientes no tratados anteriormente. Aunque estas terapias pueden tener muy buenos resultados, surgen complicaciones si el paciente desarrolla inhibidores contra el factor VIII o el factor IX recientemente administrado.

Los inhibidores son anticuerpos de IgG, principalmente de la subclase IgG4, que reacciona con FVIII o FIX e interfiere con la función procoagulante. Los inhibidores afectan aproximadamente 1 de cada 5 pacientes con hemofilia A grave. La mayoría de los sujetos desarrollan estos inhibidores poco después de la administración de las primeras infusiones de factor VIII, que frecuentemente es la infancia temprana, aunque los sujetos desarrollan inhibidores en una etapa posterior de la vida. Los inhibidores también afectan a aproximadamente 1 de cada 15 personas con hemofilia A leve o moderada. Estos inhibidores normalmente se desarrollan durante la edad adulta y no solo destruyen el FVIII exógeno administrado, también destruyen el FVIII endógeno. Como resultado, los hemofílicos leves y moderados se vuelven graves. Clínicamente, los pacientes de hemofilia A con inhibidores se clasifican como pacientes con respuesta alta o baja según la intensidad de la respuesta anamnésica que experimentan cuando se vuelven a exponer al FVIII. Los inhibidores afectan aproximadamente 1 de cada 100 pacientes con hemofilia B. En la mayoría de los casos, los inhibidores aparecen después de las primeras infusiones con el factor IX terapéutico, y pueden ir acompañados de reacciones alérgicas.

El zimógeno de FX y los polipéptidos de FXa modificados proporcionados en el presente documento y los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento se pueden usar universalmente en los tratamientos para los pacientes con hemofilia, incluidos los pacientes de hemofilia con inhibidores, y se pueden utilizar para el tratamiento de dolencias hemorrágicas asociadas con la hemofilia. Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento se pueden usar, por ejemplo, para controlar o prevenir los episodios hemorrágicos espontáneos, o controlar o prevenir la hemorragia en respuesta a un traumatismo, o procedimientos quirúrgicos, potenciando la generación de trombina a la vez que se deriva la necesidad de FVIIIa y/o FIXa.

Los polipéptidos de FX modificados se pueden someter a ensayo para determinar la eficacia terapéutica, por ejemplo, mediante el uso de modelos animales. Por ejemplo, ratones deficientes en FVIII o FIX, ratones hemofílicos inducidos por anticuerpos, o cualquier otro modelo de enfermedad conocido para la hemofilia, se puede tratar con los polipéptidos de FX modificados. La evolución de los síntomas de la enfermedad y sus fenotipos se vigila para evaluar los efectos de los polipéptidos de FX modificados. Los polipéptidos de FX modificados también se pueden administrar a modelos animales, y también a sujetos, tal como en ensayos clínicos, para evaluar la eficacia *in vivo* en comparación con los controles de placebo y/o los controles usando los polipéptidos de FX sin modificar.

b. Otras deficiencias en factores de coagulación

El zimógeno de FX y los polipéptidos de FXa modificados, tales como los que se describen en el presente documento, también se pueden usar para tratar pacientes con coagulopatías resultado de las deficiencias en factores de coagulación diferentes a FVIII y FIX. Por ejemplo, los polipéptidos de FX se pueden usar para tratar pacientes con deficiencia en Factor VIII, deficiencia en Factor X, deficiencia en Factor XIII; y los tipos II, IV, V, y VI de deficiencias en factor de coagulación múltiple familiar (FMFD) (véase, Roberts, HR y MD Bingham, "Other Coagulation Factor Deficiencies," *Thrombosis and Hemorrhage*, 2ª ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1998: 773-802).

i. Deficiencia en Factor VII

El zimógeno de FX y los polipéptidos de FXa modificados, tales como los que se describen en el presente documento, se puede usar en sujetos o pacientes con deficiencia en Factor VII. La deficiencia en Factor VII es un trastorno hemorrágico recesivo autosómico que afecta aproximadamente a 1 de cada 500.000 personas. La deficiencia en FVII puede ser clínicamente leve, moderada o grave, donde la deficiencia leve a moderada se caracteriza por un aumento en la hemorragia después de cirugía y traumatismo. Los pacientes con deficiencia en FVII grave (menos del 1 % de la actividad de FVII) experimentan síntomas similares a la hemofilia. Por ejemplo, los sujetos con deficiencia en FVII son propensos a las hemorragias articulares, hemorragia nasal espontánea, hemorragia gastrointestinal, hemorragia del tracto urinario. También se han notificado hemorragias intracerebrales y hemorragias musculares, mientras que las mujeres pueden experimentar una menorragia grave (sangrado menstrual intenso). El tratamiento se puede realizar mediante terapia de sustitución con plasma, PCC, y FVIIa recombinante (Hedner et al., (1993) *Transfusion Med Rev*, 7:78-83; documento US 2009-0291890). Los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento actúan después de FVII en la ruta de coagulación, y por tanto se pueden usar en el tratamiento de los episodios hemorrágicos y en la prevención de hemorragias durante las intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes con deficiencia en FVII. Los polipéptidos de FX modificados se pueden administrar en la forma zimógena o como polipéptidos de FX (FXa) activados.

ii. Deficiencia en Factor X

El zimógeno de FX y los polipéptidos de FXa modificados, tales como los que se describen en el presente documento, se puede usar en sujetos o pacientes con deficiencia en Factor X. La deficiencia en Factor X es un trastorno hemorrágico recesivo autosómico con una incidencia de aproximadamente 1 de cada 1.000.000 personas. La deficiencia de Factor X presenta fenotipos hemorrágicos variables que varían de clínicamente leves (6-10 UI/dl) a graves (<1 UI/dl, o <1 % de la actividad de FX normal). Los individuos con una actividad del factor X de 10-15 % de la hemorragia espontánea limitada a la experiencia normal, y la hemorragia se produce solo en asociación con cirugía o trauma (Peyvandi et al., (1998) *Br J Haematol*. 102:626-628; Uprichard, J y DJ Perry, (2002) *Blood Reviews*. 16:97-110; Roberts, HR y MD Bingham, "Other Coagulation Factor Deficiencies," *Thrombosis and Hemorrhage*, 2ª ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1998: 773-802). Es habitual que los pacientes con deficiencia en FX experimenten hemorragias nasales, y un 50 % de mujeres afectadas presentan menorragia. Hemartrosis, una hemorragia postquirúrgica grave y una hemorragia del sistema nervioso central se han notificado también en pacientes con casos graves.

Actualmente, el tratamiento de sustitución para la deficiencia del Factor X está limitado a la sangre (Girolami et al. (1970) *Thromb Diath Haemorrh* 24(1):175-184), plasma congelado reciente (FFP) (Girolami et al., (1970) *Br J Haematol* 19(2): 179-192), y tratamientos combinados, por ejemplo, los concentrados del complejo de la protrombina (PCC) que contienen Factor (Lechler, E (1999) *Thromb Res* 95(Suppl 1):S39-S50). Tratamientos combinados que contienen FX, y se describen además en la Sección I. La administración del polipéptido de FX está actualmente disponible. Los polipéptidos de FXa modificados descritos en el presente documento se pueden usar para tratar los episodios hemorrágicos y evitar hemorragias en intervenciones quirúrgicas o procedimientos invasivos en pacientes deficientes en FX.

iii. Deficiencias familiares en el factor de coagulación múltiple

El zimógeno de FX y los polipéptidos de FXa modificados, tales como los que se describen en el presente documento, también se pueden usar para tratar pacientes con coagulopatías resultantes de deficiencias heredadas en factores de coagulación múltiples, denominadas también deficiencias familiares en factores de coagulación múltiples (FMFD). Existen seis tipos de FMFD que se clasifican sobre la base de cuales factores están afectados. La FMFD de Tipo I es el resultado de deficiencias en los factores V y VIII; La FMFD de tipo II es el resultado de deficiencias en los factores VIII y IX; los pacientes con FMFD de tipo III son deficientes en los factores de coagulación dependientes de la vitamina K (es decir, los factores II, VII, IX, y X); La FMFD de tipo IV es el resultado de deficiencias en los factores VII y VIII; las deficiencias en los factores VIII, IX, y XI dan lugar a FMFD de tipo V; Y las deficiencias en los factores IX y XI se clasifican como FMFD de tipo VI. Las FMFD de tipos II y IV contienen deficiencias en los factores de coagulación anteriores a FX en las rutas de coagulación y por tanto podrían beneficiarse del tratamiento con polipéptidos FX modificados descritos en el presente documento solos o en combinación con otros tratamientos. Los polipéptidos de FX descritos en el presente documento se pueden usar

también para tratar otros tipos de FMFD, normalmente como parte de un tratamiento combinado. De los FMFD, solo el tipo I y el tipo III se han caracterizado extensamente.

Las manifestaciones clínicas de las FMFD de tipo II varían desde la hemorragia asintomática a la grave, dependiendo del grado de deficiencia o disfunción del factor. defectos en la gamma glutamil carboxilasa y en el complejo de la vitamina K epóxido reductasa, dan lugar a defectos en la etapa de carboxilación durante la síntesis de FII, FVII, FIX, y FX pueden producir una deficiencia combinada de estos cuatro factores (Brenner et al., (1998) Blood. 92:4554-4559; Oldenburg et al., (2000) Thromb Haemost. 84:937-941). La FMFD de tipo III es heredada de una manera recesiva autosómica. Algunos individuos con FMFD de tipo III son sensibles a dosis grandes de vitamina K (Goldsmith et al., (1982) J Clin Invest. 69:1253-1260). Sin embargo, el tratamiento de los episodios hemorrágicos requiere terapia para sustituir los factores deficientes (Roberts, HR y MD Bingham, "Other Coagulation Factor Deficiencies," Thrombosis and Hemorrhage, 2ª ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1998: 773-802). Por lo tanto, los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento se pueden usar como parte de un régimen de tratamiento para algunos tipos de FMFD.

c. Otros

Se pueden tratar otros trastornos hemorrágicos congénitos con los polipéptidos de FX, incluido el zimógeno del FX o polipéptidos de FXa, proporcionados en el presente documento para promover la coagulación. Los episodios hemorrágicos espontáneos y asociados a cirugía con la enfermedad de von Willebrand (vWD) pueden tratarse utilizando los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento. vWD es un trastorno hemorrágico producido por un defecto o deficiencia de la proteína de coagulación de la sangre, el Factor de von Willebrand (vWF), y se estima que se produce en el 1 % al 2 % de la población. Los sujetos con vWD tienen hematomas fácilmente, tienen hemorragias nasales recurrentes, sangran tras la extracción de un diente, una tonsilectomía u otra cirugía, y las pacientes femeninas pueden tener un aumento en el sangrado menstrual. Los polipéptidos de FX modificados se pueden usar la hemorragia espontánea y asociada a cirugía en pacientes con vWD.

Otros trastornos hemorrágicos relacionados con plaquetas, tales como por ejemplo, trombostenia de Glanzmann y síndrome de Hermansky-Pudlak se asocian también con una actividad de coagulación endógena reducida. La hemorragia espontánea en exceso o asociada a cirugía en pacientes con trastornos hemorrágicos relacionados con plaquetas puede también controlarse mediante dosis terapéuticas de los polipéptidos de FX modificados. Por ejemplo, un paciente con trombostenia de Glanzmann que se somete a cirugía puede tratarse antes, durante y/o después de la cirugía con los polipéptidos de FX modificados para evitar una pérdida importante de sangre. Se pueden administrar los polipéptidos de FX modificados como en la forma zimógena inactiva o como los polipéptidos de FX activados (FXa).

2. Trastornos hemorrágicos adquiridos

Se pueden adquirir también trastornos hemorrágicos, más bien que congénitos. El zimógeno de FX y los polipéptidos de FXa modificados, tales como los que se describen en el presente documento, se pueden usar también para tratar trastornos hemorrágicos adquiridos. Los trastornos hemorrágicos adquiridos incluyen coagulopatías como resultado de procedimientos quirúrgicos o coagulopatías inducidas por fármacos, por ejemplo, trombocitopenia debida a regímenes quimioterapéuticos. En un ejemplo, los polipéptidos de FX modificados se pueden usar como un antídoto para una sobredosis de una sustancia terapéutica anticoagulante (documento US 2011/0015128). Los polipéptidos de FX modificados se pueden usar también para tratar deficiencias adquiridas en el factor de coagulación, tales como deficiencia adquirida del factor X como resultado de enfermedad hepática, deficiencia de vitamina K. Otros trastornos hemorrágicos adquiridos que se pueden beneficiar del tratamiento de FX modificado incluyen síndrome urémico hemolítico, púrpura alérgica (púrpura de Henoch Schonlein) y coagulación intravascular diseminada (DIC).

En un ejemplo, los polipéptidos de FX/FXa modificados se pueden usar para tratar episodios hemorrágicos debidos a trauma, o cirugía, o recuento o actividad disminuida de plaquetas, en un sujeto. Por ejemplo, se puede tratar la coagulopatía hemodilucional, por ejemplo, como resultado de una transfusión de sangre, o coagulopatía traumática aguda tras trauma con polipéptidos de FX/FXa modificados. Los métodos ilustrativos para pacientes sometidos a cirugía incluyen tratamientos para evitar hemorragias y tratamientos antes, durante, o después de cirugías tales como, aunque no de forma limitativa, cirugía de corazón, angioplastia, cirugía pulmonar, cirugía abdominal, cirugía espinal, cirugía cerebral, cirugía vascular, cirugía dental, o cirugía de trasplante de órganos, incluyendo trasplante de médula ósea, corazón, pulmón, páncreas, o hígado.

a. Trombocitopenia adquirida por quimioterapia

El tratamiento de quimioterapia, tal como para leucemia y otros cánceres, puede dar como resultado trombocitopenia. Esto es probablemente debido a una pérdida de producción de plaquetas en la médula ósea de pacientes que reciben quimioterapia, y se produce normalmente 6-10 días después de la medicación. El tratamiento de la trombocitopenia adquirida es normalmente mediante plaquetas, glóbulos rojos o transfusión de plasma, que sirve para evitar cualquier hemorragia espontánea anómala que pueda dar como resultado la deficiencia de

plaquetas. La hemorragia en pacientes con trombocitopenia inducida por quimioterapia, o cualquier otra trombocitopenia adquirida o congénita, puede controlarse también mediante la administración de cantidades terapéuticas de los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, se puede administrar a un paciente trombocitopénico con hemorragia incontrolada, tal como en el tracto gastrointestinal, una inyección en bolo intravenoso de una cantidad terapéutica de un polipéptido de FX para detener la hemorragia. Se pueden administrar los polipéptidos de FX modificados como en la forma zimógena inactiva o como los polipéptidos de FX activados (FXa).

b. Otras coagulopatías

Se pueden tratar otras coagulopatías adquiridas utilizando los polipéptidos de FX modificados presentados en el presente documento. La coagulopatía puede ser el resultado de dolencias que incluyen, aunque no de forma limitativa, insuficiencia hepática fulminante (FHF; tal como la producida por fármacos hepatotóxicos, toxinas, enfermedades metabólicas, enfermedades infecciosas e isquemia), otras enfermedades hepáticas, incluyendo cirrosis y enfermedad asociada con enfermedad de Wilson, deficiencia de vitamina K (tal como la producida por un tratamiento con antibióticos o dieta), síndrome urémico hemolítico, trombocitopenia trombótica (TTC) y coagulopatía intravascular diseminada (DIC). El tratamiento convencional es generalmente mediante transfusión con plasma, glóbulos rojos (RBC), o plaquetas, pero puede ser insatisfactorio.

En un ejemplo, se pueden administrar polipéptidos de FX modificados a un paciente con FHF que se somete a procedimientos invasivos para evitar la hemorragia. El tratamiento convencional con plasma congelado reciente (FFP) es a menudo insatisfactorio y puede requerir grandes cantidades de plasma, produciendo una sobrecarga de volumen y anasarca (una infiltración generalizada de fluidos de edema en el tejido conectivo subcutáneo). El tratamiento con cantidades terapéuticas de polipéptidos de FX modificados mediante bolo intravenoso durante, antes y/o después de cirugía invasiva, tales como por ejemplo, biopsia hepática o trasplante de hígado, puede evitar la hemorragia y establecer la hemostasia en pacientes con FHF. El paciente puede controlarse mediante PT de la sangre para determinar la eficacia del tratamiento.

En otro ejemplo, se puede administrar FX a un paciente con hemorragia grave asociada con coagulopatía, tales como por ejemplo, hemorragia intraabdominal grave posterior a cesárea asociada con disfunción hepática y DIC, que no responde a infusiones de transfusiones convencionales. Además, los polipéptidos de FX modificados se pueden usar para tratar coagulopatías en pacientes neonatales y pediátricos. Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento presentan una dependencia aumentada de FVa para una mayor actividad de coagulación en comparación con los polipéptidos de FX sin modificar, y una semivida aumentada, por tanto se pueden administrar, por ejemplo, a dosis más bajas, con menos frecuencia, y menos reacciones adversas. Los polipéptidos de FX modificados se pueden administrar tanto en la forma inactivada de zimógeno, para activarse mediante las enzimas endógenas, o en forma de polipéptidos de FX (FXa) activados.

c. Hemorragia adquirida por trasplante

La hemorragia grave después de un trasplante de médula ósea (BMT) y trasplante de citoblastos (SCT) es una complicación relativamente habitual asociada a estos procedimientos, y que supone una amenaza para la vida, debido al reducción de plaquetas. Por ejemplo, la hemorragia alveolar difusa (DAH) es una complicación pulmonar de BMT con una incidencia estimada del 1-21 % en la población trasplantada, y con una tasa de mortalidad del 60-100 %. El tratamiento convencional de dichos episodios hemorrágicos incluye el tratamiento con corticoesteroides y la transfusión de plasma, plaquetas y/o RBC, aunque en gran medida son infructuosos, con una tasa de mortalidad general de aproximadamente el 50 % (Hicks et al. (2002) Bone Marrow Transpl. 30:975-978). La administración de FX mediante bolo intravenoso, con o sin tratamiento concomitante con corticoesteroides y/o infusión de plaquetas, se puede llevar a cabo para tratar el DAH y establecer la hemostasia. Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento presentan una dependencia aumentada de FVa para una mayor actividad de coagulación en comparación con los polipéptidos de FX sin modificar, y una semivida aumentada, por tanto se pueden administrar, por ejemplo, a dosis más bajas, con menos frecuencia, y menos reacciones adversas. Los polipéptidos de FX modificados se pueden administrar tanto en la forma inactivada de zimógeno, para activarse mediante las enzimas endógenas, o en forma de polipéptidos de FX (FXa) activados.

d. Hemorragia inducida por el tratamiento con anticoagulantes

Los pacientes sometidos a tratamiento con anticoagulantes para el tratamiento de dolencias, como la tromboembolia, pueden presentar episodios hemorrágicos tras la administración aguda de anticoagulantes, tales como warfarina, heparina, fondaparinux, y Rivaroxaban, o desarrollar trastornos hemorrágicos como resultado del uso a largo plazo de estos tratamientos. Los tratamientos para los episodios hemorrágicos incluyen de forma típica la administración de procoagulantes, tales como vitamina K, plasma, FIX exógeno, y protaminas para neutralizar la heparina. La administración de FX exógeno, solo o como parte de una formulación farmacéutica, también se puede llevar a cabo para neutralizar el efecto de los anticoagulantes, aumentar el PT, aPTT, y/u otros marcadores de la coagulación y establecer la hemostasia (Gruber et al., 2008 Blood. 112:Resumen 3825). Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento se pueden usar en tratamientos para controlar los episodios

hemorrágicos en pacientes con trastornos hemorrágicos adquiridos debido a los tratamientos con anticoagulantes. Los polipéptidos de FX modificados se pueden administrar tanto en la forma inactivada de zimógeno, para activarse mediante las enzimas endógenas, o en forma de polipéptidos de FX (FXa) activados. Para un tratamiento más rápido, los polipéptidos modificados generalmente se administran en forma de polipéptidos de FX (FXa) activados.

5

e. Hemofilia adquirida

Los inhibidores del factor VIII pueden aparecer espontáneamente en individuos por otra parte sanos, dando como resultado una dolencia conocida como "hemofilia adquirida". La hemofilia adquirida es una enfermedad rara, con una incidencia anual de 0,2-1,0 por millón de personas. Los autoanticuerpos son principalmente anticuerpos de IgG4, que, cuando se unen al FVIII, inhiben la actividad de FVIII interfiriendo en la escisión de la trombina, la interacción con el factor de von Willebrand, y/o la unión a fosfolípidos. Esto da como resultado una hemorragia que supone un riesgo para la vida en aproximadamente un 87 % de los pacientes afectados. Los sitios habituales de sangrado son la piel, mucosa, músculos y retroperitoneo, a diferencia de los pacientes con hemofilia hereditaria, que sangran predominantemente en articulaciones y músculos. La hemofilia adquirida se puede tratar con un concentrado de complejo de protrombina activada o factor VII recombinante activado VII (NovoSeven®, Novo Nordisk) para controlar los episodios hemorrágicos en pacientes. Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento presentan una actividad de coagulación mejorada y derivan la necesidad de terapia de sustitución de FVII. Los polipéptidos de FX modificados se pueden administrar tanto en la forma inactivada de zimógeno, para activarse mediante las enzimas endógenas, o en forma de polipéptidos de FX (FXa) activados. Para aplicaciones que necesitan una resolución más rápida, por ejemplo, durante la cirugía, los polipéptidos modificados se pueden administrar en forma de polipéptidos de FX (FXa) activados.

10

15

20

3. Traumatismo y hemorragia quirúrgica

25

Los polipéptidos de FX modificados se pueden usar como terapia para el tratamiento de las hemorragias asociadas con la pérdida de sangre periquirúrgica y traumática en sujetos con sistemas de coagulación normales. Por ejemplo, los polipéptidos de FX modificados se pueden administrar a un paciente para fomentar la coagulación y reducir la pérdida de sangre asociada con la cirugía y, adicionalmente, reducir la necesidad de transfusión de sangre.

30

35

En algunos ejemplos, los polipéptidos de FX modificados se pueden administrar a pacientes con coagulación normal que se someten a varios tipos de cirugía para realizar la rápida hemostasia y prevenir la pérdida de sangre. El tratamiento con FX modificado puede fomentar la hemostasia en el lugar de la cirugía y reducir o evitar pérdidas de sangre, reduciendo o eliminando de esta forma la necesidad de transfusión. Algunos de los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento presentan propiedades mejoradas tal como un aumento en la semivida, aumento en la resistencia a inhibidores de la proteasa en circulación, y aumento en la actividad catalítica, y por tanto, podrían administrarse, por ejemplo, a dosis más bajas, con menos frecuencia, y menos reacciones adversas. Los polipéptidos de FX modificados se pueden administrar tanto en la forma inactivada de zimógeno, para activarse mediante las enzimas endógenas, o en forma de polipéptidos de FX (FXa) activados.

40

45

50

Los polipéptidos del Factor X modificados, tales como los que se describen en el presente documento, también se pueden usar para fomentar la coagulación y evitar pérdidas de sangre en sujetos con lesiones traumáticas. El traumatismo se define como una lesión en un tejido vivo producida por un agente extrínseco, y es la cuarta causa principal de muerte en Estados Unidos. El traumatismo se clasifica en trauma romo (que da como resultado una compresión interna, daño en los órganos y hemorragia interna) o traumatismo penetrante (a consecuencia de un agente que penetra en el cuerpo y destruye el tejido, vasos sanguíneos y órganos, dando como resultado una hemorragia interna). El traumatismo se puede producir por diversos eventos, entre los que se incluyen, aunque no de forma limitativa, accidentes de circulación (que producen traumatismo romo y penetrante), heridas por arma de fuego (que producen traumatismo penetrante), heridas punzantes (que producen traumatismo penetrante), accidentes con maquinaria (que producen traumatismo romo y penetrante), y caídas desde alturas significativas (que producen traumatismo romo y/ traumatismo penetrante). La hemorragia incontrolada como resultado de un traumatismo es responsable de la mayoría de la mortalidad asociada.

55

60

65

La coagulopatía difusa es una complicación relativamente habitual asociada a los pacientes con traumatismo, que se producen en un 25-36 % de los sujetos. La coagulopatía puede desarrollarse en una fase temprana después de la lesión, como resultado de una variedad de factores tales como la dilución y el consumo de factores de coagulación y de plaquetas, fibrinólisis, acidosis, e hipotermia. La gestión convencional implica terapia de sustitución mediante transfusión con plasma fresco congelado (PFC), plaquetas, RBC y/o crioprecipitado, corrección de la acidosis, y tratamiento de la hipotermia. Frecuentemente, estas etapas son insuficientes para detener la hemorragia y evitar la muerte. El tratamiento mediante la administración de cantidades terapéuticas de FX, tanto en solitario como junto con otras terapias puede fomentar la coagulación y reducir las pérdidas de sangre en pacientes con traumatismo. Por ejemplo, los tratamientos que contienen el polipéptido de FX mejoran la coagulación, y la resistencia final del coágulo en modelos de coagulopatía dilucional en porcino (Dickneite et al., (2010) J Trauma 68(5):1151-1157; Mitterlechner et al., (2011) J Thrombosis and Haemostasis. 9(4):729-737). Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento presentan una dependencia aumentada de FVa para una mayor actividad de coagulación en comparación con los polipéptidos de FX sin modificar, y una semivida aumentada, por tanto se

pueden administrar, por ejemplo, a dosis más bajas, con menos frecuencia, y menos reacciones adversas. Los polipéptidos de FX modificados se pueden administrar tanto en la forma inactivada de zimógeno, para activarse mediante las enzimas endógenas, o en forma de polipéptidos de FX (FXa) activados.

5 I. Tratamientos combinados

Cualquier de los polipéptidos de FX modificados descritos en el presente documento se puede administrar junto con, antes de, de forma intermitente con, o después de, otros agentes o procedimientos terapéuticos, entre los que se incluyen, aunque no de forma limitativa, otras sustancias biológicas, compuestos de molécula pequeña, y cirugía.

10 Para cualquier enfermedad o dolencia, incluidas todas las ilustradas anteriormente, para las que FX (incluida FXa y rFXa) están indicadas o se han utilizado y para las que están disponibles otros agentes y tratamientos, FX, en la forma zimógena o activada, se puede usar en combinaciones conjuntas. Por lo tanto, los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento, en la forma zimógena o activada, se pueden usar de forma análoga. Dependiendo de la enfermedad o dolencia a tratar, las combinaciones ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, combinaciones con otros factores de coagulación purificados de plasma o recombinantes, procoagulantes, tales como vitamina K, derivados de la vitamina K e inhibidores de la proteína C, plasma, plaquetas, glóbulos rojos de la sangre y corticoesteroides.

20 En algunos ejemplos, la sangre y el plasma fresco congelado (FFP) son fuentes de terapia de sustitución con factor X para la elevación mínima de los niveles de factor X (Girolami et al. (1970) *Thromb Diath Haemorrh* 24(1): 175-184; Girolami et al., (1970) *Br J Haematol* 19(2): 179-192). Sin embargo, El tratamiento de la deficiencia en Factor X se lleva a cabo de forma típica con concentrados de complejo de protrombinasa (PCC) que contienen Factor X además de FII, FVII, y FIX (Lechler, E (1999) *Thromb Res* 95(Supl 1):S39-S50). Dichos concentrados están comercialmente disponibles, por ejemplo Konyne 80 (Cutter, USA); Profilnine HT (Alpha, USA); Proplex T (Baxter Hyland, USA; o Bebulin VH (Immuno, USA). También están disponibles PCC activados que contienen FX activado (FXa), por ejemplo, Autoplex (Baxter, Hyland, USA) y FEIBA (Immuno, USA). Típicamente, la hemostasia se consigue con niveles de FX después de la cirugía de 10-20 UI/dl (Knight et al., (1985) *Transfusion*, 25(1):78-80; Bolton-Maggs, PHB. *The rare coagulation disorders. Treatment of hemophilia*. Manchester, World Federation of Hemophilia; 2006). Los concentrados de FIX y FX también se han usado para tratar la deficiencia en Factor X. Sin embargo, los episodios tromboembólicos suponen un problema cuando se usan los PCC, los PCC activados, y otros concentrados que contienen polipéptidos de FX sin modificar (Lechler (1999) *Thromb Res*. 95(Supl. 1):S39-S50). Los episodios tromboembólicos por concentrados que contienen FX se pueden reducir o eliminar mediante el uso de los polipéptidos de FX modificados, tales como las que se describen en el presente documento.

35 Los polipéptidos de FX modificados proporcionados en el presente documento presentan una dependencia aumentada de FVa para una mayor actividad de coagulación en comparación con los polipéptidos de FX sin modificar, y una semivida aumentada, por tanto se pueden administrar, por ejemplo, a dosis más bajas, con menos frecuencia, y menos reacciones adversas. Los polipéptidos de FX modificados se pueden administrar tanto en la forma inactivada de zimógeno, para activarse mediante las enzimas endógenas, o en forma de polipéptidos de FX (FXa) activados.

40 J. Artículos de fabricación y kits

45 Los compuestos farmacéuticos de los polipéptidos de FX modificados o de los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de FX modificados, o un derivado o una porción biológicamente activa de los mismos se pueden envasar como artículos de fabricación que contienen material de envasado, una composición farmacéutica que es eficaz para tratar una enfermedad o trastorno hemostáticos, y una etiqueta que indica que dicho polipéptido de FX modificado o molécula de ácido nucleico es para usarse en el tratamiento de una enfermedad o trastorno hemostático.

50 Los artículos de fabricación descritos en el presente documento contienen materiales de envase. Los materiales de envasado para usar en el envasado de productos farmacéuticos son bien conocidos de los expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, patentes de Estados Unidos con números 5.323.907 y 5.052.558. Los ejemplos de materiales de envasado para sustancias farmacéuticas incluyen, aunque no de forma limitativa, envases blíster, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, frascos, y cualesquiera material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y modo de administración y tratamiento previsto. Se contempla una amplia gama de formulaciones de los compuestos y las composiciones proporcionados en el presente documento ya que se trata de una variedad de tratamiento para cualquier enfermedad o trastorno hemostático.

60 Los polipéptidos de FX modificados y las moléculas de ácidos nucleicos también se pueden proporcionar como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en el presente documento y elementos para la administración. Por ejemplo, un FX modificado se puede suministrar con un dispositivo para su administración, tal como una jeringuilla, un inhalador, una copa dosificadora, un gotero, o un aplicador. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones para la aplicación, incluidas las dosificaciones, regímenes de dosificación, e instrucciones sobre los modos de administración. Los kits también puede incluir una composición farmacéutica descrita en el presente documento y elementos para el diagnóstico. Por ejemplo, dichos kits pueden incluir un elemento para medir la

concentración, cantidad, o actividad de FX o un sistema regulado por FX en un sujeto.

K. Ejemplos

- 5 Los siguientes ejemplos se incluyen con fines ilustrativos solamente y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Ejemplo 1

10 Clonación y expresión de polipéptidos del Factor X

A. Clonación del gen del Factor X en el vector pFUSE

15 El ácido nucleico de 488 aminoácidos que codifica el polipéptido precursor del Factor X (FX) humano (P00742; definido en la SEQ ID NO:1) se clonó en el vector de expresión mamífero, pFUSE-hlgG1-Fc2 (abreviado en el presente documento como pFUSE) (InvivoGen; SEQ ID NO:266), que contiene un promotor compuesto, hEF1-HTLV, que contiene el promotor principal del Factor de elongación 1 α (EF-1 α) y el segmento R y parte de la secuencia U5 (R-U5') de la repetición terminal larga del virus de la leucemia de linfocitos T (HTLV) de Tipo 1. Se usó el kit de clonación In-Fusion CF Dry-Down PCR (Clontech) de acuerdo con las condiciones especificadas por el proveedor.

20 Para el proceso In-Fusion, el plásmido pFUSE sin la porción Fc de la inmunoglobulina 1 humana (hlgG1) se linealizó usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el cebador directo pFUSE-Acc-F1: GTGCTAGCTGGCCAGACATGATAAG (SEQ ID NO: 267) y el cebador inverso pFUSE-Acc-R3: CATGGTGGCCCTCCTTCGCCGGTGATC (SEQ ID NO: 268), y se utilizó como el ADN aceptor. La secuencia de codificación de longitud completa de FX se amplificó mediante la PCR usando ADNc de FX humano (Origene, Rockville, MD) con molde con el cebador directo FX-wtsp-Invivo-F 1: **CGAAGGAGGGCCACCATG**GGGCGCCCACTGCACCTC (SEQ ID NO: 269) y el cebador inverso FX-Invivo-R1: **TGTCTGGCCAGCTAGCACT**CACTTTAATGGAGAGGACG (SEQ ID NO: 270). Para las dos secuencias de cebadores para amplificación del FX donante anteriormente definidas, ambas secuencias de inicio y complementarias 'ATG' de FX de los codones de detención 'TGA' están subrayadas en las secuencias de los cebadores directo e inverso, respectivamente. Las regiones de homología larga de 18 nt, una cola ce cebador 5' sin hibridación para In-Fusion, se muestran en negra.

35 Se utilizó una reacción de la PCR y condiciones de termociclado convencionales, junto con el kit Phusion High-Fidelity Master Mix (New England Biolabs), según lo recomendado por el fabricante. A continuación, los productos de la PCR Donante y Aceptor se digirieron con la enzima de restricción *DpnI* para eliminar el fondo del molde de la PCR metilado precursor derivado de *E. coli*. Estos se mezclaron entre sí, y la reacción In-Fusion se llevó a cabo en las condiciones especificadas por el proveedor.

40 La mezcla de reacción se transformó en células *E. coli* XL1 Blue supercompetentes (Stratagene). Las colonias se seleccionaron en placas de agar 2xYT suplementadas con 25 ppm de Zeocina (InvivoGen). El ADN plásmido se aisló de clones seleccionados, y se secuenciaron para comprobar la clonación correcta. Un clon que contenía la secuencia correcta se usó para posteriores estudios.

45

B. Construcción del plásmido FX con las secuencias señal de protrombina y de propéptido

50 Para intercambiar las secuencias señal y de propéptido del FX con las secuencias de protrombina, el plásmido generado en el Ejemplo 1A anterior se linealizó mediante la PCR con el cebador directo F10-Pro-Acc-F1: GCCAATTCTTTCTTGAAGAGATG (SEQ ID NO: 271) y el cebador inverso pFUSE-Acc-R3: CATGGTGGCCCTCCTTCGCCGGTGATC (SEQ ID NO: 272), y se utilizó como el ADN aceptor. Las secuencias de nucleótidos de la señal y propéptidos de trombina (definidos como los aminoácidos 1-43 SEQ ID NO:415 y definidos como SEQ ID NO:273) se amplificó mediante la PCR usando el ADNc de la protrombina humana (Origene) como molde del cebador directo FII-SP+Pro-F10Acc-F1: **CGAAGGAGGGCCACCATG**GCGCACGTCGGAGGCTTG (SEQ ID NO: 274) y el cebador inverso FII-SP+Pro-F10Acc-R1: **TTCAAGAAAGGAATTGGCT**CGCCGGACCCGCTGGAGCAG (SEQ ID NO: 275). Para las dos secuencias de cebadores para amplificación de protrombina donante anteriormente definidas, las regiones de homología larga de 18 nt, una cola ce cebador 5' sin hibridación para InFusion, se muestran en negra, y el codón de inicio 'ATG' de la protrombina está subrayado en la secuencia del cebador directo. Las reacciones de la PCR convencional e InFusion se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente, y un clon de secuencia verificada, se seleccionó para su uso como plantilla para la generación de variantes de FX.

60

C. Generación de variantes de FX

65 Las variantes de FX se generaron usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange Lightning (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con oligonucleótidos específicamente diseñados que sirven como

cebadores para incorporar mutaciones diseñadas en el ADN recientemente sintetizado. Los cebadores complementarios que incluyen las mutaciones deseadas se extendieron durante el ciclado usando el ADN plásmido purificado bicatenario superenrollado, generado en el Ejemplo 1B, que contiene la secuencia de ADNc de FX clonado como molde. La extensión de los cebadores dio como resultado la incorporación de las mutaciones de interés en las hebras recientemente sintetizadas, y dio como resultado un plásmido mutado con muescas escalonadas. Tras la amplificación, el producto de la mutagénesis se digirió con la enzima de restricción *DpnI* para eliminar las hebras precursoras metiladas iniciales del ADN plásmido derivado de *E. coli*. A continuación, el ADN se transformó en células *E. coli* XL1Blue supercompetentes (Stratagene) seguido por selección en placas de agar 2xYT suplementadas con 25 ppm de Zeocina (InvivoGen). El ADN plásmido se aisló de los clones seleccionados, y se secuenció para verificar la incorporación de una o varias mutaciones en una o varias ubicaciones del gen FX.

La secuencia de nucleótidos de uno de los oligonucleótidos de cada par de cebadores complementario usado para general las variantes de FX se proporcionan en la Tabla 15, a continuación. las secuencias del triplete de nucleótidos que codifica un aminoácido sustituido se muestran en mayúsculas. Por ejemplo, para generar una variante de FX que contiene la sustitución I16L (I16L según la numeración de quimiotripsina; SEQ ID NO:416), el cebador directo FX-I16L, y un cebador que es complementario del cebador directo FX-I16L, se usaron para sustituir una secuencia 'ATC' de 3 pb natural por una secuencia mutante 'CTG' de 3 pb.

La Tabla 15 siguiente muestra los cebadores de oligonucleótidos usados en la mutagénesis de FX. Los tripletes mutantes se muestran en mayúscula, y los nombres del cebador corresponden a la mutación, según la numeración de la quimiotripsina, producida como resultado de la mutagénesis usando el cebador.

