

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 903**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2013 PCT/US2013/071009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14081831**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2013 E 13857297 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2922871**

54 Título: **Métodos y composiciones para proteínas del factor IX modificadas**

30 Prioridad:

20.11.2012 US 201261728469 P
18.09.2013 US 201361879394 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**STAFFORD, DARREL W. y
FENG, DENGMIN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 744 903 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

Métodos y composiciones para proteínas del factor IX modificadas

5 Declaración de apoyo gubernamental

Esta invención se realizó con apoyo gubernamental con la Subvención Núm. HL006350 otorgada por el Instituto Nacional de Salud. El gobierno tiene determinados derechos en la invención.

10 Declaración sobre la presentación electrónica de un listado de secuencia

Se proporciona un listado de secuencia en formato de texto ASCII, enviado bajo el C.F.R. 37 § 1.821, titulado 5470-643WO_ST25.txt, de 26,453 bytes de tamaño, generado el 18 de noviembre de 2013 y presentado a través de EFS-Web, en lugar de una copia en papel.

15 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

20 La invención se refiere a proteínas del Factor IX que contienen modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína del Factor IX, así como también constructos de ácido nucleico que codifican las proteínas del Factor IX.

Antecedentes de la invención

25 El Factor IX está disponible comercialmente tanto como un producto derivado del plasma (Mononine®) o como una proteína recombinante (Benefix®). El Mononine® tiene la desventaja de que existe un potencial de transmitir enfermedades mediante la contaminación con bacterias y virus (tales como el VIH, la hepatitis) que se transmiten a través del procedimiento de purificación. El uso de una proteína recombinante (por ejemplo, Benefix®) evita estos problemas. Sin embargo, las propiedades farmacocinéticas del Factor IX recombinante (rFactor IX, por ejemplo, Benefix®) no se comparan bien con las propiedades del Factor IX derivado del plasma humano (pdFactor IX, por ejemplo, Mononine®) después de la infusión por bolo intravenoso (i.v.) en sistemas de modelos de animales de laboratorio y en humanos. Debido a las propiedades farmacocinéticas menos favorables del rFactor IX, se requiere generalmente dosis un 20-30 % más altas del rFactor IX para lograr el mismo nivel de actividad procoagulante que el pdFactor IX (White y otros, (Abril de 1998) Seminars in Hematology vol. 35, núm. 2 Supl. 2: 33-38; Roth y otros, (15 de diciembre de 2001) Blood vol. 98 (13): 3600-3606).

40 El documento WO 2008/127655 se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento de trastornos del factor de coagulación sanguínea y/o para reducir el daño articular asociado con el sangrado mediante tratamientos suministrados a la articulación en un sujeto. La presente invención proporciona proteínas del Factor IX (FIX) que tienen sitios de glicosilación adicionales y modificaciones de la secuencia de aminoácidos. Las proteínas del Factor IX de esta invención tienen una actividad específica más alta y una función de coagulación útil más larga con relación a la proteína del Factor IX de tipo silvestre o no modificada.

Resumen de la invención

45 La presente invención se define adicionalmente como se expone en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona una proteína del FIX que comprende la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:3):

50

55

60

65

5
10
15
20
25

Tyr Asn Ser Gly Arg Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
 Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu
 Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn
 Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp
 Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile
 Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val
 Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro
 Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
 Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg
 Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu
 Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile
 Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly
 Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg
 Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile
 Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln
 Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Xaa Ser Thr Lys Phe
 Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser
 Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe
 20 Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly
 Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu
 Thr (SEQ ID NO:3),

en donde Xaa es leucina.

25

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína del FIX aislada que comprende el aminoácido expuesto en la SEQ ID NO:3, en donde Xaa es leucina. La molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos (secuencia optimizada en codón FIX 24-K5R con secuencia de propéptido y una sustitución R338L) (SEQ ID NO:5):

30
35
40
45
50
55

ATG CAG CGG GTG AAT ATG ATC ATG GCT GAG AGT CCA GGA CTT ATC ACC ATA TGC
 TTG CTG GGG TAT CTC CTC TCC GCT GAG TGC ACC GTA TTC CTC GAT CAC GAG AAC
 GCC AAC AAA ATC CTT AAC AGA CGT AGG CGA TAC AAC AGT GGC CGA CTG GAG GAG
 TTT GTC CAA GGT AAC CTG GAA CGG AAT TGT ATG GAG AAG TGT AGT TTC GAG
 GAG GCT CGG GAG GTG TTT GAG AAC ACA GAA AGA ACA ACC GAA TTT TGG AAG CAA
 TAT GTC GAT GGT GAC CAA TGT GAG TCT AAC CCT TGT CTT AAT GGA GGC TCA TGC
 AAA GAC GAC ATT AAC AGT TAT GAA TGT TGG TGT CCC TTT GGC TTC GAG GGA AAG
 AAT TGT GAG CTG GAC GTG ACC TGC AAT ATT AAG AAC GGA AGG TGC GAG CAG TTT
 TGC AAA AAC AGT GCT GAT AAC AAG GTG GTA TGT TCT TGC ACC GAA GGT TAC CGT
 CTT GCT GAA AAT CAG AAG AGC TGT GAA CCA GCC GTT CCC TTT CCC TGT GGA CGT
 40 GTA AGC GTT TCT CAG ACA TCA AAA CTG ACC CGG GCT GAG ACT GTG TTC CCT GAC
 GTC GAT TAC GTT AAC TCT ACC GAA GCC GAA GGA AGC CCC GGC AGC GGG TCA GCT
 AAC GCA ACC GGC CCT AGC GGT GAA GGC TCC GCT CCT TCC GAA GGA AAC GCA ACC
 GGA CCA GGT ACC TCC GGA GGA AGC CCA GCC AAC TCC ACA GGG GGG TCC CCT GCC
 GAG GGG AGC CCT GAG AGT GAG ATC CTG GAT AAC ATC ACA CAG AGC ACA CAG AGC
 TTT AAT GAC TTC ACC CGT GTG GTG GGA GGC GAG GAT GCA AAG CCC GGA CAG TTT
 45 CCA TGG CAG GTG GTC CTG AAC GGC AAG GTG GAT GCC TTT TGC GGA GGA TCT ATC
 GTG AAT GAA AAG TGG ATT GTG ACT GCT GCC CAC TGT GTG GAG ACT GGT GTG AAA
 ATC ACT GTG GTA GCA GGA GAA CAC AAT ATT GAG GAG ACC GAG CAT ACC GAG CAG
 AAG CGC AAT GTG ATC CGC ATC ATA CCT CAC CAT AAC TAC AAT GCA ACA ATT AAT
 AAG TAC AAC CAT GAC ATC GCC CTG TTG GAG CTG GAT GAG CCC CTG GTG CTC AAT
 TCT TAT GTG ACA CCA ATC TGC ATA GCT GAC AAG GAA TAC ACT AAC ATT TTC CTG
 50 AAG TTT GGC AGT **GGA TAC GTG TCA** GGA TGG GGC AGA GTG TTC CAC AAG GGA CGC
 TCT GCT CTC GTG CTT CAG TAC CTG CGA GTG CCT TTG GTG GAT CGG GCA ACA TGT
 TTG NNN AGC ACA AAA TTT ACT ATT TAC AAC AAT ATG TTT TGC GCC GGC TTC CAC
 GAA GGA GGG CGA GAT TCA TGC CAG GGA GAC AGT GGC GGT CCA CAC GTG ACT GAA
 GTC GAA GGC ACC TCT TTT TTG ACC GGA ATC ATC TCT TGG GGT GAA GAG TGT GCC
 55 ATG AAA GGA AAG TAT GGC ATA TAC ACA AAG GTG TCC CGC TAT GTG AAC TGG ATC
 AAG GAG AAG ACC AAA CTC ACC TAG,

en donde NNN es cualquier codón de tres nucleótidos que codifica leucina.

60

La presente invención proporciona, además, una proteína del Factor IX, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula de esta invención para su uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico.

En la presente descripción se describe como referencia una proteína del Factor IX (FIX) aislada que comprende una sustitución K5R (sustitución de Lys por Arg en la posición 5) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1:

65

ES 2 744 903 T3

	Tyr	Asn	Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg
	1				5					10					15	
	Glu	Cys	Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe
				20					25					30		
5	Glu	Asn	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly
		35					40						45			
	Asp	Gln	Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp
	50					55					60					
	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys
	65				70						75					80
10	Asn	Cys	Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu
				85					90					95		
	Gln	Phe	Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr
				100				105					110			
	Glu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val
			115				120					125				
15	Pro	Phe	Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr
	130					135						140				
	Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu
	145				150					155						160
20	Ala	Glu	Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn
				165					170						175	
	Asp	Phe	Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe
			180					185					190			
	Pro	Trp	Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly
25				195				200					205			
	Ser	Ile	Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu
	210						215					220				
	Thr	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu
	225				230					235						240
30	Thr	Glu	His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His
				245					250						255	
	His	Asn	Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu
				260					265				270			
	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	Asn	Ser	Tyr	Val	Thr	Pro	Ile
			275				280					285				
35	Cys	Ile	Ala	Asp	Lys	Glu	Tyr	Thr	Asn	Ile	Phe	Leu	Lys	Phe	Gly	Ser
	290					295						300				
	Gly	Tyr	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Val	Phe	His	Lys	Gly	Arg	Ser	Ala
	305				310					315						320
	Leu	Val	Leu	Gln	Tyr	Leu	Arg	Val	Pro	Leu	Val	Asp	Arg	Ala	Thr	Cys
				325					330						335	
40	Leu	Arg	Ser	Thr	Lys	Phe	Thr	Ile	Tyr	Asn	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly
				340					345					350		
	Phe	His	Glu	Gly	Gly	Arg	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro
			355				360						365			
	His	Val	Thr	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Ser	Phe	Leu	Thr	Gly	Ile	Ile	Ser
	370					375						380				
45	Trp	Gly	Glu	Glu	Cys	Ala	Met	Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys
	385					390					395					400
	Val	Ser	Arg	Tyr	Val	Asn	Trp	Ile	Lys	Glu	Lys	Thr	Lys	Leu	Thr	
				405					410						415.	

50

La presente invención proporciona una proteína del Factor IX (FIX) aislada que comprende al menos tres sitios de glicosilación adicionales con relación al FIX humano de tipo silvestre, una sustitución K5R y una sustitución R338X de la secuencia de aminoácidos del FIX de SEQ ID NO:1, en donde X es leucina.
 SEQ ID NO:1:

55

60

65

ES 2 744 903 T3

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
 20 25 30
 5 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
 35 40 45
 Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
 50 55 60
 Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
 65 70 75 80
 10 Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
 85 90 95
 Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
 100 105 110
 15 Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
 115 120 125
 Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 130 135 140
 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 145 150 155 160
 20 Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 165 170 175
 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 180 185 190
 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 195 200 205
 25 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 210 215 220
 Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 225 230 235 240
 30 Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 245 250 255
 His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 260 265 270
 Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285
 35 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 290 295 300
 Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 305 310 315 320
 Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 325 330 335
 40 Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 340 345 350
 Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 355 360 365
 45 His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 370 375 380
 Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
 385 390 395 400
 Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 405 410 415.

50

En la presente descripción se describe una proteína del FIX que comprende la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:2):

YNSGRLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTE FWKQYVDGDQ CESNPCLNGG
 SCKDDINSYE CWCPFGFEGK NCELDTVTCNI KNGRCEQFCK NSADNKVVCS CTEGYRLAEN
 QKSCEPAVPF PCGRVSVSQT SKLTRAETVF PDVDYVNSTE AEGSPGSGSA NATGPSGEGS
 55 APSEGNATGP GTSGGSPANS TGGSPAEGSP GSEILDNITQ STQSFNDFTR VVGGEDAKPG
 QFPWQVVLNG KVDAFCGSI VNEKWIPTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE TEHTEQKRNV
 IRIIPHHNYN ATINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNIFL KFGSGYVSGW
 GRVFKGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLXST KFTIYNNMFC AGFHEGGRDS CQGDSSGGPHV
 TEVEGTSFLT GIISWGEECA MKGYGIYTK VSRVNWIKK KTKLT,

60

en donde X es cualquier aminoácido excepto R (arginina).

En la presente descripción se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos (secuencia optimizada en codón FIX 24-K5R con secuencia de propéptido) (SEQ ID NO:4):

65

5
 10
 15
 20
 25

```

ATG CAG CGG GTG AAT ATG ATC ATG GCT GAG AGT CCA GGA CTT ATC ACC ATA TGC
TTG CTG GGG TAT CTC CTC TCC GCT GAG TGC ACC GTA TTC CTC GAT CAC GAG AAC
GCC AAC AAA ATC CTT AAC AGA CGT AGG CGA TAC AAC AGT GGC CGA CTG GAG GAG
TTT GTC CAA GGT AAC CTG GAA CGG GAA TGT ATG GAG GAG AAG TGT AGT TTC GAG
GAG GCT CGG GAG GTG TTT GAG AAC ACA GAA AGA ACA ACC GAA TTT TGG AAG CAA
TAT GTC GAT GGT GAC CAA TGT GAG TCT AAC CCT TGT CTT AAT GGA GGC TCA TGC
AAA GAC GAC ATT AAC AGT TAT GAA TGT TGG TGT CCC TTT GGC TTC GAG GGA AAG
AAT TGT GAG CTG GAC GTG ACC TGC AAT ATT AAG AAC GGA AGG TGC GAG CAG TTT
TGC AAA AAC AGT GCT GAT AAC AAG GTG GTA TGT TCT TGC ACC GAA GGT TAC CGT
CTT GCT GAA AAT CAG AAG AGC TGT GAA CCA GCC GTT CCC TTT CCC TGT GGA CGT
GTA AGC GTT TCT CAG ACA TCA AAA CTG ACC CGG GCT GAG ACT GTG TTC CCT GAC
GTC GAT TAC GTT AAC TCT ACC GAA GCC GAA GGA AGC CCC GGC AGC GGG TCA GCT
AAC GCA ACC GGC CCT AGC GGT GAA GGC TCC GCT CCT TCC GAA GGA AAC GCA ACC
GGA CCA GGT ACC TCC GGA GGA AGC CCA GCC AAC TCC ACA GGG GGG TCC CCT GCC

GAG GGG AGC CCT GGC AGT GAG ATC CTG GAT AAC ATC ACA CAG AGC ACA CAG AGC
TTT AAT GAC TTC ACC CGT GTG GTG GGA GGC GAG GAT GCA AAG CCC GGA CAG TTT
CCA TGG CAG GTG GTC CTG AAC GGC AAG GTG GAT GCC TTT TGC GGA GGA TCT ATC
GTG AAT GAA AAG TGG ATT GTG ACT GCT GCC CAC TGT GTG GAG ACT GGT GTG AAA
ATC ACT GTG GTA GCA GGA GAA CAC AAT ATT GAG GAG ACC GAG CAT ACC GAG CAG
AAG CGC AAT GTG ATC CGC ATC ATA CCT CAC CAT AAC TAC AAT GCA ACA ATT AAT
AAG TAC AAC CAT GAC ATC GCC CTG TTG GAG CTG GAT GAG CCC CTG GTG CTC AAT
TCT TAT GTG ACA CCA ATC TGC ATA GCT GAC AAG GAA TAC ACT AAC ATT TTC CTG
AAG TTT GGC AGT GGA TAC GTG TCA GGA TGG GGC AGA GTG TTC CAC AAG GGA CGC
TCT GCT CTC GTG CTT CAG TAC CTG CGA GTG CCT TTG GTG GAT CGG GCA ACA TGT
TTG AGG AGC ACA AAA TTT ACT ATT TAC AAC AAT ATG TTT TGC GCC GGC TTC CAC
GAA GGA GGG CGA GAT TCA TGC CAG GGA GAC AGT GGC GGT CCA CAC GTG ACT GAA
GTC GAA GGC ACC TCT TTT TTG ACC GGA ATC ATC TCT TGG GGT GAA GAG TGT GCC
ATG AAA GGA AAG TAT GGC ATA TAC ACA AAG GTG TCC CGC TAT GTG AAC TGG ATC
AAG GAG AAG ACC AAA CTC ACC TAG
  
```

30 Adicionalmente, se proporciona un método para aumentar la biodisponibilidad de una proteína del Factor IX en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la proteína del Factor IX, la molécula de ácido nucleico y/o la célula como se describe en la presente descripción.

35 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la capacidad del FIX de tipo silvestre (FIXWT) y sus variantes K5A (FIXK5A) y K5R (FIXK5R) para proteger a ratones con hemofilia B de la hemorragia 7 días después de la inyección. *Ratones C57BL/6 con ablación del gen del Factor IX* se sometieron a una incisión en la vena safena 7 días después de la inyección del FIX o una de sus variantes. El número de veces que el sangrado se detuvo espontáneamente se determinó hasta un límite de 30 minutos, como se describe en la presente descripción. La mediana de NOD (número de rupturas) para FIXK5R fue 19 y para FIXK5A fue 8 ($P < 0,05$, prueba t no pareada). FIXWT se encuentra en el medio con 14 rupturas. Cada punto representa un solo ratón.

La Figura 2 muestra el tamaño de las variantes del FIX con diferentes modificaciones de la glicosilación. Carril 1. FIX wt; Carril 2. FIX 15, que tiene tres sitios de glicosilación adicionales en el péptido de activación; Carril 3. FIX 19. Además de los mismos tres sitios de glicosilación adicionales en el péptido de activación como FIX15, FIX 19 tiene un sitio de glicosilación más en la región catalítica; Carril 4. FIX 23, que también tiene tres sitios de glicosilación adicionales en el péptido de activación. En comparación con FIX15, se introdujeron más aminoácidos entre cada sitio; Carril 6. FIX 24, además de los tres sitios adicionales en FIX 23, FIX 24 tiene un sitio de glicosilación más en la región catalítica.

Figura 3. Los ratones con hemofilia B recibieron una inyección por bolo (0,9 mg/kg) de: FIXK5R, que se une más fuertemente que el de tipo silvestre al colágeno IV; FIXWT; y FIXK5A, que se une más débilmente que el de tipo silvestre al colágeno IV. Siete días después de la inyección, la capacidad de estas moléculas para promover la hemostasia en una prueba de sangrado por la vena safena se comparó con ratones de tipo silvestre y con hemofilia B. Los valores de P son de un modelo unilateral de Mann-Whitney. El valor de P para FIX_{K5R} frente a FIX_{K5A} fue 0,003.

55 Otros aspectos, características y ventajas de esta invención se harán evidentes a partir de la descripción detallada de las modalidades que siguen a continuación.

Descripción detallada de la invención

60 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología que se usa en la descripción de la invención en la presente es con el propósito de describir modalidades particulares y no se pretende que sean limitativas de la invención.

65 Definiciones

Como se usa en la presente, "una", "un" o "el/la" pueden significar uno o más de uno. Por ejemplo, "una" célula puede significar una sola célula o una multiplicidad de células.

5 Además, como se usa en la presente, "y/o" se refiere y abarca cualquiera y todas las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como también la ausencia de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

10 El término "aproximadamente", como se usa en la presente, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad (por ejemplo, una cantidad de metilación) y similares, significa que incluye variaciones del $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, o incluso $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada.

15 Como se usa en la presente, la frase de transición "que consiste esencialmente en" significa que el alcance de una reivindicación debe interpretarse como que abarca los materiales o etapas enumerados en la reivindicación, "y aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s)" de la invención reivindicada. Ver, *En re Herz*, 537 F.2d 549, 551-52, 190 U.S.P.Q. 461, 463 (CCPA 1976) (énfasis en el original); ver, además MPEP § 2111.03. Por lo tanto, el término "que consiste esencialmente en", cuando se usa en una reivindicación de esta invención, no pretende interpretarse como equivalente a "que comprende".

20 El término "propiedades farmacocinéticas" tiene su significado usual y acostumbrado y se refiere a la absorción, distribución, metabolismo y excreción de la proteína del Factor IX.

25 El significado usual y acostumbrado de "biodisponibilidad" es la fracción o cantidad de una dosis administrada de un fármaco biológicamente activo que alcanza la circulación sistémica. En la presente descripción se describe el término "biodisponibilidad" que incluye el significado usual y acostumbrado pero, además, se considera que tiene un significado más amplio para incluir el grado al cual la proteína del Factor IX es bioactiva. En el caso del Factor IX, por ejemplo, una medida de "biodisponibilidad" es la actividad procoagulante de la proteína del Factor IX obtenida en la circulación después de la infusión.

30 "Modificación postraduccional" tiene su significado usual y acostumbrado e incluye, pero no se limita a, la eliminación de la secuencia líder, γ -carboxilación de residuos de ácido glutámico, β -hidroxilación de residuos de ácido aspártico, glicosilación ligada a N de residuos de asparagina, glicosilación ligada a O de residuos de serina y/o treonina, sulfatación de residuos de tirosina, fosforilación de residuos de serina y cualquiera de sus combinaciones.

35 Como se usa en la presente, la "actividad biológica" se determina con referencia a un estándar derivado del plasma humano. Para el Factor IX, el estándar es MONONINE® (ZLB Behring). Se considera que la actividad biológica del estándar es del 100 %.

40 El término "proteína del Factor IX" o "proteína del FIX", como se usa en la presente, incluye la proteína del Factor IX de tipo silvestre, así como también proteínas de origen natural o artificiales (por ejemplo, el dimorfismo T/A en el péptido de activación del FIX humano en la posición 148 (numeración basada en la secuencia de aminoácidos del FIX humano maduro de SEQ ID NO:1, que muestra una T en la posición 148) como se describe en Graham y otros, ("The Malmo polymorphism of coagulation factor IX, an immunologic polymorphism due to dimorphism of residue 148 that is in linkage disequilibrium with two other FIX polymorphisms" Am. J. Hum. Genet. 42:573-580 (1988)). En la presente descripción se describe una proteína del FIX que incluye una proteína del FIX que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, en donde el aminoácido en la posición 148 puede ser una T o una A y un sujeto puede ser o bien heterocigoto u homocigoto ya sea para T o A en este sitio. Una proteína del FIX descrita en la presente descripción puede incluir además formas mutadas del FIX como se conocen en la literatura (ver, por ejemplo, Chang y otros, "Changing residue 338 in human factor IX from arginine to alanine causes an increase in catalytic activity" J. Biol. Chem. 273:12089-94 (1998); Cheung y otros, "Identification of the endothelial cell binding site for factor IX" PNAS EE.UU. 93:11068-73 (1996); Horst, Molecular Pathology, página 361 (458 páginas) CRC Press, 1991). Una proteína del FIX, como se describe en la presente descripción, incluye además cualquier otra proteína del FIX humano de origen natural o proteína del FIX humano artificial conocida ahora o identificada posteriormente, y derivados y fragmentos activos/dominios activos de esta, como se conoce en la técnica. Una proteína del Factor IX de esta invención incluye, además, la forma activa farmacológicamente del FIX, que es la molécula a partir de la cual el péptido de activación se ha escindido de la proteína por la acción de proteasas (o se elimina de la proteína por ingeniería genética al eliminarla en el nivel de ácido nucleico), lo que resulta en dos cadenas de polipéptidos no contiguos para el FIX (cadena ligera y cadena pesada) plegadas como el factor de coagulación FIX funcional. Específicamente, las proteínas del Factor IX que tienen una modificación para aumentar el grado de glicosilación se incluyen específicamente en el término amplio.

60 El término "vida media" es un término amplio que incluye el significado usual y acostumbrado, así como también el significado usual y acostumbrado que se encuentra en la literatura científica para el Factor IX. Se incluye específicamente en esta definición una medición de un parámetro asociado con el Factor IX, que define el tiempo posterior a la infusión para una disminución a partir de un valor inicial medido en el momento de la infusión hasta la mitad del valor inicial. En algunas modalidades, la vida media del FIX puede medirse en sangre y/o en componentes sanguíneos mediante el uso de un anticuerpo contra el Factor IX en una variedad de inmunoensayos, como se conocen bien en la técnica y como se describen en la presente descripción. Alternativamente, la vida media puede medirse como una disminución en la actividad

del Factor IX mediante el uso de ensayos funcionales, lo que incluye ensayos de coagulación estándar, como se conocen bien en la técnica y como se describen en la presente descripción.

5 El término "recuperación", como se usa en la presente, incluye la cantidad del FIX, según se mide mediante cualquier método aceptable lo que incluye, pero no se limita a, niveles de antígeno del FIX o proteasa del FIX o niveles de actividad de coagulación, detectada en la circulación de un animal o sujeto humano receptor tras la extracción, lo más inmediato posible desde el punto de vista práctico, de una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre o producto de la sangre) con el propósito de medir el nivel del FIX después de su infusión, inyección, suministro o administración de cualquier otra manera. Con las metodologías actuales, el tiempo de muestreo biológico más inmediato para medir la recuperación del FIX generalmente se encuentra dentro de los primeros 15 minutos después de la infusión, inyección o suministro/administración de cualquier otra manera del FIX, de lo contrario, pero es razonable esperar tiempos de muestreo más rápidos a medida que las tecnologías científicas y/o clínicas mejoradas. En esencia, el valor de recuperación para el FIX pretende representar aquí la fracción máxima del FIX infundido, inyectado o suministrado/administrado de cualquier otra manera que puede medirse en la circulación del receptor en el punto de tiempo más inmediato posible después de la infusión, inyección u otro suministro a un animal o paciente receptor.

20 El término "sitio(s) de glicosilación" es un término amplio que tiene su significado usual y acostumbrado. En el contexto de la presente solicitud, el término se aplica tanto a sitios que potencialmente podrían aceptar un resto de carbohidratos, así como también a los sitios dentro de la proteína, específicamente del FIX, en los que se ha unido realmente un resto de carbohidratos e incluye cualquier secuencia de aminoácidos que podría actuar como aceptor de oligosacáridos y/o carbohidratos.

25 El término "aislado" puede referirse a un ácido nucleico o polipéptido que se encuentra sustancialmente libre de material celular, material viral y/o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante), o precursores químicos u otros productos químicos (cuando se sintetiza químicamente). Además, un "fragmento aislado" es un fragmento de un ácido nucleico o polipéptido que no es de origen natural como un fragmento y no se encontraría en el estado natural.

30 Una "célula aislada" se refiere a una célula que se separa de otras células y/o componentes tisulares con los que se asocia normalmente en su estado natural. Por ejemplo, una célula aislada es una célula que forma parte de un cultivo celular. Una célula aislada puede ser, además, una célula que se administra o se introduce en un sujeto, por ejemplo, para impartir un efecto terapéutico o beneficioso de cualquier otra manera.

35 Composiciones de la invención

En la presente descripción se describe una proteína aislada del Factor IX (FIX) que comprende una sustitución K5R en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1:

40

45

50

55

60

65

ES 2 744 903 T3

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
 20 25 30
 5 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
 35 40 45
 Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
 50 55 60
 Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
 65 70 75 80
 10 Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
 85 90 95
 Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
 100 105 110
 15 Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
 115 120 125
 Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 130 135 140
 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 145 150 155 160
 20 Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 165 170 175
 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 180 185 190
 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 195 200 205
 25 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 210 215 220
 Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 225 230 235 240
 Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 245 250 255
 30 His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 260 265 270

 Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285
 35 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 290 295 300
 Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 305 310 315 320
 Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 325 330 335
 40 Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 340 345 350
 Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 355 360 365
 His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 370 375 380
 45 Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
 385 390 395 400
 Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 405 410 415.