Tabla 15

| TABLA 15: Cebadores de oligonucleótidos | | |
|---|--|-----------|
| Nombre del cebador (numeración de quimiotripsina) | Secuencia del cebador (5' a 3') | SEQ ID NO |
| FX-I16L-For | gacaacaacctcaccaggCTGgtgggaggccaggaatgc | 276 |
| FX-V17A-For | CaacaacctcaccaggatcGCCggaggccaggaatgcaag | 277 |
| FX-V17I-For | caacctcaccaggatcATCggaggccaggaatgc | 278 |
| FX-V17L-For | caacctcaccaggatcCTGggaggccaggaatgc | 279 |
| FX-V17T-For | caacctcaccaggatcACCggaggccaggaatgc | 280 |
| FX-V17S-For | caacctcaccaggatcAGCggaggccaggaatgc | 281 |
| FX-V17P-For | caacctcaccaggatcCCCggaggccaggaatgc | 282 |
| FX-G18A-For | accaggatcgtgGCCggccaggaatgcaaggac | 283 |
| FX-G18P-For | accaggatcgtgCCCggccaggaatgcaaggac | 284 |
| FX-G18S-For | accaggatcgtgAGCggccaggaatgcaaggac | 285 |
| FX-G18V-For | accaggatcgtgGTGggccaggaatgcaaggac | 286 |
| FX-G18T-For | accaggatcgtgACCggccaggaatgcaaggac | 287 |
| FX-G19A-For | caccaggatcgtgggaGCCcaggaatgcaaggac | 288 |
| FX-G19V-For | caccaggatcgtgggaGTGcaggaatgcaaggac | 289 |
| FX-G19R-For | caccaggatcgtgggaCGGcaggaatgcaaggac | 290 |
| FX-G19K-For | caccaggatcgtgggaAAGcaggaatgcaaggac | 291 |
| FX-G19P-For | caccaggatcgtgggaCCCcaggaatgcaaggac | 292 |
| FX-G19H-For | caccaggatcgtgggaCACcaggaatgcaaggac | 293 |
| FX-D194N-For | gatgcctgccaggggAACagcgggggcccgcac | 294 |
| FX-D194S-For | gatgcctgccaggggAGCagcgggggcccgcac | 295 |
| FX-L32S/G40H-For | gtgtccctggcagggcAGCctcatcaatgaggaaaacgagCACttctgtggtggaacc | 296 |
| FX-E21A-For | gatcgtgggaggccagGCTgcaaggacggggag | 297 |

| TABLA 15: Cebadores de oligonucleótidos | | |
|--|---|------------------|
| Nombre del cebador (numeración de quimi tripsina) | Secuencia del cebador (5' a 3') | SEQ ID NO |
| FX-E21S-For | gatcgtgggaggccagAGCtgcaaggacggggag | 298 |
| FX-E21V-For | gatcgtgggaggccagGTGtgcaaggacggggag | 299 |
| FX-K23S-For | ggaggccaggaatgcAGCgacggggagtgtccc | 300 |
| FX-R143A-For | gtgagcggcttcgggGCCaccacgagaagggc | 301 |
| FX-R143S-For | gtgagcggcttcgggAGCaccacgagaagggc | 302 |
| FX-R143T-For | gtgagcggcttcgggACCaccacgagaagggc | 303 |
| FX-R143V-For | gtgagcggcttcgggGTGaccacgagaagggc | 304 |
| FX-R143Q-For | gtgagcggcttcgggCAGaccacgagaagggc | 305 |
| FX-R143N-For | gtgagcggcttcgggAACaccacgagaagggc | 306 |
| FX-R143M-For | gtgagcggcttcgggATGaccacgagaagggc | 307 |
| FX-R143K-For | gtgagcggcttcgggAAGaccacgagaagggc | 308 |
| FX-R143Y-For | gtgagcggcttcgggTACaccacgagaagggc | 309 |
| FX-R143D-For | gtgagcggcttcgggGACaccacgagaagggc | 310 |
| FX-T144A-For | gagcggcttcgggGCGGCCcagagaagggccgg | 311 |
| FX-T144L-For | gagcggcttcgggGCGCTGcagagaagggccgg | 312 |
| FX-S152A-For | gagaagggccggcagGCCaccaggctcaagatg | 313 |
| FX-S152T-For | gagaagggccggcagACCaccaggctcaagatg | 314 |
| FX-S152N-For | gagaagggccggcagAACaccaggctcaagatg | 315 |
| FX-R154E-For | ggccggcagtcaccGAGctcaagatgctggag | 316 |
| FX-K156A-For | cagtcaccaggctcGCCatgctggaggtgcc | 317 |
| FX-K156S-For | cagtcaccaggctcAGCatgctggaggtgcc | 318 |
| FX-K156N-For | cagtcaccaggctcAACatgctggaggtgcc | 319 |
| FX-K156D-For | cagtcaccaggctcGACatgctggaggtgcc | 320 |
| FX-K156R-For | cagtcaccaggctcAGGatgctggaggtgcc | 321 |
| FX-K156V-For | cagtcaccaggctcGTGatgctggaggtgcc | 322 |
| FX-K156Y-For | cagtcaccaggctcTACatgctggaggtgcc | 323 |
| FX-K156M-For | cagtcaccaggctcATGatgctggaggtgcc | 324 |
| FX-V17S/G18A-For | caacctcaccaggatcAGCGCCggccaggaatgcaag | 325 |
| FX-I16L/V17S-For | gacaacaacctcaccaggCTGAGCggaggccaggaatgcaag | 326 |
| FX-I16L/G18A-For | gacaacaacctcaccaggCTGgtgGCCggccaggaatgcaaggac | 327 |
| FX-S 152A/K156M-For | gagaagggccggcagGCCaccaggctcATGatgctggaggtgcc | 328 |
| FX-N35D-For | ccctggcaggccctgctcatcGACgaggaaaacgagggtttctgt | 329 |
| FX-N35A-For | ccctggcaggccctgctcatcGCCgaggaaaacgagggtttctgt | 330 |
| FX-N35S-For | ccctggcaggccctgctcatcAGCgaggaaaacgagggtttctgt | 331 |
| FX-E37R-For | caggccctgctcatcaatgagCGCaacgagggtttctgtgtgga | 332 |
| FX-E37K-For | caggccctgctcatcaatgagAAGaacgagggtttctgtgtgga | 333 |

| TABLA 15: Cebadores de oligonucleótidos | | |
|--|---|------------------|
| Nombre del cebador (numeración de quimiotripsina) | Secuencia del cebador (5' a 3') | SEQ ID NO |
| FX-E37A-For | caggccctgctcatcaatgagGCCaacgagggtttctgtggtgga | 334 |
| FX-E37S-For | caggccctgctcatcaatgagAGCaacgagggtttctgtggtgga | 335 |
| FX-E39R-For | ctgctcatcaatgaggaaaacCGCggtttctgtggtggaactatt | 336 |
| FX-E39K-For | ctgctcatcaatgaggaaaacAAGggtttctgtggtggaactatt | 337 |
| FX-E39A-For | ctgctcatcaatgaggaaaacGCCggtttctgtggtggaactatt | 338 |
| FX-R150A-For | gggcgcacccacgagaagggcGCCcagtcaccaggctcaagatg | 339 |
| FX-R150D-For | gggcgcacccacgagaagggcGACcagtcaccaggctcaagatg | 340 |
| FX-R150E-For | gggcgcacccacgagaagggcGAGcagtcaccaggctcaagatg | 341 |
| FX-R150S-For | gggcgcacccacgagaagggcAGCcagtcaccaggctcaagatg | 342 |
| FX-R150G-For | gggcgcacccacgagaagggcGGCcagtcaccaggctcaagatg | 343 |
| FX-R143E-For | gggattgtgagcggcttcgggGAGaccacgagaagggccggcag | 344 |
| FX-R143D-For | gggattgtgagcggcttcgggGACaccacgagaagggccggcag | 345 |
| FX-R143M-For | gggattgtgagcggcttcgggATGaccacgagaagggccggcag | 346 |
| FX-R143N-For | gggattgtgagcggcttcgggAACaccacgagaagggccggcag | 347 |
| FX-R143Q-For | gggattgtgagcggcttcgggCAGaccacgagaagggccggcag | 348 |
| FX-R93E-For | gaggtggtcatcaagcacaacGAGttcacaaggagacctatgac | 349 |
| FX-R93A-For | gaggtggtcatcaagcacaacGCCttcacaaggagacctatgac | 350 |
| FX-R240A-For | gccttctcaagtggatcgacGCCtccatgaaaaccaggggcttg | 351 |
| FX-R240E-For | gccttctcaagtggatcgacGAGtccatgaaaaccaggggcttg | 352 |
| FX-K236A-For | accaaggtcaccgccttctcGCCtggatcgacaggtccatgaaa | 353 |
| FX-K236E-For | accaaggtcaccgccttctcGAGtggatcgacaggtccatgaaa | 354 |
| FX-R125A-For | gcgctgcctgcctccccgagGCCgactgggcccaggtccacgctg | 355 |
| FX-R125E-For | gcgctgcctgcctccccgagGAGgactgggcccaggtccacgctg | 356 |
| FX-K96A-For | atcaagcacaaccggttcacaGCCgagacctatgacttcgacatc | 357 |
| FX-K96E-For | atcaagcacaaccggttcacaGAGgagacctatgacttcgacatc | 358 |
| FX-K23 6E/R240E-For | gtcaccgccttctcGAGtggatcgacGAGtccatgaaaaccagg | 359 |
| FX-K156A-For | ggccggcagtcaccaggctcGCCatgctggaggtgcctcactg | 360 |
| FX-K156S-For | ggccggcagtcaccaggctcAGCagctggaggtgcctcactg | 361 |
| FX-E[51]N-For | gatggcgaccagtgtAACaccagtcttgcag | 362 |
| FX-Q[56]N/Q[58]S-For | gagaccagtcttgcAACaacAGCggcaaatgtaaagac | 363 |
| FX-Q[58]N/K[60]S-For | cagtcttgcagaaacAACggcAGCtgtaaagacggcctc | 364 |
| FX-K[62]N/G[64] S-For | gaaccagggcaaatgtAACgacAGCctcggggaatacacc | 365 |
| FX-L[65]N/E[67]S-For | caaatgtaaagacggcAACgggAGCtacacctgcacctg | 366 |
| FX-E[67]N-For | gtaaagacggcctcgggAACtacacctgcacctgttag | 367 |
| FX-L[73]N/G[75] S-For | gaatacacctgcacctgtAACgaaAGCttcgaaggcaaaaac | 368 |
| FX-G[75]N/E[77] S-For | ctgcacctgttagaaAACttcAGCggcaaaaactgtgaattattc | 369 |

| TABLA 15: Cebadores de oligonucleótidos | | |
|--|---|------------------|
| Nombre del cebador (numeración de quimiotripsina) | Secuencia del cebador (5' a 3') | SEQ ID NO |
| FX-R[86]N/I[88]S-For | ctgtgaattattcacaAACaagAGCtgcagcctggacaac | 370 |
| FX-T[85]N/K[87] S-For | caaaaactgtgaattattcAACcggAGCctctgcagcctggac | 371 |
| FX-L[83]N-For | ggcaaaaactgtgaaAACttcacacggaagctc | 372 |
| FX-E[82]N/F[84]S-For | gaaggcaaaaactgtAACttaAGCacacggaagctctgc | 373 |
| FX-E[82]S-For | gaaggcaaaaactgtAGCttattcacacggaag | 374 |
| FX-G[78]N/N[80]S-For | gtttagaaggattcgaaAACaaaAGCtgtgaattattcacac | 375 |
| FX-E[77]N/K[79]S-For | ctgtttagaaggattcAACggcAGCaactgtgaattattc | 376 |
| FX-D[95]N/D[97]S-For | cagcctggacaacgggAACtgtAGCcagttctgccacgag | 377 |
| FX-G[114]N-For | gtgctcctgcgcccgcAACTacaccctggctgac | 378 |
| FX-K[122]S-For | ctggctgacaacggcAGCgcctgcattcccacag | 379 |
| FX-D[119]N/G[121]S-For | gggtacaccctggctAACaacAGCaaggcctgcattccc | 380 |
| FX-K23N/G25S-For | ggaggccaggaatgcAACgacAGCgagtgctccctggcag | 381 |
| FX-E36N/N38S-For | gccctgctcatcaatAACgaaAGCgagggttctgtggtg | 382 |
| FX-R63N/K65S-For | ctctaccaagccaagAACttcAGCgtgagggtaggggac | 383 |
| FX-E84N/E86S-For | ggtagggcgggtgcacAACgtgAGCgtggtcatcaagcac | 384 |
| FX-T113N/R115S-For | ctcaagacccccatcAACttcAGCcatgaacgtggcgctg | 385 |
| FX-K134N/G 136S-For | acgctgatgacgcagAACacgAGCattgtgagcggcttc | 386 |
| FX-R202N/K204S-For | ggccccgacgtcaccAACttcAGCgacacctactctgtg | 387 |
| FX-D205N/Y207S-For | gtcaccgcttcaagAACaccAGCttcgtgacaggcac | 388 |
| FX-K204N-For | cacgtcaccgcttcAACgacacctactctgtg | 389 |
| FX-T244N/G246S-For | gacaggtccatgaaaAACaggAGCttgcccaggccaag | 390 |
| FX-R245N/I247S-For | aggtccatgaaaaccAACggcAGCcccaggccaagagc | 391 |
| FX-G[114]N+D[119]N/G[121]S-For | gtgctcctgcgcccgcAACTacaccctggctAACaacAGCaaggc ctgcattccc | 392 |

La Tabla 16 siguiente muestra las variantes de FX que se generaron, donde las mutaciones se han indicado usando la numeración relativa al polipéptido de FX maduro mostrado en la SEQ ID NO:134, y también basado en la numeración de quimiotripsina. Las SEQ ID NOS proporcionadas se refieren al polipéptido precursor codificado y a las secuencias maduras de los mutantes relacionados.

5

Tabla 16: Variantes de FX

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | SEQ ID NO. (precursor) | SEQ ID NO. (maduro) |
|------------------------------------|---|------------------------|---------------------|
| I195L | I16L | 416 | 135 |
| V196I | V17I | 417 | 136 |
| V196S | V17S | 418 | 137 |
| T85N/K87S/V196S | T[85]N/K[87]S/V17S | 419 | 138 |
| Q56N/Q58S/V196S | Q[56]N/Q[58]S/V17S | 420 | 139 |
| K62N/G64S/V196S | K[62]N/G[64]S/V17S | 421 | 140 |
| L65N/E67S/V196S | L[65]N/E[67]S/V17S | 422 | 141 |
| E67N/V196S | E[67]N/V17S | 423 | 142 |
| L73N/G75S/V196S | L[73]N/G[75]S/V17S | 424 | 143 |
| G75N/E77S/V196S | G[75]N/E[77]S/V17S | 425 | 144 |
| R86N/I88S/V196S | R[86]N/I[88]S/V17S | 426 | 145 |
| G114N/V196S | G[114]N/V17S | 427 | 146 |
| D95N/D97S/V196S | D[95]N/D[97]S/V17S | 428 | 147 |
| E82S/V196S | E[82]S/V17S | 429 | 148 |
| E82N/F84S/V196S | E[82]N/F[84]S/V17S | 430 | 149 |
| G78N/N80S/V196S | G[78]N/N[80]S/V17S | 431 | 150 |
| E77N/K79S/V196S | E[77]N/K[79]S/V17S | 432 | 151 |
| D119N/G121S/V196S | D[119]N/G[121]S/V17S | 433 | 152 |
| L83N/V196S | L[83]N/V17S | 434 | 153 |
| K122S/V196S | K[122]S/V17S | 435 | 154 |
| E51N/N196S | E[51]N/V17S | 436 | 155 |
| Q58N/K60S/V196S | Q[58]N/K[60]S/V17S | 437 | 156 |
| G114N/D119N/G121S/V196S | G[114]N/D[119]N/G[121]S/V17S | 438 | 157 |
| G198A | G19A | 439 | 158 |

Tabla 16: Variantes de FX

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | SEQ ID NO. (precursor) | SEQ ID NO. (maduro) |
|------------------------------------|---|------------------------|---------------------|
| G198V | G19V | 440 | 159 |
| G198R | G19R | 441 | 160 |
| G198K | G19K | 442 | 161 |
| G198P | G19P | 443 | 162 |
| G198H | G19H | 444 | 163 |
| L211S/G219H | L32S/G40H | 445 | 164 |
| G197P | G18P | 446 | 165 |
| D378N | D194N | 447 | 166 |
| D378S | D194S | 448 | 167 |
| V196L | V17L | 449 | 168 |
| V196T | V17T | 450 | 169 |
| V196P | V17P | 451 | 170 |
| G197V | G18V | 452 | 171 |
| G197T | G18T | 453 | 172 |
| G197S | G18S | 454 | 173 |
| E200A | E21A | 455 | 174 |
| E200S | E21S | 456 | 175 |
| E200V | E21V | 457 | 176 |
| K202S | K23S | 458 | 177 |
| R326A | R143A | 459 | 178 |
| R326S | R143S | 460 | 179 |
| R326T | R143T | 461 | 180 |
| R326V | R143V | 462 | 181 |
| R326Q | R143Q | 463 | 182 |

Tabla 16: Variantes de FX

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | SEQ ID NO. (precursor) | SEQ ID NO. (maduro) |
|------------------------------------|---|------------------------|---------------------|
| R326N | R143N | 464 | 183 |
| R326M | R143M | 465 | 184 |
| R326K | R143K | 466 | 185 |
| R326Y | R143Y | 467 | 186 |
| T327A | T144A | 468 | 187 |
| T327L | T144L | 469 | 188 |
| S334A | S152A | 470 | 189 |
| S334T | S152T | 471 | 190 |
| S334N | S152N | 472 | 191 |
| R336E | R154E | 473 | 192 |
| K338A | K156A | 474 | 193 |
| K338S | K156S | 475 | 194 |
| K338N | K156N | 476 | 195 |
| K338R | K156R | 477 | 196 |
| K338V | K156V | 478 | 197 |
| K338Y | K156Y | 479 | 198 |
| K338M | K156M | 480 | 199 |
| T327A/K338A | T144A/K156A | 481 | 200 |
| T327L/K338M | T144L/K156M | 482 | 201 |
| E200V/T327L/K338M | E21V/T144L/K156M | 483 | 202 |
| E200V/T327L/S334A/K338M | E21V/T144L/S152A/K156M | 484 | 203 |
| V196S/G197A | V17S/G18A | 485 | 204 |
| V196S/I211S/G219H | V17S/I32S/G40H | 486 | 205 |
| D119N/G121SA/196 S/I211S/G219H | D[119]N/G[121]SA/I7S/I32S/G40H | 487 | 206 |

Tabla 16: Variantes de FX

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | SEQ ID NO. (precursor) | SEQ ID NO. (maduro) |
|-------------------------------------|---|------------------------|---------------------|
| G114NA/196S/I211S/G219H | G[114]NA/17S/I32S/G40H | 488 | 207 |
| G114N/D119N/G121S/V196S/I211S/G219H | G[114]N/D[119]N/G[121]SA/17S/I32S/G40H | 489 | 208 |
| G197A/I211S/G219H | G18A/I32S/G40H | 490 | 209 |
| V196S/G197A/I211S/G219H | V17S/G18A/I32S/G40H | 491 | 210 |
| I195L/V196S | I16L/V17S | 492 | 211 |
| I195L/G197A | I16L/G18A | 493 | 212 |
| I195L/I211S/G219H | I16L/I32S/G40H | 494 | 213 |
| V196S/N214D | V17S/N35D | 495 | 214 |
| V196S/N214A | V17S/N35A | 496 | 215 |
| V196S/N214S | V17S/N35S | 497 | 216 |
| V196S/E216R | V17S/E37R | 498 | 217 |
| V196S/E216K | V17S/E37K | 499 | 218 |
| V196S/E216A | V17S/E37A | 500 | 219 |
| V196S/E216S | V17S/E37S | 501 | 220 |
| V196S/E218R | V17S/E39R | 502 | 221 |
| V196S/E218K | V17S/E39K | 503 | 222 |
| V196S/E218A | V17S/E39A | 504 | 223 |
| V196S/R332A | V17S/R150A | 505 | 224 |
| V196S/R332D | V17S/R150D | 506 | 225 |
| V196S/R332E | V17S/R150E | 507 | 226 |
| V196S/R332S | V17S/R150S | 508 | 227 |
| V196S/R332G | V17S/R150G | 509 | 228 |
| V196S/R326E | V17S/R143E | 510 | 229 |
| V196S/R326D | V17S/R143D | 511 | 230 |

Tabla 16: Variantes de FX

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | SEQ ID NO. (precursor) | SEQ ID NO. (maduro) |
|------------------------------------|---|------------------------|---------------------|
| V196S/R326M | V17S/R143M | 512 | 231 |
| V196S/R326N | V17S/R143N | 513 | 232 |
| V196S/R326Q | V17S/R143Q | 514 | 233 |
| V196S/R273E | V17S/R93E | 515 | 234 |
| V196S/R273A | V17S/R93A | 516 | 235 |
| V196S/R424A | V17S/R240A | 517 | 236 |
| V196S/R424E | V17S/R240E | 518 | 237 |
| V196S/K420A | V17S/K236A | 519 | 238 |
| V196S/K420E | V17S/K236E | 520 | 239 |
| V196S/R306E | V17S/R125A | 521 | 240 |
| V196S/K276A | V17S/K96A | 522 | 241 |
| V196S/K276E | V17S/K96E | 523 | 242 |
| V196S/K420E/R424E | V17S/K236E/R240E | 524 | 243 |
| V196S/R273E/K420E/R424E | V17S/R93E/K236E/R240E | 525 | 244 |
| V196S/R273E/R306E/K420E/R424E | V17S/R93E/R125E/K236E/R240E | 526 | 245 |
| V196S/K338A | V17S/K156A | 527 | 246 |
| V196S/K338S | V17S/K156S | 528 | 247 |
| V196S/E215N/N217S | V17S/E36N/N38S | 529 | 248 |
| V196S/E264N/E266S | V17S/E84N/E86S | 530 | 249 |
| D119N/G121SA/196S/E264N/E266S | D[119]N/G[121]SA/17S/E84N/E86S | 531 | 250 |
| G114NA/196S/E264N/E266S | G[114]NA/17S/E84N/E86S | 532 | 251 |
| V196S/R429N/I431S | V17S/R245N/I247S | 533 | 252 |
| V196S/R243N/K245S | V17S/R63N/K65S | 534 | 253 |
| V196S/T293N/R295S | V17S/T113N/R115S | 535 | 254 |

Tabla 16: Variantes de FX

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | SEQ ID NO. (precursor) | SEQ ID NO. (maduro) |
|---|--|------------------------|---------------------|
| V196S/D389N/Y391S | V17S/D205N/Y207S | 536 | 255 |
| V196S/K388N | V17S/K204N | 537 | 256 |
| D119N/G121S/V196S/K388N | D[119]N/G[121]S/V17S/K204N | 538 | 257 |
| V196S/T428N/G430S | V17S/T244N/G246S | 539 | 258 |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | V17S/I32S/G40H/E84N/E86S | 540 | 259 |
| D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | D[119]N/G[121]S/V17S/I32S/G40H/E84N/E86S | 541 | 260 |
| G114N/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | G[114]N/V17S/I32S/G40H/E84N/E86S | 542 | 261 |
| V196S/E264N/E266S/K388N | V17S/E84N/E86S/K204N | 543 | 262 |
| D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/K388N | D[119]N/G[121]S/V17S/I32S/G40H/K204 N | 544 | 263 |
| G114N/V196S/I211S/G219H/K388N | G[114]N/V17S/I32S/G40H/K204N | 545 | 264 |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S/K388N | V17S/I32S/G40H/E84N/E86S/K204N | 546 | 265 |

Ejemplo 2**Expresión, purificación y activación de polipéptidos de FX****5 A. Expresión y purificación de polipéptidos de FX**

Polipéptidos de FX de tipo natural y variantes se expresaron en células CHO-Express (CHOX) (Excellgene). Las células CHO Express (CHOX) se mantuvieron en medio completo DM204B (Irvine Scientific) y se usaron para inocular cultivos de producción sembrados. Las transfecciones se realizaron en biorreactores WAVE (GE Healthcare). Bolsas wave de 20 l se inocularon con aproximadamente 400 ml de cultivo sembrado en 4,6 l de medio completo DM204B hasta una densidad de siembra de $1,2 \times 10^6$ vc/ml. El biorreactor WAVE se configuró en un ángulo de balanceo de 6 grados y una velocidad de balanceo de 24 rpm a 37,1 °C para permitir a las células alcanzar una densidad celular de $13-16 \times 10^6$ vc/ml 3 días después. 16 mg de ADN plásmido de FX y 102,5 mg de PEI (polietilenimina) se combinaron para formar un complejo de transfección, que se diluyó en 5,0 l de TfMAX2 antes de su adición al cultivo en el biorreactor WAVE, 3 días después de la siembra inicial. El complejo de transfección junto con el medio TfMAX se añadió a la bolsa wave. El cultivo se dejó expresar durante 4 días antes de recoger los lisados de FX en bruto. Para la recogida, el contenido de las bolsas wave se dejaron sedimentar durante 3 h a 4 °C. El sobrenadante del cultivo se recogió a continuación mediante un filtro profundo CUNO, seguido de purificación de FX.

Los polipéptidos de FX se purificaron usando una columna Q Fast Flow (GE Healthcare), donde se absorben los polipéptidos de FX con dominios Gla funcionales, seguido de una etapa de elución con calcio. Típicamente, el sobrenadante del cultivo procedente de las células transfectadas se diluyó dos veces con una solución que contenía Tris 20 mM pH 8,0, y a continuación se añadió EDTA 500 mM pH 8,0 a la muestra diluida hasta una concentración final de EDTA de 1,5 mM. Las muestras se filtraron antes de cargarse en la columna Q Fast Flow que se había equilibrado previamente en primer lugar con Tampón B (Tris 20 mM pH 8,0, NaCl 1 M), después Tampón A (Tris 20 mM pH 8,0, NaCl 0,15 M). Tras cargar las muestras, la columna se lavó con Tampón A hasta que la absorbancia del flujo pistón a 280 nm alcanzó un nivel de base. El tampón A se sustituyó por Tampón C (Tris 20 mM pH 8,0, NaCl 0,15 M, CaCl_2 10 mM) y se realizó un lavado de la bomba para sustituir completamente el tampón de las líneas. Tras completar el lavado de la bomba, se aplicó el Tampón C a la columna para eluir los polipéptidos de FX, que se recogieron en fracciones. Tras la elución, la columna se lavó con Tampón B mientras se seguían recogiendo fracciones, hasta que el pigmento de color rosa (del medio de cultivo) se eliminó de la columna por lavado. La columna se volvió a equilibrar para reutilización por lavado con Tampón A.

Las fracciones eluidas se purificaron adicionalmente usando una columna Source 15Q (GE Healthcare). Las fracciones recogidas con el Tampón C anterior, que contenían FX, se combinaron, y se añadió EDTA hasta una concentración final 20 mM. A continuación, las fracciones combinadas se diluyeron dos veces con Tris 50 mM, pH 8,0 y se cargaron en la cargaron 15Q que se había equilibrado previamente con Tampón D (Tris 20 mM pH 8,0, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,01 %, CaCl_2 2,5 mM). Tras lavar la columna cargada con Tampón D, se aplicó un gradiente de NaCl 0,15 M a NaCl 0,5 M a la columna, y se recogieron las fracciones. Las fracciones que contenían FX se combinaron, y se añadió CaCl_2 hasta 12,5 mM.

B. Activación de FX y variantes de FX

Para generar FX activado FX (FXa) a partir del zimógeno de FX, 10,1 µg por ml de activador FX de veneno de víbora de Russell (Haematologic Technologies), que previamente se había conjugado con biotina, se añadieron a las fracciones combinadas que lo contenían, generadas en el Ejemplo 2A. La reacción de activación se incubó a 37 °C durante 1,5 horas, después se diluyó 1:5 en MES 20 mM, pH 6,0. A continuación la mezcla se aplicó a una columna StrepTrap (GE Healthcare) para eliminar el activador FX de veneno de víbora de Russell.

Finalmente, el FX no activado se separó del FXa activado mediante cromatografía con Heparina HP. El flujo pistón de la columna StrepTrap se aplicó directamente a una columna Heparina HP (GE Healthcare), que previamente se había equilibrado en Tampón E (MES 20 mM, pH 6,0, NaCl 50 mM). Un gradiente lineal de NaCl 0,1 a 0,7 M en MES 20 mM, pH 6,0 se aplicó a la columna y la recogieron las fracciones. Las fracciones que contenían FXa activo se combinaron, y el Tampón se intercambió con MES 5 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM mediante diafiltración.

Ejemplo 3.**Determinación de la concentración de proteasa (FXa) catalíticamente activa en una solución madre**

La determinación de la concentración catalíticamente activa de Factor Xa (FXa) en una solución madre de FXa, o variante de FX, se realizó mediante valoración volumétrica de la muestra de proteasa en la disolución madre con -mono-*p*'-guanidinobenzoato de fluoresceína (FMGB), un sustrato éster fluorogénico desarrollado como titulador de sitios activos para serina proteasas de tipo tripsina. En algunos casos, la concentración de FXa activo o variante de FXa también se determinó por valoración volumétrica con ecotina, un inhibidor reversible de unión fuerte a FXa procedente de *Escherichia coli* que tiene una *K* picomolar contra FXa de tipo natural (Seymour et al. (1994)

Biochemistry 33:3949-3958). Para un subconjunto de variantes de FXa, donde la titulación con FMGB no fue posible, la titulación con ecotina se realizó como se describe más adelante.

5 A. Titulación del sitio activo de FXa usando un titulador de sitio activo de mono-*p*'-guanidinobenzoato de fluoresceína (FMGB).

10 The concentración de Factor X catalíticamente activo (FXa) en una solución madre de FXa se determinó mediante una versión modificada del ensayo de titulación descrito en Bock et al. (Archives of Biochemistry and Biophysics (1989) 273:375-388) usando el sustrato de éster fluorogénico mono-*p*'-guanidinobenzoato de fluoresceína (FMGB).
 15 FMGB reacciona rápidamente con FXa, pero no con FX o proteasa inactiva, para formar un compuesto intermedio de acil-enzima eficazmente estable en condiciones en las que la concentración de FMGB está en saturación, y la desacetilación es especialmente lenta y una limitación de velocidad para la catálisis. En estas condiciones, la proteasa FXa experimenta una única renovación catalítica para liberar el fluoróforo de fluoresceína. Cuando la emisión inicial de fluorescencia se calibra contra una curva patrón de concentración externa de la fluorescencia de la fluoresceína, se puede calcular la concentración de sitios activos.

20 Las modificaciones del ensayo según fue originalmente descrito por Bock *et al.* fueron: 1) la inclusión de cantidades de saturación del cofactor a FXa, 2) la adición de Factor Va (FVa purificado de plasma, Heamatologic Technologies) y una elevada concentración de fosfolípidos (75 % de fosfatidilcolina (PC)/25 % de fosfatidilserina (PS); vesículas PC/PS ~120 nm de diámetro; Avanti Polar Lipids) y 3) un aumento en la concentración de FMGB.

25 En ausencia de las FVa y vesículas PC/PS, las variantes de FXa con dependencia demostrada creciente del cofactor reaccionaron poco, o no reaccionaron con el sustrato de éster de FMGB. Por lo tanto, estas modificaciones fueron necesarias para soportar la actividad catalítica completa de las variantes de FXa, en las que se diseñó mediante ingeniería genética una elevada dependencia del cofactor (véase el ejemplo 4A).

30 Se desarrollaron más revisiones para modificar el ensayo para un formato de placa de 96 pocillos para minimizar los volúmenes de reacción y aumentar el rendimiento de la muestra (hasta 18 muestras por placa). Los ensayos de titulación del sitio activo se llevaron a cabo en un volumen de reacción final de 50 µl en una placa de 96 pocillos de semiárea negra (Costar n.º 3694). El método actual se optimizó para la titulación del sitio activo en variantes de la proteasa FXa con soluciones madre de concentraciones 10 - 100 µM. Para las disoluciones madre de proteasa con concentraciones fuera de este intervalo, fue necesaria una etapa de dilución o concentración inicial. Las reacciones finales contenían ~300 - 650 nM de cada variante de FXa y FMGB 10, 50 o 75 µM en 1 x Tampón A (Hepes 50 mM-NaOH, NaCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM y BSA al 0,1 %, pH 7,4) que contiene FVa 1 µM y PC/PS fosfolípidos 240 µM. Se prepararon soluciones de trabajo de FMGB a una concentración 2x en Tampón A (20 - 150 µM) a partir de una concentración madre de FMGB 5 mM en DMF basado en el peso seco, y la concentración se confirmó mediante espectroscopia de absorbancia a 452 nm usando un coeficiente de extinción de 19.498 M⁻¹ cm⁻¹ en suero salino tamponado con fosfato (PBS), pH 7,2.

40 Los ensayos de titulación del sitio activo se prepararon de la siguiente forma: las variantes de FXa se diluyeron hasta 0,6 - 1,3 µM en 1 x Tampón A que contenía 2x FVa y vesículas PC/PS (2 µM y 480 µM, respectivamente) y un volumen de 25 µl se distribuyó en alícuotas en pocillos duplicados de una placa de ensayo de 96 pocillos de semiárea negra. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 25 µl de la solución de trabajo 2x de FMGB (20 - 150 µM) en 1 x Tampón A. La fluorescencia de la fluoresceína liberada en la fase de emisión inicial de la reacción se midió cada 30 segundos, durante 180 minutos, usando un lector de microplacas Envision (Perkin Elmer) con una excitación de 485 nm y una emisión de 535 nm.

50 La cantidad estequiométrica de fluoresceína liberada después de la catálisis de FMGB mediante FXa activa se determinó usando una curva patrón de fluoresceína libre en 1 x Tampón A que contenía FVa 1 µM y fosfolípidos PC/PS 240 µM. La solución patrón de fluoresceína se preparó recientemente a partir de una solución madre de -70 - 150 mM en DMF, y se confirmó la concentración precisa de FMGB mediante espectroscopia de absorbancia en condiciones convencionales a 496 nm usando un coeficiente de extinción de 89.125 M⁻¹ cm⁻¹ en NaOH 0,1 N. A continuación se preparó una curva patrón de fluoresceína libre mediante la dilución en serie del patrón en 1 x Tampón A que contenía FVa 1 µM y fosfolípidos PC/PS 240 µM con un intervalo de FMGB 0 a 2,5 µM.

55 Para el análisis de datos, las trazas de reacción se exportaron como archivos .TXT desde el paquete informático Envision (Perkin Elmer) y el posterior análisis de datos no lineales se realizó con XLfit4, un paquete informático para el ajuste automático de curvas y análisis estadístico en el entorno de la hoja de cálculo de Microsoft Excel (IDBS Software). Se determinó la contribución de la hidrólisis del FMGB del fondo, que se restó de la traza de la reacción experimental usando un conjunto de pocillos de control a los que no se había añadido FXa. De forma típica, la hidrólisis de FMGB del fondo fue menor del 5 % de la emisión inicial de fluorescencia observada total. La curva corregida se ajustó a una única ecuación exponencial con un componente lineal (para tener en cuenta la velocidad de desacetilación lenta) en la forma: $\Delta\text{Fluorescencia} = Y_0 + \text{Amp} \cdot (1 - \exp(-k_{\text{obs}} \cdot (X - X_0))) + \text{pendiente} \cdot (X - X_0)$ donde los parámetros X y X₀ = tiempo de finalización y tiempo de inicio de la reacción, Y₀ = un desplazamiento que tienen en cuenta la fluorescencia de fondo en el sistema de ensayo, Amp = la amplitud de la fase de emisión inicial en las condiciones del ensayo de saturación anteriormente detalladas, k_{obs} es la constante de velocidad de primer orden

observada para la formación de la acil-enzima y la pendiente es una constante de velocidad volumétrica asociada con la renovación completa de FMGB mediante la proteasa. La concentración de proteasa FXa activa en la reacción se calculó por comparación del parámetro de ajuste de la amplitud (Amp) y la curva patrón de fluoresceína. Los valores de ensayos duplicados se promediaron y se determinó la desviación estándar. La concentración de FXa activa en la preparación madre se determinó a continuación a partir de la concentración de ensayo calculada, y se ajustó según el grado de dilución usado en el ensayo.

B. Titulación del sitio activo de FXa usando un inhibidor de unión fuerte

10 Cuando la titulación de FMGB no es posible, la concentración de un Factor Xa o variante de FXa catalíticamente activo en una solución madre de FXa se determinó mediante titulación con una cantidad conocida de ecotina, un inhibidor reversible de unión fuerte a FXa procedente de *Escherichia coli*.

15 La concentración de ecotina activa en la preparación comercial (Molecular Innovations, Inc.) se determinó titulando una concentración conocida de la tripsina recombinante humana (rh-Trypsin, Polymun Scientific) con la preparación de ecotina de *E. coli*. Las titulaciones se realizaron en un volumen de 2,0 ml de 1 x Tampón B (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, PEG 8000 al 0,1 %) usando una concentración final de sitio activo 100 nM titulado con rh-Tyrpsin y una dosis escalonada de ecotina de 0 - 200 nM. Después de 60 min de incubaciones a temperatura ambiente; en una placa de polipropileno de 96 pocillos profundos, se transfirieron 2,0 ml a una cubeta de cuarzo limpia (10 mm x 10 mm). Se añadió FMGB a una concentración final de 5 µM (1,9 µl/2,0 ml de una disolución madre 5,3 mMY la cantidad de rh-Trypsin activa residual se determinó de la emisión inicial de FMGB. Los datos se integraron durante 50 segundos de la meseta de emisión inicial para cada dosis de ecotina y se transformó en $\Delta F_{obs}/\Delta F_{max}$, donde ΔF_{max} es la amplitud total de la emisión inicial de rh-Trypsin en ausencia de inhibidor, y ΔF_{obs} es la amplitud de la emisión inicial en presencia de inhibidor. La concentración de trabajo del inhibidor activo se determinó posteriormente a partir de la ordenada en X extrapolada para la inhibición completa, y la cantidad conocida de la rh-Trypsin activa en la reacción.

25 Las reacciones de titulación del sitio activo con ecotina se realizaron preparando una dilución en serie de 1,33 veces (150 µl en 50 µl) de ecotina a una concentración 2x (400 nM - 0 nM) en 1x Tampón B suplementado con BSA al 0,1 %. Las muestras de proteasa FXa o variante de FXa se diluyeron hasta una concentración de trabajo 2x (400 nM) y 50 µl se distribuyeron en alícuotas en pocillos duplicados de una placa de ensayo de polipropileno de 96 pocillos. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 50 µl de la serie de dilución de 12 puntos de 2x ecotina hasta concentraciones finales de ecotina comprendidas de 200 nM - 0 nM en volúmenes de reacción de 100 µl (50 µl + 50 µl).