50 En algunos casos, la Lys en la posición 5 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 puede sustituirse con treonina, leucina o isoleucina, como ejemplos no limitantes. Se describe en la presente descripción cualquier sustitución de la Lys en la posición 5 que resulta en una molécula del Factor XI que aumenta la afinidad entre el Factor IX y el colágeno de tipo IV.

55 En otros casos de la proteína del FIX descritos en la presente descripción, la valina (Val) en la posición 10 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 puede sustituirse con los siguientes ejemplos no limitantes: leucina, isoleucina, metionina o fenilalanina, histidina o treonina.

60 La proteína del FIX descrita en la presente descripción puede ser una proteína del FIX con una sustitución en la posición 5 como se describe en la presente descripción y/o una sustitución en la posición 10 como se describe en la presente descripción y/o una sustitución de la fenilalanina (Phe) en la posición 9 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 con cualquier otro aminoácido.

65 La proteína del FIX descrita en la presente descripción puede ser una proteína del FIX con una sustitución en la posición 5 como se describe en la presente descripción y/o una sustitución en la posición 10 como se describe en la presente descripción y/o una sustitución de la fenilalanina (Phe) en la posición 9 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1

ES 2 744 903 T3

con cualquier otro aminoácido y/o una sustitución de la glutamina (Gln) en la posición 11 con los siguientes ejemplos no limitantes: asparagina, lisina o arginina.

5 Las sustituciones, como se describen en la presente descripción en las posiciones 5, 9, 10 y 11 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:1, pueden presentarse individualmente o en cualquier combinación.

10 La proteína del Factor IX con las sustituciones como se describe en la presente descripción en las posiciones 5, 9, 10 y 11, individualmente o en combinación, puede comprender, además, uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etcétera) sitios de glicosilación adicionales con relación al FIX humano de tipo silvestre.

15 La presente invención proporciona una proteína del Factor IX (FIX) aislada que comprende al menos tres sitios de glicosilación adicionales con relación al FIX humano de tipo silvestre, una sustitución K5R y una sustitución R338X de la secuencia de aminoácidos del FIX de SEQ ID NO:1, en donde X es leucina.

15 SEQ ID NO:1:

	Tyr	Asn	Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg
	1				5					10					15	
	Glu	Cys	Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe
				20					25					30		
20	Glu	Asn	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly
			35					40					45			
	Asp	Gln	Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp
	50					55					60					
	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys
	65					70					75					80
25	Asn	Cys	Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu
					85					90					95	
	Gln	Phe	Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr
				100					105					110		
	Glu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val
			115					120					125			
30	Pro	Phe	Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr
	130						135					140				
	Arg	Ala	Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu
	145					150					155					160
	Ala	Glu	Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn
35					165					170						175
	Asp	Phe	Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe
			180						185					190		
	Pro	Trp	Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly
			195					200					205			
40	Ser	Ile	Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu
	210						215					220				
	Thr	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu
	225					230					235					240
	Thr	Glu	His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His
				245						250					255	
45	His	Asn	Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu
				260					265					270		
	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	Asn	Ser	Tyr	Val	Thr	Pro	Ile
			275					280					285			
	Cys	Ile	Ala	Asp	Lys	Glu	Tyr	Thr	Asn	Ile	Phe	Leu	Lys	Phe	Gly	Ser
	290						295					300				
50	Gly	Tyr	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Val	Phe	His	Lys	Gly	Arg	Ser	Ala
	305					310					315					320
	Leu	Val	Leu	Gln	Tyr	Leu	Arg	Val	Pro	Leu	Val	Asp	Arg	Ala	Thr	Cys
				325						330					335	
	Leu	Arg	Ser	Thr	Lys	Phe	Thr	Ile	Tyr	Asn	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly
				340					345					350		
55	Phe	His	Glu	Gly	Gly	Arg	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro
			355					360						365		
	His	Val	Thr	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Ser	Phe	Leu	Thr	Gly	Ile	Ile	Ser
			370				375					380				
60	Trp	Gly	Glu	Glu	Cys	Ala	Met	Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys
	385					390					395					400
	Val	Ser	Arg	Tyr	Val	Asn	Trp	Ile	Lys	Glu	Lys	Thr	Lys	Leu	Thr	
				405						410					415.	

65 En la presente descripción se describe una proteína del Factor IX (FIX) aislada que comprende al menos tres sitios de glicosilación adicionales con relación al FIX humano de tipo silvestre, una sustitución K51R y/o una sustitución R384X de la secuencia de aminoácidos del FIX de SEQ ID NO:6, en donde X es un aminoácido distinto de la arginina.

MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRRRRRYNSG
 KLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLN
 GGSKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTICNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCT
 5 EGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDVDYVNSTEAEAGSPGS
 GSANATGPSGEGSAPSEGNATGPGTSGGSPANSTGGSPAEGSPGSEILDNITQSTQ
 SFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIIVNEKWIVTAAHCVETGV
 KITVVAGEHNIEETEHEQKRNVRIRIIPHHNYNATINKYNHDIALLELDEPLVLSY
 10 VTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRST
 KFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGGY
 GIYTKVSRVYVNWIKKTKLT (SEQ ID NO:6).

En la presente descripción se describe una proteína del FIX que comprende la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:7)
 de:

MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRRRRRYNSG
 RLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLN
 GGSKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTICNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCT
 20 EGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDVDYVNSTEAEAGSPGS
 GSANATGPSGEGSAPSEGNATGPGTSGGSPANSTGGSPAEGSPGSEILDNITQSTQ
 SFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIIVNEKWIVTAAHCVETGV
 KITVVAGEHNIEETEHEQKRNVRIRIIPHHNYNATINKYNHDIALLELDEPLVLSY
 25 VTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLXS
 TKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGG
 YGIYTKVSRVYVNWIKKTKLT (SEQ ID NO:7),

en donde X es cualquier aminoácido excepto R (arginina).

Además, en la presente descripción se describe una proteína del FIX que comprende la secuencia de aminoácidos (SEQ
 ID NO:2):

YNSGRLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTTE FWKQYVDGDQ CESNPCLNNGG
 35 SKDDINSYE CWCPFGFEGK NCELDVTCNI KNGRCEQFCK NSADNKVVCS CTEGYRLAEN
 QKSCEPAVPF PCGRVSVSQT SKLTRAETVF PDVDYVNSTE AEGSPGSGSA NATGPSGEGS
 APSEGNATGP GTSGGSPANS TGGSPAEGSP GSEILDNITQ STQSFNDFTR VVGEDAKPG
 QFPWQVVLNG KVDAFCGGSI VNEKWIVTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE TEHEQKRN
 IRIIPHHNYN ATINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNIFL KFGSGYVSGW
 40 GRVVFHKGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLXST KFTIYNNMFC AGFHEGGRDS CQGDSSGPHV
 TEVEGTSFLT GIISWGEECA MKGKYGIYTK VSRVYVNWIK KTKLT,

en donde X es cualquier aminoácido excepto R (arginina).

Además, en la presente descripción se proporciona una proteína del FIX que comprende la secuencia de aminoácidos
 (SEQ ID NO:3):

Tyr Asn Ser Gly Arg Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
 Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu
 Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn
 50 Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp
 Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile
 Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val
 Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro
 Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
 55 Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg
 Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu
 Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile
 Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly
 Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg
 Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile
 60 Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln
 Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Xaa Ser Thr Lys Phe
 Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser
 Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe
 65 Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly
 Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu
 Thr,

en donde Xaa es leucina. En algunos casos descritos en la presente descripción, Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto arginina, lo que incluye, por ejemplo, cualquiera de los aminoácidos enumerados en la presente descripción en la Tabla 1.

5

Además, en la presente descripción se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos (secuencia optimizada en codón FIX 24-K5R con secuencia de propéptido) (SEC ID NO:4):

10

15

20

25

30

```

ATG CAG CGG GTG AAT ATG ATC ATG GCT GAG AGT CCA GGA CTT ATC ACC ATA TGC
TTG CTG GGG TAT CTC CTC TCC GCT GAG TGC ACC GTA TTC CTC GAT CAC GAG AAC
GCC AAC AAA ATC CTT AAC AGA CGT AGG CGA TAC AAC AGT GGC CGA CTG GAG GAG
TTT GTC CAA GGT AAC CTG GAA CGG GAA TGT ATG GAG GAG AAG TGT AGT TTC GAG
GAG GCT CGG GAG GTG TTT GAG AAC ACA GAA AGA ACA ACC GAA TTT TGG AAG CAA
TAT GTC GAT GGT GAC CAA TGT GAG TCT AAC CCT TGT CTT AAT GGA GGC TCA TGC
AAA GAC GAC ATT AAC AGT TAT GAA TGT TGG TGT CCC TTT GGC TTC GAG GGA AAG
AAT TGT GAG CTG GAC GTG ACC TGC AAT ATT AAG AAC GGA AGG TGC GAG CAG TTT
TGC AAA AAC AGT GCT GAT AAC AAG GTG GTA TGT TCT TGC ACC GAA GGT TAC CGT
CTT GCT GAA AAT CAG AAG AGC TGT GAA CCA GCC GTT CCC TTT CCC TGT GGA CGT
GTA AGC GTT TCT CAG ACA TCA AAA CTG ACC CGG GCT GAG ACT GTG TTC CCT GAC
GTC GAT TAC GTT AAC TCT ACC GAA GCC GAA GGA AGC CCC GGC AGC GGG TCA GCT
AAC GCA ACC GGC CCT AGC GGT GAA GGC TCC GCT CCT TCC GAA GGA AAC GCA ACC
GGA CCA GGT ACC TCC GGA GAG AGC ACA GCC AAC TCC ACA GGG GGG TCC CCT GCC
GAG GGG AGC CCT GGC AGT GAG ATC CTG GAT AAC ATC ACA CAG AGC ACA CAG AGC
TTT AAT GAC TTC ACC CGT GTG GTG GGA GGC GAG GAT GCA AAG CCC GGA CAG TTT
CCA TGG CAG GTG GTC CTG AAC GGC AAG GTG GAT GCC TTT TGC GGA GGA TCT ATC
GTG AAT GAA AAG TGG ATT GTG ACT GCT CAC TGT GTG GAG ACT GGT GTG AAA
ATC ACT GTG GTA GCA GGA GAA CAC AAT ATT GAG GAG ACC GAG CAT ACC GAG CAG
AAG CGC AAT GTG ATC CGC ATC ATA CCT CAC CAT AAC TAC AAT GCA ACA ATT AAT
AAG TAC AAC CAT GAC ATC GCC CTG TTG GAG CTG GAT GAG CCC CTG GTG CTC AAT
TCT TAT GTG ACA CCA ATC TGC ATA GCT GAC AAG GAA TAC ACT AAC ATT TTC CTG
AAG TTT GGC AGT GGA TAC GTG TCA GGA TGG GGC AGA GTG TTC CAC AAG GGA CGC
TCT GCT CTC GTG CTT CAG TAC CTG CGA GTG CCT TTG GTG GAT CGG GCA ACA TGT
TTG AGG AGC ACA AAA TTT ACT ATT TAC AAC AAT ATG TTT TGC GCC GGC TTC CAC
GAA GGA GGG CGA GAT TCA TGC CAG GGA GAC AGT GGC GGT CCA CAC GTG ACT GAA
GTC GAA GGC ACC TCT TTT TTG ACC GGA ATC ATC TCT TGG GGT GAA GAG TGT GCC
ATG AAA GGA AAG TAT GGC ATA TAC ACA AAG GTG TCC CGC TAT GTG AAC TGG ATC
AAG GAG AAG ACC AAA CTC ACC TAG
    
```

35

En modalidades adicionales, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos (secuencia optimizada en codón FIX 24-K5R con secuencia de propéptido y una sustitución R338L) (SEQ ID NO:5):

40

45

50

55

60

```

ATG CAG CGG GTG AAT ATG ATC ATG GCT GAG AGT CCA GGA CTT ATC ACC ATA TGC
TTG CTG GGG TAT CTC CTC TCC GCT GAG TGC ACC GTA TTC CTC GAT CAC GAG AAC
GCC AAC AAA ATC CTT AAC AGA CGT AGG CGA TAC AAC AGT GGC CGA CTG GAG GAG
TTT GTC CAA GGT AAC CTG GAA CGG GAA TGT ATG GAG GAG AAG TGT AGT TTC GAG
GAG GCT CGG GAG GTG TTT GAG AAC ACA GAA AGA ACA ACC GAA TTT TGG AAG CAA
TAT GTC GAT GGT GAC CAA TGT GAG TCT AAC CCT TGT CTT AAT GGA GGC TCA TGC
AAA GAC GAC ATT AAC AGT TAT GAA TGT TGG TGT CCC TTT GGC TTC GAG GGA AAG
AAT TGT GAG CTG GAC GTG ACC TGC AAT ATT AAG AAC GGA AGG TGC GAG CAG TTT
TGC AAA AAC AGT GCT GAT AAC AAG GTG GTA TGT TCT TGC ACC GAA GGT TAC CGT
CTT GCT GAA AAT CAG AAG AGC TGT GAA CCA GCC GTT CCC TTT CCC TGT GGA CGT
GTA AGC GTT TCT CAG ACA TCA AAA CTG ACC CGG GCT GAG ACT GTG TTC CCT GAC
GTC GAT TAC GTT AAC TCT ACC GAA GCC GAA GGA AGC CCC GGC AGC GGG TCA GCT
AAC GCA ACC GGC CCT AGC GGT GAA GGC TCC GCT CCT TCC GAA GGA AAC GCA ACC
GGA CCA GGT ACC TCC GGA GAG AGC ACA GCC AAC TCC ACA GGG GGG TCC CCT GCC
GAG GGG AGC CCT GGC AGT GAG ATC CTG GAT AAC ATC ACA CAG AGC ACA CAG AGC
TTT AAT GAC TTC ACC CGT GTG GTG GGA GGC GAG GAT GCA AAG CCC GGA CAG TTT
CCA TGG CAG GTG GTC CTG AAC GGC AAG GTG GAT GCC TTT TGC GGA GGA TCT ATC
GTG AAT GAA AAG TGG ATT GTG ACT GCT GCC CAC TGT GTG GAG ACT GGT GTG AAA
ATC ACT GTG GTA GCA GGA GAA CAC AAT ATT GAG GAG ACC GAG CAT ACC GAG CAG
AAG CGC AAT GTG ATC CGC ATC ATA CCT CAC CAT AAC TAC AAT GCA ACA ATT AAT
AAG TAC AAC CAT GAC ATC GCC CTG TTG GAG CTG GAT GAG CCC CTG GTG CTC AAT
TCT TAT GTG ACA CCA ATC TGC ATA GCT GAC AAG GAA TAC ACT AAC ATT TTC CTG
AAG TTT GGC AGT GGA TAC GTG TCA GGA TGG GGC AGA GTG TTC CAC AAG GGA CGC
TCT GCT CTC GTG CTT CAG TAC CTG CGA GTG CCT TTG GTG GAT CGG GCA ACA TGT
TTG NNN AGC ACA AAA TTT ACT ATT TAC AAC AAT ATG TTT TGC GCC GGC TTC CAC
GAA GGA GGG CGA GAT TCA TGC CAG GGA GAC AGT GGC GGT CCA CAC GTG ACT GAA
GTC GAA GGC ACC TCT TTT TTG ACC GGA ATC ATC TCT TGG GGT GAA GAG TGT GCC
ATG AAA GGA AAG TAT GGC ATA TAC ACA AAG GTG TCC CGC TAT GTG AAC TGG ATC
AAG GAG AAG ACC AAA CTC ACC TAG,
    
```

65

en donde NNN es cualquier codón de tres nucleótidos que codifica leucina.