35 Las reacciones de inhibición se incubaron durante 120 minutos a temperatura ambiente (~25 °C) antes de leer a la actividad residual de FXa o variante de FXa con el sustrato fluorogénico, Pefalfluor Xa (CH₃SO₂-D-CHA-Gly-Arg-AMC, Centerchem). FXa de tipo natural y las variantes de FXa con elevada actividad sobre el sustrato peptídico se diluyeron de 10 a 100 veces hasta un volumen final de 75 µl de 1x Tampón B suplementado con tampón BSA al 0,1 % para conseguir una velocidad de la reacción en un intervalo aceptable. Las variantes de FXa con poca actividad sobre el sustrato peptídico se analizaron sin diluir. Los 75 µl de las muestras diluidas o no diluidas se transfirieron a una placa de ensayo de 96 pocillos de color negro, seguido por la adición de 25 µl de Pefalfluor Xa 0,4 mM (0,1 mM final). La velocidad de la reacción inicial se midió a continuación a 25 °C durante 15 - 60 min. Se asumió que cualquier disociación debida a los cambios en la dilución era poco importante durante la medición de la velocidad; por tanto, las concentraciones de incubación fueron las concentraciones finales utilizadas para el inhibidor y la proteasa en el posterior análisis de datos.

45 La relación entre la velocidad de la reacción en la presencia del inhibidor (V_i) y la velocidad de la reacción en ausencia de inhibidor, (V_0) se determinó para cada concentración del inhibidor (ecotina) a una concentración fija de la proteasa. Las relaciones V_i/V_0 se representaron gráficamente, y las curvas de titulación resultantes se evaluaron mediante la expresión de la Ecuación (1) en el paquete informático Pris (Graphpad Software). Los análisis se realizaron suponiendo una estequiometría de inhibidor/proteasa de n=1.

Ecuación (1):

$$V_i/V_0 = Y - \text{Ordenada en el origen} + \text{pendiente} * [\text{ecotina}]$$

55 El valor de ajuste para la ordenada en X, extrapolada de la Ecuación (1), se usó a continuación para determinar la concentración de titulación del sitio activo (AST) en la solución madre de FXa y el valor de "Fracción activa", suponiendo que la concentración total de la proteasa era conocida, y que la ecotina era activa a las concentraciones utilizadas para generar la curva de respuesta a dosis, usando la Ecuación (2). Solamente se evaluaron los valores que se definieron por la pérdida lineal de actividad (0 %-90 %) para aumentar las concentraciones de ecotina.

Ecuación (2):

$$([\text{Ordenada en X}]_{\text{valor de ajuste}} / [\text{FXa}]_{\text{ensayo}}) * [\text{FXa}]_{\text{proteína total}} - [\text{FXa}]_{\text{Ecotina-AST}}$$

Ejemplo 4.**Determinación de la actividad catalítica de FXa por su sustrato, Protrombina (FII)**

5 Las actividades catalíticas de FXa y variantes de FXa por su sustrato, protrombina (FII), se evaluaron tanto en presencia (dependencia de cofactor) y ausencia (independiente de cofactor) de FVa purificado de plasma y fosfolípidos. Las respectivas actividades catalíticas se evaluaron indirectamente usando un ensayo fluorogénico, en el cual, la fluorescencia generada por la escisión mediada por trombina (FIIa) del sustrato sintético Pefaf fluor TH (H-D-CHA-Ala-Arg-AMC; Centerchem) se usó para evaluar la escisión mediante FXa de protrombina (FII) para generar trombina (FIIa).

15 Se usó un intervalo de concentraciones de protrombina para calcular las constantes cinéticas donde la proteasa sustrato (protrombina) estaba en exceso de al menos 1000 veces respecto de la concentración de la proteasa activadora (FXa) para los ensayos dependientes del cofactor y al menos de 10 a 1000 veces sobre la concentración de proteasa activadora (FXa) para los ensayos independientes del cofactor dependiente de la actividad de la variante. En resumen, el siguiente ensayo proporciona una medida de la cinética de la activación de protrombina catalizada por protrombinasa mediante observación directa de la actividad de la trombina sobre sus sustrato, Pefaf fluor TH, en un ensayo cinético medido durante 30-60 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Para la determinación de las constantes cinéticas de la función FXa/protrombinasa (k_{cat} y K_M), se realizaron experimentos con una cantidad limitante de Factor Xa en presencia o ausencia de una cantidad de saturación fija de Factor Va (20 nM) y vesículas PC/PS que contenían fosfolípidos (20 μ M) a concentraciones crecientes de protrombina (entre 0 y 8 μ M). La liberación del fluoróforo libre, AMC (7-amino-4-metilcumarina) tras la catálisis de Pefaf fluor TH de trombina se evaluó después de forma continua durante la reacción, y se determinaron las constantes de velocidad de las variantes de FXa.

25

A. Protocolo de ensayo dependiente de FVa

30 Para los ensayos que evalúan la cinética de la activación de protrombina (FII) mediante FXa en presencia de FVa (purificado de plasma, Heamatologic Technologies, Inc.) y fosfolípidos (75 % de fosfatidilcolin (PC)/25 % de fosfatidilserina (PS); vesículas PC/PS ~120 nm de diámetro; Avanti Polar Lipids), las variantes de FXa se expresaron, se purificaron, se activaron, y el sitio activo se tituló como se describe en el Ejemplo 1-3, más arriba. A continuación, las variantes de FXa se diluyeron en serie hasta una concentración 2x de 0,2 pM en un volumen de 2 ml de 1 x Tampón A (Hepes 20 mM/NaCl150 mM/CaCl₂ 5 mM/BSA al 0,1 %/PEG-8000 al 0,1 %, pH 7,4) que contenía 2x concentraciones de FVa (40 nM) y vesículas PC/PS (40 μ M).

35

40 Una solución de protrombina (FII) tratada con DFP/FPR-cmk 5 μ M se preparó en 2,0 ml de 1 x Tampón A que contenía sustrato Pefaf fluor TH 0,1 mM. Esto representó la concentración más elevada de protrombina sometida a ensayo, y proporcionó un volumen suficiente para 3 ensayos en placas. La solución de protrombina/Pefaf fluor TH a continuación se diluyó en serie de 1,8 veces en una placa de polipropileno de 12 canales profundos con un volumen final de 700 μ l 1 x Tampón A que contenía Pefaf fluor TH 0,1 mM, dando como resultado diluciones finales de 5000 nM, 2778 nM, 1543 nM, 857 nM, 476 nM, 265 nM, 147 nM, 82 nM, 45 nM, 25 nM, 14 nM y 0 nM de protrombina. Un total de 25 μ l de cada serie de dilución de protrombina se distribuyó en alícuotas en hasta tres placas de ensayo de 96 pocillos de semiárea negra. Las reacciones de ensayo se iniciaron de forma típica con un sistema de gestión de líquidos BioMek FX o una micropipeta de 12 canales para dispensar 25 μ l de las soluciones de protrombinasa (FXa/FVa/Fosfolípidos/Ca²⁺) en tres placas de ensayo que contenían 25 μ l de la serie de dilución de protrombina de acuerdo con un mapa de placa predefinido (4 variantes de FXa/placa).

45

50 Las concentraciones finales de los reactivos del ensayo fueron las siguientes: FXa 0,1 pM, FVa 20 nM, vesículas PC/PS 20 μ M, Pefaf fluor TH 50 μ M y diluciones de protrombina (FII) de 0 nM a 2500 nM. Las reacciones se siguieron en un lector de fluorescencia de placas SpectraMax durante 30 min a 25 °C. Una curva patrón de AMC sirvió como factor de conversión para las URF a μ M en los cálculos de análisis de los datos usando un intervalo de dosis comprendido de 0 μ M a 100 μ M AMC.

50

A. Protocolo de ensayo independiente de FVa

55

60 Para los ensayos que evalúan la cinética de la activación de protrombina (FII) mediante FXa en ausencia de FVa, pero en presencia de fosfolípidos (75 % de fosfatidilcolin (PC)/25 % de fosfatidilserina (PS); vesículas PC/PS - 120 nm de diámetro; Avanti Polar Lipids), las variantes de FXa se expresaron, se purificaron, se activaron, y el sitio activo se tituló como se describe en los ejemplos 1-3, más arriba. A continuación, las variantes de FXa se diluyeron en serie hasta una 2x concentración de 20 pM (natural) o 1 nM-4 nM (para variantes de FXa) en un volumen de 2 ml de 1x Tampón A que contenía una 2x concentración de vesículas PC/PS (40 μ M). Una solución de protrombina (FII) tratada con DFP/FPR-cmk 8 μ M se preparó en 2,0 ml de 1x Tampón A que contenía sustrato Pefaf fluor TH 0,1 mM. Esto representó la concentración más elevada de protrombina sometida a ensayo, y proporcionó un volumen suficiente para hasta 3 ensayos en placas. La solución de protrombina/Pefaf fluor TH a continuación se diluyó en serie de 1,8 veces en una placa de polipropileno de 12 canales profundos con un volumen final de 700 μ l 1x Tampón A que contenía Pefaf fluor TH 0,1 mM, dando como resultado diluciones finales de 8000 nM, 4444 nM, 2469 nM,

65

1372 nM, 762 nM, 423 nM, 235 nM, 131 nM, 73 nM, 40 nM, 22 nM y 0 nM de protrombina. Un total de 25 µl de cada serie de dilución de protrombina se distribuyó en alícuotas en hasta tres placas de ensayo de 96 pocillos de semiárea negra. Las reacciones de ensayo se iniciaron de forma típica con un sistema de gestión de líquidos BioMek FX o una micropipeta de 12 canales para dispensar 25 µl de las soluciones de protrombinasa (FXa/Fosfolípidos/Ca²⁺) en tres placas de ensayo que contenían 25 µl de la serie de dilución de protrombina de acuerdo con un mapa de placa predefinido (4 variantes de FXa/placa).

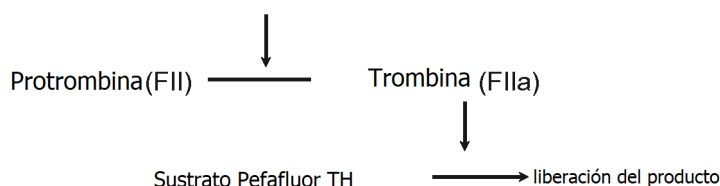
Las concentraciones finales de los reactivos del ensayo fueron las siguientes: FXa 10 pM o variante de FXa 0,5 - 2 nM, vesículas PC/PS 20 µM, Pefalfluor TH 50 µM y diluciones de protrombina (FII) de 0 nM a 4000 nM. Las reacciones se siguieron en un lector de fluorescencia de placas SpectraMax durante 30 min a 25 °C. Una curva patrón de AMC sirvió como factor de conversión para las URF a µM en los cálculos de análisis de los datos usando un intervalo de dosis comprendido de 0 µM a 100 µM AMC.

C. Análisis de los datos

Todas las ecuaciones utilizadas para determinar la cinética en estado estacionario de la catálisis de protrombina (FII) mediante FXa se basan en las descritas en la referencia "Zymogen-Activation Kinetics: Modulatory effects of trans-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid and poly-D-lysine on plasminogen activation" en Petersen, et al. (1985) Biochem. J. 225:149-158. La teoría de la cinética en estado estacionario del sistema descrito mediante el Esquema A siguiente se describe mediante la expresión de la ecuación (3) que representa una acumulación parabólica del producto.

Esquema A:

FXa/FVa/Fosfolípido/Ca²⁺ (complejo de la protrombinasa)



Ecuación (3)

$$p = a_0 \frac{k_a [z_0]}{K_z + [z_0]} * \frac{k_e [S_0]}{K_s + [S_0]} * \frac{t^2}{2}$$

De acuerdo con el mecanismo del Esquema A, a₀ es la concentración de proteasa de activación (FXa), z₀ es la concentración de zimógeno (FII), k_a y K_z representan la k_{cat} y K_M para la conversión catalizada por activador del zimógeno en enzima activa (FIIa), mientras que k_e y K_s representan la k_{cat} y K_M para la conversión de sustrato en producto por FIIa durante un tiempo dado t.

Para el análisis de las curvas de progreso, la ecuación (3) se reformuló como la ecuación (4) donde la cinética en estado estacionario de la hidrólisis de protrombina del sustrato fluorogénico se determinó independientemente y se sustituyó por la constante del compuesto k₂.

Ecuación (4)

$$p = a_0 \frac{k_a [z_0]}{K_z + [z_0]} * k_2 * \frac{t^2}{2}$$

La actividad de la trombina (FIIa) sobre Pefalfluor TH en 1 x Tampón A se determinó independiente como K_M = 5,7 µM y un valor k_{cat} de 40,4 s⁻¹. La sustitución de estos valores en la ecuación (5) proporcionó un factor de corrección k₂ de 36,3 s⁻¹.

Ecuación (5)

$$k_2 = \frac{k_e [S_0]}{K_M + [S_0]}$$

5 Para determinar el grado de actividad catalítica de FXa, los datos en bruto recogidos por la aplicación SoftMax Pro (Molecular Devices) se exportaron como archivos .TXT. Se realizó un análisis de datos no lineal adicional con el programa informático ActivityBase usando el módulo de análisis de datos XE Runner (IDBS Software). La plantilla de la hoja de datos se configuró para ajustar automáticamente las velocidades de la reacción parabólica ($\mu\text{M/s}^2$) de las variantes de FXa estudiadas para cada concentración de protrombina mediante la función de una hipérbola rectangular convencional (es decir, ecuación de Michaelis-Menten) dada por la ecuación (6) para ajustar los valores de V_{max} y K_M .

Ecuación (6)

$$\text{Velocidad de reacción}(\mu\text{M}/\text{sec}^2) = \frac{V_{\text{máx}} [S_0]}{K_M + [S_0]}$$

15 El valor de k_{cat} de la variante de FXa estudiada se calculó a continuación del valor de ajuste de V_{max} ($\mu\text{M/s}^2$) con la ecuación (7).

Ecuación (7)

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{máx}}}{[FXa] * 0,5 * k_2}$$

25 La constante de especificidad k_{cat}/K_M se calculó directamente a partir del valor de ajuste de K_M y la k_{cat} calculada surgida de la evaluación de la ecuación (7) anterior.

D. Resultados

30 Las Tablas 17-18 siguientes definen los parámetros cinéticos usados para calcular la actividad catalítica, definida en la Tabla 19. para cada una de las variantes de FXa estudiadas en presencia y ausencia del cofactor de FXa c(FVa). El valor de ajuste de la constante de Michaelis-Menten, K_M , y de la constante de velocidad catalítica calculada, k_{cat} , para cada uno de los mutantes de FXa, así como del FXa recombinante natural (designado como FXa WT) y el FXa purificado de plasma (Haematologic Technologies, Inc), se proporcionan en las Tablas 17 y 18, respectivamente, a continuación. Las Tablas 17 y 18 también proporcionan la desviación estándar (S.D.), coeficiente de variación (como porcentaje; %CV) y el número de ensayos realizados (n) para los parámetros cinéticos K_M y k_{cat} . Cada uno de los parámetros cinéticos se determinó para los mutantes de FXa en presencia y ausencia del cofactor de FXa, FVa.

40 Los valores de k_{cat} calculados para los polipéptidos de FXa, definidos en la Tabla 18, se dividieron por los valores de ajuste de K_M , definida en la Tabla 17. para generar la constante cinética de la actividad catalítica, k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Las actividades catalíticas de los mutantes de FXa se definen en la Tabla 19 como la constante de actividad catalítica, y también como el porcentaje de actividad de FXa natural. También se presenta en la Tabla 19 la dependencia relativa del cofactor (última columna), en la que la dependencia del cofactor se define como el cociente entre la actividad catalítica (k_{cat}/K_M) en presencia de FVa (actividad catalítica dependiente de FVa) dividida por la actividad catalítica (k_{cat}/K_M) en ausencia de FVa (actividad catalítica independiente de FVa).

45 Cuando la actividad de la variante de FXa se comparó con la del FXa natural (% de WT k_{cat}/K_M), se comparó con un polipéptido de FXa recombinante natural (FXa WT) que se expresó y se purificó con las mismas condiciones que las usadas para los polipéptidos variantes de FXa para garantizar que cualquier diferencia en la actividad era resultado de las una o varias mutaciones, y no el resultado de diferencias en, por ejemplo, modificaciones posteriores a la traducción asociadas con diferentes sistemas de expresión. Por lo tanto, el polipéptido de FXa natural usado para la comparación era el FXa recombinante natural generado mediante la clonación el gen FX, cuya secuencia se define en la SEQ ID NO:1, y expresado en células CHO como un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se define como los aminoácidos 1-139 y 195-448 de la SEQ ID NO:134, tal como se describe en el ejemplo 2.

55 Las actividades catalíticas observadas (k_{cat}/K_M en la Tabla 19) de las variantes de FXa van desde actividad

protrombinasa no detectable en unas pocas variantes (por ejemplo FXa-G197P, FXa-G198A, FXa-D378N y FXa-I195L/V196S) a un pequeño aumento en k_{cat}/K_M para la activación de la protrombina (FII), en comparación con FXa natural (por ejemplo, FXa-L65N/E67S/V196S, FXa-R236V, FXa-V196S y FXa-L211S/G219H). Algunas de las variantes mostraron un importante aumento en la dependencia del cofactor, en comparación con FXa natural, incluidos FXa-V196S, FXa-K338S, FXa-I195L, FXa-G197S, y combinaciones de los mismos, tales como FXa-V196S/K338S, FXa-V196S/R326M, FXa-V196S/R326N, FXa-V196S/K276E y FXa-V196S/R332G. El aumento en la dependencia del cofactor observado se debió principalmente a una disminución en la actividad de las variantes de FXa en ausencia de FVa, sin embargo, algunas variantes también mostraron menor afinidad por el sustrato en ausencia del cofactor, demostrado por valores de K_M de 3 a 5 veces menores en los ensayos dependientes de FVa (Tabla 17).

Algunas variantes de FXa, mutadas para proporcionar sitios de glicosilación simples o múltiples, demostraron una actividad próxima a la natural (por ejemplo FXa-E82N/F84S/V196S, FXa-G114N/V196S/E264N/E266S, FXa-V196S/E264N/E266S/K388N y FXa-G114N/V196S/I211S/G219H); mientras que otros mostraron actividad catalítica reducida.

Tabla 17. Valor de ajuste de K_M para los mutantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | FVa Presente | | | | Sin FVa | | | |
|------------------------------------|---|--------------|-----------------|------|-----|------------|-----------------|-------|-----|
| | | K_M (nM) | \pm S.D. (nM) | %cv | n | K_M (nM) | \pm S.D. (nM) | %CV | n |
| FXa plasma | FXa plasma | 146,0 | 49,9 | 34 % | 120 | 145,5 | 44,4 | 31 % | 100 |
| FX WT | FX WT | 165,2 | 78,0 | 47 % | 38 | 127,9 | 22,0 | 17 % | 16 |
| I195L | I16L | 101,8 | 41,5 | 41 % | 28 | 145,6 | 63,5 | 44 % | 10 |
| V196I | V17I | 129,5 | 3,1 | 2 % | 2 | 136,7 | 11,0 | 8 % | 2 |
| V196S | V17S | 78,2 | 22,0 | 28 % | 47 | 252,5 | 185,5 | 73 % | 25 |
| T85N/K87S/V196S | T185N/K187S/V17S | 38,6 | 3,1 | 8 % | 3 | 499,5 | 334,2 | 67 % | 3 |
| Q56N/Q58S/V196S | Q156N/Q158S/V17S | 76,9 | 29,9 | 39 % | 3 | 384,8 | 352,7 | 92 % | 3 |
| K62N/G64S/V196S | K162N/G164S/V17S | 109,7 | 16,5 | 15 % | 2 | 461,8 | 360,4 | 78 % | 3 |
| L65N/E67S/V196S | L165N/E167S/V17S | 60,8 | 13,4 | 22 % | 2 | 977,7 | 766,2 | 78 % | 3 |
| E67N/V196S | E167N/V17S | 107,4 | 29,2 | 27 % | 3 | 713,2 | 34,2 | 5 % | 2 |
| L73N/G75S/V196S | L173N/G175S/V17S | 66,7 | 13,8 | 21 % | 3 | 645,7 | 502,7 | 78 % | 3 |
| G75N/E77S/V196S | G175N/E177S/V17S | 63,7 | 20,7 | 33 % | 2 | 305,5 | 209,9 | 69 % | 3 |
| R86N/I88S/V196S | R186N/I188S/V17S | 98,7 | 22,2 | 22 % | 3 | 105,1 | 41,8 | 40 % | 3 |
| G114N/V196S | G114N/V17S | 113,4 | 39,1 | 34 % | 6 | 1310,5 | 976,3 | 75 % | 4 |
| D95N/D97S/V196S | D195N/D197S/V17S | 53,6 | 18,7 | 35 % | 4 | 1422,5 | 534,3 | 38 % | 4 |
| E82S/V196S | E182S/V17S | 48,5 | 12,3 | 25 % | 9 | 194,1 | 110,0 | 57 % | 10 |
| E82N/F84S/V196S | E182N/F184S/V17S | 70,6 | 19,7 | 28 % | 2 | 593,9 | 198,7 | 33 % | 5 |
| G78N/I80S/V196S | G178N/I180S/V17S | 53,7 | 17,2 | 32 % | 4 | 443,0 | 457,1 | 103 % | 5 |
| E77N/K79S/V196S | E177N/K179S/V17S | 88,9 | 33,1 | 37 % | 4 | 398,2 | 173,4 | 44 % | 4 |
| D119N/G121S/V196S | D119N/G121S/V17S | 108,5 | 24,7 | 23 % | 4 | 748,9 | 526,4 | 70 % | 4 |
| L83N/V196S | L183N/V17S | 78,5 | 26,5 | 34 % | 4 | 266,2 | 74,8 | 28 % | 3 |
| K122S/V196S | K1122S/V17S | 134,1 | 32,4 | 24 % | 6 | 978,3 | 383,3 | 39 % | 5 |
| E51N/V196S | E151N/V17S | 118,6 | 18,9 | 16 % | 2 | 959,7 | 278,1 | 29 % | 2 |

| Tabla 17. Valor de ajuste de K_M para los mutantes de FXa | | FVa Presente | | | | Sin FVa | | | |
|---|---|---------------|-----------------|------|---|------------|-----------------|------|---|
| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | K_M (nM) | \pm S.D. (nM) | %cv | n | K_M (nM) | \pm S.D. (nM) | %CV | n |
| Q58N/K60S/V196S | Q[58]N/K[60]S/V17S | 97,9 | 10,9 | 11 % | 2 | 911,0 | 215,4 | 24 % | 2 |
| G114N/D119N/G121S/V196S | G[114]N/D[119]N/G[121]S/V17S | 54,9 | 15,6 | 28 % | 4 | 92,0 | 25,0 | 27 % | 4 |
| G198A | G19A | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| G198V | G19V | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| G198R | G19R | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| G198K | G19K | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| G198P | G19P | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| G198H | G19H | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| L211S/G219H | L32S/G40H | | 11,7 | 18 % | 2 | 112,1 | 7,1 | 6 % | 2 |
| G197P | G18P | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| D378N | D194N | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| D378S | D194S | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| V196L | V17L | 107,9 | 11,4 | 11 % | 2 | 137,1 | 42,9 | 31 % | 2 |
| V196T | V17T | 116,4 | 11,5 | 10 % | 2 | 138,8 | 13,8 | 10 % | 2 |
| V196P | V17P | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| G197V | G18V | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| G197T | G18T | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| G197S | G18S | 103,4 | 4,0 | 4 % | 2 | 153,9 | 11,6 | 8 % | 2 |
| E200A | E21A | 116,8 | 5,6 | 5 % | 2 | 158,9 | 11,9 | 7 % | 2 |
| E200S | E21S | 157,3 | 14,5 | 9 % | 2 | 124,1 | 46,1 | 37 % | 2 |
| E200V | E21V | 127,7 | 6,9 | 5 % | 2 | 158,8 | 22,7 | 14 % | 2 |

Tabla 17. Valor de ajuste de K_M para los mutantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | FVa Presente | | | Sin FVa | | | | |
|------------------------------------|---|--------------|-----------------|------|---------|------------|-----------------|------|---|
| | | K_M (nM) | \pm S.D. (nM) | %CV | n | K_M (nM) | \pm S.D. (nM) | %CV | n |
| K202S | | 105,5 | 1,4 | 1 % | 2 | 152,4 | 28,9 | 19 % | 2 |
| R326A | | 119,8 | 25,5 | 21 % | 2 | 143,2 | 46,2 | 32 % | 2 |
| R326S | | 101,2 | 10,2 | 10 % | 2 | 136,9 | 82,7 | 60 % | 2 |
| R326T | | 81,3 | 1,4 | 2 % | 2 | 142,0 | 87,1 | 61 % | 2 |
| R326V | | 63,0 | 22,1 | 35 % | 2 | 193,5 | 38,8 | 20 % | 2 |
| R326Q | | 69,4 | 9,1 | 13 % | 2 | 143,1 | 86,1 | 60 % | 2 |
| R326N | | 82,5 | 5,2 | 6 % | 2 | 136,2 | 82,6 | 61 % | 2 |
| R326M | | 78,7 | 5,1 | 6 % | 2 | 174,3 | 41,2 | 24 % | 2 |
| R326K | | 114,2 | 19,6 | 17 % | 2 | 158,1 | 16,9 | 11 % | 2 |
| R326Y | | 68,2 | 14,6 | 21 % | 2 | 144,8 | 29,8 | 21 % | 2 |
| T327A | | 116,5 | 24,8 | 21 % | 2 | 169,3 | 60,7 | 36 % | 2 |
| T327L | | 127,1 | 32,8 | 26 % | 3 | 198,1 | 91,9 | 46 % | 2 |
| S334A | | 115,4 | 18,0 | 16 % | 2 | 150,0 | 67,1 | 45 % | 2 |
| S334T | | 106,6 | 24,3 | 23 % | 2 | 160,4 | 52,0 | 32 % | 2 |
| S334N | | 95,6 | 22,6 | 24 % | 2 | 160,7 | 58,3 | 36 % | 2 |
| R336E | | 105,7 | 20,2 | 19 % | 3 | 158,3 | 39,4 | 25 % | 2 |
| K338A | | 100,0 | 20,1 | 20 % | 5 | 168,5 | 34,3 | 20 % | 4 |
| K338S | | 109,7 | 18,3 | 17 % | 5 | 167,1 | 20,6 | 12 % | 4 |
| K338N | | 115,0 | 40,6 | 35 % | 3 | 159,6 | 60,8 | 38 % | 2 |
| K338R | | 112,2 | 4,0 | 4 % | 2 | 182,4 | 55,9 | 31 % | 2 |
| K338V | | 90,1 | 24,4 | 27 % | 2 | 158,7 | 35,3 | 22 % | 2 |
| K338Y | | 151,8 | 0,5 | 0 % | 2 | 167,1 | 35,2 | 21 % | 2 |
| K338M | | 180,3 | 26,3 | 15 % | 2 | 180,0 | 27,8 | 15 % | 2 |

| Tabla 17. Valor de ajuste de K_M para los mutantes de FXa | | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | | FVa Presente | | | | Sin FVa | | | |
|---|--------------------------------------|---|-----------------|--------------|----|------------|-----------------|---------|---|--|--|
| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de FX inmaduro) | K_M (nM) | \pm S.D. (nM) | %cV | n | K_M (nM) | \pm S.D. (nM) | %CV | n | | |
| T327A/K338A | T144A/K156A | 187,9 | 19,9 | 11 % | 2 | 255,8 | 47,3 | 18 % | 2 | | |
| T327L/K338M | T144L/K156M | 151,7 | 11,1 | 7 % | 2 | 174,8 | 27,1 | 16 % | 2 | | |
| E200V/T327L/K338M | E21V/T144L/K156M | 125,8 | 9,5 | 8 % | 2 | 163,4 | 33,4 | 20 % | 2 | | |
| E200V/T327L/S334A/K338M | E21V/T144L/S152A/K156M | 70,0 | 7,3 | 10 % | 2 | 171,7 | 11,9 | 7 % | 2 | | |
| V196S/G197A | V17S/G18A | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | | |
| V196S/I211S/G219H | V17S/I32S/G40H | 48,2 | 11,5 | 24 % | 11 | 116,1 | 12,3 | 11 % | 2 | | |
| D119N/G121S/V196S/I211S/G219H | D119N/G121J/SV17S/I32S/G40H | 41,3 | 23,0 | 56 % | 2 | 101,5 | 52,0 | 51 % | 2 | | |
| G114N/V196S/I211S/G219H | G114N/V17S/I32S/G40H | 37,3 | 17,1 | 46 % | 2 | 76,2 | 21,0 | 28 % | 2 | | |
| G114N/D119N/G121S/V196S/I211S/G219H | G114N/D119N/G121J/SV17S/I32S/G40H | 41,4 | 18,2 | 44 % | 3 | 132,1 | 55,9 | 42 % | 4 | | |
| G197A/I211S/G219H | G18A/I32S/G40H | 96,1 | 28,9 | 30 % | 2 | 114,0 | 26,6 | 23 % | 3 | | |
| V196S/G197A/I211S/G219H | V17S/G18A/I32S/G40H | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | | |
| I195L/V196S | I16L/V17S | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | | |
| I195L/G197A | I16L/G18A | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | | |
| I195L/I211S/G219H | I16L/I32S/G40H | 111,0 | 44,4 | 40 % | 4 | 257,4 | 147,8 | 57 % | 5 | | |
| V196S/N214D | V17S/N35D | 63,4 | 6,4 | 10 % | 3 | 250,7 | 0,1 | 0 % | 2 | | |
| V196S/N214A | V17S/N35A | 82,9 | 16,1 | 19 % | 2 | 185,1 | 57,9 | 31 % | 2 | | |
| V196S/N214S | V17S/N35S | 79,5 | 9,4 | 12 % | 2 | 158,1 | 24,4 | 15 % | 2 | | |
| V196S/E216R | V17S/E37R | 59,1 | 7,9 | 13 % | 3 | 269,3 | 2,9 | 1 % | 2 | | |
| V196S/E216K | V17S/E37K | 70,0 | 1,0 | 1 % | 2 | 258,3 | 132,8 | 51 % | 2 | | |
| V196S/E216A | V17S/E37A | 66,6 | 4,7 | 7 % | 2 | 268,6 | 91,8 | 34 % | 2 | | |
| V196S/E216S | V17S/E37S | 79,5 | 19,0 | 24 % | 2 | 165,7 | 80,4 | 49 % | 2 | | |
| V196S/E218R | V17S/E39R | 64,3 | 15,8 | 25 % | 3 | 231,9 | 7,1 | 3 % | 2 | | |

Tabla 17. Valor de ajuste de K_M para los mutantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | FVa Presente | | | | Sin FVa | | | |
|------------------------------------|---|--------------|-----------------|------|----|------------|-----------------|------|---|
| | | K_M (nM) | \pm S.D. (nM) | %cv | n | K_M (nM) | \pm S.D. (nM) | %CV | n |
| V196S/E218K | V17S/E39K | 76,6 | 9,4 | 12 % | 2 | 204,2 | 41,1 | 20 % | 2 |
| V196S/E218A | V17S/E39A | 79,2 | 6,3 | 8 % | 2 | 217,1 | 5,3 | 2 % | 2 |
| V196S/R332A | V17S/R150A | 67,8 | 19,5 | 29 % | 4 | 372,0 | 82,3 | 22 % | 3 |
| V196S/R332D | V17S/R150D | 87,0 | 53,1 | 61 % | 5 | 149,2 | 53,1 | 36 % | 5 |
| V196S/R332E | V17S/R150E | 55,1 | 14,2 | 26 % | 2 | 178,2 | 68,3 | 38 % | 2 |
| V196S/R332S | V17S/R150S | 70,6 | 32,2 | 46 % | 6 | 147,0 | 33,9 | 23 % | 5 |
| V196S/R332G | V17S/R150G | 54,5 | 21,7 | 40 % | 5 | 192,8 | 74,8 | 39 % | 4 |
| V196S/R326E | V17S/R143E | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| V196S/R326D | V17S/R143D | 18,8 | 8,9 | 48 % | 5 | 2169,5 | 32,5 | 1 % | 2 |
| V196S/R326M | V17S/R143M | 39,4 | 1,4 | 3 % | 2 | 265,9 | 72,4 | 27 % | 2 |
| V196S/R326N | V17S/R143N | 20,1 | 3,6 | 18 % | 3 | 338,3 | 100,5 | 30 % | 2 |
| V196S/R326Q | V17S/R143Q | 22,1 | 5,8 | 26 % | 12 | 892,1 | 577,8 | 65 % | 3 |
| V196S/R273E | V17S/R93E | 58,7 | 4,9 | 8 % | 3 | 199,1 | 38,2 | 19 % | 2 |
| V196S/R273A | V17S/R93A | 62,6 | 10,7 | 17 % | 2 | 152,0 | 34,4 | 23 % | 2 |
| V196S/R424A | V17S/R240A | 65,0 | 15,9 | 25 % | 2 | 107,3 | 1,5 | 1 % | 2 |
| V196S/R424E | V17S/R240E | 66,3 | 5,5 | 8 % | 7 | 173,2 | 70,8 | 41 % | 2 |
| V196S/K420A | V17S/K236A | 54,7 | 20,3 | 37 % | 2 | 70,9 | 24,1 | 34 % | 2 |
| V196S/K420E | V17S/K236E | 49,9 | 16,0 | 32 % | 2 | 102,2 | 13,1 | 13 % | 2 |
| V196S/R306E | V17S/R125A | 66,6 | 3,8 | 6 % | 2 | 110,5 | n.d. | n.d. | 1 |
| V196S/K276A | V17S/K96A | 58,3 | 11,6 | 20 % | 2 | 339,1 | 96,2 | 28 % | 2 |
| V196S/K276E | V17S/K96E | 47,0 | 8,1 | 17 % | 2 | 436,6 | 51,1 | 12 % | 2 |
| V196S/K420E/R424E | V17S/K236E/R240E | 60,0 | 22,0 | 37 % | 3 | 167,5 | 111,4 | 67 % | 2 |
| V196S/R273E/K420E/R424E | V17S/R93E/K236E/R240E | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |

| Tabla 17. Valor de ajuste de K_M para los mutantes de FXa | | FVa Presente | | | | Sin FVa | | | |
|---|--|--------------|-----------------|------|----|------------|-----------------|------|---|
| | | K_M (nM) | \pm S.D. (nM) | %cv | n | K_M (nM) | \pm S.D. (nM) | %CV | n |
| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | | | | | | | | |
| V196S/R273E/R306E/K420E/R424E | V17S/R93E/R125E/K236E/R240E | 17,5 | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | n.d. | n.d. | 0 |
| V196S/K338A | V17S/K156A | 17,5 | 2,8 | 16 % | 2 | 820,8 | 417,6 | 51 % | 2 |
| V196S/K338S | V17S/K156S | 17,9 | 5,1 | 29 % | 10 | 2996,2 | 1390,0 | 46 % | 8 |
| V196S/E215N/N217S | V17S/E36N/N38S | 151,7 | 32,4 | 21 % | 3 | 1078,5 | 634,6 | 59 % | 4 |
| V196S/E264N/E266S | V17S/E84N/E86S | 97,4 | 16,0 | 16 % | 4 | 948,7 | 447,3 | 47 % | 4 |
| D119N/G121S/V196S/E264N/E266S | D[119]N/G[121]S/A17S/E84N/E86S | 101,1 | 69,8 | 69 % | 2 | 179,5 | 89,6 | 50 % | 2 |
| G114N/V196S/E264N/E266S | G[114]N/V17S/E84N/E86S | 57,1 | 19,4 | 34 % | 2 | 88,0 | 51,4 | 58 % | 2 |
| V196S/R429N/I431S | V17S/R245N/I247S | 110,7 | 4,7 | 4 % | 2 | 512,1 | 122,8 | 24 % | 2 |
| V196S/R243N/K245S | V17S/R63N/K65S | 33,2 | 4,2 | 13 % | 3 | 86,2 | 57,9 | 67 % | 2 |
| V196S/T293N/R295S | V17S/T113N/R115S | 154,9 | 45,9 | 30 % | 2 | 944,4 | 379,5 | 40 % | 2 |
| V196S/D389N/Y391S | V17S/D205N/Y207S | 119,8 | 98,2 | 82 % | 2 | 95,9 | 62,6 | 65 % | 3 |
| V196S/K388N | V17S/K204N | 134,0 | 54,7 | 41 % | 5 | 1522,3 | 969,2 | 64 % | 4 |
| D119N/G121S/V196S/K388N | D[119]N/G [121]S/V17S/K204N | 61,4 | 25,3 | 41 % | 2 | 63,7 | 13,9 | 22 % | 2 |
| V196S/T428N/G430S | V17S/T244N/G246S | 88,5 | 23,9 | 27 % | 2 | 839,1 | 63,1 | 8 % | 2 |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | V17S/I32S/G40H/E84N/E86S | 30,7 | 7,2 | 23 % | 3 | 166,0 | 44,8 | 27 % | 2 |
| D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | D[119]N/G[121]S/V17S/I32S/G40H/E84N/E86S | 40,5 | 8,1 | 20 % | 2 | 75,5 | 18,9 | 25 % | 2 |
| G114N/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | G[114]N/V17S/I32S/G40H/E84N/E86S | 62,4 | 21,0 | 34 % | 4 | 77,5 | 17,9 | 23 % | 2 |
| V196S/E264N/E266S/K388N | V17S/E84N/E86S/K204N | 64,2 | 36,0 | 56 % | 2 | 66,8 | 15,3 | 23 % | 2 |
| D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/K388N | D[119]N/G[121]S/V17S/I32S/G40H/K204N | 57,2 | 24,5 | 43 % | 3 | 68,0 | 22,9 | 34 % | 2 |
| G114N/V196S/I211S/G219H/K388N | G[114]N/V17S/I32S/G40H/K204N | 95,7 | 52,5 | 55 % | 4 | 71,4 | 23,3 | 33 % | 2 |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S/K388N | V17S/I32S/G40H/E84N/E86S/K204N | 74,6 | 1,0 | 1 % | 2 | 133,9 | 43,3 | 32 % | 2 |

Tabla 18. k_{cat} calculada para los mutantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | FVa Presente | | | Sin FVa | | | | |
|------------------------------------|---|-------------------|--------------------|------|---------|-------------------|--------------------|------|-----|
| | | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n |
| FXa plasma | FXa plasma | 46,4 | 16,4 | 35 % | 120 | 1,6E-02 | 6,3E-03 | 40 % | 100 |
| FX WT | FX WT | 37,8 | 14,7 | 39 % | 38 | 9,5E-03 | 4,1E-03 | 44 % | 16 |
| I195L | I16L | 31,2 | 8,6 | 27 % | 28 | 3,1E-04 | 9,4E-05 | 30 % | 10 |
| V196I | V17I | 28,3 | 4,7 | 17 % | 2 | 3,0E-03 | 8,6E-05 | 3 % | 2 |
| V196S | V17S | 31,7 | 10,9 | 34 % | 47 | 3,8E-05 | 8,1E-06 | 22 % | 25 |
| T85N/K87S/V196S | T[85]N/K[87]S/V 17S | 3,8 | 0,8 | 20 % | 3 | 5,8E-05 | 4,1E-05 | 70 % | 3 |
| Q56N/Q58S/V196S | Q[56]N/Q[58]S/V17S | 21,1 | 6,4 | 30 % | 3 | 5,3E-05 | 3,7E-05 | 71 % | 3 |
| K62N/G64S/V196S | K[62]N/G[64]S/V17S | 42,8 | 0,2 | 0 % | 2 | 8,5E-05 | 6,2E-05 | 72 % | 3 |
| L65N/E67S/V196S | L[65]N/E[67]S/V17S | 27,9 | 9,2 | 33 % | 2 | 1,3E-04 | 8,3E-05 | 65 % | 3 |
| E67N/V196S | E[67]N/V17S | 28,9 | 13,9 | 48 % | 3 | 7,2E-05 | 1,8E-06 | 3 % | 2 |
| L73N/G75S/V196S | L[73]N/G[75]S/V17S | 10,9 | 3,0 | 27 % | 3 | 6,6E-05 | 4,6E-05 | 70 % | 3 |
| G75N/E77S/V196S | G[75]N/E[77]S/V17S | 14,8 | 4,1 | 28 % | 2 | 5,5E-05 | 2,9E-05 | 52 % | 3 |
| R86N/I88S/V196S | R[86]N/I[88]S/V17S | 30,0 | 16,0 | 53 % | 3 | 7,3E-05 | 2,8E-05 | 39 % | 3 |
| G114N/V196S | G [114] N/V17 S | 21,4 | 7,0 | 33 % | 6 | 1,4E-04 | 8,2E-05 | 60 % | 4 |
| D95N/D97S/V196S | D[95]N/D[97]S/V17S | 13,5 | 3,1 | 23 % | 4 | 2,5E-05 | 1,3E-05 | 53 % | 4 |
| E82S/V196S | E[82]S/V17S | 7,2 | 3,8 | 53 % | 9 | 1,7E-05 | 5,4E-06 | 32 % | 10 |
| E82N/F84S/V196S | E [82]N/F [84]S/V 17 S | 15,0 | 0,9 | 6 % | 2 | 2,6E-05 | 7,6E-06 | 29 % | 5 |
| G78N/N80S/V196S | G[78]N/N[80]S/V17S | 6,5 | 2,2 | 34 % | 4 | 1,8E-05 | 9,6E-06 | 55 % | 5 |
| E77N/K79S/V196S | E[77]N/K[79]S/V17S | 11,3 | 2,4 | 22 % | 4 | 2,9E-05 | 9,0E-06 | 31 % | 4 |
| D119N/G121S/V196S | D[119]N/G[121]S/V 17S | 22,0 | 4,9 | 22 % | 4 | 4,4E-05 | 2,7E-05 | 60 % | 4 |
| L83N/V196S | L[83]N/V17S | 11,2 | 0,8 | 7 % | 4 | 3,1E-05 | 1,0E-05 | 33 % | 3 |
| K122S/V196S | K[122]S/V17S | 19,5 | 6,5 | 33 % | 6 | 6,3E-05 | 3,1E-05 | 49 % | 5 |

Tabla 18. k_{cat} calculada para los mutantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | FVa Presente | | | Sin FVa | | | | |
|------------------------------------|---|-------------------|--------------------|------|---------|-------------------|--------------------|------|---|
| | | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n |
| E51N/V196S | E[51]N/V17S | 27,1 | 6,7 | 25 % | 2 | 1,2E-04 | 2,3E-05 | 20 % | 2 |
| Q58N/K60S/V196S | Q[58]N/K[60]S/V17S | 22,5 | 1,5 | 7 % | 2 | 9,3E-05 | 1,6E-05 | 18 % | 2 |
| G114N/D119N/G121S/V196S | G[114]N/D[119]N/G[121]S/V17S | 18,0 | 6,4 | 36 % | 4 | 8,7E-06 | 2,1E-06 | 24 % | 4 |
| G198A | G19A | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| G198V | G19V | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| G198R | G19R | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| G198K | G19K | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| G198P | G19P | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| G198H | G19H | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| L211S/G219H | L32S/G40H | 28,0 | 7,7 | 28 % | 2 | 7,0E-03 | 7,1E-05 | 1 % | 2 |
| G197P | G18P | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| D378N | D194N | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| D378S | D194S | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| V196L | V17L | 39,8 | 5,1 | 13 % | 2 | 1,1E-03 | 1,1E-04 | 10 % | 2 |
| V196T | V17T | 39,4 | 8,0 | 20 % | 2 | 2,8E-04 | 6,0E-05 | 22 % | 2 |
| V196P | V17P | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |

| Tabla 18. k_{cat} calculada para los mutantes de FXa | | FVa Presente | | | | Sin FVa | | | |
|--|---|-------------------|--------------------|------|---|-------------------|--------------------|------|---|
| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n |
| G197V | G18V | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| G197T | G18T | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| G197S | G18S | 20,7 | 1,7 | 8 % | 2 | 1,6E-04 | 3,5E-05 | 23 % | 2 |
| E200A | E21A | 29,6 | 6,8 | 23 % | 2 | 1,5E-03 | 4,5E-04 | 29 % | 2 |
| E200S | E21S | 17,7 | 1,7 | 9 % | 2 | 2,8E-03 | 7,8E-04 | 27 % | 2 |
| E200V | E21V | 30,2 | 5,5 | 18 % | 2 | 2,1E-03 | 4,4E-04 | 22 % | 2 |
| K202S | K23S | 39,1 | 1,7 | 4 % | 2 | 1,6E-03 | 2,5E-05 | 2 % | 2 |
| R326A | R143A | 19,4 | 2,6 | 13 % | 2 | 6,1E-03 | 1,6E-03 | 27 % | 2 |
| R326S | R143S | 17,2 | 1,6 | 9 % | 2 | 2,6E-03 | 1,0E-03 | 39 % | 2 |
| R326T | R143T | 16,8 | 0,5 | 3 % | 2 | 2,2E-03 | 8,1E-04 | 36 % | 2 |
| R326V | R143V | 27,0 | 1,7 | 6 % | 2 | 4,7E-03 | 1,4E-03 | 30 % | 2 |
| R326Q | R143Q | 16,5 | 0,1 | 1 % | 2 | 1,5E-03 | 4,7E-04 | 30 % | 2 |
| R326N | R143N | 18,9 | 0,9 | 5 % | 2 | 2,2E-03 | 7,3E-04 | 32 % | 2 |
| R326M | R143M | 14,1 | 0,6 | 4 % | 2 | 3,3E-03 | 3,0E-04 | 9 % | 2 |
| R326K | R143K | 14,7 | 1,2 | 8 % | 2 | 9,7E-04 | 4,7E-05 | 5 % | 2 |
| R326Y | R143Y | 22,3 | 3,5 | 16 % | 2 | 4,7E-03 | 1,5E-03 | 31 % | 2 |
| T327A | T144A | 33,9 | 4,4 | 13 % | 2 | 2,8E-03 | 7,2E-04 | 26 % | 2 |
| T327L | T144L | 35,2 | 5,4 | 15 % | 3 | 4,4E-03 | 4,3E-04 | 10 % | 2 |
| S334A | S152A | 25,9 | 1,8 | 7 % | 2 | 2,4E-03 | 5,3E-04 | 22 % | 2 |
| S334T | S152T | 33,2 | 1,5 | 4 % | 2 | 2,3E-03 | 8,6E-04 | 37 % | 2 |
| S334N | S152N | 29,7 | 0,2 | 1 % | 2 | 1,6E-03 | 3,1E-04 | 20 % | 2 |

| Tabla 18. k_{cat} calculada para los mutantes de FXa | | FVa Presente | | | | Sin FVa | | | |
|--|---|-------------------|--------------------|------|----|-------------------|--------------------|------|---|
| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n |
| R336E | R154E | 33,4 | 6,5 | 20 % | 3 | 4,6E-03 | 9,9E-04 | 22 % | 2 |
| K338A | K156A | 35,6 | 6,9 | 19 % | 5 | 7,6E-04 | 3,6E-04 | 48 % | 4 |
| K338S | K156S | 31,8 | 5,3 | 17 % | 5 | 4,6E-04 | 2,3E-04 | 50 % | 4 |
| K338N | K156N | 31,3 | 5,3 | 17 % | 3 | 2,7E-03 | 5,8E-04 | 21 % | 2 |
| K338R | K156R | 41,2 | 0,6 | 1 % | 2 | 6,5E-03 | 4,4E-03 | 68 % | 2 |
| K338V | K156V | 34,2 | 3,5 | 10 % | 2 | 9,7E-04 | 3,9E-05 | 4 % | 2 |
| K338Y | K156Y | 47,7 | 8,3 | 17 % | 2 | 1,6E-03 | 1,9E-04 | 12 % | 2 |
| K338M | K156M | 53,6 | 12,2 | 23 % | 2 | 7,2E-03 | 3,2E-03 | 44 % | 2 |
| T327A/K338A | T144A/K156A | 45,0 | 3,8 | 8 % | 2 | 2,6E-04 | 3,9E-07 | 0 % | 2 |
| T327L/K338M | T144L/K156M | 28,3 | 1,7 | 6 % | 2 | 6,5E-03 | 5,2E-04 | 8 % | 2 |
| E200V/T327L/K338M | E21V/T144L/K156M | 37,9 | 1,5 | 4 % | 2 | 4,1E-03 | 3,1E-04 | 7 % | 2 |
| E200V/T327L/S334A/K338M | E21V/T144L/S152A/K156M | 20,6 | 2,6 | 12 % | 2 | 6,1E-04 | 3,3E-05 | 5 % | 2 |
| V196S/G197A | V17S/G18A | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| V196S/I211S/G219H | V17S/I32S/G40H | 12,6 | 1,8 | 15 % | 11 | 1,7E-05 | 3,0E-06 | 17 % | 2 |
| D119N/G121S/V196S/I211S/219H | D[119]N/G [121]S/V17S/I32S/G40H | 14,6 | 2,0 | 14 % | 2 | 1,4E-05 | 3,7E-06 | 27 % | 2 |
| G114N/V196S/I211S/G219H | G[114]N/V17S/I32S/G40H | 12,9 | 3,0 | 23 % | 2 | 1,3E-05 | 2,2E-06 | 17 % | 2 |
| G114N/D119N/G121S/V196S/I211S/G219H | G[114]N/D[119]N/G[121]S/V17S/I32S/G40H | 13,4 | 5,5 | 41 % | 3 | 1,0E-05 | 2,5E-06 | 25 % | 4 |
| G197A/I211S/G219H | G18A/I32S/G40H | 12,5 | 2,1 | 17 % | 2 | 2,1E-04 | 3,9E-05 | 19 % | 3 |
| V196S/G197A/I211S/G219H | V17S/G18A/I32S/G40H | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| I195L/V196S | I16L/V17S | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |

Tabla 18. k_{cat} calculada para los mutantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | FVa Presente | | | Sin FVa | | | | |
|------------------------------------|---|-------------------|--------------------|------|---------|-------------------|--------------------|------|---|
| | | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n |
| I195L/G197A | I16L/G18A | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| I195L/I211S/G219H | I16L/I32S/G40H | 31,3 | 10,7 | 34 % | 4 | 1,9E-04 | 1,2E-04 | 62 % | 5 |
| V196S/N214D | V17S/N35D | 13,4 | 2,1 | 16 % | 3 | 3,6E-05 | 5,1E-06 | 14 % | 2 |
| V196S/N214A | V17S/N35A | 17,2 | 0,2 | 1 % | 2 | 3,8E-05 | 3,7E-06 | 10 % | 2 |
| V196S/N214S | V17S/N35S | 22,8 | 0,5 | 2 % | 2 | 5,6E-05 | 5,9E-06 | 11 % | 2 |
| V196S/E216R | V17S/E37R | 13,4 | 2,9 | 22 % | 3 | 4,6E-05 | 1,2E-05 | 25 % | 2 |
| V196S/E216K | V17S/E37K | 20,7 | 1,2 | 6 % | 2 | 4,2E-05 | 4,2E-06 | 10 % | 2 |
| V196S/E216A | V17S/E37A | 14,7 | 1,1 | 7 % | 2 | 3,7E-05 | 1,4E-05 | 37 % | 2 |
| V196S/E216S | V17S/E37S | 15,4 | 4,2 | 28 % | 2 | 3,0E-05 | 1,2E-05 | 41 % | 2 |
| V196S/E218R | V17S/E39R | 12,3 | 3,4 | 28 % | 3 | 4,3E-05 | 4,6E-06 | 11 % | 2 |
| V196S/E218K | V17S/E39K | 14,6 | 4,4 | 30 % | 2 | 3,3E-05 | 1,1E-05 | 34 % | 2 |
| V196S/E218A | V17S/E39A | 19,7 | 8,1 | 41 % | 2 | 3,9E-05 | 9,3E-06 | 24 % | 2 |
| V196S/R332A | V17S/R150A | 23,3 | 4,9 | 21 % | 4 | 8,3E-05 | 3,3E-05 | 40 % | 3 |
| V196S/R332D | V17S/R150D | 41,6 | 35,7 | 86 % | 5 | 2,4E-05 | 2,5E-06 | 10 % | 5 |
| V196S/R332E | V17S/R150E | 19,3 | 5,2 | 27 % | 2 | 5,4E-05 | 1,5E-05 | 28 % | 2 |
| V196S/R332S | V17S/R150S | 23,0 | 11,2 | 49 % | 6 | 2,1E-05 | 3,6E-06 | 17 % | 5 |
| V196S/R332G | V17S/R150G | 20,8 | 9,7 | 47 % | 5 | 1,6E-05 | 3,2E-06 | 20 % | 4 |
| V196S/R326E | V17S/R143E | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 |
| V196S/R326D | V17S/R143D | 2,3 | 1,0 | 44 % | 5 | 6,9E-06 | 1,7E-06 | 25 % | 2 |
| V196S/R326M | V17S/R143M | 9,1 | 0,5 | 5 % | 2 | 5,8E-06 | 2,1E-06 | 35 % | 2 |
| V196S/R326N | V17S/R143N | 6,2 | 0,7 | 10 % | 3 | 4,8E-06 | 1,6E-06 | 34 % | 2 |

| Tabla 18. k_{cat} calculada para los mutantes de FXa | | | | | | | | | | | |
|--|---|-------------------|--------------------|------|----|-------------------|--------------------|-------|---|--|--|
| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | FVa Presente | | | | Sin FVa | | | | | |
| | | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n | | |
| V196S/R326Q | V17S/R143Q | 6,5 | 1,3 | 21 % | 12 | 6,8E-06 | 6,8E-06 | 100 % | 3 | | |
| V196S/R273E | V17S/R93E | 19,5 | 4,8 | 25 % | 3 | 3,9E-05 | 1,0E-05 | 26 % | 2 | | |
| V196S/R273A | V17S/R93A | 16,7 | 0,2 | 1 % | 2 | 2,7E-05 | 4,1E-06 | 15 % | 2 | | |
| V196S/R424A | V17S/R240A | 17,6 | 3,1 | 18 % | 2 | 2,9E-05 | 1,6E-05 | 55 % | 2 | | |
| V196S/R424E | V17S/R240E | 16,3 | 3,6 | 22 % | 7 | 2,5E-05 | 1,0E-05 | 40 % | 2 | | |
| V196S/K420A | V17S/K236A | 15,6 | 6,1 | 39 % | 2 | 2,7E-05 | 1,1E-06 | 4 % | 2 | | |
| V196S/K420E | V17S/K236E | 10,6 | 1,0 | 10 % | 2 | 2,4E-05 | 6,3E-06 | 27 % | 2 | | |
| V196S/R306E | V17S/R125A | 14,8 | 2,8 | 19 % | 2 | 2,1E-05 | n.d. | n.d. | 1 | | |
| V196S/K276A | V17S/K96A | 9,1 | 2,0 | 22 % | 2 | 1,7E-05 | 3,0E-06 | 18 % | 2 | | |
| V196S/K276E | V17S/K96E | 6,4 | 1,8 | 28 % | 2 | 1,0E-05 | 2,5E-06 | 24 % | 2 | | |
| V196S/K420E/R424E | V17S/K236E/R240E | 5,1 | 3,3 | 65 % | 3 | 2,6E-05 | 1,3E-05 | 49 % | 2 | | |
| V196S/R273E/K420E/R424E | V17S/R93E/K236E/R240E | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | | |
| V196S/R273E/R306E/K420E/R4 24E | V17S/R93E/R125E/K236E/R240E | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | | |
| V196S/K338A | V17S/K156A | 1,9 | 0,3 | 14 % | 2 | 3,0E-06 | 8,5E-07 | 28 % | 2 | | |
| V196S/K338S | V17S/K156S | 2,5 | 0,8 | 33 % | 10 | 8,9E-06 | 3,8E-06 | 42 % | 8 | | |
| V196S/E215N/N217S | V17S/E36N/N38S | 24,9 | 3,7 | 15 % | 3 | 9,4E-05 | 5,4E-05 | 58 % | 4 | | |
| V196S/E264N/E266S | V17S/E84N/E86S | 27,6 | 7,9 | 28 % | 4 | 7,1E-05 | 3,5E-05 | 50 % | 4 | | |
| D119N/G121S/V196S/E264N/E2 66S | D[119]N/G[121]SA/17S/E84N/E8 6S | 12,6 | 10,9 | 87 % | 2 | 3,0E-05 | 1,2E-05 | 42 % | 2 | | |
| G114N/V196S/E264N/E266S | G[114]NA/17S/E84N/E86S | 23,2 | 0,0 | 0 % | 2 | 2,0E-05 | 1,7E-06 | 9 % | 2 | | |
| V196S/R429N/I431S | V17S/R245N/I247S | 25,0 | 8,1 | 32 % | 2 | 4,1E-05 | 6,7E-06 | 16 % | 2 | | |
| V196S/R243N/K245S | V17S/R63N/K65S | 5,1 | 1,7 | 34 % | 3 | 6,1E-05 | 4,9E-05 | 81 % | 2 | | |

Tabla 18. k_{cat} calculada para los mutantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | FVa Presente | | | Sin FVa | | | | |
|---|--|-------------------|--------------------|------|---------|-------------------|--------------------|------|---|
| | | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n | $k_{cat}(s^{-1})$ | $\pm S.D.(s^{-1})$ | %CV | n |
| V196S/T293N/R295S | V17S/T113N/R115S | 23,1 | 9,4 | 40 % | 2 | 7,7E-05 | 1,6E-05 | 20 % | 2 |
| V196S/D389N/Y391S | V17S/D205N/Y207S | 8,5 | 2,8 | 34 % | 2 | 1,1E-04 | 5,3E-05 | 47 % | 3 |
| V196S/K388N | V17S/K204N | 24,3 | 6,9 | 28 % | 5 | 1,4E-04 | 9,8E-05 | 73 % | 4 |
| D119N/G121S/V196S/K388N | D[119]N/G[121]S/V17S/K204N | 24,0 | 0,3 | 1 % | 2 | 1,7E-05 | 6,4E-06 | 38 % | 2 |
| V196S/T428N/G430S | V17S/T244N/G246S | 21,0 | 2,4 | 11 % | 2 | 8,2E-05 | 3,5E-06 | 4 % | 2 |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | V17S/I32S/G40H/E84N/E86S | 13,1 | 5,1 | 39 % | 3 | 1,9E-05 | 8,8E-06 | 46 % | 2 |
| D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | D[119]N/G[121]S/V17S/I32S/G40H/E84N/E86S | 13,8 | 2,7 | 20 % | 2 | 1,8E-05 | 1,4E-05 | 76 % | 2 |
| G114N/V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | G[114]N/V17S/I32S/G40H/E84N/E86S | 15,4 | 6,8 | 44 % | 4 | 8,4E-06 | 3,9E-06 | 47 % | 2 |
| V196S/E264N/E266S/K388N | V17S/E84N/E86S/K204N | 17,2 | 2,3 | 14 % | 2 | 1,0E-05 | 6,0E-06 | 59 % | 2 |
| D119N/G1219H/K388N | D[119]N/G[121]S/V17S/I32S/G40H/K204N | 7,7 | 2,1 | 27 % | 3 | 9,0E-06 | 5,2E-06 | 58 % | 2 |
| G114N/V196S/I211S/G219H/K388N | G[114]N/V17S/I32S/G40H/K204N | 24,3 | 19,3 | 79 % | 4 | 8,3E-06 | 5,9E-06 | 71 % | 2 |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S/K388N | V17S/I32S/G40H/E84N/E86S/K204N | 10,4 | 1,1 | 11 % | 2 | 1,9E-05 | 1,4E-05 | 70 % | 2 |

Tabla 19. Constante de especificidad calculada (k_{cat}/K_M) y dependencia relativa del cofactor de las variantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | Actividad catalítica dependiente de FVa (FVa presente) | | | | Actividad catalítica independiente de FVa (Sin FVa) | | | | Dependencia relativa del cofactor |
|------------------------------------|---|--|-------------------------------|------|-----------------------|---|-------------------------------|------|-----------------------|-----------------------------------|
| | | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | % de WT k_{cat}/K_M | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | % de WT k_{cat}/K_M | |
| FXa plasma | FXa plasma | 3,3E+08 | 1,1E+08 | 34 % | 129 % | 1,1E+05 | 4,5E+04 | 40 % | 151 % | 2.941 |
| FXa WT | FXa WT | 2,6E+08 | 1,1E+08 | 42 % | 100 % | 7,5E+04 | 3,0E+04 | 40 % | 100 % | 3.427 |
| I195L | I16L | 3,2E+08 | 8,3E+07 | 26 % | 126 % | 2,3E+03 | 9,6E+02 | 41 % | 3 % | 138.730 |
| V196I | V17I | 2,2E+08 | 3,1E+07 | 14 % | 85 % | 2,2E+04 | 1,1E+03 | 5 % | 29 % | 9.857 |
| V196S | V17S | 4,2E+08 | 1,5E+08 | 36 % | 163 % | 2,2E+02 | 1,2E+02 | 56 % | 0,3 % | 1.949.704 |
| T85N/K87S/V196S | T[85]N/K[87]S/V17S | 9,7E+07 | 1,2E+07 | 12 % | 38 % | 1,2E+02 | 5,0E+01 | 41 % | 0,2 % | 796.199 |
| Q56N/Q58S/V196S | Q[56]N/Q[58]S/V17S | 2,8E+08 | 2,7E+07 | 10 % | 109 % | 1,7E+02 | 6,6E+01 | 40 % | 0,2 % | 1.689.225 |
| K62N/G64S/V196S | K[62]N/G[64]S/V17S | 3,9E+08 | 5,8E+07 | 15 % | 153 % | 2,0E+02 | 6,1E+01 | 30 % | 0,3 % | 1.954.206 |
| L65N/E67S/V196S | L[65]N/E[67]S/V17S | 4,5E+08 | 5,2E+07 | 11 % | 176 % | 1,6E+02 | 6,3E+01 | 39 % | 0,2 % | 2.783.973 |
| E67N/V196S | E[67]N/V17S | 2,6E+08 | 8,4E+07 | 32 % | 101 % | 1,0E+02 | 2,3E+00 | 2 % | 0,1 % | 2.577.649 |
| L73N/G75S/V196S | L[73]N/G [75] S/V17S | 1,7E+08 | 7,6E+07 | 44 % | 67 % | 1,1E+02 | 2,4E+01 | 22 % | 0,1 % | 1.622.299 |
| G75N/E77S/V196S | G[75]N/E[77]S/V17S | 2,6E+08 | 1,5E+08 | 58 % | 99 % | 2,0E+02 | 5,1E+01 | 25 % | 0,3 % | 1.260.991 |
| R86N/I88S/V196S | R[86]N/I[88]S/V17S | 2,9E+08 | 1,3E+08 | 44 % | 113 % | 7,2E+02 | 1,9E+02 | 26 % | 1 % | 404.779 |
| G114N/V196S | G[114]N/V17S | 2,0E+08 | 6,1E+07 | 31 % | 77 % | 1,1E+02 | 3,2E+01 | 28 % | 0,2 % | 1.720.332 |
| D95N/D97S/V196S | D[95]N/D[97]S/V17S | 2,7E+08 | 1,0E+08 | 38 % | 106 % | 1,7E+01 | 5,5E+00 | 32 % | 0,0 % | 15.813.111 |
| E82S/V196S | E[82]S/V17S | 1,5E+08 | 9,5E+07 | 61 % | 60 % | 1,1E+02 | 6,1E+01 | 56 % | 0,1 % | 1.414.270 |

Tabla 19. Constante de especificidad calculada (k_{cat}/K_M) y dependencia relativa del cofactor de las variantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | Actividad catalítica dependiente de FVa (FVa presente) | | | | Actividad catalítica independiente de FVa (Sin FVa) | | | | Dependencia relativa del cofactor | | |
|------------------------------------|---|--|-------------------------------|------|---------------|---|-------------------------------|---------|---------|-----------------------------------|---|-----------|
| | | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | % de WT | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | % de WT | | | |
| | | n | k_{cat}/K_M | n | k_{cat}/K_M | | | | | | | |
| E82N/F84S/V196S | E[82]N/F[84]S/V17S | 2,2E+08 | 7,5E+07 | 34 % | 87 % | 2 | 4,8E+01 | 1,6E+01 | 33 % | 0,1 % | 5 | 4.676.971 |
| G78N/N80S/V196S | G[78]N/N[80]S/V17S | 1,3E+08 | 5,7E+07 | 45 % | 49 % | 4 | 5,8E+01 | 3,7E+01 | 64 % | 0,1 % | 5 | 2.180.187 |
| E77N/K79S/V196S | E[77]N/K[79]S/V17S | 1,5E+08 | 8,3E+07 | 57 % | 57 % | 4 | 7,7E+01 | 1,9E+01 | 25 % | 0,1 % | 4 | 1.913.457 |
| D119N/G121S/V196S | D[119]N/G[121]S/V17S | 2,1E+08 | 5,2E+07 | 25 % | 80 % | 4 | 6,2E+01 | 1,4E+01 | 23 % | 0,1 % | 4 | 3.348.627 |
| L83N/V196S | L[83]N/V17S | 1,5E+08 | 3,8E+07 | 25 % | 59 % | 4 | 1,2E+02 | 4,5E+01 | 37 % | 0,2 % | 3 | 1.261.176 |
| K122S/V196S | K[122]S/V17S | 1,4E+08 | 1,9E+07 | 13 % | 55 % | 6 | 6,5E+01 | 2,5E+01 | 39 % | 0,1 % | 5 | 2.200.872 |
| E51N/V196S | E[51]N/V17S | 2,3E+08 | 2,0E+07 | 9 % | 88 % | 2 | 1,2E+02 | 1,2E+01 | 10 % | 0,2 % | 2 | 1.858.168 |
| Q58N/K60S/V196S | Q[58]N/K[60]S/V17S | 2,3E+08 | 4,1E+07 | 18 % | 90 % | 2 | 1,0E+02 | 6,3E+00 | 6 % | 0,1 % | 2 | 2.265.746 |
| G114N/D119N/ G121S/V 196S | G[114]N/D[119]N/G[121]S/V17S | 3,2E+08 | 4,1E+07 | 13 % | 125 % | 4 | 1,1E+02 | 5,4E+01 | 51 % | 0,1 % | 4 | 3.062.135 |
| G198A | G19A | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| G198V | G19V | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| G198R | G19R | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| G198K | G19K | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| G198P | G19P | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| G198H | G19H | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| L211S/G219H | L32S/G40H | 4,3E+08 | 4,1E+07 | 10 % | 168 % | 2 | 6,2E+04 | 4,6E+03 | 7 % | 83 % | 2 | 6.920 |

Tabla 19. Constante de especificidad calculada (k_{cat}/K_M) y dependencia relativa del cofactor de las variantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | Actividad catalítica dependiente de FVa (FVa presente) | | | | | | Actividad catalítica independiente de FVa (Sin FVa) | | | | | | Dependencia relativa del cofactor |
|------------------------------------|---|--|-------------------------------|------|---------|---|---------------|---|------|---------|------|---------------|------|-----------------------------------|
| | | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | % de WT | n | k_{cat}/K_M | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | % de WT | n | k_{cat}/K_M | | |
| | | | | | | | | | | | | | 0 % | |
| G197P | G18P | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | 0 | n.d. | |
| D378N | D194N | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | 0 | n.d. | |
| D378S | D194S | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | 0 | n.d. | |
| V196L | V17L | 3,7E+08 | 8,6E+07 | 23 % | 145 % | 2 | 8,4E+03 | 1,8E+03 | 22 % | 11 % | 2 | 44.694 | | |
| V196T | V17T | 3,4E+08 | 1,0E+08 | 30 % | 134 % | 2 | 2,0E+03 | 2,4E+02 | 12 % | 3 % | 2 | 172.484 | | |
| V196P | V17P | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | 0 | n.d. | |
| G197V | G18V | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | 0 | n.d. | |
| G197T | G18T | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 | n.d. | 0 | n.d. | |
| G197S | G18S | 2,0E+08 | 8,4E+06 | 4 % | 78 % | 2 | 1,0E+03 | 1,5E+02 | 15 % | 1 % | 2 | 198.192 | | |
| E200A | E21A | 2,5E+08 | 4,6E+07 | 18 % | 98 % | 2 | 9,5E+03 | 2,1E+03 | 22 % | 13 % | 2 | 26.489 | | |
| E200S | E21S | 1,1E+08 | 2,7E+05 | 0 % | 44 % | 2 | 2,3E+04 | 2,4E+03 | 10 % | 31 % | 2 | 4.796 | | |
| E200V | E21V | 2,4E+08 | 3,1E+07 | 13 % | 92 % | 2 | 1,3E+04 | 9,5E+02 | 7 % | 17 % | 2 | 18.368 | | |
| K202S | K23S | 3,7E+08 | 2,1E+07 | 6 % | 144 % | 2 | 1,1E+04 | 2,2E+03 | 20 % | 14 % | 2 | 34.688 | | |
| R326A | R143A | 1,6E+08 | 1,3E+07 | 8 % | 64 % | 2 | 4,3E+04 | 2,5E+03 | 6 % | 57 % | 2 | 3.817 | | |
| R326S | R143S | 1,7E+08 | 1,3E+06 | 1 % | 66 % | 2 | 2,1E+04 | 5,1E+03 | 25 % | 28 % | 2 | 8.216 | | |
| R326T | R143T | 2,1E+08 | 2,6E+06 | 1 % | 80 % | 2 | 1,7E+04 | 5,0E+03 | 29 % | 23 % | 2 | 11.901 | | |
| R326V | R143V | 4,5E+08 | 1,3E+08 | 29 % | 176 % | 2 | 2,4E+04 | 2,5E+03 | 10 % | 32 % | 2 | 18.752 | | |
| R326Q | R143Q | 2,4E+08 | 3,3E+07 | 14 % | 93 % | 2 | 1,2E+04 | 3,9E+03 | 33 % | 16 % | 2 | 19.958 | | |
| R326N | R143N | 2,3E+08 | 3,5E+06 | 2 % | 89 % | 2 | 1,8E+04 | 5,7E+03 | 31 % | 24 % | 2 | 12.662 | | |
| R326M | R143M | 1,8E+08 | 4,6E+06 | 3 % | 70 % | 2 | 2,0E+04 | 6,4E+03 | 32 % | 26 % | 2 | 9.107 | | |
| R326K | R143K | 1,3E+08 | 1,2E+07 | 9 % | 50 % | 2 | 6,2E+03 | 9,6E+02 | 16 % | 8 % | 2 | 20.886 | | |

Tabla 19. Constante de especificidad calculada (k_{cat}/K_M) y dependencia relativa del cofactor de las variantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | Actividad catalítica dependiente de FVa (FVa presente) | | | | Actividad catalítica independiente de FVa (Sin FVa) | | | | Dependencia relativa del cofactor | |
|------------------------------------|---|--|-------------------------------|------|-----------------------|---|-------------------------------|------|-----------------------|-----------------------------------|-----------|
| | | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | % de WT k_{cat}/K_M | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | % de WT k_{cat}/K_M | | |
| R326Y | R143Y | 3,3E+08 | 1,9E+07 | 6 % | 128 % | 3,2E+04 | 3,4E+03 | 11 % | 43 % | 2 | 10.164 |
| T327A | T144A | 2,9E+08 | 2,4E+07 | 8 % | 114 % | 1,7E+04 | 1,7E+03 | 10 % | 22 % | 2 | 17.524 |
| T327L | T144L | 2,9E+08 | 1,1E+08 | 37 % | 114 % | 2,4E+04 | 9,0E+03 | 37 % | 32 % | 2 | 12.215 |
| S334A | S152A | 2,3E+08 | 5,1E+07 | 22 % | 89 % | 1,7E+04 | 4,0E+03 | 24 % | 22 % | 2 | 13.610 |
| S334T | S152T | 3,2E+08 | 8,7E+07 | 27 % | 125 % | 1,6E+04 | 1,1E+04 | 65 % | 22 % | 2 | 19.693 |
| S334N | S152N | 3,2E+08 | 7,3E+07 | 23 % | 124 % | 1,0E+04 | 1,8E+03 | 17 % | 14 % | 2 | 31.084 |
| R336E | R154E | 3,2E+08 | 8,4E+07 | 26 % | 126 % | 2,9E+04 | 1,0E+03 | 3 % | 39 % | 2 | 11.104 |
| K338A | K156A | 3,6E+08 | 4,2E+07 | 12 % | 139 % | 4,4E+03 | 1,8E+03 | 41 % | 6 % | 4 | 80.902 |
| K338S | K156S | 2,9E+08 | 4,5E+07 | 15 % | 114 % | 2,7E+03 | 1,1E+03 | 41 % | 4 % | 4 | 109.860 |
| K338N | K156N | 2,9E+08 | 5,5E+07 | 19 % | 111 % | 1,8E+04 | 3,1E+03 | 18 % | 24 % | 2 | 16.112 |
| K338R | K156R | 3,7E+08 | 7,9E+06 | 2 % | 143 % | 3,3E+04 | 1,4E+04 | 42 % | 45 % | 2 | 10.973 |
| K338V | K156V | 3,9E+08 | 6,7E+07 | 17 % | 151 % | 6,3E+03 | 1,6E+03 | 26 % | 8 % | 2 | 61.833 |
| K338Y | K156Y | 3,1E+08 | 5,4E+07 | 17 % | 122 % | 9,7E+03 | 9,1E+02 | 9 % | 13 % | 2 | 32.379 |
| K338M | K156M | 3,0E+08 | 2,4E+07 | 8 % | 115 % | 3,9E+04 | 1,2E+04 | 30 % | 52 % | 2 | 7.576 |
| T327A/K338A | T144A/K156A | 2,4E+08 | 5,3E+06 | 2 % | 93 % | 1,0E+03 | 1,9E+02 | 18 % | 1 % | 2 | 231.251 |
| T327L/K338M | T144L/K156M | 1,9E+08 | 2,3E+06 | 1 % | 73 % | 3,8E+04 | 2,9E+03 | 8 % | 50 % | 2 | 4.966 |
| E200V/T327L/K338M | E21V/T144L/K156M | 3,0E+08 | 1,1E+07 | 4 % | 117 % | 2,5E+04 | 3,3E+03 | 13 % | 34 % | 2 | 11.872 |
| E200V/T327L/S 334A/K3 38M | E21V/T144L/S1 52A/ K156M | 2,9E+08 | 6,1E+06 | 2 % | 114 % | 3,6E+03 | 5,5E+01 | 2 % | 5 % | 2 | 82.667 |
| V196S/G197A | V17S/G18A | Actividad | n.d. | n.d. | 0 % | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| V196S/I211S/G 219H | V17S/I32S/G40H | 2,7E+08 | 7,0E+07 | 26 % | 107 % | 1,5E+02 | 9,9E+00 | 7 % | 0,2 % | 2 | 1.825,614 |