La presente invención proporciona, además, una proteína del Factor IX, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula de cualquiera de esta invención para su uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico.

5 Algunas modalidades de la invención se dirigen a proteínas del Factor IX que tienen uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, etcétera) sitios de glicosilación adicionales. Por sitios de glicosilación "adicionales" o "nuevos" se entiende que el número de sitios de glicosilación en la proteína del FIX es superior al número de sitios de glicosilación presentes normalmente en una forma de "tipo silvestre" del Factor IX. Una proteína del Factor IX de esta invención puede incluir FIX derivado del plasma, así como también formas recombinantes del FIX. Generalmente, las modalidades de la invención se dirigen a aumentar el número de sitios de glicosilación en una molécula del FIX de esta invención. Sin embargo, debe entenderse que una proteína del Factor IX de esta invención que puede modificarse para aumentar el número de sitios de glicosilación y/o aumentar el número de cadenas de azúcar no se limita a una secuencia de aminoácidos del FIX de "tipo silvestre" en particular, debido a que las proteínas del FIX de origen natural o artificiales también pueden modificarse de acuerdo con los métodos de esta invención para aumentar el número de sitios de glicosilación y/o para aumentar el número de cadenas de azúcar.

La presente invención se dirige, además, a proteínas del FIX que contienen una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, etcétera) cadenas de azúcar adicionales. Dichas cadenas laterales de azúcar adicionales pueden presentarse en uno o más de los sitios de glicosilación adicionales introducidos en las proteínas del FIX de esta invención mediante los métodos descritos en la presente descripción. Alternativamente, las cadenas laterales de azúcar adicionales pueden presentarse en sitios en la proteína del FIX como resultado de métodos químicos y/o enzimáticos para introducir dichas cadenas de azúcar en la molécula del FIX, como se conocen bien en la técnica. Por cadenas de azúcar "adicionales" o "nuevas" se entiende que el número de cadenas de azúcar en la proteína del FIX es mayor que el número de cadenas de azúcar presentes normalmente en una forma de "tipo silvestre" del Factor IX. En diversas modalidades, pueden añadirse de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 cadenas laterales de azúcar adicionales (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50).

En algunas modalidades, al menos un sitio de glicosilación adicional se encuentra en el péptido de activación del Factor IX (por ejemplo, el péptido de activación del FIX humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1). La proteína del FIX descrita en la presente descripción puede tener una inserción de un segmento peptídico que introduce uno o más sitios de glicosilación entre la posición N157 y la N167 de la secuencia de aminoácidos del Factor IX de la SEC ID NO:1.

La(s) inserción(es) puede(n) introducirse en una proteína del FIX descrita en la presente descripción para aumentar el número de sitios de glicosilación y dicha(s) inserción(es) puede(n) incluir de aproximadamente uno a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, lo que incluye cualquier número de residuos de aminoácidos de uno a 100 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100).

En algunos casos, la inserción puede incluir todo o al menos parte (por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más residuos de aminoácidos) de un péptido de activación del Factor IX de una especie no humana, tal como el ratón. Esta secuencia peptídica insertada puede modificarse posteriormente para introducir sitios de glicosilación adicionales de acuerdo con las enseñanzas en la presente descripción.

El(los) sitio(s) de glicosilación puede(n) ser sitio(s) de glicosilación ligado(s) a N. En algunas modalidades, el(los) sitio(s) de glicosilación añadido(s) incluye(n) sitio(s) de glicosilación ligado(s) a N y la secuencia de consenso es NXT/S, siempre y cuando X no sea prolina.

En algunas modalidades, pueden añadirse de aproximadamente uno a aproximadamente 15 sitios de glicosilación a la secuencia de aminoácidos del FIX. En diversas modalidades, pueden añadirse de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 sitios de glicosilación (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50). En la presente descripción se describen proteínas del FIX en las que se ha creado un sitio de glicosilación por inserción, delección o sustitución de aminoácidos específicos. En casos particulares, la inserción, delección y/o sustitución se produce en la región del péptido de activación. La secuencia de aminoácidos del péptido de activación del FIX humano se proporciona en la presente descripción como: Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg (SEQ ID NO:11).

Se contempla que los sitios de glicosilación adicionales introducidos en una secuencia de aminoácidos del FIX pueden introducirse en cualquier lugar a lo largo de la secuencia de aminoácidos de la proteína del FIX. Por lo tanto, en algunos casos, el sitio o los sitios de glicosilación adicionales se introducen en el péptido de activación (aminoácidos 146-180 de la secuencia de aminoácidos del FIX humano maduro de SEQ ID NO:1). En algunas modalidades, el sitio o los sitios de glicosilación adicionales se introducen fuera del péptido de activación (por ejemplo, antes y/o después del péptido de

activación). En algunos casos, el sitio o los sitios de glicosilación adicionales se introducen tanto dentro del péptido de activación como fuera del péptido de activación. Por lo tanto, basado en la numeración de los 415 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína del FIX humano maduro como se muestra en la SEQ ID NO:1, puede introducirse un sitio de unión de glicosilación mediante la inserción de residuos de aminoácidos adicionales entre o en cualquiera de los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415 y cualquiera de sus combinaciones. Como se usa en la presente, un "sitio de unión de glicosilación" o "sitio de glicosilación" puede significar una secuencia de consenso de unión de azúcar (es decir, una serie de aminoácidos que actúan como una secuencia de consenso para unir un azúcar (mono-, oligo- o poli-sacárido) a una secuencia de aminoácidos o puede significar el residuo de aminoácido real al que se une covalentemente el resto de azúcar. El resto de azúcar puede ser un monosacárido (molécula de azúcar simple), un oligosacárido o un polisacárido.

En casos particulares, pueden insertarse aminoácidos adicionales entre y/o sustituirse en cualquiera de los residuos de aminoácidos que forman el péptido de activación, tal como entre cualquiera de los aminoácidos 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 y cualquiera de sus combinaciones. Además, el mismo inserto de este caso puede introducirse múltiples veces en la misma y/o en diferentes ubicaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína del FIX, lo que incluye dentro del péptido de activación. Además, pueden introducirse diferentes insertos y/o los mismos insertos una o más veces en la misma y/o en diferentes ubicaciones entre los residuos de aminoácidos a lo largo de la secuencia de aminoácidos de la proteína del FIX, lo que incluye dentro del péptido de activación. En un ejemplo no limitante, puede añadirse un sitio de glicosilación en los aminoácidos 103, 151 y 228.

Se conoce bien en la técnica que algunas proteínas pueden soportar una gran cantidad de cadenas laterales de azúcar y la distancia entre los sitios de glicosilación ligados a N puede ser tan pequeña como tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos (ver, por ejemplo, Lundin y otros, "Membrane topology of the Drosophila OR83b odorant receptor" FEBS Letters 581:5601-5604 (2007); Apweiler y otros, "On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database" Biochimica et Biophysica Acta 1473:4-8 (1999)).

Además, la proteína del FIX definida en la presente descripción puede modificarse mediante mutación (por ejemplo, sustitución, adición y/o delección de aminoácidos) para introducir sitios de glicosilación ligados a N. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos en la superficie de la proteína del FIX funcional pueden identificarse de acuerdo con métodos de modelado molecular estándar en la técnica que serían adecuados para la modificación (por ejemplo, mutación) para introducir uno o más sitios de glicosilación.

Las proteínas del FIX de esta invención que tienen sitios de glicosilación adicionales pueden producirse mediante métodos recombinantes tales como mutagénesis dirigida al sitio mediante el uso de PCR. Alternativamente, la proteína del Factor IX de esta invención puede sintetizarse químicamente para preparar una proteína del Factor IX con uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, etcétera) sitios de glicosilación adicionales.

Está dentro de la habilidad de un experto en la técnica modificar cualquier residuo o residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos del FIX maduro de acuerdo con métodos que se conocen bien en la técnica y como se enseña en la presente descripción y evaluar cualquier proteína del FIX resultante para determinar la actividad, estabilidad, recuperación, vida media, etcétera, de acuerdo con métodos que se conocen bien y como se describe en la presente descripción (ver, por ejemplo, Elliott y otros, "Structural requirements for additional N-linked carbohydrate on recombinant human erythropoietin" J. Biol. Chem 279:16854-62 (2004)).

Las modalidades de la invención se dirigen a proteínas del Factor IX recombinantes en las que se han añadido sitios de glicosilación para mejorar la recuperación y/o la vida media y/o la estabilidad del Factor IX. Los sitios de glicosilación pueden ser sitios de glicosilación ligados a N. En modalidades específicas, se añade al menos un sitio de glicosilación ligado a N.

5 Como se señala en la presente descripción, en algunas modalidades, se introduce al menos un sitio de glicosilación adicional en la secuencia de aminoácidos del FIX en un sitio que se encuentra fuera del péptido de activación. En algunas modalidades, el al menos un sitio de glicosilación adicional corresponde a un sitio que se glicosila en la forma nativa de un homólogo no humano del Factor IX. Una modificación de la secuencia de aminoácidos del FIX humano para introducir una serina o treonina en el aminoácido 262 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, que es la forma madura (es decir, secretada) del FIX humano, introduciría un sitio de glicosilación ligado a N adicional en la proteína humana. En diversos casos, el homólogo no humano es de perro, cerdo, vaca o ratón.

10 Adicionalmente, se proporciona en la presente descripción un ácido nucleico que comprende, que consiste esencialmente en y/o que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del FIX de esta invención. Dichos ácidos nucleicos pueden presentarse en un vector, tal como un casete de expresión. Por lo tanto, otras modalidades de la invención se dirigen a casetes de expresión diseñados para expresar una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las proteínas del Factor IX de esta invención. Los ácidos nucleicos y/o vectores de esta invención pueden presentarse en una célula. Por lo tanto, diversas modalidades de la invención se dirigen a células huésped recombinantes que contienen el vector (por ejemplo, casete de expresión). Dicha célula puede aislarse y/o presentarse en un animal transgénico no humano. Por lo tanto, ciertas modalidades de la invención se dirigen, además, a un animal transgénico no humano que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las proteínas del Factor IX de la presente invención.

20 Una comparación de la secuencia de aminoácidos del péptido de activación del FIX de humano, ratón, cobaya y ornitorrinco revela que la secuencia de aminoácidos del FIX del ratón tiene nueve aminoácidos adicionales presentes en su péptido de activación, la secuencia de aminoácidos del FIX de cobaya tiene diez residuos de aminoácidos adicionales presentes en su péptido de activación y el ornitorrinco tiene 14 residuos de aminoácidos adicionales presentes en su péptido de activación. Estos aminoácidos adicionales se encuentran entre los dos sitios de glicosilación de origen natural (N 157 y N 167) en el Factor IX humano.

30 El FIX humano y el de ratón tienen estructuras idénticas esencialmente y la enzima humana puede funcionar en el ratón. Como el FIX humano funciona sin el segmento adicional de nueve aminoácidos que se encuentra en el ratón, esta región de la molécula del Factor IX puede tolerar modificaciones dentro de su secuencia, lo que incluye inserciones, sustituciones y/o deleciones, sin una pérdida sustancial en la integridad estructural, bioquímica o de cualquier otra manera funcional de la molécula. Los nueve aminoácidos insertados en el ratón son más probablemente residuos de superficie (de acuerdo con los estudios estructurales) y por lo tanto son accesibles para la modificación mediante las enzimas de glicosilación. En el factor IX humano nativo, los dos sitios de glicosilación ligados a N están 12 y 14 aminoácidos distantes de los sitios de escisión de amino y carboxilo, respectivamente, del péptido de activación. Por lo tanto, en algunos casos descritos en la presente descripción, pueden añadirse residuos de aminoácidos adicionales entre N157 y N167 de la proteína del Factor IX humano de SEQ ID NO:1 para añadir sitios de glicosilación para mejorar la vida media y/o la biodisponibilidad. En diversos casos, los sitios de glicosilación se añaden por inserción, deleción y/o modificación de la secuencia nativa para incluir una secuencia de unión para secuencias de consenso para la glicosilación ligada a N.

40 La secuencia humana para el péptido de activación comienza en el residuo 146 de la proteína madura. Los sitios de glicosilación naturales están en N157 y N167 (SEQ ID NO:1). En algunos casos descritos en la presente descripción, pueden insertarse residuos de aminoácidos adicionales entre los dos sitios de glicosilación normales (entre N157 y N167 en la secuencia madura) para proporcionar sitios de glicosilación adicionales. En algunos casos descritos en la presente descripción, se añaden de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos adicionales. En otros casos descritos en la presente descripción, se añaden de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos. En otros casos descritos en la presente descripción, se añaden aproximadamente de 5 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos. En aún otros casos descritos en la presente descripción, se añaden de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 residuos de aminoácidos. Típicamente, los residuos de aminoácidos se eligen entre los 20 aminoácidos biológicos siempre y cuando la prolina no se use como "X" en el sitio de glicosilación NXT/S, que es la secuencia de consenso para la glicosilación ligada a N. La Tabla 1 muestra 20 aminoácidos biológicos comunes y sus abreviaturas.

55 Pueden añadirse sitios de N-glicosilación. Las secuencias de consenso para la adición de sitios de glicosilación se conocen en la técnica e incluyen la secuencia de consenso "NXT/S" para la N-glicosilación donde X no es prolina.

60 En algunos casos descritos en la presente descripción, las secuencias de unión endógenas ligadas a N de ratones, humanos y otras secuencias del Factor IX de mamíferos se insertan en el péptido de activación. Estas pueden insertarse individualmente o en combinación. En ciertos casos descritos en la presente descripción, el segmento insertado incluye una región espaciadora entre los sitios de glicosilación, que puede presentarse individualmente, en repeticiones en tándem, en múltiples, etcétera. Una región espaciadora de esta invención puede ser de uno a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100). En algunos casos, por ejemplo, la región espaciadora puede ser de uno a aproximadamente 20 aminoácidos. En otros casos la región espaciadora puede ser de uno a aproximadamente diez aminoácidos. En otros casos, la región espaciadora puede ser de uno a aproximadamente cinco residuos de aminoácidos.

- 5 Se incluye una región espaciadora descrita en la presente descripción entre los sitios de unión de carbohidratos añadidos y/o entre los sitios de glicosilación de origen natural y los sitios de glicosilación añadidos para reducir o eliminar el impedimento estérico y proporcionar un reconocimiento eficiente mediante la glicosiltransferasa apropiada. Una región espaciadora descrita en la presente descripción puede comprender cualquier combinación de residuos de aminoácidos, siempre y cuando no sean cisteína o prolina y siempre y cuando la secuencia de aminoácidos del espaciador no tenga más de aproximadamente 10 % de residuos que son hidrófobos (por ejemplo, triptófano, tirosina, fenilalanina y valina).
- 10 En algunas modalidades, NXT/S se incorpora en la secuencia de aminoácidos insertada para añadir uno o más sitios de glicosilación adicionales. "X" puede ser cualquier aminoácido biológico, excepto que se desfavorece la prolina. En algunas modalidades, se añade al menos un sitio de glicosilación adicional a la proteína del Factor IX. En otras modalidades, se añaden dos sitios de glicosilación adicionales. En modalidades adicionales, se añaden tres sitios de glicosilación adicionales. En aún otras modalidades, se añaden cuatro sitios de glicosilación adicionales. En modalidades adicionales, se añaden cinco sitios de glicosilación adicionales. En algunas modalidades, se añaden seis sitios de glicosilación adicionales. En otras modalidades, se añaden más de seis sitios de glicosilación adicionales.
- 15 En un caso descrito en la presente descripción, la Ala en la posición 161 de la secuencia de aminoácidos del FIX maduro (SEQ ID NO: 1) se reemplaza con Asn para proporcionar un sitio de glicosilación adicional. En un caso adicional descrito en la presente descripción, la secuencia VFIQDNITD (SEQ ID NO:8) se inserta entre los residuos 161 y 162 de la secuencia de aminoácidos del FIX humano maduro de SEQ ID NO:1 para introducir un sitio de glicosilación ligado a N en la secuencia del FIX humano. En aún otro caso descrito en la presente descripción, se añade otro nuevo sitio de glicosilación mediante el reemplazo de Asp con Asn en el inserto VFIQDNITD. La secuencia insertada daría VFIQDNITN (SEQ ID NO:9). Las modalidades analizadas anteriormente podrían combinarse para proporcionar de uno a cuatro sitios de glicosilación adicionales en la proteína del Factor IX humano.
- 20 En otra modalidad, se añade la secuencia siguiente, que proporciona cinco sitios de glicosilación adicionales. Los sitios de glicosilación se muestran en negrita y subrayados. AETVFPDVYV**N**STEN**NET**IQD**N**ITD**NET**ILD**N**ITQSTQSFNDFTR (SEQ ID NO: 10)
- 25 En algunas modalidades, los sitios de glicosilación se añaden en sitios fuera del péptido de activación. Estos sitios adicionales pueden seleccionarse, por ejemplo, al alinear la secuencia de aminoácidos del Factor IX del ser humano con la secuencia de aminoácidos del Factor IX de otras especies y determinar la posición de los sitios de glicosilación en las especies no humanas. La posición homóloga o equivalente en la secuencia de aminoácidos del FIX humano se modifica después para proporcionar un sitio de glicosilación. Este método puede usarse para identificar tanto sitios potenciales de N-glicosilación como de O-glicosilación.
- 30 Las proteínas del FIX de acuerdo con la invención se producen y caracterizan por métodos que se conocen bien en la técnica y como se describe en la presente descripción. Estos métodos incluyen la determinación del tiempo de coagulación (ensayo de tiempo parcial de tromboplastina (PPT)) y la administración de la proteína del FIX a un animal de prueba para determinar la recuperación, la vida media y la biodisponibilidad mediante un inmunoensayo y/o un ensayo de actividad apropiados, como se conocen bien en la técnica.
- 35 La proteína del Factor IX, el ácido nucleico, el vector y/o la célula de esta invención pueden incluirse en una composición farmacéutica. Algunas modalidades se dirigen a un kit que incluye la proteína del Factor IX de esta invención.
- 40 La proteína del Factor IX de esta invención puede usarse en el tratamiento de un trastorno hemorrágico en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) que necesita de esto. Por lo tanto, la presente invención proporciona, además, el uso de la proteína del Factor IX, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula de esta invención para el tratamiento de un trastorno hemorrágico.
- 45 Además, se describe en la presente descripción un método para aumentar la biodisponibilidad de una proteína del Factor IX en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la proteína del Factor IX, la molécula de ácido nucleico y/o la célula descritas en la presente descripción.
- 50 Los trastornos hemorrágicos que pueden tratarse de acuerdo con esta invención incluyen una deficiencia del FIX, hemofilia B y enfermedad de Christmas. Dichos protocolos de tratamiento y regímenes de dosificación para administrar o suministrar el Factor IX a un sujeto que necesita de esto se conocen bien en la técnica.
- 55 Pueden usarse muchos vectores de expresión para crear células modificadas genéticamente. Algunos vectores de expresión se diseñan para expresar grandes cantidades de proteínas recombinantes después de la amplificación de las células transfectadas en una variedad de condiciones que favorecen las células de alta expresión seleccionadas. Algunos vectores de expresión se diseñan para expresar grandes cantidades de proteínas recombinantes sin la necesidad de amplificación con presión de selección. La presente invención incluye la producción de células modificadas genéticamente de acuerdo con métodos estándar en la técnica y no depende del uso de ningún vector de expresión o sistema de expresión específico.
- 60
- 65

Para crear una célula modificada genéticamente para producir grandes cantidades de una proteína del Factor IX, las células se transfectan con un vector de expresión que contiene el ADNc que codifica la proteína. En algunas modalidades, la proteína objetivo se expresa con enzimas cotransfectadas seleccionadas que provocan que se produzca una modificación postraduccional adecuada de la proteína objetivo en un sistema celular dado.

5

La célula puede seleccionarse de una variedad de fuentes, pero es, de cualquier otra manera, una célula que puede transfectarse con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico, preferentemente, un ADNc que codifica una proteína del Factor IX.

10

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique de cualquier otra manera, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Ver, por ejemplo, Sambrook, y otros, *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 2da ed. (1989); *DNA Cloning*, Vols. I y II (D. N Glover, ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds. 1984); *Transcription and Translation* (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); las series, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.), particularmente los Vols. 154 y 155 (Wu y Grossman, y Wu, eds., respectivamente); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos, eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, Mayer y Walker, eds. (Academic Press, Londres, 1987); *Scopes, Protein Purification: Principles and Practice*, 2da ed. 1987 (Springer-Verlag, Nueva York); y *Handbook of Experimental Immunology Vols I-IV* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds 1986).

15

20

Técnicas de Ingeniería Genética

25

Se conoce bien la producción de genes clonados, ADN recombinante, vectores, células huésped transformadas, proteínas y fragmentos de proteínas mediante ingeniería genética. Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Núm. 4,761,371 de Bell y otros de la columna 6, línea 3 a la columna 9, línea 65; Patente de Estados Unidos Núm. 4,877,729 de Clark y otros de la columna 4, línea 38 a la columna 7, línea 6; Patente de Estados Unidos Núm. 4,912,038 de Schilling de la columna 3, línea 26 a la columna 14, línea 12; y Patente de Estados Unidos Núm. 4,879,224 de Wallner de la columna 6, línea 8 a la columna 8, línea 59.

30

Un vector es un constructo de ADN replicable. Los vectores se usan en la presente descripción ya sea amplificar el ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX y/o para expresar el ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX. Un vector de expresión es un constructo de ácido nucleico replicable en el que una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína del Factor IX se une operativamente a secuencias de control adecuadas capaces de efectuar la expresión de la secuencia de nucleótidos para producir una proteína del Factor IX en un huésped adecuado. La necesidad de dichas secuencias de control variará en dependencia del huésped seleccionado y el método de transformación elegido. Generalmente, las secuencias de control incluyen un promotor transcripcional, una secuencia de operador opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión ribosómica de ARNm adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción.

35

40

Los vectores comprenden plásmidos, virus (por ejemplo, adenovirus, citomegalovirus), fagos y fragmentos de ADN integrables (es decir, fragmentos integrables en el genoma del huésped mediante recombinación). El vector se replica y funciona independientemente del genoma del huésped, o puede, en algunos casos, integrarse en el propio genoma. Los vectores de expresión pueden contener un promotor y sitios de unión a ARN que se unen operativamente al gen que se expresa y son operables en el organismo huésped.

45

Las regiones de ADN o secuencias de nucleótidos se unen operativamente o se asocian operativamente cuando se relacionan funcionalmente entre sí. Por ejemplo, un promotor se une operativamente a una secuencia de codificación si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma se une operativamente a una secuencia de codificación si se coloca de manera que permita la traducción de la secuencia.

50

Las células huésped transformadas son células que se han transformado, transducido y/o transfectado con vector(es) de proteína del Factor IX construido mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

55

Las células huésped adecuadas incluyen células procariotas, levaduras o eucariotas superiores tales como células de mamífero y células de insecto. Las células derivadas de organismos multicelulares son un huésped adecuado particularmente para la síntesis de proteína del Factor IX recombinante, y se prefieren particularmente las células de mamífero. La propagación de dichas células en cultivo celular se ha convertido en un procedimiento de rutina (*Tissue Culture*, Academic Press, Kruse y Patterson, editores (1973)). Ejemplos de líneas celulares huésped útiles son las células VERO y HeLa, las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) y las líneas celulares WI138, HEK 293, BHK, COS-7, CV y MDCK. Los vectores de expresión para dichas células incluyen normalmente (si es necesario) un origen de replicación, un promotor ubicado aguas arriba de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína del Factor IX a expresarse y asociada operativamente con este, junto con un sitio de unión a ribosoma, un sitio de empalme de ARN (si se usa ADN genómico que contiene un intrón), un sitio de poliadenilación y una secuencia de terminación de la

60

65

transcripción. En una modalidad preferida, la expresión se lleva a cabo en células de ovario de hámster chino (CHO) mediante el uso del sistema de expresión de la Patente de Estados Unidos Núm. 5,888,809.

5 Las secuencias de control de la transcripción y la traducción en los vectores de expresión a usarse en células de vertebrados transformantes se proporcionan a menudo mediante fuentes virales. Por ejemplo, los promotores usados comúnmente se derivan de polioma, Adenovirus 2, y Virus del Simio 40 (SV40). Ver por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 4,599,308.

10 Un origen de replicación podría proporcionarse ya sea mediante la construcción del vector para incluir un origen exógeno, tal como podría derivarse del SV40 u otra fuente viral (por ejemplo, polioma, adenovirus, VSV, o BPV), o podría proporcionarse mediante el mecanismo de replicación cromosomal de la célula huésped. Si el vector se integra en el cromosoma de la célula huésped, a menudo es suficiente lo último.

15 En lugar de usar vectores que contienen orígenes virales de replicación, pueden transformarse células de mamífero mediante el método de cotransformación con un marcador seleccionable y el ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados son la dihidrofolato reductasa (DHFR) o la timidina quinasa. Este método se describe, además, en la Patente de Estados Unidos Núm. 4,399,216.

20 Otros métodos adecuados para la adaptación a la síntesis de la proteína del Factor IX en el cultivo de células de vertebrados recombinantes incluyen los descritos en Gething y otros, Nature 293:620 (1981); Mantei y otros, Nature 281:40; y Levinson y otros, Solicitudes EPO Núms. 117,060A y 117,058A.