Tabla 19. Constante de especificidad calculada (k_{cat}/K_M) y dependencia relativa del cofactor de las variantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | Actividad catalítica dependiente de FVa (FVa presente) | | | Actividad catalítica independiente de FVa (Sin FVa) | | | | Dependencia relativa del cofactor | |
|--------------------------------------|--|--|-------------------------------|-----------------------|---|-------------------------------|-----------------------|-------|-----------------------------------|-----------|
| | | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | % de WT k_{cat}/K_M | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | % de WT k_{cat}/K_M | n | | |
| D119N/G121S/ V196S/ I211S/G219H | D[119]N/G[121] S/V17S/I32S/G40H | 4,0E+08 | 1,8E+08 | 44 % | 1,7E+02 | 1,2E+02 | 73 % | 0,2 % | 2 | 2.424.835 |
| G114N/V196S/ L211S/G219H | G[114]N/V17S/I32S/G40H | 3,7E+08 | 8,9E+07 | 24 % | 1,8E+02 | 8,0E+01 | 43 % | 0,2 % | 2 | 1.991.946 |
| G114N/D119N/ G121S/V196S/I211S/G219H | G[114]N/D[119] N/G[121] S/V17S/I32S/G40H | 3,3E+08 | 2,4E+07 | 7 % | 128 % | 2,4E+01 | 29 % | 0,1 % | 3 | 3.937.247 |
| G197A/I211S/ G219H | G18A/I32S/G40H | 1,3E+08 | 1,8E+07 | 13 % | 52 % | 7,0E+02 | 37 % | 3 % | 2 | 69.315 |
| V196S/G197A/I211S/G219H | V17S/G18A/I32 S/G4 OH | Sin actividad | n.d. | 0 % | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| I195L/V196S | I16L/V17S | Sin actividad | n.d. | 0 % | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| I195L/G197A | I16L/G18A | Actividad | n.d. | 0 % | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| I195L/I211S/G219H | I16L/I32S/G40 H | 2,9E+08 | 2,7E+07 | 10 % | 112 % | 1,1E+02 | 16 % | 0,9 % | 4 | 411.146 |
| V196S/N214D | V17S/N35D | 2,1E+08 | 1,4E+07 | 7 % | 82 % | 2,0E+02 | 14 % | 0,2 % | 3 | 1.467.332 |
| V196S/N214A | V17S/N35A | 2,1E+08 | 3,8E+07 | 18 % | 82 % | 4,7E+01 | 22 % | 0,3 % | 2 | 982.637 |
| V196S/N214S | V17S/N35S | 2,9E+08 | 4,1E+07 | 14 % | 112 % | 1,7E+01 | 5 % | 0,5 % | 2 | 818.829 |
| V196S/E216R | V17S/E37R | 2,3E+08 | 2,4E+07 | 11 % | 88 % | 4,1E+01 | 24 % | 0,2 % | 3 | 1.319.111 |
| V196S/E216K | V17S/E37K | 3,0E+08 | 2,1E+07 | 7 % | 115 % | 7,7E+01 | 42 % | 0,2 % | 2 | 1.626.388 |
| V196S/E216A | V17S/E37A | 2,2E+08 | 3,2E+07 | 14 % | 87 % | 4,6E+00 | 3 % | 0,2 % | 2 | 1.615.323 |
| V196S/E216S | V17S/E37S | 1,9E+08 | 7,2E+06 | 4 % | 75 % | 1,6E+01 | 9 % | 0,2 % | 2 | 1.039.836 |

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | Actividad catalítica dependiente de FVa (FVa presente) | | | | | Actividad catalítica independiente de FVa (Sin FVa) | | | | | Dependencia relativa del cofactor |
|------------------------------------|---|--|-------------------------------|------|---------|----|---|-------------------------------|------|---------|---|-----------------------------------|
| | | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | % de WT | n | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | % de WT | n | |
| | | | | | | | | | | | | |
| V196S/E218R | V17S/E39R | 1,9E+08 | 1,3E+07 | 7 % | 74 % | 3 | 1,8E+02 | 1,4E+01 | 8 % | 0,2 % | 2 | 1.028.287 |
| V196S/E218K | V17S/E39K | 1,9E+08 | 3,4E+07 | 18 % | 73 % | 2 | 1,6E+02 | 2,3E+01 | 14 % | 0,2 % | 2 | 1.176.402 |
| V196S/E218A | V17S/E39A | 2,5E+08 | 8,3E+07 | 34 % | 96 % | 2 | 1,8E+02 | 4,7E+01 | 26 % | 0,2 % | 2 | 1.364.144 |
| V196S/R332A | V17S/R150A | 3,5E+08 | 3,0E+07 | 9 % | 136 % | 4 | 2,2E+02 | 3,9E+01 | 18 % | 0,3 % | 3 | 1.618.345 |
| V196S/R332D | V17S/R150D | 4,3E+08 | 1,2E+08 | 28 % | 168 % | 5 | 1,8E+02 | 6,7E+01 | 37 % | 0,2 % | 5 | 2.395.228 |
| V196S/R332E | V17S/R150E | 3,5E+08 | 3,8E+06 | 1 % | 136 % | 2 | 3,4E+02 | 2,2E+02 | 63 % | 0,5 % | 2 | 1.019.834 |
| V196S/R332S | V17S/R150S | 3,3E+08 | 3,9E+07 | 12 % | 126 % | 6 | 1,5E+02 | 3,5E+01 | 24 % | 0,2 % | 5 | 2.209.279 |
| V196S/R332G | V17S/R150G | 3,8E+08 | 6,1E+07 | 16 % | 149 % | 5 | 9,1E+01 | 3,4E+01 | 37 % | 0,1 % | 4 | 4.218.821 |
| V196S/R326E | V17S/R143E | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| V196S/R326D | V17S/R143D | 1,3E+08 | 2,7E+07 | 21 % | 49 % | 5 | 3,2E+00 | 8,3E-01 | 26 % | 0,0 % | 2 | 39.452.222 |
| V196S/R326M | V17S/R143M | 2,3E+08 | 4,1E+06 | 2 % | 90 % | 2 | 2,2E+01 | 1,8E+00 | 8 % | 0,0 % | 2 | 10.595.674 |
| V196S/R326N | V17S/R143N | 3,1E+08 | 3,4E+07 | 11 % | 121 % | 3 | 1,4E+01 | 6,5E-01 | 5 % | 0,0 % | 2 | 22.111.090 |
| V196S/R326Q | V17S/R143Q | 3,0E+08 | 5,7E+07 | 19 % | 118 % | 12 | 6,6E+00 | 2,5E+00 | 39 % | 0,0 % | 3 | 46.198.526 |
| V196S/R273E | V17S/R93E | 3,3E+08 | 5,6E+07 | 17 % | 128 % | 3 | 2,0E+02 | 1,4E+01 | 7 % | 0,3 % | 2 | 1.681.120 |
| V196S/R273A | V17S/R93A | 2,7E+08 | 4,2E+07 | 16 % | 105 % | 2 | 1,9E+02 | 6,9E+01 | 37 % | 0,2 % | 2 | 1.446.828 |
| V196S/R424A | V17S/R240A | 2,7E+08 | 1,9E+07 | 7 % | 106 % | 2 | 2,7E+02 | 1,5E+02 | 56 % | 0,4 % | 2 | 993.583 |
| V196S/R424E | V17S/R240E | 2,4E+08 | 5,1E+07 | 21 % | 95 % | 7 | 1,5E+02 | 2,1E+00 | 1 % | 0,2 % | 2 | 1.663.352 |
| V196S/K420A | V17S/K236A | 2,8E+08 | 5,4E+06 | 2 % | 111 % | 2 | 4,0E+02 | 1,5E+02 | 38 % | 0,5 % | 2 | 712.414 |
| V196S/K420E | V17S/K236E | 2,2E+08 | 5,0E+07 | 23 % | 86 % | 2 | 2,4E+02 | 9,2E+01 | 39 % | 0,3 % | 2 | 927.406 |
| V196S/R306E | V17S/R125A | 2,2E+08 | 5,4E+07 | 24 % | 87 % | 2 | 1,9E+02 | n.d. | n.d. | 0,2 % | 1 | 1.194.201 |
| V196S/K276A | V17S/K96A | 1,6E+08 | 3,1E+06 | 2 % | 60 % | 2 | 5,0E+01 | 5,3E+00 | 11 % | 0,1 % | 2 | 3.117.288 |
| V196S/K276E | V17S/K96E | 1,3E+08 | 1,5E+07 | 12 % | 52 % | 2 | 2,3E+01 | 3,0E+00 | 13 % | 0,0 % | 2 | 5.713.870 |

Tabla 19. Constante de especificidad calculada (k_{cat}/K_M) y dependencia relativa del cofactor de las variantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | Actividad catalítica dependiente de FVa (FVa presente) | | | | Actividad catalítica independiente de FVa (Sin FVa) | | | | Dependencia relativa del cofactor | | |
|------------------------------------|---|--|-------------------------------|------|-----------------------|---|-------------------------------|---------|-----------------------|-----------------------------------|---|------------|
| | | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | % CV | % de WT k_{cat}/K_M | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | % CV | % de WT k_{cat}/K_M | | | |
| | | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | | | |
| V196S/K420E/R424E | V17S/K236E/R240E | 7,9E+07 | 2,3E+07 | 29 % | 31 % | 3 | 1,7E+02 | 3,6E+01 | 21 % | 0,2 % | 2 | 465.277 |
| V196S/R273E/ K420E/R4 24E | V17S/R93E/K2 36E/R 240E | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| V196S/R273E/R306E/K420E/R424E | V17S/R93E/R125E/K236E/R240E | Sin actividad | n.d. | n.d. | 0 % | 0 | Sin actividad | n.d. | n.d. | n.d. | 0 | n.d. |
| V196S/K338A | V17S/K156A | 1,1E+08 | 3,3E+07 | 30 % | 43 % | 2 | 3,9E+00 | 9,6E-01 | 24 % | 0,0 % | 2 | 28.406.569 |
| V196S/K338S | V17S/K156S | 1,4E+08 | 4,9E+07 | 34 % | 56 % | 10 | 3,0E+00 | 9,4E-01 | 31 % | 0,0 % | 8 | 47.490.591 |
| V196S/E215N/N217S | V17S/E36N/N38S | 1,7E+08 | 4,9E+07 | 29 % | 66 % | 3 | 8,7E+01 | 5,2E+00 | 6 % | 0,1 % | 4 | 1.971.094 |
| V196S/E264N/E266S | V17S/E84N/E86S | 2,8E+08 | 6,6E+07 | 23 % | 111 % | 4 | 7,5E+01 | 6,0E+00 | 8 % | 0,1 % | 4 | 3.815.411 |
| D119N/G121S/V196S/E264N/E266S | D[119N]/G[121 S]/V17S/E84N/E86S | 1,1E+08 | 2,9E+07 | 26 % | 44 % | 2 | 1,7E+02 | 1,5E+01 | 9 % | 0,2 % | 2 | 675.381 |
| G114N/V196S/ E264N/E 266S | G[114N]/V17S/E84N/E86S | 4,3E+08 | 1,5E+08 | 34 % | 168 % | 2 | 2,8E+02 | 1,8E+02 | 66 % | 0,4 % | 2 | 1.562.440 |
| V196S/R429N/I431S | V17S/R245N/I247S | 2,3E+08 | 8,3E+07 | 36 % | 89 % | 2 | 8,2E+01 | 6,6E+00 | 8 % | 0,1 % | 2 | 2.791.109 |
| V196S/R243N/K245S | V17S/R63N/K65S | 1,5E+08 | 3,5E+07 | 23 % | 58 % | 3 | 6,6E+02 | 1,3E+02 | 19 % | 0,9 % | 2 | 226.278 |
| V196S/T293N/R295S | V17S/T113N/R 115S | 1,5E+08 | 1,7E+07 | 12 % | 57 % | 2 | 8,5E+01 | 1,8E+01 | 21 % | 0,1 % | 2 | 1.733.605 |
| V196S/D389N/Y391S | V17S/D205N/Y207S | 9,2E+07 | 5,1E+07 | 56 % | 36 % | 2 | 1,3E+03 | 2,7E+02 | 21 % | 2 % | 3 | 70.856 |

Tabla 19. Constante de especificidad calculada (k_{cat}/K_M) y dependencia relativa del cofactor de las variantes de FXa

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | Actividad catalítica dependiente de FVa (FVa presente) | | | | Actividad catalítica independiente de FVa (Sin FVa) | | | | Dependencia relativa del cofactor | | |
|---|--|--|-------------------------------|------|---------------|---|-------------------------------|---------|---------|-----------------------------------|---|-----------|
| | | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | % CV | % de WT | k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | % CV | % de WT | | | |
| | | n | k_{cat}/K_M | n | k_{cat}/K_M | | | | | | | |
| V196S/K388N | V17S/K204N | 2,0E+08 | 7,1E+07 | 36 % | 77 % | 5 | 8,7E+01 | 1,0E+01 | 12 % | 0,1 % | 4 | 2.288.700 |
| D119N/G121S/ V196S/K 388N | D[119N]/G[121 S]/V1 7S/K204N | 4,3E+08 | 1,8E+08 | 42 % | 167 % | 2 | 2,6E+02 | 4,4E+01 | 17 % | 0,3 % | 2 | 1.661.646 |
| V196S/T428N/G430S | V17S/T244N/G246S | 2,5E+08 | 9,4E+07 | 38 % | 97 % | 2 | 9,8E+01 | 3,2E+00 | 3 % | 0,1 % | 2 | 2.555.985 |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | V17S/I32S/G40 H/E8 4N/E86S | 4,2E+08 | 6,7E+07 | 16 % | 163 % | 3 | 1,1E+02 | 2,2E+01 | 20 % | 0,2 % | 2 | 3.707.889 |
| D119N/G121SN196S/I211S/G219H/E264N/E26 6S | D[119N]/G [121] S/V17S/I32S/G40H/ E84N/ E86S | 3,4E+08 | 9,6E+05 | 0 % | 132 % | 2 | 2,3E+02 | 1,3E+02 | 56 % | 0,3 % | 2 | 1.486.131 |
| G114N/V196S/L211S/G219H/E264N/E266S | G[114N]/V17S/I32S/G40H/E84N/E86S | 2,5E+08 | 7,7E+07 | 30 % | 98 % | 4 | 1,2E+02 | 7,8E+01 | 66 % | 0,2 % | 2 | 2.147.579 |
| V196S/E264N/ E266S/K3 88N | V17S/E84N/E8 6S/K2 04N | 3,3E+08 | 2,2E+08 | 67 % | 128 % | 2 | 1,7E+02 | 1,3E+02 | 76 % | 0,2 % | 2 | 1.969.113 |
| D119N/G121S/ 219H/K388N | V196S/I211S/GD[119N]/G SV17S/I32S/G40H/K204N [121] | 1,5E+08 | 9,1E+07 | 59 % | 60 % | 3 | 1,3E+02 | 3,4E+01 | 27 % | 0,2 % | 2 | 1.218.354 |
| G114NN196S/I 211S/G219H/K 388N | G[114N]/V17S/I32S/G40H/K204N | 2,4E+08 | 8,5E+07 | 35 % | 94 % | 4 | 1,1E+02 | 4,7E+01 | 44 % | 0,1 % | 2 | 2.222.421 |
| V196S/I211S/G 66S/K388N | V17S/I32S/G40H/E84N/E86S/K204N | 1,4E+08 | 1,3E+07 | 9 % | 54 % | 2 | 1,7E+02 | 1,6E+02 | 92 % | 0,2 % | 2 | 823.652 |

Ejemplo 5**Determinación de la inhibición de FXa mediante el complejo antitrombina/heparina**

5 La inhibición del FXa natural o de las variantes de FXa mediante el complejo antitrombina/heparina (AT/heparina) se evaluó midiendo el nivel de inhibición de AT/heparina sobre la actividad catalítica de FXa respecto a un sustrato de molécula pequeña, CH₃SO₂-D-CHG-Gly-Arg-AMC (Pefalfluor FXa; Centerchem). El valor de $K_{0,5}$ se determinó para cada variante de FXa sometida a ensayo, que corresponde a la concentración molar de AT necesaria para inhibición del 50 % (CI_{50}) de la actividad catalítica de una variante de FXa en las condiciones predefinidas del ensayo. Las reacciones de inhibición se llevaron a cabo en presencia de heparina no fraccionada de longitud completa (UFH; Calbiochem), que aumenta la velocidad de la reacción de inhibición debido al efecto de "plantilla" proporcionado por las cadenas de heparina más largas (véase por ejemplo, Olson et al. (2004) Thromb Haemost 92(5), 929-939). La constante de velocidad de segundo orden aparente (k_{app}) para la inhibición de FXa natural o de variantes de FXa por el complejo AT/U FH también se evaluó directamente utilizando un protocolo modificado, en el que se variaba el tiempo de incubación con el complejo AT/UFH.

Inhibición de FXa mediante el complejo antitrombina/UFH

20 Para las reacciones de inhibición en presencia de UFH, 2x soluciones de 2000 nM, 1000 nM, 200 nM, o 100 nM AT/UFH (UFH final 2 μ M) se prepararon por dilución de una solución madre 20 μ M de AT-III humana purificada de plasma (Molecular Innovations) en una solución de UFH en exceso UFH (2 μ M) en un volumen de 1,0 ml de 1 x Tampón A (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, Tween-20 al 0,01 %, PEG 8000 al 0,1 %, pH 7,4). Las soluciones de AT/UFH se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de diluirse en serie de 2 veces en una placa de polipropileno de 96 pocillos profundos con un volumen de 500 μ l 1 x Tampón A que contiene UFH 2 μ M. Las diluciones finales de AT eran dependientes de la concentración inicial de AT y eran de 2000-0 nM, 1000-0 nM, 200-0 nM o 100-0 nM (es decir, filas A-H). Estas variantes, que mostraron una mayor resistencia a la inhibición de AR en las condiciones convencionales, se analizaron adicionalmente usando mayores concentraciones de AT. Alícuotas de 35 μ l de cada dilución AT se dispensaron en sus respectivas filas de una placa de almacenamiento de 96 pocillos de fondo en V para completar todas las columnas (es decir, 1-12). Las variantes de FXa se diluyeron inicialmente hasta 100 nM en 1 x Tampón A. Posteriormente, 50 μ l de cada variante de FXa 100 nM se diluyeron hasta una concentración 2,0 nM en 2,5 ml de 1 x Tampón A y después 70 μ l de esta solución se dispensaron a una placa de almacenamiento de 96 pocillos de fondo en V de acuerdo con el mismo mapa de placa predefinido (4 variantes de FXa por placa).

35 Las reacciones de ensayo se iniciaron en un sistema de gestión de líquidos BioMek FX programado para dispensar 35 μ l de las soluciones de FXa en las placas que contenían 35 μ l de cada dilución de AT/UFH por pocillo para un total de dos placas de ensayo duplicadas para cada variante de FXa. Las condiciones del ensayo final de inhibición fueron: 1,0 nM FXa y diluciones AT/UFH comprendidas de 35 nM a 0 nM, 50 nM a 0 nM, 100 nM a 0 nM, 500 nM a 0 nM o 1000 nM a 0 nM AT en UFH 1 μ M.

40 Las reacciones de inhibición se incubaron adicionalmente durante 30 segundos a temperatura ambiente (~25 °C) antes de transferir una alícuota de 40 μ l de la reacción mediante el BioMek FX a una placa de 96 pocillos de semiárea negra que contenían 20 μ l de Pefalfluor Xa 0,3 mM en Tampón A de ensayo suplementado con 15 mg/ml de polibreno. Para inactivar la reacción AT/UFH, se añadió polibreno (bromuro de hexadimetrina) a una concentración final de 5 mg/ml a la reacción. La actividad residual de FXa se evaluó mediante las velocidades iniciales de escisión de sustrato durante 60 minutos en un lector de placas de fluorescencia ajustado a 25 °C. Las condiciones finales del ensayo para la determinación de la actividad residual fueron variante de FXa 2,0 nM, Pefalfluor FX 0,1 mM u 5 mg/ml de polibreno en Tampón A.

50 Para determinar el grado de inhibición de AT/UFH por FXa o variante de FXas, los datos en bruto recogidos por la aplicación SoftMax Pro (Molecular Devices) se exportaron como archivos .TXT. Se realizó un análisis de datos no lineal adicional con el programa informático ActivityBase usando el módulo de análisis de datos XE Runner (IDBS Software). La plantilla se usó para calcular la serie de dilución de AT, relación de AT a FXa, y los cocientes V_i/V_0 para cada réplica de FXa para cada concentración experimental de AT. Los análisis de regresión no lineal de la actividad residual de FXa (expresada como V_i/V_0) frente a la concentración de AT se procesaron usando una ecuación de inhibición hiperbólica de la forma $[C+(Amp*(1-(X/(K_{0,5}+X))))]$; donde C = la desviación (fijada a 0 para permitir la extrapolación de los conjuntos de datos que no alcanzaron el 100 % de inhibición durante el ensayo), Amp = la amplitud del ajuste y $K_{0,5}$, que corresponde a la concentración de AT necesaria para una inhibición semimáxima en las condiciones del ensayo.

60 Para algunas variantes de FXa, AT/UFH inhibió menos del 10-15 % de la actividad proteasa total a la mayor concentración estudiada de AT, lo que representa un límite de detección superior del ensayo en las condiciones de cribado convencionales. Las variantes con inhibición máxima menor de 10 % se asignaron, por tanto, a un valor límite inferior $K_{0,5}$ de 10000 nM y, en la mayoría de los casos, se espera que tengan resistencias a AT mucho mayores que el valor indicado.

La Tabla 20 proporciona los resultados de los ensayos que se realizaron con AT/UFH. Los resultados se presentan como el parámetro ajustado $K_{0,5}$ y como representación de la extensión de la resistencia a AT-III para cada variante comprada con el FXa natural expresado como cociente de los valores ajustados $K_{0,5}$ ($K_{0,5}$ variante/ $K_{0,5}$ natural). El polipéptido de FXa natural usado para la comparación era el FXa recombinante natural de los Ejemplos 1-2,

5 Algunas variantes de FXa mostraron una resistencia superior, mayor de 500 veces, a AT en comparación con FXa natural (FXa WT). Por ejemplo, FXa-V196S/K276E, FXa-V196S/R332G, FXa-V196S/R332D, FXa-V196S/R326D, FXa-V196S/K338S, FXa-V196S/K420A y FXa-V196S/R424E se encuentran en el grupo que mostraron una resistencia significativa a AT-III.

10

| Mutación (Numeración de FXa maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | $K_{0,5}$ (nM) | \pm S.D. (nM) | %CV | $K_{0,5}$ -mut/ $K_{0,5}$ -wt | n |
|-------------------------------------|---|----------------|-----------------|------|-------------------------------|----|
| FXa plasma | FXa plasma | 2 | 1 | 44 % | 1 | 23 |
| FXa WT | FXa WT | 2 | 1 | 59 % | 1 | 10 |
| I195L | I16L | 89 | 41 | 47 % | 49 | 17 |
| V196I | V17I | 5 | 2 | 37 % | 3 | 3 |
| V196S | V17S | 132 | 25 | 19 % | 73 | 14 |
| L211S/G219H | L32S/G40H | 8 | 2 | 30 % | 4 | 3 |
| V196L | V17L | 18 | 2 | 10 % | 10 | 3 |
| V196T | V17T | 48 | 3 | 7 % | 26 | 2 |
| G197S | G18S | 75 | 9 | 11 % | 41 | 2 |
| E200A | E21A | 5 | 1 | 24 % | 3 | 2 |
| E200S | E21S | 2 | 0 | 6 % | 1 | 2 |
| E200V | E21V | 4 | 0 | 6 % | 2 | 2 |
| K202S | K23S | 5 | 2 | 54 % | 3 | 2 |
| R326A | R143A | 3 | 1 | 19 % | 2 | 2 |
| R326S | R143S | 3 | 0 | 6 % | 1 | 2 |
| R326T | R143T | 5 | 0 | 7 % | 3 | 2 |
| R326V | R143V | 10 | 2 | 24 % | 5 | 2 |
| R326Q | R143Q | 4 | 2 | 45 % | 2 | 2 |
| R326N | R143N | 10 | 7 | 69 % | 6 | 4 |
| R326M | R143M | 7 | 3 | 43 % | 4 | 4 |
| R326K | R143K | 6 | 1 | 14 % | 3 | 2 |
| R326Y | R143Y | 6 | 1 | 11 % | 3 | 2 |
| T327A | T144A | 5 | 1 | 13 % | 3 | 2 |
| T327L | T144L | 5 | 2 | 33 % | 3 | 2 |
| S334A | S152A | 12 | 8 | 69 % | 7 | 2 |
| S334T | S152T | 19 | 9 | 45 % | 11 | 2 |
| S334N | S152N | 8 | 0 | 4 % | 4 | 2 |
| R336E | R154E | 5 | 0 | 6 % | 3 | 2 |
| K338A | K156A | 23 | 3 | 13 % | 13 | 4 |
| K338S | K156S | 34 | 8 | 24 % | 19 | 4 |

Tabla 20. Inhibición de variantes de FXa mediante AT-III/UFH

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimi tripsina) | $K_{0,5}$ (nM) | \pm S.D. (nM) | %CV | $K_{0,5\text{-mut}}/K_{0,5\text{-wt}}$ | n |
|------------------------------------|---|----------------|-----------------|------|--|---|
| K338N | K156N | 8 | 1 | 19 % | 4 | 2 |
| K338R | K156R | 6 | 1 | 24 % | 3 | 2 |
| K338V | K156V | 52 | 2 | 4 % | 29 | 2 |
| K338Y | K156Y | 7 | 0 | 6 % | 4 | 2 |
| K338M | K156M | 4 | 1 | 25 % | 2 | 2 |
| T327A/K338A | T144A/K156A | 42 | 3 | 8 % | 23 | 2 |
| T327L/K338M | T144L/K156M | 5 | 1 | 27 % | 3 | 2 |
| E200V/T327L/K338M | E21V/T144L/K156M | 8 | 2 | 27 % | 4 | 2 |
| E200V/T327L/S334A/K338M | E21V/T144L/S152A/K156M | 40 | 13 | 31 % | 22 | 2 |
| V196S/I211S/G2 19H | V17S/I32S/G40H | 194 | 35 | 18 % | 108 | 4 |
| G197A/I211S/G2 19H | G18A/I32S/G40H | 128 | 43 | 34 % | 71 | 4 |
| I195L/I211S/G21 9H | I16L/I32S/G40H | 180 | 29 | 16 % | 100 | 4 |
| V196S/N214D | V17S/N35D | 154 | 18 | 12 % | 86 | 2 |
| V196S/N214A | V17S/N35A | 185 | 107 | 58 % | 103 | 2 |
| V196S/N214S | V17S/N35S | 186 | 7 | 4 % | 103 | 2 |
| V196S/E216R | V17S/E37R | 236 | 57 | 24 % | 131 | 2 |
| V196S/E216K | V17S/E37K | 400 | 99 | 25 % | 222 | 4 |
| V196S/E216A | V17S/E37A | 279 | 111 | 40 % | 155 | 2 |
| V196S/E216S | V17S/E37S | 178 | 31 | 17 % | 99 | 2 |
| V196S/E218R | V17S/E39R | 321 | 22 | 7 % | 178 | 2 |
| V196S/E218K | V17S/E39K | 404 | 200 | 49 % | 224 | 2 |
| V196S/E218A | V17S/E39A | 167 | 38 | 23 % | 93 | 2 |
| V196S/R332A | V17S/R150A | 3757 | 2834 | 75 % | 2085 | 4 |
| V196S/R332D | V17S/R150D | 7284 | 3841 | 53 % | 4042 | 2 |
| V196S/R332E | V17S/R150E | 3961 | 2026 | 51 % | 2198 | 4 |
| V196S/R332S | V17S/R150S | 7247 | 3345 | 46 % | 4022 | 4 |
| V196S/R332G | V17S/R150G | 8357 | 3285 | 39 % | 4638 | 4 |
| V196S/R326D | V17S/R143D | 5455 | 3531 | 65 % | 3027 | 2 |
| V196S/R326M | V17S/R143M | 850 | 286 | 34 % | 472 | 4 |
| V196S/R326N | V17S/R143N | 1178 | 472 | 40 % | 654 | 4 |
| V196S/R326Q | V17S/R143Q | 642 | 148 | 23 % | 356 | 4 |
| V196S/R273E | V17S/R93E | 1491 | 923 | 62 % | 828 | 2 |
| V196S/R273A | V17S/R93A | 1144 | 552 | 48 % | 635 | 4 |
| V196S/R424A | V17S/R240A | 1756 | 811 | 46 % | 975 | 4 |
| V196S/R424E | V17S/R240E | 3969 | 3725 | 94 % | 2203 | 4 |
| V196S/K420A | V17S/K236A | 10000 | 0 | 0 % | 5550 | 3 |

Tabla 20. Inhibición de variantes de FXa mediante AT-III/UFH

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimi tripsina) | $K_{0,5}$ (nM) | \pm S.D. (nM) | %CV | $K_{0,5\text{-mut}}/K_{0,5\text{-wt}}$ | n |
|------------------------------------|---|----------------|-----------------|------|--|---|
| V196S/K420E | V17S/K236E | 10000 | 0 | 0 % | 5550 | 3 |
| V196S/R306E | V17S/R125A | 10000 | 0 | 0 % | 5550 | 3 |
| V196S/K276A | V17S/K96A | 7450 | 3606 | 48 % | 4135 | 2 |
| V196S/K276E | V17S/K96E | 10000 | 0 | 0 % | 5550 | 2 |
| V196S/K420E/R4 24E | V17S/K236E/R240 E | 3019 | 1649 | 55 % | 1675 | 4 |
| V196S/K338A | V17S/K156A | 1783 | 692 | 39 % | 990 | 4 |
| V196S/K338S | V17S/K156S | 2260 | 975 | 43 % | 1254 | 4 |

* Un valor de $K_{0,5}$ de 10000 nM indica el valor límite inferior para aquellas variantes con inhibición menor del 10 % en las condiciones del ensayo.

B. Determinación de la constante de velocidad de segundo orden (k_{app}) para la inhibición de FXa mediante el complejo antitrombina/UFH

5 La constante de velocidad de segundo orden para la inhibición (k_{app}) de variantes de FXa mediante AT/UFH se determinó usando el mismo ensayo que se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5A con modificaciones poco importantes. El método es más adecuado para evaluar las constantes de velocidad de segundo orden para múltiples variantes concurrentes que los métodos de cinética competitiva o métodos discontinuos (véase, por ejemplo, Olson et al. (2004) Thromb Haemost 92(5), 929-939).

10 Para las reacciones de inhibición en presencia de UFH, se preparó una solución 1000 nM de AT/UFH por dilución de una solución madre 20 μ M de AT humana purificada de plasma (Molecular Innovations) en una solución de UFH en exceso UFH (2 μ M) en un volumen de 1,0 ml de 1x Tampón A (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, Tween-20 al 0,01 %, PEG 8000 al 0,1 %, pH 7,4). Las soluciones de AT/UFH se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de diluirse en serie de 2,0 veces en una columna de una placa de polipropileno de 96 pocillos profundos con un volumen final de 500 μ l 1 x Tampón A que contiene UFH 2 μ M. Las diluciones finales de AT-III en el ensayo de k_{app} modificado comprenden 500 nM - 0 nM (es decir, las filas A-H). Un total de 35 μ l de cada dilución AT-III se distribuyeron en alícuotas en sus respectivas filas de una placa de almacenamiento de 96 pocillos de fondo en V para completar todas las columnas (es decir, 1-12). Las variantes de FXa se diluyeron inicialmente hasta 20 100 nM en 1 x Tampón A. Posteriormente, 50 μ l de cada variante de FXa 100 nM se diluyeron hasta una concentración 2,0 nM en 2,5 ml de 1x Tampón A y después alícuotas de 70 μ l de esta solución se dispensaron a una placa de almacenamiento de 96 pocillos de fondo en V de acuerdo con el mismo mapa de placa predefinido que anteriormente (4 variantes de FXa por placa).

25 Las reacciones de ensayo se iniciaron en un sistema de gestión de líquidos BioMek FX programado para dispensar 35 μ l de las soluciones de FXa en las placas que contenían 35 μ l de cada dilución de AT/UFH por pocillo para un total de dos placas de ensayo duplicadas para cada variante de FXa. Las condiciones del ensayo final de inhibición fueron: Diluciones 1,0 nM de FXa y AT comprendidas de 500 nM a 0 nM en UFH 1 μ M de forma que la heparina estaba en exceso. Las reacciones de inhibición se incubaron a temperatura ambiente después durante periodos de tiempo diferentes a temperatura ambiente (~25 °C) dependiendo de la constante de velocidad de inhibición esperada y se ajustó para que >90 % de la inhibición se pudiera conseguir a la mayor concentración de AT en el ensayo (500 nM). Los tiempos de incubación típicos se determinaron para cada variante, o clase de variantes, pero por lo general siguió los tiempos de incubación detallados en la Tabla 21.

35 **Tabla 21. Tiempos de incubación del ensayo basándose en los valores de k_{app} esperados**

| k_{app} ($M^{-1}V^{-1}$) esperada | Incubación FXa/ATIII (s) |
|---------------------------------------|--------------------------|
| 1,0E-07 | 10 |
| 1,0e-06 | 30 |
| 1,0E-05 | 120 |
| 1,0E-04 | 600 |
| 1,0E-03 | 3600 |

| | |
|-----------------------------------|--------------------------|
| $k_{app} (M^{-1}V^{-1})$ esperada | Incubación FXa/ATIII (s) |
| 1,0E-02 | 7200 |

Después del tiempo de incubación predeterminado, una alícuota de 40 µl de la reacción mediante el BioMek FX a una placa de 96 pocillos de semiárea negra que contenían 20 µl de Pefalfluor Xa 0,3 mM en Tampón A de ensayo suplementado con 15 mg/ml de polibreno. Se añadió polibreno (bromuro de hexadimetrina) a una concentración final de 5 mg/ml al Tampón A para inactivar la reacción AT/UFH. La actividad residual de FXa se evaluó mediante las velocidades iniciales de escisión de sustrato durante 60 minutos en un lector de fluorescencia ajustado a 25 °C. Las condiciones finales del ensayo para la determinación de la actividad residual fueron variante de FXa 1,0 nM, Pefalfluor Xa 0,1 mM y 5 mg/ml de polibreno en Tampón A. Los análisis de datos para calcular el valor de $K_{0,5}$ se realizaron de una forma similar a la anteriormente descrita para los ensayos de inhibición de AT/UFH en el Ejemplo 5A usando el paquete informático ActivityBase y el módulo de análisis de datos XE Runner (IDBS Software). Usando la configuración del ensayo detallada en el Ejemplo 5A en condiciones de pseudo 1^{er} orden y analizando varios tiempos de incubación, fue posible calcular la constante de velocidad de segundo orden aparente para la inhibición mediante AT (k_{app}) usando las siguientes ecuaciones:

15 **Ecuación (8)**

$$k_{app} = \frac{k_{obs}}{\left(\frac{[AT]}{S.I.}\right)}$$

20 **Ecuación (9)**

$$k_{obs} = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}}$$

25 Puesto que el valor de ajuste para $K_{0,5} = [AT]$ a $t_{1/2}$ (definida por la hora del ensayo), todos los valores necesarios están disponibles para calcular k_{obs} y, por tanto, k_{app} para la inhibición de una variante de FXa dada mediante AT. El valor calculado para k_{app} no tiene en cuenta los posibles efectos de los cambios en la estequiometría de la inhibición (S.I.), a la que se proporciona un valor constante de 1,2 en el presente cálculo, ya que este valor refleja lo que está típicamente recogido en la bibliografía (véase por ejemplo Olson et al. (2004) *Thromb Haemost* 92(5), 929-939).

30 La Tabla 22 proporciona los resultados de los ensayos de velocidad de segundo orden que se realizaron con AT/UFH. Los resultados se presentan tanto como el parámetro ajustado k_{app} y como una representación de la extensión de la resistencia a la AT para cada variante comprada con el FXa natural expresado como cociente de los valores ajustados k_{app} (k_{app} natural/ k_{app} variante). El polipéptido de FXa natural usado para la comparación era el FXa recombinante natural generado mediante la clonación del gen FX definido en la SEQ ID NO:1 y expresado en células CHO como un polipéptido con la secuencia de aminoácidos definida como los aminoácidos 1-139 y 195-448 de la SEQ ID NO:134, como se describe en los Ejemplos 1-3 (es decir, el polipéptido de FX WT). Algunas variantes de FXa mostraron una resistencia superior, mayor de 300 veces, a AT en comparación con FXa natural. Por ejemplo, FXa-V196S/R332G, FXa-V196S/K420E/R424E, FXa-V196S/R332D, FXa-V196S/R332S, y FXa-V196S/K338S están dentro de este grupo, que mostró una resistencia significativa a AT.