25 Las células huésped tales como células de insecto (por ejemplo, células cultivadas de *Spodoptera frugiperda*) y vectores de expresión tales como el vector de expresión de baculovirus (por ejemplo, vectores derivados de *Autographa californica*MNPV, *Trichoplusia ni* MNPV, *Rachiplusia ou* MNPV, o *Galleria ou*MNPV) pueden emplearse para llevar a cabo la presente invención, como se describe en las Patentes de Estados Unidos Núms. 4,745,051 y 4,879,236 de Smith y otros. En general, un vector de expresión de baculovirus comprende un genoma de baculovirus que contiene la secuencia de nucleótidos a expresar insertada en el gen de polihedrina en una posición que varía de la señal de inicio transcripcional de polihedrina hasta el sitio de inicio ATG y bajo el control transcripcional de un promotor de polihedrina de baculovirus.

30 Las células huésped procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *Escherichia coli* (*E. coli*) o bacilos. Las células superiores eucariotas incluyen líneas celulares establecidas de origen de mamíferos, como se describe a continuación. Las células huésped ilustrativas son *E. coli* W3110 (ATCC 27,325), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* 294 (ATCC 31,446). Se dispone de una amplia variedad de vectores procariotas y microbianos adecuados. La *E. coli* se transforma típicamente mediante el uso de pBR322. Los promotores usados más comúnmente en los vectores de expresión microbiana recombinante incluyen los sistemas promotores de betalactamasa (penicilinas) y lactosa (Chang y otros, Nature 275:615 (1978); y Goeddel y otros, Nature 281:544 (1979)), un sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel y otros, Nucleic Acids Res. 8:4057 (1980) y Solicitud de Publicación EPO Núm. 36,776) y el promotor *tac* (De Boer y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 80:21 (1983)). El promotor y la secuencia Shine-Dalgarno (para la expresión del huésped procariota) se unen operativamente al ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX, es decir, se colocan para promover la transcripción del ARN mensajero del Factor IX a partir del ADN.

45 Los microbios eucariotas tales como los cultivos de levadura pueden transformarse, además, con vectores que codifican proteínas (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 4,745,057). El *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo huésped más comúnmente usado entre los eucariotas inferiores, aunque se dispone comúnmente de un número de otras cepas. Los vectores de levadura pueden contener un origen de replicación a partir del plásmido de levadura de 2 micras o una secuencia de replicación autónoma (ARS), un promotor, un ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX, secuencias de poliadenilación y la terminación de la transcripción, y un gen de selección. Un plásmido ilustrativo es YRp7, (Stinchcomb y otros, Nature 282:39 (1979); Kingsman y otros, Gene 7:141 (1979); Tschemper y otros, Gene 10:157 (1980)). Las secuencias promotoras adecuadas en vectores de levadura incluyen los promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y otros, J. Biol. Chem. 255:2073 (1980) u otras enzimas glucolíticas (Hess y otros, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149 (1968); y Holland y otros, Biochemistry 17:4900 (1978)). Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en R. Hitzeman y otros, Publicación EPO Núm. 73,657.

55 Las secuencias de codificación clonadas descritas en la presente descripción invención pueden codificar el FIX de cualquier especie de origen, lo que incluye ratón, rata, perro, zarigüeya, conejo, gato, cerdo, caballo, oveja, vaca, cuiriel, zarigüeya, ornitorrinco, y ser humano, pero codifican, preferentemente, la proteína del Factor IX de origen humano. Además, se abarca el ácido nucleico que codifica el Factor IX que puede hibridarse con el ácido nucleico que codifica las proteínas descritas en la presente descripción. La hibridación de dichas secuencias puede llevarse a cabo en condiciones de rigurosidad reducida o incluso en condiciones rigurosas (por ejemplo, condiciones rigurosas como las representadas por una rigurosidad de lavado de NaCl 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M, SDS al 0,1 % a 60 °C o incluso 70 °C) al ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX descrita en la presente descripción en un ensayo de hibridación *in situ* estándar. Ver, por ejemplo, Sambrook y otros, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2da Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory).

Las proteínas del FIX producidas de acuerdo con la invención pueden expresarse en animales transgénicos no humanos mediante métodos conocidos. Ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 6,344,596. En resumen, los animales transgénicos pueden incluir, pero no se limitan a, animales de granja (por ejemplo, cerdos, cabras, ovejas, vacas, caballos, conejos y similares) roedores (tales como ratones, ratas y cobayas), y mascotas domésticas (por ejemplo, gatos y perros). Se prefiere particularmente, en algunas modalidades, ganado animal, tal como cerdos, ovejas, cabras y vacas.

El animal transgénico no humano de esta invención se produce mediante la introducción en un embrión no humano de células individuales un polinucleótido apropiado que codifica una proteína del Factor IX humano de esta invención de manera que el polinucleótido se integra establemente en el ADN de las células de la línea germinal del animal maduro, y se hereda del modo Mendeliano normal. El animal transgénico no humano de esta invención tendría un fenotipo de producir la proteína del FIX en fluidos corporales y/o tejidos. La proteína del FIX se extraería de estos fluidos y/o tejidos y se procesaría, por ejemplo, para su uso terapéutico. (Ver, por ejemplo, Clark y otros "Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep" *Bio/Technology* 7:487-492 (1989); Van Cott y otros, "Haemophilic factors produced by transgenic livestock: abundance can enable alternative therapies worldwide" *Haemophilia* 10(4):70-77 (2004)).

Las moléculas de ADN pueden introducirse en embriones no humanos mediante una variedad de medios que incluyen, pero no se limitan a, microinyección, precipitación mediada por fosfato de calcio, fusión de liposomas, o infección retroviral de células madre totipotentes o pluripotentes. Las células transformadas pueden entonces introducirse en embriones no humanos e incorporarse a ellos para formar animales transgénicos no humanos. Los métodos para obtener animales transgénicos no humanos se describen, por ejemplo, en *Transgenic Animal Generation and Use* por L. M. Houdebine, Harwood Academic Press, 1997. Los animales transgénicos pueden generarse, además, mediante el uso de métodos de transferencia nuclear o clonación mediante el uso de líneas celulares embrionarias o adultas como se describe, por ejemplo, en Campbell y otros, *Nature* 380:64-66 (1996) y Wilmut y otros, *Nature* 385:810-813 (1997). Además, puede usarse una técnica que usa la inyección citoplasmática de ADN como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5,523,222.

Pueden obtenerse animales transgénicos no humanos productores del Factor IX mediante la introducción de un constructo quimérico que comprende secuencias que codifican el Factor IX. Se conocen bien los métodos para obtener animales transgénicos. Ver, por ejemplo, Hogan y otros, *MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO*, (Cold Spring Harbor Press 1986); Krimpenfort y otros, *Bio/Technology* 9:88 (1991); Palmiter y otros, *Cell* 41:343 (1985), Kraemer y otros, *GENETIC MANIPULATION OF THE EARLY MAMMALIAN EMBRYO*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1985); Hammer y otros, *Nature* 315:680 (1985); Wagner y otros, Patente de Estados Unidos Núm. 5,175,385; Krimpenfort y otros, Patente de Estados Unidos Núm. 5,175,384, Janne y otros, *Ann. Med.* 24:273 (1992), Brem y otros, *Chim. Oggi.* 11:21 (1993), Clark y otros, Patente de Estados Unidos Núm. 5,476,995.

En algunas modalidades, pueden usarse regiones reguladoras que actúan en cis que son "activas" en el tejido mamario, porque los promotores son más activos en el tejido mamario que en otros tejidos en las condiciones fisiológicas en que se sintetiza la leche. Dichos promotores incluyen, pero no se limitan a, los promotores de la proteína ácida de suero (WAP) corta y larga, caseína α , β y κ corta y larga, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina ("BLG"). Las secuencias señal pueden usarse, además, de acuerdo con esta invención que dirige la secreción de las proteínas expresadas a otros fluidos corporales, particularmente sangre y orina. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen los péptidos señal de factores de coagulación secretados, lo que incluye péptidos señal del Factor IX, proteína C y activador de plasminógeno de tipo tejido.

Entre las secuencias útiles que regulan la transcripción, además de los promotores analizados anteriormente, están los potenciadores, las señales de empalme, las señales de terminación de la transcripción, los sitios de poliadenilación, las secuencias reguladoras, las secuencias de procesamiento de ARN y otras secuencias que regulan la expresión de transgenes.

Preferentemente, el sistema de expresión o constructo incluye una región no traducida de 3' aguas abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante deseada. Esta región puede aumentar la expresión del transgén. Entre las regiones no traducidas de 3' útiles con respecto a esto están las secuencias que proporcionan una señal poli A.

Pueden derivarse secuencias no traducidas de 3' heterólogas adecuadas, por ejemplo, a partir del antígeno t pequeño de SV40, la región no traducida de 3' de caseína, u otras secuencias no traducidas de 3' que se conocen bien en esta técnica. Los sitios de unión del ribosoma también son importantes para aumentar la eficiencia de expresión del FIX. Igualmente, las secuencias que regulan la modificación postraduccional del FIX son útiles en la invención.

Las secuencias de codificación del Factor IX, junto con los vectores y las células huésped para la expresión de estas, se describen en la solicitud de Patente Europea núm. 373012, solicitud de Patente Europea núm. 251874, solicitud de Patente PCT núm. 8505376, solicitud de Patente PCT núm. 8505125, solicitud de Patente Europea núm. 162782, y solicitud de Patente PCT núm. 8400560.

Composiciones de la invención

65

ES 2 744 903 T3

En la presente descripción se describe una proteína del Factor IX (FIX) aislada que comprende al menos tres sitios de glicosilación adicionales con relación al FIX humano de tipo silvestre, una sustitución K5R y una sustitución R338X de la secuencia de aminoácidos del FIX de SEQ ID NO:1, en donde X es un aminoácido distinto de la arginina.

SEQ ID NO:1:

```

5   Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
    1      5      10      15      20      25      30      35      40      45
    Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
    20      25      30      35      40      45      50      55      60      65
    Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
10  Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
    50      55      60      65      70      75      80      85      90      95
    Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
    65      70      75      80      85      90      95      100      105      110
15  Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
    85      90      95      100      105      110      115      120      125
    Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
    100      105      110      115      120      125      130      135      140
20  Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
    115      120      125      130      135      140      145      150      155
    Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
    130      135      140      145      150      155      160      165      170
25  Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
    145      150      155      160      165      170      175      180      185
    Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
    165      170      175      180      185      190      195      200      205
30  Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
    180      185      190      195      200      205      210      215      220
    Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
    195      200      205      210      215      220      225      230      235
    Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
    210      215      220      225      230      235      240      245      250
35  Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
    225      230      235      240      245      250      255      260      265
    Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
    245      250      255      260      265      270      275      280      285
40  His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
    260      265      270      275      280      285      290      295      300
    Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
    275      280      285      290      295      300      305      310      315
    Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290      295      300      305      310      315      320      325      330
45  Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
    305      310      315      320      325      330      335      340      345
    Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
    325      330      335      340      345      350      355      360      365
    Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
    340      345      350      355      360      365      370      375      380
50  Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
    355      360      365      370      375      380      385      390      395
    His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370      375      380      385      390      395      400      405      410
    Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
    385      390      395      400      405      410      415
55  Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
    405      410      415

```

En la presente descripción se describe una proteína del Factor IX (FIX) aislada que comprende al menos tres sitios de glicosilación adicionales con relación al FIX humano de tipo silvestre, una sustitución K51R y una sustitución R384X de la secuencia de aminoácidos FIX de SEQ ID NO:6, en donde X es un aminoácido distinto de la arginina.

```

55  MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRRRRYNSG
    KLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLN
    GGSKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCT
60  EGYRLAENQKSCPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPDVDYVNSTEAE GSPGS
    GSANATGPSGEGSAPSEGNATGPGTSGG SPANSTGGSPAEGSPGSEILDNITQSTQ
    SFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKV DAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGV
    KITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNATINKYNHDIALLELDEPLVLSY
65  VTPICIADKEYTNIFLKFSGSYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRST
    KFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMK GKY
    GIYTKVSRVYVNWIKETKLT (SEQ ID NO:6).

```

Además, en la presente descripción se describe una proteína del FIX que comprende la secuencia de aminoácidos:

5 MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRRRRYNSG
 RLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLN
 GGSKDDINSYECWCWPFGEFGKNCELDVTICNKNRCEQFCKNSADNKVVCSCT
 EGYRLAENQKSCEPAVPPFCGRVSVSQT SKLTRAETVFPDVDYVNSTE AEGSPGS
 GSANATGPSGEGSAPSEGNATGPGTSGGSPANSTGGSPAEGSPGSEILDNITQSTQ
 10 SFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSI VNEK WIVTAAHCVETGV
 KITVVAGEHNIEETEHEQKRN VIRIIPHHNYNATINKYNHDIALLELDEPLVLSY
 VTPICIADKEYTNIFLKFSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLXS
 TKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGG
 15 YGIYTKVSRVNWIKETKLT (SEQ ID NO:7),

en donde X es cualquier aminoácido excepto R (arginina).

Adicionalmente, en la presente descripción se describe una proteína del FIX que comprende la secuencia de aminoácidos:

20 YNSGRLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTTE FWKQYVDGDQ CESNPCLNGG
 SCKDDINSYE CWCPFGFEGK NCELDVTCNI KNGRCEQFCK NSADNKVVCS CTEGYRLAEN
 QKSCEPAVPP FCGRVSVSQT SKLTRAETVF PDVDYVNSTE AEGSPGSGSA NATGPSGEGS
 APSEGNATGP GTSGGSPANS TGGSPAEGSP GSEILDNITQ STQSFNDFTR VVGEDAKPG
 QFPWQVVLNG KVDAFCGGSI VNEK WIVTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE TEHEQKRN
 25 IRIIPHHNYN ATINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNIFL KFGSGYVSGW
 GRV FHKGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLXST KFTIYNNMFC AGFHEGGRDS CQGD SGGPHV
 TEVEGTSFLT GIISWGEECA MKGKYGIYTK VSRVNWIKETKLT (SEQ ID NO:2),

en donde X es cualquier aminoácido excepto R (arginina).

30 La invención proporciona una proteína del FIX que comprende la secuencia de aminoácidos:

Tyr Asn Ser Gly Arg Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
 Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu
 Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn
 Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp
 35 Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile

Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val
 Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro
 Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 40 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
 Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg
 Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu
 Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile
 Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly
 45 Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg
 Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile
 Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln
 Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Xaa Ser Thr Lys Phe
 50 Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser
 Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe
 Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly
 Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu
 Thr (SEQ ID NO:3),

55 en donde Xaa es leucina.

Además, en la presente descripción se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos (secuencia optimizada en codón 24-K5R del FIX con secuencia de propéptido):

60

65

ES 2 744 903 T3

5 ATG CAG CGG GTG AAT ATG ATC ATG GCT GAG AGT CCA GGA CTT ATC ACC ATA TGC
 TTG CTG GGG TAT CTC CTC TCC GCT GAG TGC ACC GTA TTC CTC GAT CAC GAG AAC
 GCC AAC AAA ATC CTT AAC AGA CGT AGG CGA TAC AAC AGT GGC CGA CTG GAG GAG
 TTT GTC CAA GGT AAC CTG GAA CGG GAA TGT ATG GAG GAG AAG TGT AGT TTC GAG
 GAG GCT CGG GAG GTG TTT GAG AAC ACA GAA AGA ACA ACC GAA TTT TGG AAG CAA
 TAT GTC GAT GGT GAC CAA TGT GAG TCT AAC CCT TGT CTT AAT GGA GGC TCA TGC
 AAA GAC GAC ATT AAC AGT TAT GAA TGT TGG TGT CCC TTT GGC TTC GAG GGA AAG
 AAT TGT GAG CTG GAC GTG ACC TGC AAT ATT AAG AAC GGA AGG TGC GAG CAG TTT
 TGC AAA AAC AGT GCT GAT AAC AAG GTG GTA TGT TCT TGC ACC GAA GGT TAC CGT
 10 CTT GCT GAA AAT CAG AAG AGC TGT GAA CCA GCC GTT CCC TTT CCC TGT GGA CGT
 GTA AGC GTT TCT CAG ACA TCA AAA CTG ACC CGG GCT GAG ACT GTG TTC CCT GAC
 GTC GAT TAC GTT AAC TCT ACC GAA GCC GAA GGA AGC CCC GGC AGC GGG TCA GCT
 AAC GCA ACC GGC CCT AGC GGT GAA GGC TCC GCT CCT TCC GAA GGA AAC GCA ACC
 GGA CCA GGT ACC TCC GGA GGA AGC CCA AAC TCC ACA GGG GGG TCC CCT GCC
 GAG GGG AGC CCT GGC AGT GAG ATC CTG GAT AAC ATC ACA CAG AGC ACA CAG AGC
 15 TTT AAT GAC TTC ACC CGT GTG GTG GGA GGC GAG GAT GCA AAG CCC GGA CAG TTT
 CCA TGG CAG GTG GTC CTG AAC GGC AAG GTG GAT GCC TTT TGC GGA GGA TCT ATC
 GTG AAT GAA AAG TGG ATT GTG ACT GCT GCC CAC TGT GTG GAG ACT GGT GTG AAA
 ATC ACT GTG GTA GCA GGA GAA CAC AAT ATT GAG GAG ACC GAG CAT ACC GAG CAG
 AAG CGC AAT GTG ATC CGC ATC ATA CCT CAC CAT AAC TAC AAT GCA ACA ATT AAT
 AAG TAC AAC CAT GAC ATC GCC CTG TTG GAG CTG GAT GAG CCC CTG GTG CTC AAT
 20 TCT TAT GTG ACA CCA ATC TGC ATA GCT GAC AAG GAA TAC ACT AAC ATT TTC CTG
 AAG TTT GGC AGT **GGA TAC GTG TCA** GGA TGG GGC AGA GTG TTC CAC AAG GGA CGC
 TCT GCT CTC GTG CTT CAG TAC CTG CGA GTG CCT TTG GTG GAT CGG GCA ACA TGT
 TTG AGG AGC ACA AAA TTT ACT ATT TAC AAC AAT ATG TTT TGC GCC GGC TTC CAC
 GAA GGA GGG CGA GAT TCA TGC CAG GGA GAC AGT GGC GGT CCA CAC GTG ACT GAA
 25 GTC GAA GGC ACC TCT TTT TTG ACC GGA ATC ATC TCT TGG GGT GAA GAG TGT GCC
 ATG AAA GGA AAG TAT GGC ATA TAC ACA AAG GTG TCC CGC TAT GTG AAC TGG ATC
 AAG GAG AAG ACC AAA CTC ACC TAG (SEQ ID NO:4)

30 En modalidades adicionales, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos (secuencia optimizada en codón FIX 24-K5R con secuencia de propéptido y una sustitución R338L):

35 ATG CAG CGG GTG AAT ATG ATC ATG GCT GAG AGT CCA GGA CTT ATC ACC ATA TGC
 TTG CTG GGG TAT CTC CTC TCC GCT GAG TGC ACC GTA TTC CTC GAT CAC GAG AAC
 GCC AAC AAA ATC CTT AAC AGA CGT AGG CGA TAC AAC AGT GGC CGA CTG GAG GAG
 TTT GTC CAA GGT AAC CTG GAA CGG GAA TGT ATG GAG GAG AAG TGT AGT TTC GAG
 GAG GCT CGG GAG GTG TTT GAG AAC ACA GAA AGA ACA ACC GAA TTT TGG AAG CAA
 TAT GTC GAT GGT GAC CAA TGT GAG TCT AAC CCT TGT CTT AAT GGA GGC TCA TGC
 AAA GAC GAC ATT AAC AGT TAT GAA TGT TGG TGT CCC TTT GGC TTC GAG GGA AAG
 AAT TGT GAG CTG GAC GTG ACC TGC AAT ATT AAG AAC GGA AGG TGC GAG CAG TTT
 40 TGC AAA AAC AGT GCT GAT AAC AAG GTG GTA TGT TCT TGC ACC GAA GGT TAC CGT
 CTT GCT GAA AAT CAG AAG AGC TGT GAA CCA GCC GTT CCC TTT CCC TGT GGA CGT
 GTA AGC GTT TCT CAG ACA TCA AAA CTG ACC CGG GCT GAG ACT GTG TTC CCT GAC
 GTC GAT TAC GTT AAC TCT ACC GAA GCC GAA GGA AGC CCC GGC AGC GGG TCA GCT
 AAC GCA ACC GGC CCT AGC GGT GAA GGC TCC GCT CCT TCC GAA GGA AAC GCA ACC
 GGA CCA GGT ACC TCC GGA GGA AGC CCA GCC AAC TCC ACA GGG GGG TCC CCT GCC
 45 GAG GGG AGC CCT GGC AGT GAG ATC CTG GAT AAC ATC ACA CAG AGC ACA CAG AGC
 TTT AAT GAC TTC ACC CGT GTG GTG GGA GGC GAG GAT GCA AAG CCC GGA CAG TTT
 CCA TGG CAG GTG GTC CTG AAC GGC AAG GTG GAT GCC TTT TGC GGA GGA TCT ATC
 GTG AAT GAA AAG TGG ATT GTG ACT GCT GCC CAC TGT GTG GAG ACT GGT GTG AAA
 ATC ACT GTG GTA GCA GGA GAA CAC AAT ATT GAG GAG ACC GAG CAT ACC GAG CAG
 AAG CGC AAT GTG ATC CGC ATC ATA CCT CAC CAT AAC TAC AAT GCA ACA ATT AAT
 50 AAG TAC AAC CAT GAC ATC GCC CTG TTG GAG CTG GAT GAG CCC CTG GTG CTC AAT
 TCT TAT GTG ACA CCA ATC TGC ATA GCT GAC AAG GAA TAC ACT AAC ATT TTC CTG
 AAG TTT GGC AGT **GGA TAC GTG TCA** GGA TGG GGC AGA GTG TTC CAC AAG GGA CGC
 TCT GCT CTC GTG CTT CAG TAC CTG CGA GTG CCT TTG GTG GAT CGG GCA ACA TGT
 TTG NNN AGC ACA AAA TTT ACT ATT TAC AAC AAT ATG TTT TGC GCC GGC TTC CAC
 55 GAA GGA GGG CGA GAT TCA TGC CAG GGA GAC AGT GGC GGT CCA CAC GTG ACT GAA
 GTC GAA GGC ACC TCT TTT TTG ACC GGA ATC ATC TCT TGG GGT GAA GAG TGT GCC
 ATG AAA GGA AAG TAT GGC ATA TAC ACA AAG GTG TCC CGC TAT GTG AAC TGG ATC
 AAG GAG AAG ACC AAA CTC ACC TAG (SEQ ID NO:5),

60 en donde NNN es cualquier codón de tres nucleótidos que codifica leucina.

La presente invención proporciona, además, el uso de la proteína del Factor IX, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula de esta invención para el tratamiento de un trastorno hemorrágico.

65 Algunas modalidades de la invención se dirigen a proteínas del Factor IX que tienen uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, etcétera) sitios de glicosilación adicionales. Por sitios de glicosilación "adicionales" o

"nuevos" se entiende que el número de sitios de glicosilación en la proteína del FIX es superior al número de sitios de glicosilación presentes normalmente en una forma de "tipo silvestre" del Factor IX. Una proteína del Factor IX de esta invención puede incluir FIX derivado del plasma, así como también formas recombinantes del FIX. Generalmente, las modalidades de la invención se dirigen a aumentar el número de sitios de glicosilación en una molécula del FIX de esta invención. Sin embargo, debe entenderse que una proteína del Factor IX de esta invención que puede modificarse para aumentar el número de sitios de glicosilación y/o aumentar el número de cadenas de azúcar no se limita a una secuencia de aminoácidos del FIX de "tipo silvestre" en particular, debido a que las proteínas del FIX de origen natural o artificiales también pueden modificarse de acuerdo con los métodos de esta invención para aumentar el número de sitios de glicosilación y/o para aumentar el número de cadenas de azúcar.

La presente invención se dirige, además, a proteínas del FIX que contienen una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, etcétera) cadenas de azúcar adicionales. Dichas cadenas laterales de azúcar adicionales pueden presentarse en uno o más de los sitios de glicosilación adicionales introducidos en las proteínas del FIX de esta invención mediante los métodos descritos en la presente descripción. Alternativamente, las cadenas laterales de azúcar adicionales pueden presentarse en sitios en la proteína del FIX como resultado de métodos químicos y/o enzimáticos para introducir dichas cadenas de azúcar en la molécula del FIX, como se conocen bien en la técnica. Por cadenas de azúcar "adicionales" o "nuevas" se entiende que el número de cadenas de azúcar en la proteína del FIX es mayor que el número de cadenas de azúcar presentes normalmente en una forma de "tipo silvestre" del Factor IX. En diversas modalidades, pueden añadirse de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 cadenas laterales de azúcar adicionales (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50).

En algunas modalidades, al menos un sitio de glicosilación adicional se encuentra en el péptido de activación del Factor IX (por ejemplo, el péptido de activación del FIX humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1). Como se describe en la presente descripción, la proteína del FIX tiene una inserción de un segmento peptídico que introduce uno o más sitios de glicosilación entre la posición N157 y la N167 de la secuencia de aminoácidos del Factor IX de SEQ ID NO:1.

La(s) inserción(es) puede(n) introducirse en una proteína del FIX descrita en la presente descripción para aumentar el número de sitios de glicosilación y tal(es) inserción(es) puede(n) incluir de aproximadamente uno a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, lo que incluye cualquier número de residuos de aminoácidos de uno a 100 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100).

En algunos casos, la inserción puede incluir todo o al menos parte (por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más residuos de aminoácidos) de un péptido de activación del Factor IX de una especie no humana, tal como el ratón. Esta secuencia peptídica insertada puede modificarse posteriormente para introducir sitios de glicosilación adicionales de acuerdo con las enseñanzas en la presente descripción.

El(los) sitio(s) de glicosilación puede(n) ser sitio(s) de glicosilación ligado(s) a N. En algunas modalidades, el(los) sitio(s) de glicosilación añadido(s) incluye(n) sitio(s) de glicosilación ligado(s) a N y la secuencia de consenso es NXT/S, siempre y cuando X no sea prolina.

En algunas modalidades, pueden añadirse de aproximadamente uno a aproximadamente 15 sitios de glicosilación a la secuencia de aminoácidos del FIX. En diversas modalidades, pueden añadirse de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 sitios de glicosilación (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50). En la presente descripción se describen proteínas del FIX en las que se ha creado un sitio de glicosilación por inserción, delección o sustitución de aminoácidos específicos. En casos particulares, la inserción, delección y/o sustitución se encuentra en la región del péptido de activación. La secuencia de aminoácidos del péptido de activación del FIX humano se proporciona en la presente descripción como: Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg (SEQ ID NO:11).