Tabla 22. Constante de segundo orden para la inhibición mediante AT/UFH

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | $k_{app} (M^{-1} s^{-1})$ | $\pm S.D. (M^{-1} s^{-1})$ | %CV | $\frac{k_{app-wt}}{k_{app-mut}}$ | n |
|------------------------------------|---|---------------------------|----------------------------|------|----------------------------------|----|
| FXa plasma | FXa plasma | 1,4E+07 | 7,2E+06 | 52 % | 1 | 3 |
| FX WT | FX WT | 9,7E+06 | 4,6E+06 | 47 % | 1 | 6 |
| I195L | I16L | 5,3E+05 | 9,1E+04 | 17 % | 18 | 4 |
| V196S | V17S | 5,3E+05 | 1,7E+05 | 32 % | 18 | 11 |
| T85N/K87S/V196S | T[85]N/K[87]S/V17S | 1,8E+05 | 2,1E+03 | 1 % | 55 | 2 |
| Q56N/Q58S/V196S | Q[56]N/Q[58]S/V17 S | 3,2E+05 | 2,1E+04 | 7 % | 31 | 2 |
| K62N/G64S/V196S | K[62]N/G[64]S/V17 S | 2,8E+05 | 4,3E+03 | 2 % | 35 | 2 |
| L65N/E67S/V196S | L[65]N/E[67]S/V17S | 3,8E+05 | 1,7E+04 | 4 % | 25 | 2 |

| Tabla 22. Constante de segundo orden para la inhibición mediante AT/UFH | | | | | | | |
|---|---|------------------------------|-------------------------------|------|--------------------------|---|--|
| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | k_{app} ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | $k_{app-wt}/k_{app-mut}$ | n | |
| E67N/V196S | E[67]N/V17S | 4,4E+05 | 4,3E+02 | 0 % | 22 | 2 | |
| L73N/G75S/V196S | L[73]N/G[75]S/V17S | 3,1E+05 | 7,6E+03 | 2 % | 32 | 2 | |
| G75N/E77S/V196S | G[75]N/E[77]S/V17S | 4,4E+05 | 5,2E+02 | 0 % | 22 | 2 | |
| R86N/I88S/V196S | R[86]N/I[88]S/V17S | 4,9E+05 | 5,2E+03 | 1 % | 20 | 2 | |
| G114N/V196S | G[114]N/V17S | 3,4E+05 | 8,0E+03 | 2 % | 28 | 4 | |
| D95N/D97S/V196S | D[95]N/D[97]S/V17 S | 4,1E+05 | 2,0E+05 | 49 % | 24 | 2 | |
| E82S/V196S | E[82]S/V17S | 2,3E+05 | 2,2E+05 | 96 % | 42 | 8 | |
| E82N/F84S/V196S | E[82]N/F[84]S/V17S | 4,2E+05 | 1,6E+05 | 39 % | 23 | 3 | |
| G78N/N80S/V196S | G[78]N/N[80]S/V17 S | 1,5E+05 | 5,0E+04 | 33 % | 64 | 4 | |
| E77N/K79S/V196S | E[77]N/K[79]S/V17S | 2,1E+05 | 1,2E+05 | 57 % | 47 | 2 | |
| D119N/G121S/V196S | D[119]N/G[121]S/V 17S | 7,5E+05 | 1,7E+05 | 23 % | 13 | 2 | |
| L83N/V196S | L[83]N/V17S | 6,0E+05 | 3,2E+04 | 5 % | 16 | 2 | |
| K122S/V196S | K[122]S/V17S | 9,3E+05 | 1,4E+05 | 15 % | 11 | 4 | |
| E51N/V196S | E[51]N/V17S | 8,6E+05 | 2,9E+04 | 3 % | 11 | 2 | |
| Q58N/K60S/V196S | Q[58]N/K[60]S/V17 S | 6,4E+05 | 1,3E+04 | 2 % | 15 | 2 | |
| G114N/D119N/G121S /V196S | G[114]N/D[119]N/G [121] S/V17S | 1,4E+05 | 8,1E+04 | 59 % | 71 | 5 | |
| V196T | V17T | 3,2E+06 | 8,3E+04 | 3 % | 3 | 2 | |
| G197S | G18S | 1,4E+06 | 3,9E+05 | 28 % | 7 | 2 | |
| S334T | S152T | 1,2E+07 | 3,1E+06 | 25 % | 1 | 4 | |
| K338A | K156A | 5,8E+06 | 1,1E+06 | 19 % | 2 | 2 | |
| K338S | K156S | 3,2E+06 | 1,7E+05 | 5 % | 3 | 2 | |
| K338V | K156V | 3,4E+06 | 2,1E+05 | 6 % | 3 | 2 | |
| T327A/K338A | T144A/K156A | 1,5E+06 | 4,6E+05 | 32 % | 7 | 2 | |
| T327L/K338M | T144L/K156M | 5,4E+06 | 2,7E+06 | 50 % | 2 | 2 | |
| E200V/T327L/K338M | E21V/T144L/K156M | 3,4E+06 | 1,2E+06 | 36 % | 3 | 2 | |
| E200V/T327L/S334A/ K338M | E21V/T144L/S152A/ K156M | 3,8E+06 | 6,9E+05 | 18 % | 3 | 2 | |
| V196S/I211S/G219H | V17S/I32S/G40H | 2,5E+05 | 3,9E+04 | 15 % | 39 | 4 | |
| D119N/G121S/V196S/L211S/G219H | D[119]N/G[121]S/V17S/I32S/G40H | 9,5E+04 | n.d. | n.d. | 102 | 1 | |
| G114N/V196S/I211S/ G219H | G[114]N/V17S/I32S /G40H | 5,6E+04 | n.d. | n.d. | 173 | 1 | |
| G114N/D119N/G121S/V196S/I211S/G219H | G[114]N/D[119]N/G [121] S/V17S/I32S/G 40H | 6,5E+04 | 2,2E+04 | 34 % | 149 | 5 | |
| G197A/I211S/G219H | G18A/I32S/G40H | 1,2E+06 | 5,2E+05 | 44 % | 8 | 2 | |
| I195L/I211S/G219H | I16L/I32S/G40H | 3,1E+05 | 3,1E+04 | 10 % | 31 | 4 | |
| V196S/N214D | V17S/N35D | 7,6E+05 | 4,0E+05 | 53 % | 13 | 2 | |

Tabla 22. Constante de segundo orden para la inhibición mediante AT/U FH

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimi tripsina) | k_{app} ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | $k_{app-wt}/k_{app-mut}$ | n |
|------------------------------------|---|------------------------------|-------------------------------|------|--------------------------|----|
| V196S/N214A | V17S/N35A | 1,4E+06 | 1,0E+05 | 7 % | 7 | 2 |
| V196S/N214S | V17S/N35S | 9,0E+05 | 8,4E+04 | 9 % | 11 | 2 |
| V196S/E216R | V17S/E37R | 4,5E+05 | 1,4E+05 | 31 % | 22 | 2 |
| V196S/N216K | V17S/E37K | 2,5E+05 | 2,7E+03 | 1 % | 39 | 2 |
| V196S/N216A | V17S/E37A | 3,3E+05 | 8,4E+03 | 3 % | 29 | 2 |
| V196S/N216S | V17S/E37S | 4,7E+05 | 4,1E+03 | 1 % | 21 | 2 |
| V196S/E218R | V17S/E39R | 4,1E+05 | 8,8E+04 | 22 % | 24 | 2 |
| V196S/N218K | V17S/E39K | 2,1E+05 | 2,3E+04 | 11 % | 48 | 2 |
| V196S/N218A | V17S/E39A | 5,4E+05 | 5,5E+04 | 10 % | 18 | 4 |
| V196S/R332A | V17S/R150A | 2,9E+04 | 6,7E+03 | 23 % | 339 | 3 |
| V196S/R332D | V17S/R150D | 5,6E+03 | 1,9E+03 | 35 % | 1.754 | 6 |
| V196S/R332E | V17S/R150E | 2,3E+04 | 4,9E+03 | 21 % | 428 | 2 |
| V196S/R332S | V17S/R150S | 9,1E+03 | 7,9E+03 | 86 % | 1.070 | 5 |
| V196S/R332G | V17S/R150G | 3,3E+03 | 1,4E+03 | 43 % | 2.926 | 6 |
| V196S/R326D | V17S/R143D | 6,3E+03 | 4,9E+03 | 78 % | 1.555 | 3 |
| V196S/R326M | V17S/R143M | 3,5E+04 | 2,9E+03 | 8 % | 280 | 4 |
| V196S/R326N | V17S/R143N | 2,5E+04 | 3,0E+03 | 12 % | 396 | 4 |
| V196S/R326Q | V17S/R143Q | 5,2E+04 | 1,1E+04 | 21 % | 186 | 4 |
| V196S/R273E | V17S/R93E | 2,3E+04 | 4,2E+03 | 18 % | 415 | 2 |
| V196S/R273A | V17S/R93A | 7,8E+03 | 1,2E+03 | 15 % | 1.257 | 4 |
| V196S/R424A | V17S/R240A | 2,7E+04 | 1,4E+03 | 5 % | 364 | 2 |
| V196S/R424E | V17S/R240E | 8,3E+03 | 2,7E+03 | 33 % | 1.173 | 2 |
| V196S/K420A | V17S/K236A | 2,5E+04 | 3,9E+03 | 15 % | 389 | 4 |
| V196S/K420E | V17S/K236E | 1,4E+04 | 8,4E+03 | 58 % | 672 | 4 |
| V196S/R306E | V17S/R125A | 3,5E+04 | 5,4E+03 | 16 % | 281 | 4 |
| V196S/K276A | V17S/K96A | 4,7E+05 | 1,6E+05 | 34 % | 21 | 4 |
| V196S/K276E | V17S/K96E | 3,2E+05 | 1,8E+05 | 57 % | 30 | 4 |
| V196S/K420E/R424E | V17S/K236E/R240E | 5,1E+03 | 2,8E+01 | 1 % | 1.929 | 2 |
| V196S/K338A | V17S/K156A | 4,5E+04 | 2,5E+04 | 55 % | 218 | 4 |
| V196S/K338S | V17S/K156S | 2,3E+04 | 7,6E+03 | 33 % | 421 | 10 |
| V196S/E215N/N217S | V17S/E36N/N38S | 7,5E+05 | 6,4E+03 | 1 % | 13 | 2 |
| V196S/E264N/E266S | V17S/E84N/E86S | 8,7E+05 | 6,1E+04 | 7 % | 11 | 2 |
| D119N/G121S/V196S/E264N/E266S | D[119]N/G[121]S/V17S/E84N/E86S | 4,0E+05 | 1,8E+04 | 4 % | 24 | 2 |
| G114N/V196S/E264N /E266S | G[114]N/V17S/E84N /E86S | 2,0E+05 | n.d. | n.d. | 48 | 1 |
| V196S/R429N/I431S | V17S/R245N/I247S | 2,4E+05 | 5,6E+03 | 2 % | 40 | 2 |

Tabla 22. Constante de segundo orden para la inhibición mediante AT/U FH

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimi tripsina) | k_{app} ($M^{-1}s^{-1}$) | $\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$) | %CV | $k_{app-wt}/k_{app-mut}$ | n |
|------------------------------------|---|------------------------------|-------------------------------|------|--------------------------|---|
| V196S/R243N/K245S | V 17S/R63N/K65S | 5,0E+05 | 1,2E+04 | 2 % | 19 | 2 |
| V196S/T293N/R295S | V17S/T113N/R115S | 6,1E+05 | 1,2E+02 | 0 % | 16 | 2 |
| V196S/D389N/Y391S | V17S/D205N/Y207S | 7,6E+05 | 1,7E+04 | 2 % | 13 | 2 |
| V196S/K388N | V17S/K204N | 7,1E+05 | 3,0E+04 | 4 % | 14 | 4 |
| D119N/G121S/V196S/K388N | D[119]N/G[121]S/V17S/K204N | 1,4E+05 | 4,9E+03 | 4 % | 71 | 2 |
| V196S/T428N/G430S | V17S/T244N/G246S | 9,5E+05 | 1,6E+04 | 2 % | 10 | 2 |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | V17S/I32S/G40H/E84N/E86S | 2,1E+05 | 1,5E+04 | 7 % | 46 | 2 |
| D119N/G121S/V196S/ | D[119]N/G[121]S/V | 1,4E+05 | 1,7E+04 | 12 % | 69 | 2 |
| L211S/G219H/E264N/ E266S | 17S/I32S/G40H/E84 N/E86S | | | | | |
| G114N/V196S/I211S/ | G[114]N/V17S/I32S | 8,3E+04 | 1,4E+04 | 16 % | 118 | 3 |
| G219H/E264N/E266S | /G40H/E84N/E86S | | | | | |
| V196S/E264N/E266S/ K388N | V17S/E84N/E86S/K 204N | 2,7E+05 | 1,8E+04 | 7 % | 37 | 2 |
| D119N/G121S/V196S/ | D[119]N/G[121]S/V | 6,2E+04 | 7,3E+03 | 12 % | 157 | 4 |
| L211S/G219H/K388N | 17S/I32S/G40H/K20 4N | | | | | |
| G114N/V196S/I211S/ | G[114]N/V17S/I32S | 3,7E+04 | 2,1E+03 | 6 % | 267 | 2 |
| G219H/K388N | /G40H/K204N | | | | | |
| V196S/I211S/G219H/ | V17S/I32S/G40H/E | 2,2E+05 | 1,2E+04 | 6 % | 44 | 2 |
| E264N/E266S/K388N | 84N/E86S/K204N | | | | | |

Ejemplo 6.

Determinación de la unión funcional del cofactor (K_{D-app}) de FXa por su cofactor, Factor Va

5 La unión funcional del cofactor (K_{D-app}) de las variantes de FXa por el cofactor Factor Va (FVa) en presencia o saturación de sustrato, protrombina (FII), se evaluó indirectamente en un ensayo fluorogénico mediante análisis de la actividad de la trombina (FIIa), generada tras activación mediante FXa, sobre el sustrato sintético Pefaf fluor TH. Se usó un intervalo de concentraciones de FVa para calcular la constante de velocidad cinética aparente (K_{D-app}) cuando el cofactor (FVa) estaba en exceso de al menos 1000 veces respecto a la concentración de la proteasa de activación (FXa). El ensayo se diseñó como una variación del ensayo descrito en el Ejemplo 4 (Determinación de la actividad catalítica de FXa por su sustrato, protrombina (FII)) donde el cofactor (FVa) a varias concentraciones se preincubó con FXa en presencia de vesículas de fosfolípidos que forman el complejo de protrombinasa antes de evaluar la actividad catalítica con niveles de saturación del sustrato, protrombina (FII). En resumen, las variantes de FXa activadas y con el sitio activo titulado se diluyeron en un Tampón que contenía calcio con vesículas de fosfolípidos, se mezclaron con varias concentraciones de FVa para formar el complejo de protrombinasa y posteriormente se mezclaron con concentraciones de saturación de protrombina y el sustrato fluorescente, Pefaf fluor TH (H-D-CHA-Ala-Arg-AMC, Centerchem) para iniciar el ensayo. La liberación del fluoróforo libre, AMC (7-amino-4-metilcumarina) tras la catálisis de Pefaf fluor TH por la trombina generada se midió después de forma continua durante un periodo de tiempo, y se determinaron las constantes de velocidad de las variantes de FXa.

A. Protocolo de ensayo

25 Para los ensayos que evalúan la cinética de la activación de protrombina mediante FXa en presencia de varias concentraciones de FVa (FVa purificado de plasma, Heamatologic Technologies, Inc.) y fosfolípidos, las variantes de FXa se expresaron, se purificaron, se activaron, y el sitio activo se tituló como se describe en los Ejemplos 1-3, más arriba. A continuación, las variantes de FXa se diluyeron en serie hasta concentraciones de 0,4-8 pM (4x) en un volumen de 0,25 ml de 1 x Tampón A (Hepes 20 mM/NaCl150 mM/CaCl₂ 5 mM/BSA al 0,1 %/PEG-8000 al 0,1 %, pH 7,4). FVa se diluyó adicionalmente hasta varias concentraciones superiores dependiendo de las variantes analizadas, pero comprendidas de forma típica en 2-60 nM (4x de la dosis superior) en un volumen de 1,0 ml de 1 x Tampón A que contenía 80 μ M de fosfolípidos recientemente suspendidos (75 % de fosfatidilcolinas (PC)/25 % de fosfatidilserina (PS); vesículas PC/PS ~ 120 nm de diámetro; Avanti Polar Lipids). Las soluciones de FVa se

diluyeron en serie de 1,8 veces en una placa de polipropileno de 12 canales de pocillos profundos con un volumen final de 0,4 ml de 1x Tampón A que contenía 80 µM de vesículas PC/PS (4x). La serie de dilución de FVa se mezcló posteriormente 1:1 con las diluciones 4x FXa (25 µl cada) en una placa de ensayo de 96 pocillos de fondo redondo de color negro según un mapa de placa predefinido (4 variantes de FXa/placa) y se preincubaron a durante 15 min a 25 °C para formar complejos de protrombinasa equilibrados con varias concentraciones de FVa. Las soluciones 2x finales (50 µl) fueron las siguientes: variante de FXa 0,2-4 pM, FVa 60-0 nM y vesículas PC/PS 40 µM.

Una solución de protrombina (FII) con el sitio activo 5000 nM (2x) titulado y tratada con DFP/FPR-cmk se preparó en 30 ml de 1 x Tampón que contenía sustrato Pefafuor TH 0,1 mM proporcionando volumen suficiente para 4 ensayos. Esto representa una concentración de saturación 2x de protrombina (FII), que estaría al menos 10-50 veces por encima de los valores de K_M recogidos en el Ejemplo 4, Tabla 17. Las reacciones del ensayo se iniciaron de forma típica usando un sistema de gestión de líquidos BioMek FX programado para dispensar 50 µl de las diluciones FII/Pefafuor TH en 4 placas de ensayo que contenían 50 µl de cada variante de FXa y dilución de FVa (complejos de protrombinasa). Las concentraciones finales de los reactivos del ensayo fueron las siguientes: FXa 0,1-2,0 pM, vesículas PC/PS 20 µM, Pefafuor TH 50 µM, protrombina (FII) 2,5 µM y 0-0,5 nM, 0-1,0 nM, 0-3,0 nM o 0-10 nM de diluciones de FVa, aunque a veces se pueden emplear otros intervalos de dilución de FVa. Las reacciones se siguieron en un lector de fluorescencia de placas SpectraMax durante 30 min a 25 °C. Una curva patrón de AMC sirvió como factor de conversión para las URF a µM en los cálculos de análisis posterior de los datos usando un intervalo de dosis comprendido de 0 µM a 100 µM AMC.

B. Análisis de los datos

Para determinar la afinidad funcional de las variantes de FXa para FVa según su actividad catalítica, los datos en bruto recogidos por la aplicación SoftMax Pro (Molecular Devices) se exportaron como archivos .TXT. Se realizó un análisis de datos no lineal adicional con el programa informático ActivityBase usando el módulo de análisis de datos XE Runner (IDBS Software). Los análisis de datos se realizaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 4C con modificaciones poco importantes. La plantilla Abase se configuró para ajustar automáticamente las velocidades de la reacción parabólica ($\mu\text{M/s}^2$) de las variantes de FXa estudiadas para cada concentración de FVa mediante la función de una hipérbola rectangular convencional (es decir, ecuación de Michaelis-Menten) dada por la ecuación (10) para ajustar los valores de V_{max} y $K_{D\text{-app}}$.

Ecuación (10)

$$\text{Velocidad de reacción } (\mu\text{M/s}^2) = \frac{V_{\text{max}} [S_n]}{K_{D\text{-app}} + [S_n]}$$

La Tabla 23 establece la afinidad funcional ($K_{D\text{-app}}$) para cada una de las variantes de FXa analizada. También se analizó si el FXa recombinante natural (denominado como FXa WT) y el FXa purificado de plasma (Haematologic Technologies, Inc). La Tabla 23 presenta los resultados expresados como la constante cinética de afinidad, $K_{D\text{-app}}$ (nM), y también como cociente entre la afinidad funcional del FXa natural en comparación con el del variante FXa, en el que la afinidad funcional de cada variante de FXa está definido por el valor de $K_{D\text{-app}}$ (nM) para la activación del sustrato, protrombina (FII). Cuando la actividad de la variante de FXa se comparó con la del FXa natural, se comparó con un polipéptido de FXa recombinante natural que se expresó y se purificó con las mismas condiciones que las usadas para los polipéptidos variantes de FXa para garantizar que cualquier diferencia en la actividad era resultado de las una o varias mutaciones, y no el resultado de diferencias en, por ejemplo, modificaciones posteriores a la traducción asociadas con diferentes sistemas de expresión. Por lo tanto, el polipéptido de FXa natural usado para la comparación era el FXa recombinante natural generado mediante la clonación el gen FX, cuya secuencia se define en la SEQ ID NO:1, y expresado en células CHO como un polipéptido con una secuencia de aminoácidos definida como los aminoácidos 1-139 y 195-448 de la SEQ ID NO:134, como se describe en los Ejemplos 1-3 (es decir, el polipéptido de FXa WT). La desviación estándar (S.D.), coeficiente de variación (como porcentaje; %CV) y el número de ensayos realizados (n) también se proporcionan en la Tabla 23.

Aunque algunas variantes mostraron afinidades similares a las naturales o aumentos nominales en $K_{D\text{-app}}$ (por ejemplo FXa-R326Y y FIXa-FXa-L211S/G219H) algunas variantes mostraron disminuciones notables en la afinidad funcional con aumentos de más de 10 - 100 veces en $K_{D\text{-app}}$. Las variantes con un aumento significativo en la dependencia del cofactor (Ejemplo 4) mostraron las mayores disminuciones en la afinidad funcional por el cofactor. Por ejemplo, FXa-V196S/R326Q, FXa-V196S/K420E/R424E, FXa-V196S/R273E, y FXa-V196S/K338S están dentro de este grupo.

| Tabla 23. Afinidad funcional por el cofactor de las variantes de FXa ($K_{D\text{-app}}$) | | | | | | | |
|---|---|-------------------------|------------|------|------------------------------------|---|--|
| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | $K_{D\text{-app}}$ (nM) | ±S.D. (nM) | %CV | $K_{D\text{-WT}}/K_{D\text{-mut}}$ | n | |
| FXa plasma | FXa plasma | 0,01 | 0,00 | 21 % | 1,64 | 5 | |

| Tabla 23. Afinidad funcional por el cofactor de las variantes de FXa (K_{D-app}) | | | | | | | |
|--|---|------------------|-----------------|------|----------------------|----|--|
| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | K_{D-app} (nM) | \pm S.D. (nM) | %CV | K_{D-WT}/K_{D-mut} | n | |
| FX WT | FX WT | 0,02 | 0,01 | 47 % | 1,00 | 3 | |
| I195L | I16L | 0,18 | 0,06 | 33 % | 0,09 | 10 | |
| V196S | V17S | 0,39 | 0,12 | 32 % | 0,04 | 14 | |
| Q56N/Q58S/V196S | Q[56]N/Q[58]S/V17S | 0,49 | 0,18 | 37 % | 0,03 | 2 | |
| K62N/G64S/V196S | K[62]N/G[64]S/V17S | 0,72 | 0,25 | 34 % | 0,02 | 2 | |
| E67N/V196S | E[67]N/V17S | 1,08 | 0,13 | 12 % | 0,01 | 2 | |
| L73N/G75S/V196S | L[73]N/G[75]S/V17S | 0,45 | 0,07 | 16 % | 0,04 | 2 | |
| G75N/E77S/V196S | G[75]N/E[77]S/V17S | 0,90 | 0,28 | 31 % | 0,02 | 2 | |
| G114N/V196S | G[114]N/V17S | 0,73 | 0,24 | 32 % | 0,02 | 3 | |
| D119N/G121S/V196S | D[119]N/G[121]S/V17S | 0,62 | 0,19 | 30 % | 0,03 | 3 | |
| K122S/V196S | K[122]S/V17S | 0,46 | 0,17 | 37 % | 0,03 | 3 | |
| E51N/V196S | E[51]N/V17S | 0,38 | 0,05 | 14 % | 0,04 | 2 | |
| Q58N/K60S/V196S | Q[58]N/K[60]S/V17S | 0,52 | 0,19 | 36 % | 0,03 | 3 | |
| L211S/G219H | L32S/G40H | 0,02 | 0,00 | 7 % | 0,67 | 3 | |
| V196L | V17L | 0,06 | 0,01 | 21 % | 0,27 | 3 | |
| V196T | V17T | 0,31 | n.d. | n.d. | 0,05 | 1 | |
| G197S | G18S | 0,18 | 0,07 | 39 % | 0,09 | 3 | |
| R326A | R143A | 0,03 | n.d. | n.d. | 0,60 | 1 | |
| R326S | R143S | 0,03 | n.d. | n.d. | 0,55 | 1 | |
| R326T | R143T | 0,04 | n.d. | n.d. | 0,42 | 1 | |
| R326Q | R143Q | 0,03 | n.d. | n.d. | 0,50 | 1 | |
| R326N | R143N | 0,04 | 0,01 | 22 % | 0,44 | 2 | |
| R326M | R143M | 0,04 | n.d. | n.d. | 0,39 | 1 | |
| R326K | R143K | 0,03 | n.d. | n.d. | 0,60 | 1 | |
| R326Y | R143Y | 0,02 | 0,00 | 2 % | 0,86 | 2 | |
| K338A | K156A | 0,20 | n.d. | n.d. | 0,08 | 1 | |
| K338S | K156S | 0,15 | 0,04 | 25 % | 0,11 | 3 | |
| K338N | K156N | 0,06 | n.d. | n.d. | 0,25 | 1 | |
| K338R | K156R | 0,02 | 0,01 | 55 % | 0,73 | 2 | |
| K338V | K156V | 0,15 | 0,05 | 35 % | 0,11 | 3 | |
| K338M | K156M | 0,36 | n.d. | n.d. | 0,04 | 1 | |
| T327A/K338A | T144A/K156A | 0,24 | 0,15 | 59 % | 0,06 | 2 | |
| T327L/K338M | T144L/K156M | 0,03 | 0,00 | 17 % | 0,61 | 2 | |
| E200V/T327L/S334A/K338M | E21V/T144L/S152A/K156M | 0,11 | 0,04 | 37 % | 0,14 | 3 | |
| V196S/I211S/G219H | V17S/I32S/G40H | 0,32 | 0,09 | 29 % | 0,05 | 2 | |
| I195L/I211S/G219H | I16L/I32S/G40H | 0,37 | 0,05 | 14 % | 0,04 | 3 | |

Tabla 23. Afinidad funcional por el cofactor de las variantes de FXa (K_{D-app})

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | K_{D-app} (nM) | \pm S.D. (nM) | %CV | K_{D-WT}/K_{D-mut} | n |
|------------------------------------|---|------------------|-----------------|------|----------------------|---|
| V196S/N214D | V17S/N35D | 0,32 | 0,07 | 23 % | 0,05 | 3 |
| V196S/N214A | V17S/N35A | 0,38 | n.d. | n.d. | 0,04 | 1 |
| V196S/N214S | V17S/N35S | 0,33 | n.d. | n.d. | 0,05 | 1 |
| V196S/E216R | V17S/E37R | 0,16 | 0,06 | 38 % | 0,10 | 3 |
| V196S/N216K | V17S/E37K | 0,25 | 0,06 | 23 % | 0,06 | 2 |
| V196S/N216A | V17S/E37A | 0,29 | 0,12 | 41 % | 0,05 | 2 |
| V196S/N216S | V17S/E37S | 0,40 | 0,13 | 31 % | 0,04 | 3 |
| V196S/E218R | V17S/E39R | 0,34 | 0,12 | 34 % | 0,05 | 3 |
| V196S/N218K | V17S/E39K | 0,29 | 0,05 | 18 % | 0,05 | 2 |
| V196S/N218A | V17S/E39A | 0,36 | 0,13 | 35 % | 0,04 | 3 |
| V196S/R332A | V17S/R150A | 0,54 | n.d. | n.d. | 0,03 | 1 |
| V196S/R332D | V17S/R150D | 1,70 | 0,60 | 35 % | 0,01 | 3 |
| V196S/R332E | V17S/R150E | 0,49 | 0,04 | 7 % | 0,03 | 2 |
| V196S/R332S | V17S/R150S | 0,56 | 0,11 | 19 % | 0,03 | 2 |
| V196S/R332G | V17S/R150G | 0,56 | 0,12 | 22 % | 0,03 | 3 |
| V196S/R326D | V17S/R143D | 1,02 | 0,33 | 32 % | 0,02 | 3 |
| V196S/R326M | V17S/R143M | 0,56 | 0,27 | 48 % | 0,03 | 4 |
| V196S/R326N | V17S/R143N | 2,21 | 0,15 | 7 % | 0,01 | 2 |
| V196S/R326Q | V17S/R143Q | 1,21 | 0,26 | 21 % | 0,01 | 3 |
| V196S/R273E | V17S/R93E | 15,04 | 3,42 | 23 % | 0,001 | 3 |
| V196S/R273A | V17S/R93A | 2,45 | 0,08 | 3 % | 0,01 | 3 |
| V196S/R424A | V17S/R240A | 5,86 | 0,11 | 2 % | 0,003 | 2 |
| V196S/R424E | V17S/R240E | 6,31 | 1,00 | 16 % | 0,002 | 3 |
| V196S/K420A | V17S/K236A | 0,37 | n.d. | n.d. | 0,04 | 1 |
| V196S/K420E | V17S/K236E | 0,39 | n.d. | n.d. | 0,04 | 1 |
| V196S/R306E | V17S/R125A | 2,25 | 1,49 | 66 % | 0,01 | 5 |
| V196S/K276A | V17S/K96A | 0,62 | 0,11 | 18 % | 0,03 | 3 |
| V196S/K276E | V17S/K96E | 0,70 | 0,02 | 3 % | 0,02 | 3 |
| V196S/K420E/R424E | V17S/K236E/R240E | 20,86 | 13,15 | 63 % | 0,001 | 4 |
| V196S/K338A | V17S/K156A | 0,93 | 0,24 | 26 % | 0,02 | 3 |
| V196S/K338S | V17S/K156S | 0,91 | 0,19 | 21 % | 0,02 | 3 |
| V196S/E215N/N217S | V17S/E36N/N38S | 0,28 | 0,03 | 10 % | 0,06 | 2 |
| V196S/E264N/E266S | V17S/E84N/E86S | 0,48 | 0,03 | 6 % | 0,03 | 2 |
| V196S/R429N/I431S | V17S/R245N/I247S | 1,06 | 0,34 | 32 % | 0,01 | 2 |
| V196S/T293N/R295S | V17S/T113N/R115S | 0,64 | 0,15 | 23 % | 0,02 | 2 |
| V196S/K388N | V17S/K204N | 0,59 | 0,06 | 10 % | 0,03 | 2 |

| Mutación (Numeración de FX maduro) | Mutación (Numeración de quimi tripsina) | K_{D-app} (nM) | \pmS.D. (nM) | %CV | K_{D-WT}/K_{D-mut} | n |
|---|--|------------------------------------|----------------------------------|------------|--|----------|
| V196S/T428N/G430S | V17S/T244N/G246S | 0,73 | 0,10 | 14 % | 0,02 | 2 |

Ejemplo 7

Análisis farmacocinéticos de polipéptidos de FXa

Las propiedades farmacocinéticas (PK) de los polipéptidos variantes de FXa se evaluaron midiendo la cantidad de variante de FXa en plasma de ratón en varios puntos temporales después de la administración intravenosa. Se usó un ensayo ELISA para cuantificar la proteína FXa total en plasma de ratón para evaluar las propiedades farmacocinéticas.

A. Animales.

Ratones CD-1 macho (30-40 g), suministrados por Charles Rivers Laboratories (Hollister, CA) se mantuvieron en cuarentena durante al menos 3 días antes del tratamiento. Para los estudios de PK en serie, los ratones CD-1 macho (30-37 g) se equiparon con una cánula interna en la vena yugular. Agua del grifo filtrada y alimento estuvieron disponibles *ad libitum* antes de usar en experimentos PD o PK.

B. Dosificación y extracción de sangre

Los ratones (N=3 por punto temporal) recibieron polipéptidos de FXa por vía intravenosa (0,5 mg/kg, volumen de dosis 2 ml/kg) mediante la vena de la cola. En el momento adecuado (2-960 min) después de la dosificación, los animales se anestesiaron, y se extrajo sangre (0,5-1 ml) usando punción cardiaca terminada en jeringas que contenían citrato. Cuando no había cantidad suficiente de proteína para los estudios PK finales, se usó extracción de sangre en serie de un total de 4-6 animales y puntos temporales escalonados; se usaron dos ratones para cada ciclo temporal completo para recoger todos los puntos temporales sin extraer un exceso de volumen sanguíneo. Para los experimentos de extracción de sangre en serie, se tomaron muestras de sangre en animales conscientes sujetos retirando en primer lugar una pequeña cantidad de sangre a una jeringuilla de 0,1 ml que contenía suero salino al 0,9 %. A continuación se conectó una jeringuilla que contenía 4,5 μ l de citrato de sodio 0,1 M y se extrajo 0,05 ml de sangre en la jeringa, y la sangre se transfirió a un tubo de 1,5 ml. La jeringuilla inicial se volvió a conectar, y 0,07 ml de suero salino se devolvieron a través de la cánula. La cánula se tapó hasta el siguiente punto temporal, cuando el proceso se repitió. Para los estudios tanto en serie como terminales, las muestras de sangre se centrifugaron en los 15 minutos posteriores a su recogida (9000 rpm, 8 minutos, 4 °C) y el plasma se eliminó y se congeló de forma ultrarrápida inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenó congelado (-70 °C) hasta su análisis.

C. Evaluación PK.

Las muestras de sangre citrada se recogieron en varios puntos temporales hasta 960 min después de la dosis (es decir, antes de la dosis, 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 360, y 960 min) mediante punción cardiaca par los experimentos terminales o el catéter interno para los experimentos en serie, como se describe en el Ejemplo 7B anterior. Las concentraciones de FXa en plasma se determinaron usando un ELISA específico del Factor X/Xa humano. Un par correspondiente de anticuerpos policlonales de detección y captura (n.º FX-EIA-C, Affinity Biologicals, Ancaster, ON) se utilizó. El ELISA de FX/Xa ELISA proporcionó una medida usada para determinar los parámetros farmacocinéticos de la variante de interés.

En resumen, un anticuerpo policlonal purificado por afinidad contra FX/Xa (1:500) se revistió sobre los pocillos de una placa en Tampón de revestimiento (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM, pH 9,6) durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron con Tampón de lavado (PBST) y las muestras de plasma que contenían FX/Xa se diluyeron en Diluyente de muestra (Hepes 100 mM, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, BSA al 1,0 %, Tween-20 al 0,1 %, pH 7,2) que se aplicaron. Todas las muestras y patrones se normalizaron a una concentración final de 1:200 de plasma de ratón CD-1 diluido en Diluyente de muestra para mantener la coherencia. Las muestras de plasma se diluyeron 1:200 y 1:1000 en la placa, seguido de una dilución 1:4 posterior proporcionando un conjunto de dilución adicional de 1:1000 y 1:4000. Tras el lavado de la placa para eliminar el material no unido, se añadió un anticuerpo de detección conjugado con peroxidasa (1:1000) a la placa para unirse al FX/Xa capturado. Tras el lavado de la placa para eliminar el anticuerpo conjugado no unido, se inició la actividad peroxidasa mediante incubación con sustrato quimioluminiscente (SuperSignal Femto, n.º 37074, Thermo Scientific). La señal quimioluminiscente se midió con un lector de fluorescencia en placas SpectraMax. La curva patrón de la actividad peroxidasa es característicamente lineal para un intervalo de concentraciones de 0,82 pg/ml a 25 ng/ml. La propia variante de FXa se usó en la curva patrón para eliminar las diferencias en la afinidad del anticuerpo para diferenciar entre variantes de FXa. Cada muestra se midió en dos placas de ensayo independientes, y estas mediciones comprendidas en el

intervalo lineal de la curva patrón se usaron para calcular la concentración de las variantes de FXa en la muestra de plasma.

D. Análisis de datos PK.

5 Los parámetros PK (ELISA) de los estudios en ratones con variantes de FXa se calcularon usando un análisis no compartimentado en WinNonLin (v5,1, Pharsight Corp., Mountain View, CA). La PK de las variantes de FXa siguió una disminución en plasma aparentemente biexponencial. Los parámetros seleccionados para cada variante analizada se proporcionan en la Tabla 25. Los parámetros PK incluyen semivida (terminal, min), MRT (MRT_{0-final}, min), Área bajo la curva (ABC), 0-final (min.µg/ml)/Dosis (mg/kg); Concentración máxima (C_{max}; (µg/ml)/Dosis (µg/kg), Vd (ml/kg) y aclaramiento (Cl, ml/min/kg).

Tabla 24. Definiciones y fórmulas usadas para calcular los parámetros farmacocinéticos.

| Término/Fórmula | Definición |
|---|---|
| Semivida en plasma | la semivida del polipéptido de FXa durante la fase terminal del perfil de concentración de FXa en plasma frente al tiempo |
| Beta T _{1/2} (T _{1/2 β}) | calculado como -ln2 dividido por la pendiente negativa durante la fase terminal de la gráfica log-lineal de la curva de concentración de FXa en plasma frente al tiempo |
| MRT _{0-final} | el tiempo medio que el polipéptido de FXa reside en el cuerpo; calculado como ABCM _{0-final} /ABC 0-final, donde ABCM _{0-final} es el área total bajo el primer momento de la curva frente al tiempo y ABC es como se define a continuación |
| ABC _{0-final} /Dosis | calculada como [ABC _(0-t)], donde t es el último punto temporales con una concentración del polipéptido de FXa mensurable en plasma dividida por la dosis IV (mg/kg) |
| ABC _{0-inf} /Dosis | calculada como [ABC _(0-t) + Ct/(ln2/ T _{1/2 β})], donde t es el último punto temporales con una concentración del polipéptido de FXa mensurable en plasma dividida por la dosis IV (mg/kg) |
| C _{max} /Dosis | (ug/ml por mg/kg) |
| C _{max} | el tiempo posterior a la dosis correspondiente a la concentración máxima de FXa medida en plasma, |
| Cl | aclaramiento sistémico calculado como (Dosis / ABC _{0-inf}) |
| V _{ss} | volumen de distribución en estado estacionario; calculado como MRT*Cl |
| V _z | volumen de distribución basado en la constante (β) de eliminación terminal; calculated as Cl/ (ln2/T _{1/2 β}) |

15

20

Tabla 25. Propiedades PK de las variantes de FXa evaluadas mediante ELISA

| Mutante (Numeración de maduro) | Mutante (Numeración de Químo) | n | Beta | T _{1/2} | T _{máx.} | C _{max} /Dosis | ABC _{0-final} /Dosis | ABC _{0-inf} /Dosis | Vz | IC | MRT (0-final) | MRT (0-inf) |
|--------------------------------|-------------------------------|---|------|------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------|------|---------------|-------------|
| I195L | I16L | 4 | 320 | 4 | 4 | 16 | 548 | 788 | 577 | 1,3 | 81 | 312 |
| E82S/V196S | E[82]S/V17S | 1 | 403 | 22 | 29 | 1719 | 3388 | 172 | 0,3 | 0,3 | 272 | 120 |
| V196S | V17S | 4 | 523 | 3 | 30 | 1840 | 2757 | 306 | 0,44 | 0,44 | 241 | 743 |
| G197S | G18S | 2 | 225 | 6 | 17 | 1584 | 2383 | 134 | 0,43 | 0,43 | 125 | 310 |
| K338A | K156A | 2 | 462 | 2 | 21 | 1411 | 1844 | 350 | 0,56 | 0,56 | 267 | 577 |
| K338S | K156S | 2 | 570 | 4 | 16 | 795 | 1770 | 402 | 0,71 | 0,71 | 106 | 715 |
| V196S/I211 S/G219H | V17S/I32S/G40H | 2 | 405 | 4 | 23 | 1408 | 1723 | 336 | 0,58 | 0,58 | 248 | 483 |
| I195L/I211 S/G219H | I16L/I32S/G40H | 2 | 337 | 4 | 23 | 1095 | 1708 | 284 | 0,59 | 0,59 | 111 | 377 |
| V196S/R332 A | V17S/R150A | 1 | 172 | 5 | 19 | 1205 | 1522 | 163 | 0,66 | 0,66 | 110 | 213 |
| V196S/R332D | V17S/R150D | 2 | 427 | 2 | 14 | 1250 | 1503 | 410 | 0,67 | 0,67 | 249 | 473 |
| V196S/R332 S | V17S/R150S | 2 | 516 | 2 | 20 | 632 | 1471 | 382 | 1,07 | 1,07 | 67 | 626 |
| V196S/R332 G | V17S/R150G | 1 | 266 | 2 | 22 | 1029 | 1463 | 262 | 0,68 | 0,68 | 101 | 292 |
| E67N/N96 S | E[67]N/V17S | 2 | 322 | 2 | 20 | 1113 | 1396 | 328 | 0,72 | 0,72 | 157 | 337 |
| R86N/I88S/V196S | R[86]N/I[88] SA/17S | 2 | 249 | 2 | 21 | 747 | 1353 | 267 | 0,74 | 0,74 | 75 | 309 |
| D95N/D97S/V196S | D[95]N/D[97] SA/17S | 2 | 162 | 10 | 16 | 938 | 1333 | 178 | 0,76 | 0,76 | 75 | 195 |
| D119N/G12 1SA/196S | D[119]N/G[1 2]1SA/17S | 2 | 473 | 2 | 21 | 755 | 1312 | 566 | 0,82 | 0,82 | 87 | 489 |
| L83N/V196 S | L[83]N/V17S | 2 | 213 | 4 | 23 | 981 | 1298 | 251 | 0,84 | 0,84 | 91 | 226 |
| V196S/E264 N/E266S | V17S/E84N/E86S | 2 | 400 | 2 | 23 | 987 | 1296 | 441 | 0,77 | 0,77 | 149 | 383 |
| V196S/R243 N/K245S | V17S/R63N/K65S | 2 | 306 | 4 | 15 | 1150 | 1269 | 348 | 0,79 | 0,79 | 217 | 329 |
| V196S/D389 N/Y391S | V17S/D205N/Y207S | 2 | 267 | 2 | 23 | 1046 | 1250 | 308 | 0,87 | 0,87 | 166 | 306 |
| V196S/K388 | V17S/K204N | 1 | 514 | 2 | 18 | 639 | 1151 | 644 | 0,87 | 0,87 | 104 | 548 |
| G114N/V19 6S | G[114]N/V17S | 2 | 277 | 2 | 22 | 808 | 1132 | 342 | 0,91 | 0,91 | 93 | 285 |
| T85N/K87S/V196S | T[85]N/K[87]SA/17S | 2 | 309 | 2 | 19 | 933 | 1131 | 370 | 0,99 | 0,99 | 175 | 341 |

Tabla 25. Propiedades PK de las variantes de FXa evaluadas mediante ELISA

| Mutante (Numeración de maduro) | Mutante (Numeración de Quirno) | n | Beta T _{1/2} | T _{max.} | C _{max} /Dosis | ABC _{0-final} /Dosis | ABC _{0-inf} /Dosis | Vz | IC | MRT (0-final) | MRT (0-inf) |
|--------------------------------|---|----|-----------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----|------|---------------|-------------|
| G114N/V19 6S/I211S/G 219H | G[114]N/V17 S/I32S/G40H | 2 | 326 | 2 | 22 | 928 | 1098 | 412 | 0,92 | 137 | 289 |
| G78N/N80S/V196S | G[78]N/N[80]S/V17S | 1 | 195 | 2 | 14 | 631 | 768 | 373 | 1,31 | 93 | 194 |
| D119N/G12 264N/E266S | D[119]N/G[121]SN S/E84N/E86S | 17 | 384 | 2 | 12 | 611 | 741 | 689 | 1,39 | 139 | 351 |
| V196S/I211 64N/E266S | S/G219H/E2 V17S/I32S/ G40H/E84N/ E86S | 1 | 249 | 2 | 12 | 522 | 658 | 540 | 1,55 | 78 | 210 |
| D119N/G12 211S/G219H | 1S/V196S/I[D]119]N/G[121]SN S/I32S/G40H | 17 | 332 | 6 | 11 | 530 | 614 | 786 | 1,63 | 112 | 239 |

Ejemplo 8**Evaluación *in vivo* de la actividad procoagulante del polipéptido de FXa**

- 5 Se estableció una línea de ratones deficientes en FVIII (FVI11^{-/-}) como modelo de la hemofilia A en ratón para evaluar la actividad procoagulante de los polipéptidos de FXa. Los ratones se trataron con el polipéptido de FXa y se midió la cantidad de sangre perdida en 20 minutos para determinar la actividad procoagulante de los polipéptidos de FXa.

10 A. Evaluación *in vivo* de la actividad procoagulante del polipéptido de FXa

15 Ratones FVI^{-/-} se anestesiaron mediante administración intraperitoneal de un cóctel de ketamina/xilazina (45 mg/ml y 3,6 mg/ml en suero salino) y se colocaron en una plataforma calentada (39 °C) para garantizar que no había disminución de la temperatura corporal. El quirófano se mantuvo a una temperatura de 82 °F (28,8 °C). Diez (10) minutos antes de cortar la cola, la cola sumergió en 10 ml de PBS precalentado (tubo de centrifuga de 15 ml; 39 °C). Hasta quince ratones recibieron inyección con FXa recombinante humana (diluida en MES 5 mM pH 5,5, NaCl 100 mM) o polipéptidos de FXa modificados (diluidos en MES 5 mM pH 6, NaCl 100 mM) mediante la vena de la cola en una inyección única. Un grupo de ratones del control negativo recibieron solamente el tampón adecuado. En los casos en que no se realizó la inyección, el animal fue excluido del estudio.

20 La inyección con polipéptido de FXa o tampón se realizó 5 minutos antes de cortar la cola. El corte de la cola se realizó con una cuchilla a 5 mm del extremo de la cola, y la sangre se recogió en PBS durante 20 minutos. Al final del periodo de recogida, se evaluó la pérdida de sangre total. Los tubos de recogida se mezclaron, y una alícuota de 1 ml de cada muestra se tomó y se analizó para determinar el contenido de hemoglobina. Triton X-100 se diluyó 1:4 en agua estéril, y 100 µl se añadieron a las muestras de 1 ml para producir la hemolisis. A continuación, la absorbancia de las muestra se midió a una longitud de onda de 546 nm. Para calcular la cantidad de sangre perdida, la absorbancia se leyó sobre una curva patrón generada midiendo la absorbancia a 546 nm de volúmenes conocidos de sangre murina, diluida en PBS y hemolizada como anteriormente con Triton X-100. Los valores se expresaron como promedio ± SEM.

30

1. Estudio de respuesta a la dosis que evalúa la actividad coagulante de FXa natural

35 En un estudio, la actividad coagulante de FXa natural se analizó en ratones FVIII^{-/-} como se ha descrito anteriormente usando dosis de 0,1, 0,3 y 1 mg de FXa/kg de peso corporal. La sangre perdida en el grupo de control, que reciben Tampón (MES 5 mM pH 5,5, NaCl 100 mM) solamente fue 940,95 ± 30,78 µl (n = 9). El tratamiento con FXa natural a 0,1 mg/kg no tuvo efecto inhibitor sobre la pérdida de sangre (958,76 ± 31,91 µl, n = 9), mientras que el tratamiento con 0,3 mg/kg y 1 mg/kg dio como resultado una inhibición de la pérdida de sangre de 870,36 ± 53,92 µl y 802,62 ± 52,92 µl, respectivamente (n = 10 para cada dosis). No se pudo determinar un valor preciso para DE50 para este estudio, debido a la toxicidad observada para dosis elevadas de FXa natural.

40

45 En un estudio posterior, la dosis máxima tolerada (MTD) de FXa natural se determinó en 0,125 mg/kg. Un estudio posterior estudió la coagulación después de una sola dosis de 0,1 mg/kg. En este experimento, el tratamiento con FXa natural no tuvo efecto inhibitor sobre la pérdida de sangre, en comparación con el grupo tratado solo con tampón (890,14 ± 23,97 µl a 914,03 ± 23,48 µl (grupo del tampón, n = 15; grupo de dosis, n = 10). El análisis estadístico usando Kruskal-Wallis seguido por la prueba posterior de Dunn (experimento de respuesta a la dosis) y una prueba de Mann-Whitney (experimento en monodosis) respectivamente, demostraron que no había inhibición significativa de la pérdida de sangre con FXa natural a 0,1 mg/kg.

2. Estudios de respuesta a la dosis que evalúan la actividad coagulante de FXa-I195L (I16L)

50

55 La respuesta a la dosis del efecto procoagulante del mutante de FXa I195L (I16L de acuerdo con la numeración de quimiotripsina) se estudió en ratones FVIII^{-/-} como se ha descrito anteriormente. En el primer análisis, la pérdida de sangre en el grupo de los animales que recibieron solamente tampón (MES 5 mM pH 6, NaCl 100 mM) fue 930,74 ± 16,33 µl (n = 9). El tratamiento con FXa-I195L (I16L) a 0,2, 0,6 y 2 mg/kg dio como resultado una inhibición significativa de la pérdida de sangre: 717,34 ± 41,34 µl (n = 8), 704,93 ± 46,45 µl (n = 10), y 488 ± 95,65 µl (n = 11), respectivamente (p < 0,05 usando Kruskal-Wallis seguido por la prueba posterior de Dunn).

60 En un segundo ensayo, la pérdida de sangre en el grupo tratado solamente con tampón 910,85 ± 23,79 µl (n = 12). El tratamiento con FXa-I195L (I16L) a 0,46 mg/kg dio como resultado una inhibición no significativa de la pérdida de sangre (828,24 ± 36,79 µl; n = 8). Sin embargo, el tratamiento con FXa-I195L (I16L) a dosis crecientes de 1,53 y 4,58 mg/kg dio como resultado una inhibición significativa de la pérdida de sangre: 690,99 ± 41,88 µl (n = 9) y 121,62 ± 76,52 µl (n = 7), respectivamente, en comparación con el grupo del control (p < 0,05 usando Kruskal-Wallis seguido por la prueba posterior de Dunn).

65

3. Estudios de respuesta a la dosis que evalúan la actividad coagulante de FXa-V196S (V17S)

La respuesta a la dosis del efecto procoagulante del mutante de FXa-V196S (V17S de acuerdo con la numeración de quimiotripsina) se estudió en ratones FVIII^{-/-}, usando los métodos anteriores. En el primer ensayo, la sangre perdida en el grupo de control de animales, que reciben Tampón (MES 5 mM pH 6, NaCl 100 mM) solamente fue 855,94 ± 62,55 µl (n = 9). El tratamiento con FXa-V196S (V17S) a 0,7 y 2,33 mg/kg dio como resultado una inhibición no significativa de la pérdida de sangre en comparación con el grupo del control: 737,16 ± 21,75 µl (n = 8) y 614,38 ± 75,13 µl (n = 8), respectivamente. Una mayor dosis de FXa-V196S (V17S) a 6,98 mg/kg, sin embargo, dio como resultado una inhibición significativa de la pérdida de sangre en comparación con el grupo tratado solamente con tampón (151,51 ± 32,43 µl (n = 7); p < 0,05 usando Kruskal-Wallis seguido por la prueba posterior de Dunn).

En un segundo ensayo, la pérdida de sangre en el grupo tratado solamente con tampón 877,36 ± 41,7 µl (n = 8). El tratamiento con FXa-V196S (V17S) a 0,7 mg/kg dio como resultado una inhibición no significativa de la pérdida de sangre (532,80 ± 53,34 µl; n = 9); mientras que el tratamiento con FXa-V196S (V17S) a 2,33 y 6,98 mg/kg condujo a una inhibición de la pérdida de sangre que fue significativa en comparación con el grupo tratado solamente con tampón (189,66 ± 40,14 µl (n = 8) y 89,28 ± 14,46 µl (n = 7), respectivamente; p < 0,05 usando Kruskal-Wallis seguido por la prueba posterior de Dunn).

En un tercer ensayo, la pérdida de sangre en el grupo tratado solamente con tampón 1018,82 ± 27,13 µl (n = 9). El tratamiento con FXa-V196S (V17S) a 0,7 mg/kg dio como resultado una inhibición no significativa de la pérdida de sangre (760,27 ± 25,92 µl, n = 9). El tratamiento con FXa-V196S (V17S) a 2,33 y 6,98 mg/kg condujo a una inhibición de la pérdida de sangre que fue significativa en comparación con el grupo tratado solamente con tampón (414,06 ± 61,89 µl (n = 9) y 187,24 ± 25,08 µl (n = 9), respectivamente; p < 0,05 usando Kruskal-Wallis seguido por la prueba posterior de Dunn).

4. Estudios de respuesta a la dosis que evalúan la actividad coagulante de FXa a temperatura reducida

La actividad de coagulación de FXa-V196S (V17S) también se evaluó a temperatura ambiente de 72-74 °F (22,2-23,3 °C), mientras que los experimentos anteriores (Ejemplo 8A1-3) se había realizado a una temperatura ambiente de 82 °F (27,8 °C). En la primera evaluación, la pérdida de sangre en el grupo tratado solamente con tampón 939,93 ± 19,12 µl (n = 9). El tratamiento con FXa-V196S (V17S) a 0,7 mg/kg produjo una reducción no significativa de la pérdida de sangre (798,71 ± 26,04 µl; n = 9), mientras que el tratamiento con FXa-V196S (V17S) a 2,33 y 6,98 mg/kg condujo a reducciones significativas de la pérdida de sangre que fue significativa en comparación con el grupo tratado solamente con tampón (502,48 ± 93,31 µl (n = 8) y 141,81 ± 30,37 µl (n = 9), respectivamente; p < 0,05 usando Kruskal-Wallis seguido por la prueba posterior de Dunn).

En una segunda evaluación a temperatura ambiente de 72-74 °F (22,2-23,3 °C), la pérdida de sangre en el grupo tratado solamente con tampón 977,42 ± 20,61 µl (n = 9). El tratamiento con FXa-V196S (V17S) a 0,7 mg/kg dio como resultado una reducción no significativa de la pérdida de sangre (690,52 ± 79,41 µl; n = 10). El tratamiento con FXa-V17S a 2,33 y 6,98 mg/kg condujo a una inhibición significativa de la pérdida de sangre en comparación con el grupo tratado solamente con tampón (305,74 ± 70 µl (n = 10) y 152,42 ± 37,44 µl (n = 10), respectivamente; p < 0,05 usando Kruskal-Wallis seguido por la prueba posterior de Dunn).

Las actividades de coagulación de otros polipéptidos de FXa se determinaron como se ha descrito anteriormente a temperatura ambiente de 72-74 °F (22,2-23,3 °C). Los valores de DE₅₀ calculados usando regresión no lineal, para los polipéptidos de FXa estudiados, se muestran en la Tabla 26.

| Mutante (Numeración de maduro) | Mutación (Numeración de quimiotripsina) | n/grupo/exp t | N (expts) | DE50 promedio (mg/kg) |
|--------------------------------|---|---------------|-----------|-----------------------|
| I195L | I16L | 7 - 12 | 2 | 2,5 |
| V196S | V17S | 7 - 10 | 5 | 2,0 |
| G114N/V196S | G[114]N/V17S | 8 - 10 | 2 | 1,4 |
| D95N/D97S/V196S | D[95]N/D[97]S/V17S | 8 - 10 | 2 | >3 |
| E82S/V196S | E[82]S/V17S | 8 - 10 | 2 | >3 |
| G197S | G18S | 8 - 10* | 2 | 0,7 |
| K338A | K156A | 7 - 10 | 3 | 1,9 |
| K338S | K156S | 7 - 10 | 2 | 1,6 |

| Tabla 26 Valores de DE₅₀ de respuesta a la dosis | | | | | |
|--|--------------------------------------|-----------------------|----------------------|------------------|------------------------------|
| Mutante (Numeración de maduro) | Mutación (Numeración de) | quimiotripsina | n/grupo/exp t | N (expts) | DE50 promedio (mg/kg) |
| V196S/I211S/G219H | V17S/I32S/G40H | | 7 - 10 | 3 | 2,5 |
| I195L/I211S/G219H | I16L/I32S/G40H | | 8-9 | 3 | 1,7 |
| V196S/R332A | V17S/R150A | | 8-10 | 2 | 0,2 |
| V196S/R332D | V17S/R150D | | 8 - 10 | 3 | 0,08 |
| V196S/R332S | V17S/R150S | | 8-9 | 3 | 0,1 |
| V196S/R332G | V17S/R150G | | 8-10 | 5 | 0,2 |
| V196S/ K338A | V17S/K156A | | 8 | 1 | 7,9 |
| V196S/K338S | V17S/K156S | | 8-10 | 1 | >5 |
| V196S/E264N/E266S | V17S/E84N/E86S | | 8 - 10 | 2 | 2,7 |
| V196S/R243N/K245S | V17S/R63N/K65S | | 8-10 | 2 | >3 |
| V196S/I211S/G219H/E264N/E266S | V17S/I32S/G40H/E84N/E86S | | 9-10 | 2 | 2,1 |
| D119N/G121S/V196S/I211S/G219H/K388N | D[119]N/G[121]S/V17S/I32S/G40H/K204N | | 8 - 10 | 2 | >3 |

* = El grupo de dosis más grande del experimento 2 tuvo solamente 3 animales, se observaron muertes con esta dosis.

Aunque serán evidentes modificaciones para los expertos en esta materia, se pretende que la presente invención esté limitada solamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido del Factor Xa (FXa) activo modificado aislado, que comprende una sustitución de aminoácido en una posición que corresponde a la posición 196 y en una posición que corresponde a la posición 332 en un polipéptido de FXa sin modificar con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, en donde:
- 5 las posiciones de aminoácidos correspondientes se determinan por alineación con la SEQ ID NO:134; la sustitución en la posición 196 es con un resto de aminoácido polar neutro que es serina (S) o treonina (T);
 10 la sustitución en la posición 332 es Alanina (A), Aspartato (D), Glutamato (E), Serina (S) o Glicina(G); el FXa sin modificar comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de la SEQ ID NO:134, en donde:
- 15 el FXa modificado presenta al menos una dependencia del cofactor de FVa aumentada 50 veces en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene la sustitución de aminoácido; y el FXa modificado comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, o veinte sustituciones de aminoácidos en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar.
- 20 2. El polipéptido de FXa modificado aislado de la reivindicación 1, en donde el polipéptido de FX modificado comprende una sustitución de aminoácido con S en una posición que corresponde a la posición 196 con referencia a las posiciones de aminoácido que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la misma sustitución de aminoácido en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FXa sin modificar que no comprende S en la posición correspondiente a 196.
- 25 3. El polipéptido de FXa modificado aislado de la reivindicación 1 o 2 en donde el FXa modificado presenta al menos una dependencia del cofactor FVa aumentada 75 veces en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar que no contiene la sustitución de aminoácido.
- 30 4. El polipéptido de FXa modificado aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende solamente una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustitución(ones) de aminoácidos, en comparación con el polipéptido de FXa sin modificar de la misma forma.
- 35 5. El polipéptido de FXa modificado aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además sustitución(ones) de aminoácidos seleccionadas entre sustitución(ones) de aminoácidos con:
 S en una posición que corresponde a la posición 211; D en una posición que corresponde a la posición 214; A en una posición que corresponde a la posición 214; S en una posición que corresponde a la posición 214; R en una posición que corresponde a la posición 216; K en una posición que corresponde a la posición 216; A en una posición que corresponde a la posición 216; S en una posición que corresponde a la posición 216; R en una posición que
 40 corresponde a la posición 218; K en una posición que corresponde a la posición 218; A en una posición que corresponde a la posición 218; H en una posición que corresponde a la posición 219; A en una posición que corresponde a la posición 273; E en una posición que corresponde a la posición 273; A en una posición que corresponde a la posición 276; E en una posición que corresponde a la posición 276; E en una posición que
 45 corresponde a la posición 306; S en una posición que corresponde a la posición 326; T en una posición que corresponde a la posición 326; V en una posición que corresponde a la posición 326; Q en una posición que corresponde a la posición 326; N en una posición que corresponde a la posición 326; M en una posición que corresponde a la posición 326; K en una posición que corresponde a la posición 326; Y en una posición que
 50 corresponde a la posición 326; E en una posición que corresponde a la posición 326; D en una posición que corresponde a la posición 338; A en una posición que corresponde a la posición 338; S en una posición que corresponde a la posición 338; N en una posición que corresponde a la posición 338; R en una posición que corresponde a la posición 338; V en una posición que corresponde a la posición 338; Y en una posición que
 55 corresponde a la posición 338; M en una posición que corresponde a la posición 338; A en una posición que corresponde a la posición 420; E en una posición que corresponde a la posición 420; A en una posición que corresponde a la posición 424; y E en una posición que corresponde a la posición 424, con referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la(s) misma(s) sustitución(ones) en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FXa sin modificar.
- 60 6. El polipéptido de FXa modificado aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende sustitución(ones) de aminoácidos seleccionadas entre sustitución(ones) de aminoácidos con:
- S en una posición que corresponde a la posición 196, S en una posición que corresponde a la posición 211 y H en una posición que corresponde a la posición 219;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y D en una posición que corresponde a la posición 214;
 65 S en una posición que corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 214;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y S en una posición que corresponde a la posición 214;

- S en una posición que corresponde a la posición 196 y R en una posición que corresponde a la posición 216;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y K en una posición que corresponde a la posición 216;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 216;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y S en una posición que corresponde a la posición 216;
 5 S en una posición que corresponde a la posición 196 y R en una posición que corresponde a la posición 218;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y K en una posición que corresponde a la posición 218;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 218;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 273;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 273;
 10 S en una posición que corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 276;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 276;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 306;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 326;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y D en una posición que corresponde a la posición 326;
 15 S en una posición que corresponde a la posición 196 y M en una posición que corresponde a la posición 326;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y N en una posición que corresponde a la posición 326;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y Q en una posición que corresponde a la posición 326;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 332;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y D en una posición que corresponde a la posición 332;
 20 S en una posición que corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 332;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y S en una posición que corresponde a la posición 332;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y G en una posición que corresponde a la posición 332;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 338;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y S en una posición que corresponde a la posición 338;
 25 S en una posición que corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 420;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 420;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y A en una posición que corresponde a la posición 424;
 S en una posición que corresponde a la posición 196 y E en una posición que corresponde a la posición 424; y
 30 S en una posición que corresponde a la posición 196, E en una posición que corresponde a la posición 420 y E
 en una posición que corresponde a la posición 424, basándose en la numeración del maduro con referencia a las
 posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134 o la misma sustitución de aminoácido en un
 resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FXa sin modificar.
7. El polipéptido de FXa modificado aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende
 35 sustitución(ones) de aminoácido(s) con S en una posición que corresponde a la posición 196 y A en una posición
 que corresponde a la posición 332, basándose en la numeración del maduro con referencia a las posiciones de
 aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134 o la misma sustitución de aminoácido en un resto de
 aminoácido correspondiente en el polipéptido de FXa sin modificar.
8. El polipéptido de FXa modificado aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende
 40 sustitución(ones) de aminoácido(s) adicional(es) que altera(n) la glicosilación mediante la introducción de un sitio de
 glicosilación no nativo.
9. El polipéptido de FXa modificado aislado de la reivindicación 8, en donde el sitio de glicosilación no nativo se
 45 introduce mediante sustitución(ones) de aminoácido(s), en donde la sustitución de aminoácidos se selecciona entre
 sustitución(ones) de aminoácidos con:
- N en una posición que corresponde a la posición 51;
 N en una posición que corresponde a la posición 56 y S en una posición que corresponde a la posición 58;
 50 N en una posición que corresponde a la posición 62 y S en una posición que corresponde a la posición 64;
 N en una posición que corresponde a la posición 65 y S en una posición que corresponde a la posición 67;
 N en una posición que corresponde a la posición 67;
 N en una posición que corresponde a la posición 73 y S en una posición que corresponde a la posición 75;
 N en una posición que corresponde a la posición 75 y S en una posición que corresponde a la posición 77;
 55 N en una posición que corresponde a la posición 77 y S en una posición que corresponde a la posición 79;
 N en una posición que corresponde a la posición 78 y S en una posición que corresponde a la posición 80;
 S en una posición que corresponde a la posición 82;
 N en una posición que corresponde a la posición 83;
 N en una posición que corresponde a la posición 82 y S en una posición que corresponde a la posición 84;
 60 N en una posición que corresponde a la posición 85 y S en una posición que corresponde a la posición 87;
 N en una posición que corresponde a la posición 86 y S en una posición que corresponde a la posición 88;
 N en una posición que corresponde a la posición 95 y S en una posición que corresponde a la posición 97;
 N en una posición que corresponde a la posición 114;
 N en una posición que corresponde a la posición 119 y S en una posición que corresponde a la posición 121; S
 65 en una posición que corresponde a la posición 122;
 N en una posición que corresponde a la posición 215 y S en una posición que corresponde a la posición 217;

- N en una posición que corresponde a la posición 243 y S en una posición que corresponde a la posición 245;
 N en una posición que corresponde a la posición 264 y S en una posición que corresponde a la posición 266;
 N en una posición que corresponde a la posición 293 y S en una posición que corresponde a la posición 295;
 N en una posición que corresponde a la posición 388;
- 5 N en una posición que corresponde a la posición 389 y S en una posición que corresponde a la posición 391;
 N en una posición que corresponde a la posición 428 y S en una posición que corresponde a la posición 430; y
 N en una posición que corresponde a la posición 429 y S en una posición que corresponde a la posición 431, con
 referencia a las posiciones de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:134, o la(s) misma(s)
 sustitución(ones) en un resto de aminoácido correspondiente en el polipéptido de FXa sin modificar.
- 10 10. El polipéptido de FXa modificado aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el polipéptido de
 FXa sin modificar se selecciona entre:
- 15 a) un polipéptido de FX activo (FXa) que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de
 aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que comprende
 la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de la SEQ ID NO:134; o
 b) una forma catalíticamente activa de a).
- 20 11. El polipéptido de FXa modificado aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el polipéptido de
 FXa modificado contiene una cadena pesada y ligera y consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra
 como los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-
 448 de la SEQ ID NO:134.
- 25 12. El polipéptido de FXa modificado aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende una
 secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
- 30 a) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos
 1-139 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-
 448 de cualquiera de las SEQ ID NOS:224-228; y
 b) una forma catalíticamente activa de a) que incluye las sustitución(ones) de aminoácidos y presenta actividad
 catalítica.
- 35 13. Un polipéptido del Factor X (FX) modificado, que comprende un polipéptido de FXa modificado de cualquiera de
 las reivindicaciones 1-12.
- 40 14. El polipéptido de FX modificado de la reivindicación 13, que comprende sustituciones de aminoácidos con S en
 la posición 196 y A en la posición 332, con referencia a las posiciones de aminoácidos en el polipéptido de FX
 maduro de la SEQ ID NO:134.
- 45 15. El polipéptido de FX modificado de la reivindicación 13, en donde el polipéptido de FX sin modificar se selecciona
 entre:
- 50 a) un polipéptido de FX zimógeno que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de
 aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que comprende
 la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 143-448 de la SEQ ID NO:134;
 b) un polipéptido de FX activo (FXa) que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de
 aminoácidos que se muestra como los restos 1-139 de la SEQ ID NO:134, y una cadena pesada que comprende
 la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 195-448 de la SEQ ID NO:134; y
 c) una forma catalíticamente activa de b).
- 55 16. El polipéptido de FX modificado de la reivindicación 13, que comprende una secuencia de aminoácidos
 seleccionada entre:
- 60 a) una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOS:224-228; y
 b) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos
 1-139 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como los restos 143-
 448 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 224-228.
- 65 17. El polipéptido de FX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 13-16 que es un polipéptido zimógeno.
18. El polipéptido de FX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 13-16 que es un polipéptido bicatenario.
19. El polipéptido de FX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 13-16 que es un polipéptido
 monocatenario.

20. El polipéptido de FX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 13-16 que está activado.
21. El polipéptido de FX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o el polipéptido de FX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 13-20, en donde solo la secuencia primaria está modificada.
- 5 22. El polipéptido de FX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o el polipéptido de FX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 13-21, que comprende además una modificación química o una modificación posterior a la traducción.
- 10 23. El polipéptido de FXa modificado o el polipéptido de FX de la reivindicación 22, en donde el polipéptido de FXa modificado o el polipéptido de FX está glicosado, carboxilado, hidroxilado, sulfatado, fosforilado, albuminado, o conjugado a un resto de polietilenglicol (PEG).
- 15 24. Una molécula de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de FXa modificado o un polipéptido de FX de cualquiera de las reivindicaciones 1-23.
25. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 24.
- 20 26. El vector de la reivindicación 25, en donde el vector es un vector procarionta, un vector vírico, o un vector eucariota.
27. El vector de la reivindicación 25 o de la reivindicación 26, en donde el vector es un vector de mamífero.
- 25 28. Una célula aislada, que comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 25-27.
29. La célula de la reivindicación 28, que es una célula eucariota.
30. La célula de la reivindicación 29, en donde la célula eucariota es una célula de mamífero.
- 30 31. Un método para producir un polipéptido de FXa modificado o un polipéptido de FX modificado, que comprende:
 cultivar la célula de cualquiera de las reivindicaciones 28-30 en condiciones en las que la célula expresa el polipéptido de FXa modificado o el polipéptido de FX modificado; y
 recuperar el polipéptido de FXa modificado o el polipéptido de FX modificado.
- 35 32. La célula de cualquiera de las reivindicaciones 28-30, en donde la célula expresa el polipéptido de FXa modificado o el polipéptido de FX modificado.
- 40 33. Una composición farmacéutica, que comprende el polipéptido de FXa modificado o el polipéptido de FX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-23 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
34. El polipéptido de FXa modificado o el polipéptido de FX modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-23 para su uso en el tratamiento de un trastorno de la coagulación.
- 45 35. El polipéptido de FXa modificado o el polipéptido de FX modificado de la reivindicación 34, en donde el trastorno de la coagulación se selecciona entre un trastorno debido a una deficiencia de un factor de coagulación, un trastorno debido a la presencia de inhibidores adquiridos de un factor de coagulación, un trastorno hematológico, un trastorno hemorrágico, una enfermedad de Von Willebrand, un trastorno que es el resultado de una terapia anticoagulante con un antagonista de la vitamina K, trastornos plaquetarios hereditarios, deficiencia de vitamina K epóxido reductasa
 50 C1, deficiencia de gamma-carboxilasa, hemorragia asociada con trauma, lesión, trombosis, trombocitopenia, accidente cerebrovascular, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada (DIC), síndrome de Bernard Soulier, tromblastemia de Glanzman y deficiencia de almacenamiento del combinado plaquetario.
- 55 36. El polipéptido de FXa modificado o el polipéptido de FX modificado de la reivindicación 34 o 35, en donde el trastorno de la coagulación se selecciona entre hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

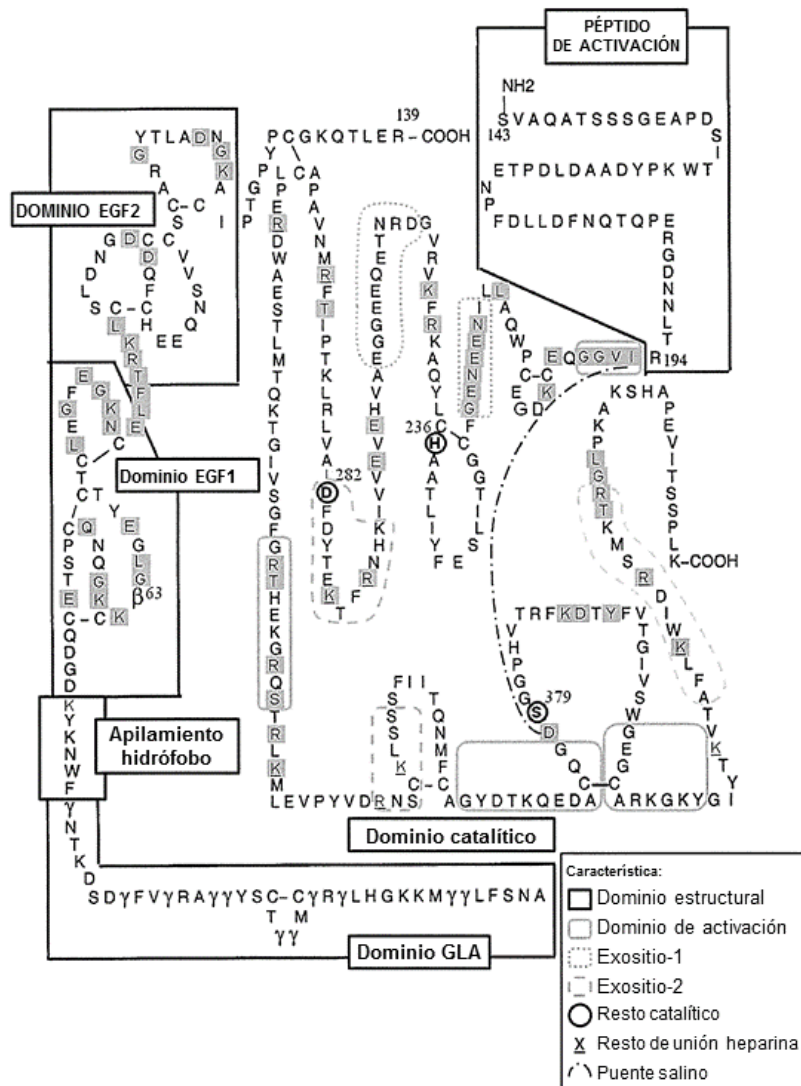


Figura 1

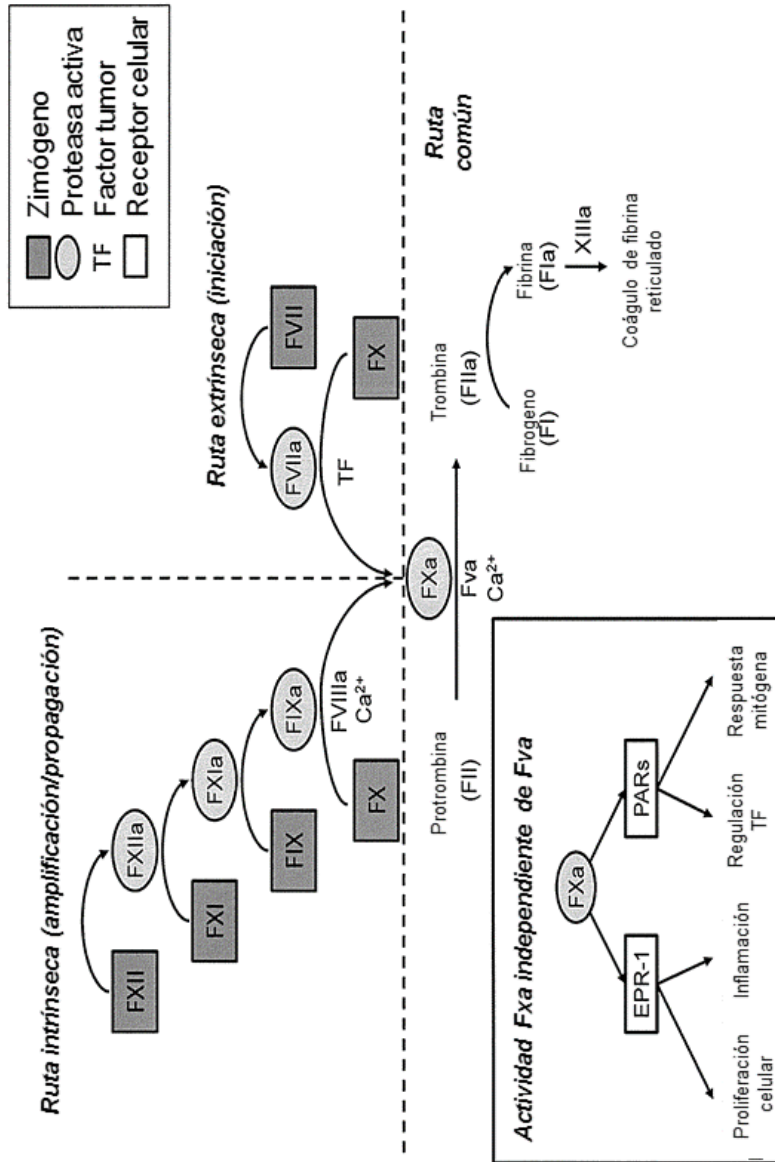


Figura 2A

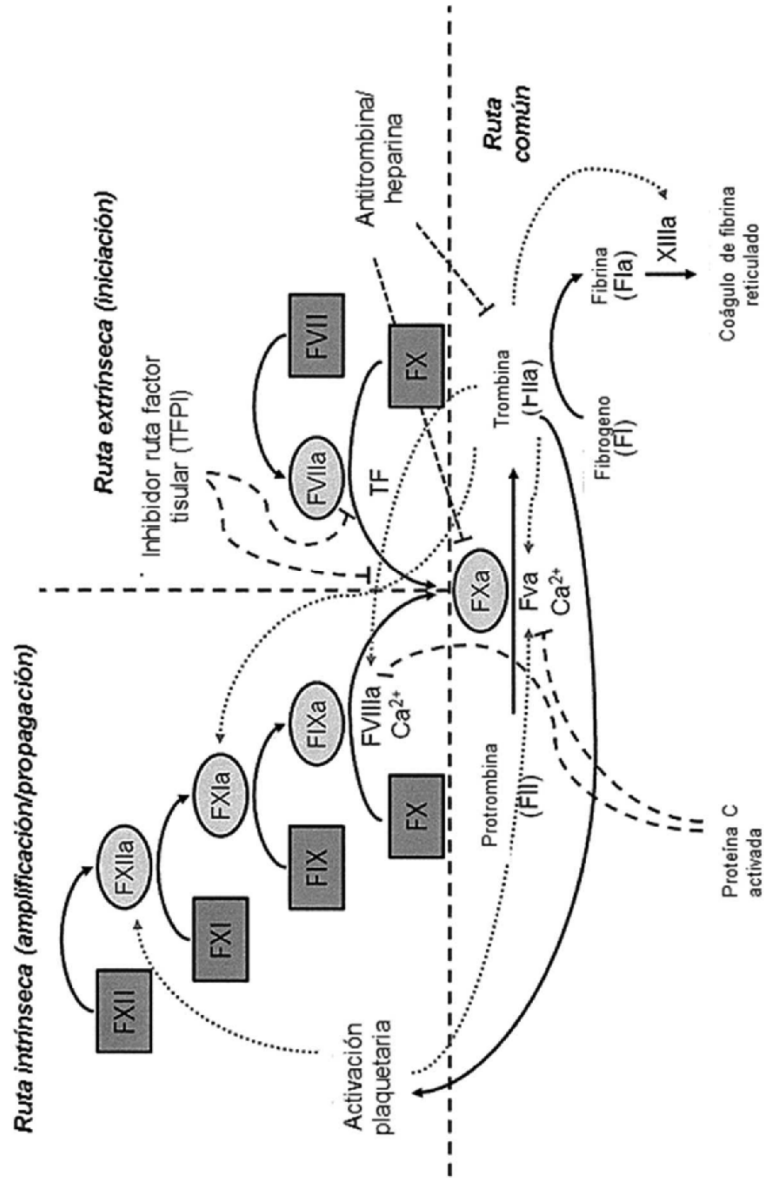


Figura 2B

Figura 3A

Humano
gibón
*****:*****:***

Humano
gibón
*****:*****:***

Humano
gibón
*****:*****:***

Humano
gibón
*****:*****:***

Humano
gibón
*****:*****:***

Humano
gibón
*****:*****:***

human
Gibbon
*****:*****:***

ANSFL~~E~~EMKKGHL~~E~~RECM~~E~~ETCSYEAREV~~F~~EDSDK~~T~~NEFWNK~~Y~~KGDD~~Q~~CETS~~P~~CQ~~N~~Q~~G~~K
ANSFL~~E~~EMKKG~~N~~L~~R~~ECM~~E~~ETCSYEAREV~~F~~EDSDK~~T~~NEFWNK~~Y~~KGDD~~Q~~CETS~~P~~CQ~~N~~EGK
*****:*****:***

CKDGI~~G~~EY~~T~~CT~~C~~L~~E~~GF~~E~~PK~~N~~CEL~~F~~TR~~K~~L~~C~~SL~~D~~NG~~D~~CD~~Q~~F~~C~~HE~~B~~Q~~N~~SV~~V~~CS~~C~~ARG~~Y~~TL~~A~~D~~N~~
CKDGI~~G~~EY~~T~~CT~~C~~L~~E~~GF~~E~~PK~~N~~CEL~~F~~TR~~K~~L~~C~~SL~~D~~NG~~D~~CD~~Q~~F~~C~~HE~~B~~Q~~N~~SV~~V~~CS~~C~~ARG~~Y~~TL~~A~~D~~N~~
*****:*****:***

GKACI~~P~~TG~~P~~Y~~P~~CG~~K~~Q~~T~~L~~E~~RR~~R~~KS~~V~~AQ~~A~~TSS~~S~~GE~~A~~PD~~S~~IT~~T~~WK~~P~~Y~~D~~A~~D~~LD~~P~~TEN~~P~~FD~~L~~LD~~F~~
GKACI~~P~~TG~~P~~Y~~P~~CG~~K~~Q~~T~~L~~E~~RR~~R~~KS~~V~~AQ~~A~~TSS~~S~~GE~~A~~PD~~S~~IT~~T~~WK~~P~~Y~~D~~A~~D~~LD~~P~~TEN~~P~~FD~~L~~LD~~F~~
*****:*****:***

NQ~~T~~Q~~P~~ER~~G~~D~~N~~N~~L~~TR~~I~~V~~G~~GQ~~E~~CK~~D~~GE~~C~~PWQ~~A~~LL~~I~~NE~~E~~NE~~G~~FC~~G~~GT~~I~~LSE~~F~~Y~~I~~LTA~~A~~H~~C~~L~~Y~~Q
NQ~~T~~Q~~P~~ET~~G~~D~~N~~N~~L~~VR~~I~~V~~G~~RE~~C~~DE~~G~~CPWQ~~A~~LL~~I~~NE~~E~~NE~~G~~FC~~G~~GT~~I~~LSE~~F~~Y~~I~~LTA~~A~~H~~C~~L~~Y~~Q
*****:*****:***

AKR~~F~~K~~V~~R~~V~~GD~~R~~NT~~E~~Q~~E~~EG~~E~~AV~~H~~EV~~V~~IK~~N~~R~~F~~T~~K~~E~~T~~Y~~D~~FD~~I~~AV~~L~~RL~~K~~TP~~I~~TF~~R~~M~~N~~V~~A~~P
AKR~~F~~K~~V~~R~~V~~GD~~R~~NT~~E~~Q~~E~~EG~~E~~AV~~H~~EV~~V~~IK~~N~~R~~F~~T~~K~~E~~T~~Y~~D~~FD~~I~~AV~~L~~RL~~K~~TP~~I~~TF~~R~~M~~N~~V~~A~~P
*****:*****:***

ACL~~P~~ER~~D~~WA~~E~~ST~~I~~MTQ~~K~~T~~G~~I~~V~~SG~~F~~RT~~H~~E~~K~~GR~~O~~STR~~L~~K~~M~~L~~E~~VP~~Y~~VD~~R~~NS~~C~~KL~~S~~SS~~F~~I~~I~~T~~Q~~
ACL~~P~~ER~~D~~WA~~E~~ST~~I~~MTQ~~K~~T~~G~~I~~V~~SG~~F~~RT~~H~~E~~K~~GR~~O~~STR~~L~~K~~M~~L~~E~~VP~~Y~~VD~~R~~NS~~C~~KL~~S~~SS~~F~~I~~I~~T~~Q~~
*****:*****:***

NM~~P~~CA~~G~~Y~~D~~T~~K~~Q~~E~~DA~~C~~Q~~G~~D~~S~~GG~~P~~H~~V~~TR~~F~~K~~D~~T~~Y~~F~~V~~T~~G~~I~~V~~SW~~G~~E~~G~~CAR~~K~~G~~K~~Y~~G~~I~~Y~~TK~~V~~T~~A~~FL~~K~~
NM~~P~~CA~~G~~Y~~D~~T~~K~~Q~~E~~DA~~C~~Q~~G~~D~~S~~GG~~P~~H~~V~~TR~~F~~K~~D~~T~~Y~~F~~V~~T~~G~~I~~V~~SW~~G~~E~~G~~CAR~~K~~G~~K~~Y~~G~~I~~Y~~TK~~V~~T~~A~~FL~~K~~
*****:*****:***

WID~~R~~SM~~K~~TR~~G~~L~~P~~KA~~K~~SHA~~P~~EV~~I~~TSS~~P~~LK
WID~~R~~SM~~K~~TR~~G~~L~~P~~KA~~K~~SHA~~P~~EV~~I~~TSS~~P~~LK
*****:*****:***

Figura 3B

| | |
|--------------|---|
| Humano | ANSFLBEMKKGHLERECMEETCSYERAREVFEDSDKNTNEFMNKYKDGDQCETSPPCQNOGK |
| Babuno oliva | SNSFLBRLKKGNLERECMBETCSYBARREVFEIDDKTNEFMNKYKDGDQCETSPPCQNEKGK :*****:***** |
| Humano | CKDGLGEYTCCTCLEGPEGKNCCELFTTRKLCSLDNGDCDQFCHBEQNSVVCSCARGYTLADN |
| Babuno oliva | CRDGLGEYTCCTCLEGPEGKNCCELFTTRKLCSLDNGDCDQFCHBEQNSVVCSCARGYTLADN *:***** |
| Humano | GKACIPITGPPYPCGKQTLERRRKRSAVAQATSSSGEAPDSITWPKPYDADLDPTEPNPFLLDF |
| Babuno oliva | GKACIPITGPPYPCGKQTLERRRKRSAVAQATSSSGEAPDSITWPKPYDADLDPTEPNPFLLDF *****:***** |
| Humano | NQTQPERGDNLLIRLVGGRECEHNGECPWQALLINENEGFCGGTILSEFYLLTAHCLYQ |
| Babuno oliva | NQTQPERGDNLLIRLVGGRECEHNGECPWQALLINENEGFCGGTILSEFYLLTAHCLYQ *****:***** |
| Humano | AKRFKVRVGDRLNTEQEEGGEAVHEVEVIKHNRFPTKETYPDIAVLRKKTPTFRMNVAP |
| Babuno oliva | AKRFKVRVGDRLNTEQEEGGEAVHEVEVIKHNRFPTKETYPDIAVLRKKTPTFRMNVAP *****:***** |
| Humano | ACLPERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRLKMLEVYVDRNSCKLSSSFIITQ |
| Babuno oliva | ACLPERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRLKMLEVYVDRNSCKLSSSFIITQ ***** |
| Humano | NMFCAGYDTKQEDACQGDSSGPHVTRFKDITYFVTGIVSWGEGCARKGKYGITYTKVTAFLK |
| Babuno oliva | NMFCAGYDTKQEDACQGDSSGPHVTRFKDITYFVTGIVSWGEGCARKGKYGITYTKVTAFLK *****:***** |
| Humano | WIDRSMKTRGLPKAKASHAPEVITSSPLK |
| Babuno oliva | WIDRSMKTRGLPKAKASHAPEVITSSPLK *****:***** |

Figura 3C

Humano ANSFLEEMKKKGHIERECMEETCSYEAREVEVEDSDKTNHFNWKKYKDGDDQ CETSPCONQ GK
macaco SNSFLBEMKKKNLIERECMEETCSYEAREVLEBDSKTNHFNWKKYKDGDDQ CETSPCONEGK
:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***
Humano CKDGLGEYTCICIEGFEGKNCBELFTRKLCSLDNGDCDQFCHEEQNSVVCSCARGYTLADN
macaco CRDGLGEYTCICIEGFEGKNCBELFTRKLCSLDNGECDOFCHEEQNSVVCSCARGYTLADN
*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***
Humano GKACIPTPGYPGKQTLERRKRSVAQATSSSGEAPDSITWKPYPDAADLDPTENPPDLLDF
macaco GKACIPTPGYPGKQTLERRKRSVAQATSSSGEAPDNIWKPDADADATENPPDLLDF
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***
Humano NOTQPERGDNNLTRIVGGQEKDECECPWQALLINENEGFCGGTIISEFYIILTAHCLYQ
macaco NOTQPERGDNNLTRIVGGRECENGECPWQALLINENEGFCGGTIISEFYIILTAHCLYQ
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:***
Humano AKRPFKVRVGDENTQEBEGGEAVHEVEVVTKHNRFTEKTYDFDIAVLRLLKPTITFRMNVAP
macaco AKRPFKVRVGDMDMEQEBEGGEAVHEVEVITKHNRFTEKTYDFDIAVLRLLKSPITFRMNVAP
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***
Humano ACLPERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRLLKMLEVPYVDRNSCKLSSSFIITQ
macaco ACLPERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRLLKMLEVPYVDRNSCKLSSSFIITQ
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***
Humano NMFCAGYDTKQEDACQGDSSGPHVTRFKDITYFVTGIVSWGEGCARKGKYGITYTKVTAFLK
macaco NMFCAGYHAQEDACQGDSSGPHVTRFKDITYFVTGIVSWGEGCARKGKYGITYTKVTAFLK
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***
Humano WIDRSMKTRGLPKAKSHAPEVITSSPLK
macaco WIDRSMKTRGLPKAESRAPPEASTSSPLK
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:***

Figura 3D

Human
 Ttđ ANSFLIEEMKKGHLIERECMEETCSYEAREVFEFDSDKTNEFWNKYKDGDQCE_{TS}PCQNGK
 ANSILIEELKKG_NLIERECMEETCSYEAREVFEFDSQ_{TNE}FWNKYKDGDQCE_{SD}PCQNGK
 ::***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***

Human
 Ttđ CKDGLGEY_{TCT}CLIEGPEGN_{CEL}FTRKLC_{SL}DNGDCDQ_FCHEQNS_{VV}SCARGY_TLADN
 CKDGLGQY_{TCT}CLIEGPEGN_{CEL}FTRKLC_{SL}DNGDCDQ_FCHEQNS_{VV}SCARGY_TLADD
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***

Human
 Ttđ GKACIP_{TG}PYP_{CG}KQ_{TLE}RRKR_{SV}AQ_{AT}SSSGEAP_{DS}ITW_{KPY}DAAD_{LD}PTEN_PFDL_{LD}F
 GKACIP_{TG}PYP_{CG}KL_{TLE}RRK_{RAA}AQ_{AT}HR_RGET_{PT}TRPQH_{NT}SD_{PD}PTEN_PFDL_{LG}F
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***

Human
 Ttđ NQ_{TQ}PERG_DNNL_{TR}I_VGGQ_ECKD_GEC_PWQ_{ALL}IN_ENEG_FCGG_TILSE_FY_{IL}TAH_{CL}YQ
 NQ_{TQ}PE_WES_{DL}V_RI_VGG_RDC_{KD}GEC_PWQ_{ALL}IN_ENEG_FCGG_TILSE_FY_{IL}TAH_{CL}HQ
 ***** :.:. *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***

Human
 Ttđ AKR_FKV_RVGD_RNT_EQ_EEG_EAV_HEVE_VIK_HNR_PTK_ETY_DFD_IAV_LRL_KTP_ITR_MN_VAP
 AKR_FKV_RVGD_RNT_EKE_EGG_ETV_HEVE_VIK_HNR_PSI_ETY_DFD_ITV_LRL_KTP_ITR_MN_VAP
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***

Human
 Ttđ ACL_PER_DW_AEST_{LM}TQ_{KT}GI_VS_GFR_IHE_KGR_{OST}RL_KMLE_VY_{VD}RNS_{CK}LSS_SFI_{IT}Q
 ACL_PER_DW_AEST_{LM}TQ_{KT}GI_VS_GFR_IHE_KGR_{OST}RL_KMLE_VY_{VD}RNT_{CK}LSS_SFI_{IT}Q
 *** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***

Human
 Ttđ NMF_CAG_YD_TKQ_ED_ACQ_GD_SG_PH_VTR_FKD_TY_FVT_GI_VSWG_ECA_RK_KY_GI_YTK_VTA_PL_K
 NMF_CAG_YEA_RQ_ED_ACQ_GD_SG_PH_VTR_FKD_TY_FVT_GI_VSWG_ECA_RK_KY_GI_YTK_VSG_FL_K
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***

Human
 Ttđ WID_RSM_KTR_GL_PKA_KSHA_PE_VIT_SS_PL_K
 WID_RSM_KTR_GV_PKA_ESH_VP_GVNT_SS_PL_K
 *****:*****:*** * * *****

Figura 3E

Humano
 Elefante africano
 ANSFLLEEMKKGHLIERECMEETCSYEAREVFEEDSDKTNENFVNKYYKDGDQCETSPCQNOGK
 ANSFLLEEMKQGNLERECMEETCSFEAREVFEEDVKTNENFVNRYYKDGDQCESNPPCQNOGK
 *****:*****:***** * . *****:***** * . *****
 CKDGLGEYTCCTCLEGFEGKNCCELFTRKLCSLDNGDCDQFCHBEQNSVVCSCARGYTLADN
 CQDGLGEYTCCTCLEGFEGKNCCELFTRELCSLDNGDCDQFCNEBERNSVVCSCARGYTLGDN
 *:*****:***** * :*****:*****:***** * . ***** **
 Humano
 Elefante africano
 GKACIPGPGYPCCGQTLERKRKRSVAQATSSSGEAPDSITWPKPYDAADLDPTENPFDLIDF
 GKSCISTEPFPCCGLTMRNRKRSLSLAQANNVSGSPPETSTQKQYGLDDLAPTENPVNLLNL
 :* * :**** * : * .***:****. **..*: * * * * . ** * .***: * .***:
 NQTOPERGDNNLTIRIVGGQECXKDGCEPWQALLINENEGFCGGTILSEFYIILTAHCLLYQ
 NQEPEDTSDLVRIVGGRCXKEGCEPWQALLVNEBENEGFCGGTILNEYIILTAHCLHQ
 ** **: * . * .***:****:****:*****:*****:***** * :*****:**** *
 AKRFKRVVGDNRNTEQEEGGEAHVHEVVVVKHNRFPTKETYDFDIIVLRLKTPITFRMNVAP
 AKRFKRVVGDNRNTEKEEENEMAHEVEIILKHNFVRETYDFDIAVIKTKPTIFRMNVAP
 *****:*****:*** * . *****:**** * :*****:**** * .*****
 Humano
 Elefante africano
 ACLPERDMAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRLKMLEVYVDRNSCKLSSSFIITQ
 ACLPEKDMAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRASTLILKMLEVYVDRNCKLSSSFIITQ
 *****:*****:***** * * *****:*****:***** * .***** * .***
 Humano
 Elefante africano
 NMFCAGYDTKQEDACQDSSGGPHVTRPKDTYFVTGIVSWGEGCARKKGYGYTKVTAFLK
 NMFCAGYDCKPEDACQDSSGGPHVTRPKDTYFVTGIVSWGEGCARKKGYGYTKVTSPLK
 *****: * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
 Humano
 Elefante africano
 WIDRSMKTRGLPKAKSHAPEVITSSPLK
 WIDRCMKTKAGVHAQAP-----
 ****.***: * .***: * .***: * .***: * .***: * .***: * .***: * .***: * .***: * .***:

Figura 3F

```

Humano
rata
ANSFL24E5EMKK2GH1L1RECM1ET1CS1YEARE1VE1ED1SD1KT1NE1FW1N1K1Y1K1D1G1D1Q1C1ET1S1PC1Q1Q1G1K
ANS1FE1EE1FK1KN1LE1RE1CM1EE1I1CS1YE1VE1RE1LE1FE1DD1E1K1TE1K1E1WT1K1Y1K1D1G1D1Q1CESS1PC1Q1Q1GA
*****
Humano
rata
CK1D1G1L1GE1Y1T1CT1CL1EG1FE1GK1NC1EL1FT1R1KL1CS1L1D1NG1D1CC1D1Q1FG1HE1Q1NS1V1V1CS1C1ARG1Y1TL1AD1N
CR1D1GI1GG1Y1TC1T1CS1EG1FE1GK1NC1EL1FV1R1KL1CR1LD1NG1D1CC1D1Q1FC1RE1E1Q1NS1V1V1CS1C1AS1G1Y1FL1GN1D
*:*: *:
Humano
rata
GK1ACT1PT1GP1Y1PC1CG1K1Q1TL1ER1R1KS1V1A1Q1AT1SS1SS1GE1AP1D1ST1W1K1PY1DA1AD1LD1PT1EN1PF1DL1LD1F
GK1SC1IST1AP1PC1CG1K1IT1TGR1R1KS1V1AL1NT1SD1S--EL1D1LE1D1AL1LD1ED1FL1SP1TEN1PI1EL1IN1L
*:*: *:
Humano
rata
N1Q1T1Q1BER1GD1NN1L1R1I1V1GG1Q1E1CK1D1GE1CP1W1Q1ALL1I1NE1NE1NE1GF1CG1GT1L1SE1F1Y1IL1TA1A1H1CL1I1Y1Q
NE1T1Q1PE1RS1SD1LV1R1IV1GG1RE1CK1D1GE1CP1W1Q1ALL1I1NE1D1NE1GF1CG1GT1IL1NE1F1Y1IL1TA1A1H1CL1I1H1Q
*:*: *:
Humano
rata
AK1R1FK1VR1VG1DR1NT1EO1EG1GE1VA1VE1VE1V1IK1H1N1R1FT1K1ET1Y1D1F1D1IA1V1L1R1L1K1TP1IT1FR1M1V1AP
AR1R1FK1V1VG1DR1NT1E1KE1EG1NE1M1VE1V1IK1H1N1K1F1Q1RD1TY1D1Y1DI1AV1L1R1L1K1TP1IT1FR1M1V1AP
*:*: *:
Humano
rata
AC1L1PE1RD1WA1EST1IM1T1Q1KT1G1I1VS1GF1R1THE1K1GR1Q1ST1R1L1K1M1L1EV1PY1VD1R1NS1CK1L1SS1PI1IT1Q
AC1L1P1Q1Q1D1WA1EST1IM1T1Q1KT1G1I1VS1GF1R1THE1K1GR1Q1SN1L1K1M1L1EV1PY1VD1R1NT1CK1L1ST1FS1IT1Q
*:*: *:
Humano
rata
NM1FC1AG1Y1DT1K1Q1ED1AC1Q1G1D1S1GG1PH1V1TR1FK1DT1Y1F1V1T1G1I1VS1NG1EG1CA1R1K1G1Y1GY1TK1V1T1AP1L1K1
NM1FC1AG1YE1AK1L1ED1AC1Q1G1D1S1GG1PH1V1TR1FK1NT1Y1V1T1G1I1VS1NG1EG1CA1R1K1G1K1Y1TK1V1T1PL1K
*:*: *:
Humano
rata
WID1RS1MK1TR1GL1PK1AK1SHA1PE1V1IT1SS1PL1K
WID1RS1MK1AR1V1GP1TA1ET1PRT1AG1PP1N----
*:*: *:

```

Figura 3G

Humano ANSFLPEMKKGGHLERECMEETCSYEAREVEVEDSDKTNTEFWNKYKDDGDQCE TSPCONQ GK
conejo ANSLFLELKKGNIERECMEENCSYEBALEVFEDEKREKTNTEFWNKYVDGDQCESNPCQNQGT
*****:***** .***** ***** :***** ***** :***** .*****
Humano CKDGLGEYTCCTLEGFEGKNCCELFRKLCSLDNGDCDQFCHEEQNSVVCSCARGYTLADN
conejo CKDGLGMYYTCSCEVGEYEGDCEPVTFRKLCSLDNGGCDQFCKEEENSVLCSCASGYTLGDN
***** :*****:*** .***** ***** :*****:***** ***** .**
Humano GKACIP TGPYPGCKQTLERRRKSVAQAATSSSGEAPDLSITWKPYDAADLDPTENPPDLLDF
conejo GKSCISTELFP CGKVTLGRWR- -SPATNSSEGPPEAPGPEQDDGNLTATENPFNLIDS
:* . * :** ** * : * : ** . ** . * : : * : * . ***** .***
Humano NQTQPERGDNILTRIVGGQEKDGECPWQALLINENEGFCGGTILSEFYILTAHGLIYQ
conejo PEPPEDDSSSLVRIVGGQDCEBDGECPWQALLVNEENEGFCGGTILSEYHVLTAAHGLHQ
: . * * * . ***** : * : ***** : ***** : ***** : * : ***** : *
Humano AKRPKRVVGDRLNTEQEBEGEAVHEVEVVIKHNRFTEKETYDFDI AVLRLKTPITPRNVAP
conejo AKRPKRVVGDRLDTEHBEENETHEVEVVVKHNRFVKEFYDFDI AVLRLKTPITPRNVAP
*****:***:*** . * . ***** : ***** : ***** : ***** : *****
Humano ACLPERDWAESTLMTQKTGIYSVGFGRTHEKGRQSTRLKMLEVPYVDRNSCKLSSSFITQ
conejo ACLPQKDWAESTLMAQKTGIYSVGFGRTHEMGR LSTTLKMLEVPYVDRNSCKRSSSFITQ
*****:*****:***** ***** ** * * ***** : ***** : ***** : *****
Humano NMFCAGYDTKQEDACQGDSSGGPHVTRFKDITYFVTGIYSWGECCARKKGYIYTKVTAFLK
conejo NMFCAGYDARPEDACQGDSSGGPHVTRFPDITYFVTGIYSWGECCARKKFGVYTKVSNFLK
*****: * : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : *****
Humano WIDRSMKTRGLPKAKSHAPEVITSSPLK----
conejo WIEKSMRARA VPAEAAGT PGPPTQPTIKGSSPS
::::* . * : * : * . * * . * *

Figura 3H

Humano ANSFLEEMKKGHLIERECMEETCSYEAREVFEEDSDKTFNEFWNKYKDGDQCEITSPCQNGK
 rata ANSFPEEIKKGNLBERECVBEIICSFEAREVFEDENEKTEFEWVKYEDGDQCESSPCQNGE
 *:
 Humano CKDGLGEYTCCTLEGFEGKNCCLFTRKLCSLDNGDCDQFCHEQNSVVCSCARGYTLADN
 rata CRDGLGSYTCCTLEGFEGKNCCLFVKRLCSLDNGDCDQFCREQNSVVCSCAKGYFLGND
 *:
 Humano GKACIPPTGPPYPCGKQTLERRKRSVAQATSSSGEAPDSITWKPYDADLDPTENPFDLIDF
 Humano GKSCLSIAPPCGKTNKGRAKRSVALNTSNSEPPEDLMP--DADILYPTESPSELLNL
 rata *:
 Humano NQTPERGNLTRLVGGQECCKDGECPWQALLIN-ENEGFCGGTILSEFYIILTAHCLY
 Humano NKTEPEANGDDVIRIVGGQECCKRGECPWQALLFSDHEITDGFCCGTIILNEFYIILTAHCLH
 rata *:
 Humano QAKRFKVRVGDNRNTEQEBEGGEAVHEVEVIKHNRFTEKETYDFDIAVLRLKTPITFRMNVA
 rata QAKRFKVRVGDNLNTEQEDDGGEMVHEVDMIIKHNFQRDYDPTIAMLRLKTPITFRENVA
 *:
 Humano PACLPERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRKMLVYVYVDRNSCKLSSSFIIT
 Humano PACLPQKDWAEATLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSKVLKMEVYVYVDRNTRCRLSTSFISIT
 rata *:
 Humano QNMFCAGYDTRKQEDACQGDSSGGPHVTRFKDITYFVTGIVSWGEGCARKKGKYGIYTKVTAFL
 Humano QNMFCAGYDAKQEDACQGDSSGGPHVTRFKDITYFVTGIVSWGEGCARKKGKYGIYTKVTAFL
 rata *:
 Humano KWIDRSMKTRGLPKAKSHAPEVITSSPLK
 Humano KWIDRSMKARVGPTEPRLTTHPPY---
 rata *:

Figura 31

Humano ANSFLIEEMKKGHLIERECMECTCSYEAREVFEEDSDKTNIEFNNKYYKDDQCFETSPCQNOGK
petro ANSFLIEEMKKGNLIERECMECTCSFIEAREVFEEDTAKTMEFNNKYYKDDQCESSPCQNOGQ
*****:*****:*****: ** *****:*****:
Humano CKDGLGEYTCLEGFEGKNCCELFTRKLCSLDNGDCDQFCHEEQNSVVCSCARGYTLADN
petro CKDGLLLEYSCICLEGEYEGKNCCELSTRKLCSDVNDGDCDQFCREEQSSVVCSCARGYTLGDN
***** **: *****:*****:*****:*****:***** ** *. **
Humano GKACIPPTGYPYCGKQTLERRRRKRSVAQAATSSSGE--APDSITWKPDAADLIDPTENPFDL
petro GKSCISTEPPCCGKTIVGRRKRATEETAPSSSEAPPDAEEEAQMLEQYDPGDLSPQSTMFLL
::* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:
Humano IDFNQUTQ--PERGDNILTRIVGGQEQCKDGECPWQALLINEENEGFCGGTILSEFYILTTAA
petro LPFNQUTNSDPEDEDASGLVRIVGGQDCRDGECPPWQALLINEENEGFCGGTILSEFYILTTAA
* *****: *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:
Humano HCLLYOAKRFKVRVGDNRNTEQEEGGEAVHEVEVVIKHNRFTEKYDIEDIAVLRRLKPTITFR
petro HCLQQAKKFTVVRVGERDIDKEEGNEVAHEVEMIIKHKKFVRETYDIEDIAVIRLKLKPTITFR
*** **:
Humano MNVAPACLPBERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRKMLLEVYVDNRNSCKLSSS
petro MNVAPACLPQKDWAESTLMTQKTGIVSGFGKTHEKGRPSTTLKMEVEVYVDNRNCKLSSS
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
Humano FIITQNMFCAGYDTKQEDACQGDSSGGPHVTRFKDITYFVTGIVSWGEGCARKKGYGIYTKV
petro FSITQNMFCAGYDSKPEDACQGDSSGGPHVTRFKDITYFVTGIVSWGEGCARKKGYGIYTKV
* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
Humano TAFLEKMWIDRSMKTRG---LPKAKSHAPEVITSSPLK--
petro TNFLKMWIDRSMKARAGWGGFPGKKEPSPSIMADPPPGPC
* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
* *:

Figura 3J

Humano I195L ANSFLBEMKKGHLEBRCMEETCSYEAREVFEEDSDKTNIEFNNKYYKDGDCETSPPCQNGK
 ANSFLBEMKKGHLEBRCMEETCSYEAREVFEEDSDKTNIEFNNKYYKDGDCETSPPCQNGK
 * * * * *
 Humano I195L CKDGLGELYTCTCLEBGFEGKNCLEL.FTRKLC.SLDNGDCDQ.FCHEEQNSVVCSCARGYTLADN
 CKDGLGELYTCTCLEBGFEGKNCLEL.FTRKLC.SLDNGDCDQ.FCHEEQNSVVCSCARGYTLADN
 * * * * *
 Humano I195L GKACIPTGPPYPCGKQTLERKRKRSVAQATSSGGEAPDSITWKKPYDAADLDPTENPFDLIDF
 GKACIPTGPPYPCGKQTLERKRKRSVAQATSSGGEAPDSITWKKPYDAADLDPTENPFDLIDF
 * * * * *
 Humano I195L NOTQPERGDNNL.FRI.VGGQEQECKDGECPWQAL.L.INEBENEGFCGGTILSEFYILLTAHCLYQ
 NOTQPERGDNNL.FRI.VGGQEQECKDGECPWQAL.L.INEBENEGFCGGTILSEFYILLTAHCLYQ
 * * * * * : * * * * *
 Humano I195L AKRFKRVVGDNRNTEQEBEGGEAIVHEVEVVIKHNRFTEKETYDPDIAVLRRLKTPITFRMNVAP
 AKRFKRVVGDNRNTEQEBEGGEAIVHEVEVVIKHNRFTEKETYDPDIAVLRRLKTPITFRMNVAP
 * * * * *
 Humano I195L ACLPERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHHEKGRQSTRLKMLEVPPYVDRNSCKLSSSFIITQ
 ACLPERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHHEKGRQSTRLKMLEVPPYVDRNSCKLSSSFIITQ
 * * * * *
 Humano I195L NMFCAGYDTKQEDACQGDSSGPHVTRFKDITYFVTGIVSWGEGCARKKGYIYTKVTAFLK
 NMFCAGYDTKQEDACQGDSSGPHVTRFKDITYFVTGIVSWGEGCARKKGYIYTKVTAFLK
 * * * * *
 Humano I195L WIDRSMKTRGLPKAKSHAPEVITSSPLK
 WIDRSMKTRGLPKAKSHAPEVITSSPLK
 * * * * *

Figura 3K

Humano
 Ap152T
 ANSFL~~E~~EMKKGHL~~R~~ECME~~F~~TCY~~E~~BAR~~E~~VF~~E~~DDSD~~K~~TNE~~F~~W~~N~~KY~~K~~D~~G~~D~~C~~ETS~~P~~CC~~O~~NGK
 ANS~~F~~LE~~M~~KK~~G~~H~~L~~R~~E~~C~~M~~E~~F~~T~~C~~Y~~E~~A~~R~~E~~V~~F~~E~~D~~S~~D~~K~~T~~N~~E~~F~~W~~N~~K~~Y~~K~~D~~~~G~~~~D~~~~C~~E~~T~~S~~P~~C~~O~~~~N~~G~~K~~

 Humano
 Ap152T
 CKDGL~~G~~EY~~T~~CT~~C~~L~~B~~G~~F~~E~~G~~K~~N~~C~~E~~L~~F~~T~~R~~K~~L~~C~~S~~L~~D~~N~~G~~D~~C~~D~~Q~~F~~C~~H~~E~~Q~~N~~S~~V~~V~~C~~S~~C~~A~~R~~G~~Y~~T~~L~~A~~D~~N
 CKD~~G~~L~~G~~E~~Y~~T~~C~~T~~C~~L~~B~~G~~F~~E~~G~~K~~N~~C~~E~~L~~F~~T~~R~~K~~L~~C~~S~~L~~D~~N~~G~~D~~C~~D~~Q~~F~~C~~H~~E~~Q~~N~~S~~V~~V~~C~~S~~C~~A~~R~~G~~Y~~T~~L~~A~~D~~N

 Humano
 Ap152T
 GKACT~~P~~T~~G~~P~~Y~~P~~C~~G~~K~~Q~~T~~L~~E~~R~~R~~K~~R~~S~~V~~A~~Q~~A~~T~~S~~S~~S~~G~~E~~A~~P~~D~~S~~I~~T~~W~~K~~P~~Y~~D~~A~~A~~D~~I~~D~~P~~T~~E~~N~~P~~F~~D~~L~~L~~D~~F~~
 GK~~A~~C~~T~~~~P~~T~~G~~~~P~~~~Y~~~~P~~~~C~~~~G~~~~K~~~~Q~~~~T~~~~L~~~~E~~~~R~~~~R~~~~K~~~~R~~~~S~~~~V~~~~A~~~~Q~~~~A~~~~T~~~~S~~~~S~~~~S~~~~G~~~~E~~~~A~~~~P~~~~D~~~~S~~~~I~~~~T~~~~W~~~~K~~~~P~~~~Y~~~~D~~~~A~~~~A~~~~D~~~~I~~~~D~~~~P~~~~T~~~~E~~~~N~~~~P~~~~F~~~~D~~~~L~~~~L~~~~D~~~~F~~

 Humano
 Ap152T
 NOT~~Q~~PER~~G~~D~~N~~N~~L~~T~~R~~I~~V~~G~~G~~Q~~E~~CK~~D~~GE~~C~~PW~~Q~~ALL~~I~~NE~~N~~EG~~F~~CG~~G~~T~~I~~L~~S~~E~~F~~Y~~I~~L~~T~~A~~H~~C~~L~~Y~~Q~~
 N~~O~~T~~Q~~~~P~~~~E~~~~R~~~~G~~~~D~~~~N~~~~N~~~~L~~~~T~~~~R~~~~I~~~~V~~~~G~~~~G~~~~Q~~~~E~~~~C~~~~K~~~~D~~~~G~~~~E~~~~C~~~~P~~~~W~~~~Q~~~~A~~~~L~~~~L~~~~I~~~~N~~~~E~~~~N~~~~E~~~~G~~~~F~~~~C~~~~G~~~~G~~~~T~~~~I~~~~L~~~~S~~~~E~~~~F~~~~Y~~~~I~~~~L~~~~T~~~~A~~~~H~~~~C~~~~L~~~~Y~~~~Q~~

 Humano
 Ap152T
 AKR~~F~~K~~V~~R~~V~~G~~D~~R~~N~~T~~E~~Q~~E~~B~~E~~G~~G~~E~~A~~V~~E~~V~~E~~V~~I~~K~~H~~N~~R~~F~~T~~K~~E~~T~~Y~~D~~F~~D~~I~~A~~V~~L~~R~~L~~K~~T~~P~~I~~T~~F~~R~~M~~N~~V~~A~~P
 AK~~R~~~~F~~~~K~~~~V~~~~R~~~~V~~~~G~~~~D~~~~R~~~~N~~~~T~~~~E~~~~Q~~~~E~~~~B~~~~E~~~~G~~~~G~~~~E~~~~A~~~~V~~~~E~~~~V~~~~E~~~~V~~~~I~~~~K~~~~H~~~~N~~~~R~~~~F~~~~T~~~~K~~~~E~~~~T~~~~Y~~~~D~~~~F~~~~D~~~~I~~~~A~~~~V~~~~L~~~~R~~~~L~~~~K~~~~T~~~~P~~~~I~~~~T~~~~F~~~~R~~~~M~~~~N~~~~V~~~~A~~~~P~~

 Humano
 Ap152T
 ACL~~P~~ER~~D~~MA~~E~~ST~~I~~M~~T~~Q~~K~~T~~G~~I~~V~~S~~G~~F~~R~~I~~H~~E~~K~~G~~R~~Q~~S~~T~~R~~L~~K~~M~~L~~E~~V~~P~~Y~~V~~D~~R~~N~~S~~C~~K~~L~~S~~S~~S~~F~~I~~T~~T~~Q~~
 AC~~L~~~~P~~~~E~~~~R~~~~D~~~~M~~~~A~~~~E~~~~S~~~~T~~~~I~~~~M~~~~T~~~~Q~~~~K~~~~T~~~~G~~~~I~~~~V~~~~S~~~~G~~~~F~~~~R~~~~I~~~~H~~~~E~~~~K~~~~G~~~~R~~~~Q~~~~S~~~~T~~~~R~~~~L~~~~K~~~~M~~~~L~~~~E~~~~V~~~~P~~~~Y~~~~V~~~~D~~~~R~~~~N~~~~S~~~~C~~~~K~~~~L~~~~S~~~~S~~~~S~~~~F~~~~I~~~~T~~~~T~~~~Q~~

 Humano
 Ap152T
 NMF~~C~~A~~G~~Y~~D~~T~~K~~Q~~E~~D~~A~~C~~Q~~G~~D~~S~~G~~G~~B~~H~~V~~T~~R~~F~~K~~D~~T~~Y~~F~~V~~T~~G~~I~~V~~S~~W~~G~~E~~G~~C~~A~~R~~K~~K~~G~~Y~~I~~Y~~T~~K~~V~~T~~A~~F~~L~~K
 N~~M~~~~F~~~~C~~~~A~~~~G~~~~Y~~~~D~~~~T~~~~K~~~~Q~~~~E~~~~D~~~~A~~~~C~~~~Q~~~~G~~~~D~~~~S~~~~G~~~~G~~~~B~~~~H~~~~V~~~~T~~~~R~~~~F~~~~K~~~~D~~~~T~~~~Y~~~~F~~~~V~~~~T~~~~G~~~~I~~~~V~~~~S~~~~W~~~~G~~~~E~~~~G~~~~C~~~~A~~~~R~~~~K~~~~K~~~~G~~~~Y~~~~I~~~~Y~~~~T~~~~K~~~~V~~~~T~~~~A~~~~F~~~~L~~~~K~~

 Humano
 Ap152T
 WID~~R~~SM~~K~~T~~R~~G~~L~~P~~K~~A~~K~~S~~H~~A~~P~~E~~V~~I~~T~~S~~S~~P~~L~~K
 W~~I~~~~D~~~~R~~~~S~~~~M~~~~K~~~~T~~~~R~~~~G~~~~L~~~~P~~~~K~~~~A~~~~K~~~~S~~~~H~~~~A~~~~P~~~~E~~~~V~~~~I~~~~T~~~~S~~~~S~~~~P~~~~L~~~~K~~