Se contempla que los sitios de glicosilación adicionales introducidos en una secuencia de aminoácidos del FIX pueden introducirse en cualquier lugar a lo largo de la secuencia de aminoácidos de la proteína del FIX. Por lo tanto, en algunos casos, el sitio o sitios de glicosilación adicionales se introducen en el péptido de activación (aminoácidos 146-180 de la secuencia de aminoácidos del FIX humano maduro de SEQ ID NO:1), fuera del péptido de activación (por ejemplo, antes y/o después del péptido de activación) o ya sea dentro del péptido de activación como fuera del péptido de activación. Por lo tanto, basado en la numeración de los 415 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína del FIX humano maduro como se muestra en la SEQ ID NO:1, puede introducirse un sitio de unión de glicosilación mediante la inserción de residuos de aminoácidos adicionales entre cualquiera de los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108,

109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415 y cualquiera de sus combinaciones. Como se usa en la presente, un "sitio de unión de glicosilación" o "sitio de glicosilación" puede significar una secuencia de consenso de unión de azúcar (es decir, una serie de aminoácidos que actúan como una secuencia de consenso para unir un azúcar (mono-, oligo- o poli-sacárido) a una secuencia de aminoácidos o puede significar el residuo de aminoácido real al que se une covalentemente el resto de azúcar. El resto de azúcar puede ser un monosacárido (molécula de azúcar simple), un oligosacárido o un polisacárido.

En casos particulares, pueden insertarse aminoácidos adicionales entre y/o sustituidos en cualquiera de los residuos de aminoácidos que forman el péptido de activación, tal como entre cualquiera de los aminoácidos 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 y cualquiera de sus combinaciones. Además, el mismo inserto en este caso en particular puede introducirse múltiples veces en la misma y/o en diferentes ubicaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína del FIX, lo que incluye dentro del péptido de activación. Además, pueden introducirse diferentes insertos y/o los mismos insertos una o más veces en la misma y/o en diferentes ubicaciones entre los residuos de aminoácidos a lo largo de la secuencia de aminoácidos de la proteína del FIX, lo que incluye dentro del péptido de activación.

Se conoce bien en la técnica que algunas proteínas pueden soportar una gran cantidad de cadenas laterales de azúcar y la distancia entre los sitios de glicosilación ligados a N puede ser tan pequeña como tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos (ver, por ejemplo, Lundin y otros, "Membrane topology of the Drosophila OR83b odorant receptor" FEBS Letters 581:5601-5604 (2007); Apweiler y otros, "On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database" Biochimica et Biophysica Acta 1473:4-8 (1999)).

Además, la proteína del FIX descrita en la presente descripción puede modificarse mediante mutación (por ejemplo, sustitución, adición y/o delección de aminoácidos) para introducir sitios de glicosilación ligados a N. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos en la superficie de la proteína del FIX funcional pueden identificarse de acuerdo con métodos de modelado molecular estándar en la técnica que serían adecuados para la modificación (por ejemplo, mutación) para introducir uno o más sitios de glicosilación.

Las proteínas del FIX descritas en la presente descripción que tienen sitios de glicosilación adicionales pueden producirse mediante métodos recombinantes tales como mutagénesis dirigida al sitio mediante el uso de PCR. Alternativamente, la proteína del Factor IX de esta invención puede sintetizarse químicamente para preparar una proteína del Factor IX con uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, etcétera) sitios de glicosilación adicionales.

Está dentro de la habilidad de un experto en la técnica modificar cualquier residuo o residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos del FIX maduro de acuerdo con métodos que se conocen bien en la técnica y como se enseña en la presente descripción y evaluar cualquier proteína resultante del FIX para determinar la actividad, estabilidad, recuperación, vida media, etcétera, de acuerdo con métodos que se conocen bien y como se describe en la presente descripción (ver, por ejemplo, Elliott y otros, "Structural requirements for additional N-linked carbohydrate on recombinant human erythropoietin" J. Biol. Chem. 279:16854-62 (2004)).

Las modalidades de la invención se dirigen a proteínas del Factor IX recombinantes en las que se han añadido sitios de glicosilación para mejorar la recuperación y/o la vida media y/o la estabilidad del Factor IX. Los sitios de glicosilación pueden ser sitios de glicosilación ligados a N. En modalidades específicas, se añade al menos un sitio de glicosilación ligado a N.

Como se indica en la presente descripción, se introduce al menos un sitio de glicosilación adicional en la secuencia de aminoácidos del FIX en un sitio que se encuentra fuera del péptido de activación. En algunos casos, el al menos un sitio de glicosilación adicional corresponde a un sitio que se glicosila en la forma nativa de un homólogo no humano del Factor IX. Una modificación de la secuencia de aminoácidos del FIX humano para introducir una serina o treonina en el aminoácido 262 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, que es la forma madura (es decir, secretada) del FIX humano, introduciría un sitio de glicosilación ligado a N adicional en la proteína humana. En diversos casos, el homólogo no humano es de perro, cerdo, vaca o ratón.

Adicionalmente, se proporciona en la presente descripción un ácido nucleico que comprende, que consiste esencialmente en y/o que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del FIX de esta invención. Dichos ácidos nucleicos pueden presentarse en un vector, tal como un casete de expresión. Por lo tanto, otras modalidades de la invención se dirigen a casetes de expresión diseñados para expresar una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las proteínas del Factor IX de esta invención. Los ácidos nucleicos y/o vectores de esta invención pueden presentarse en una célula. Por lo tanto, diversas modalidades de la invención se dirigen a células huésped recombinantes que contienen el vector (por ejemplo, casete de expresión). Dicha célula puede aislarse y/o presentarse en un animal transgénico no humano. Por lo tanto, ciertas modalidades de la invención se dirigen, además, a un animal transgénico no humano que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las proteínas del Factor IX de la presente invención.

Una comparación de la secuencia de aminoácidos del péptido de activación del FIX de humanos, ratones, cobayas y ornitorrinco revela que la secuencia de aminoácidos del FIX de ratones tiene nueve aminoácidos adicionales presentes en su péptido de activación, la secuencia de aminoácidos del FIX de cobayas tiene diez residuos de aminoácidos adicionales presentes en su péptido de activación y el ornitorrinco tiene 14 residuos de aminoácidos adicionales presentes en su péptido de activación (Figura 5). Estos aminoácidos adicionales se encuentran entre los dos sitios de glicosilación de origen natural (N 157 y N 167) en el Factor IX humano.

El FIX humano y el de ratón tienen estructuras idénticas esencialmente y la enzima humana puede funcionar en el ratón. Como el FIX humano funciona sin el segmento adicional de nueve aminoácidos que se encuentra en el ratón, esta región de la molécula del Factor IX puede tolerar modificaciones dentro de su secuencia, lo que incluye inserciones, sustituciones y/o deleciones, sin una pérdida sustancial en la integridad estructural, bioquímica o de cualquier otra manera funcional de la molécula. Los nueve aminoácidos insertados en el ratón son más probablemente residuos de superficie (de acuerdo con los estudios estructurales) y por lo tanto son accesibles para la modificación mediante las enzimas de glicosilación. En el factor IX humano nativo, los dos sitios de glicosilación ligados a N están 12 y 14 aminoácidos distantes de los sitios de escisión de amino y carboxilo, respectivamente, del péptido de activación. Por lo tanto, en algunos casos, pueden añadirse residuos de aminoácidos adicionales entre N157 y N167 de la proteína del Factor IX humano de SEQ ID NO:1 para añadir sitios de glicosilación para mejorar la vida media y/o la biodisponibilidad. En diversos casos, los sitios de glicosilación se añaden por inserción, deleción y/o modificación de la secuencia nativa para incluir una secuencia de unión para secuencias de consenso para la glicosilación ligada a N.

La secuencia humana para el péptido de activación comienza en el residuo 146 de la proteína madura. Los sitios de glicosilación naturales están en N157 y N167 (SEQ ID NO:1). En algunos casos, pueden insertarse residuos de aminoácidos adicionales entre los dos sitios de glicosilación normales (entre N157 y N167 en la secuencia madura) para proporcionar sitios de glicosilación adicionales. En algunos casos, se añaden de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos adicionales. En otros casos, se añaden de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos. En aún otros casos, se añaden de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 residuos de aminoácidos. Típicamente, los residuos de aminoácidos se eligen entre los 20 aminoácidos biológicos siempre y cuando la prolina no se use como "X" en el sitio de glicosilación NXT/S, que es la secuencia de consenso para la glicosilación ligada a N. La Tabla 1 muestra 20 aminoácidos biológicos comunes y sus abreviaturas.

Pueden añadirse sitios de N-glicosilación. Las secuencias de consenso para la adición de sitios de glicosilación se conocen en la técnica e incluyen la secuencia de consenso "NXT/S" para la N-glicosilación donde X no es prolina.

En algunos casos, las secuencias de unión endógenas ligadas a N de ratones, humanos y otras secuencias del Factor IX de mamíferos se insertan en el péptido de activación. Estas pueden insertarse individualmente o en combinación. En ciertos casos, el segmento insertado incluye una región espaciadora entre los sitios de glicosilación, que puede presentarse individualmente, en repeticiones en tándem, en múltiples, etcétera. Una región espaciadora descrita en la presente descripción puede tener de uno a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100). En algunos casos, por ejemplo, la región espaciadora puede ser de uno a aproximadamente 20 aminoácidos. En otros casos la región espaciadora puede ser de uno a aproximadamente diez aminoácidos. En otros casos, la región espaciadora puede ser de uno a aproximadamente cinco residuos de aminoácidos.

Se incluye una región espaciadora descrita en la presente descripción entre los sitios de unión de carbohidratos añadidos y/o entre los sitios de glicosilación de origen natural y los sitios de glicosilación añadidos para reducir o eliminar el impedimento estérico y proporcionar un reconocimiento eficiente mediante la glicosiltransferasa apropiada. Una región espaciadora descrita en la presente descripción puede comprender cualquier combinación de residuos de aminoácidos, siempre y cuando no sean cisteína o prolina y siempre y cuando la secuencia de aminoácidos del espaciador no tenga más de aproximadamente 10 % de residuos que son hidrófobos (por ejemplo, triptófano, tirosina, fenilalanina y valina).

En algunos casos, se incorpora NXT/S en la secuencia de aminoácidos insertada para añadir uno o más sitios de glicosilación adicionales. "X" puede ser cualquier aminoácido biológico, excepto que se desfavorece la prolina. En algunas

- modalidades, se añade al menos un sitio de glicosilación adicional a la proteína del Factor IX. En otras modalidades, se añaden dos sitios de glicosilación adicionales. En modalidades adicionales, se añaden tres sitios de glicosilación adicionales. En aún otras modalidades, se añaden cuatro sitios de glicosilación adicionales. En modalidades adicionales, se añaden cinco sitios de glicosilación adicionales. En algunas modalidades, se añaden seis sitios de glicosilación adicionales. En otras modalidades, se añaden más de seis sitios de glicosilación adicionales.
- En un caso, la Ala en la posición 161 de la secuencia de aminoácidos del FIX maduro (SEQ ID NO:1) se reemplaza con Asn para proporcionar un sitio de glicosilación adicional. En otro caso, la secuencia VFIQDNITD (SEQ ID NO:8) se inserta entre los residuos 161 y 162 de la secuencia de aminoácidos del FIX humano maduro de SEQ ID NO:1 para introducir un sitio de glicosilación ligado a N en la secuencia del FIX humano. En aún otro caso, se añade otro sitio de glicosilación nuevo mediante el reemplazo de Asp con Asn en el inserto VFIQDNITD. La secuencia insertada daría VFIQDNITN (SEQ ID NO:9). Los casos analizados anteriormente podrían combinarse para proporcionar de uno a cuatro sitios de glicosilación adicionales en la proteína del Factor IX humano.
- En otra modalidad, se añade la secuencia siguiente, que proporciona cinco sitios de glicosilación adicionales. Los sitios de glicosilación se muestran en negrita y subrayados. AETVFPDVDYV**N**STEN**E**TIQD**N**ITD**N**ETILD**N**ITQSTQSFNDFTR (SEQ ID NO: 10)
- En algunas modalidades, los sitios de glicosilación se añaden en sitios fuera del péptido de activación. Estos sitios adicionales pueden seleccionarse, por ejemplo, al alinear la secuencia de aminoácidos del Factor IX del ser humano con la secuencia de aminoácidos del Factor IX de otras especies y determinar la posición de los sitios de glicosilación en las especies no humanas. La posición homóloga o equivalente en la secuencia de aminoácidos del FIX humano se modifica después para proporcionar un sitio de glicosilación. Este método puede usarse para identificar tanto sitios potenciales de N-glicosilación como de O-glicosilación.
- Las proteínas del FIX de acuerdo con la invención se producen y caracterizan por métodos que se conocen bien en la técnica y como se describe en la presente descripción. Estos métodos incluyen la determinación del tiempo de coagulación (ensayo de tiempo parcial de tromboplastina (PPT)) y la administración de la proteína del FIX a un animal de prueba para determinar la recuperación, la vida media y la biodisponibilidad mediante un inmunoensayo y/o un ensayo de actividad apropiados, como se conocen bien en la técnica.
- La proteína del Factor IX, el ácido nucleico, el vector y/o la célula de esta invención pueden incluirse en una composición farmacéutica. Algunas modalidades se dirigen a un kit que incluye la proteína del Factor IX de esta invención. La proteína del Factor IX de esta invención puede usarse para tratar un trastorno hemorrágico mediante la administración de una cantidad eficaz de la proteína del Factor IX a un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) que necesita de esto. Por lo tanto, la presente invención proporciona, además, el uso de la proteína del Factor IX, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula de esta invención para el tratamiento de un trastorno hemorrágico. Los trastornos hemorrágicos que pueden tratarse de acuerdo con los usos de esta invención incluyen una deficiencia del FIX, hemofilia B y la enfermedad de Christmas. Dichos protocolos de tratamiento y regímenes de dosificación para administrar o suministrar el Factor IX a un sujeto que necesita de esto se conocen bien en la técnica.
- Pueden usarse muchos vectores de expresión para crear células modificadas genéticamente. Algunos vectores de expresión se diseñan para expresar grandes cantidades de proteínas recombinantes después de la amplificación de las células transfectadas en una variedad de condiciones que favorecen las células de alta expresión seleccionadas. Algunos vectores de expresión se diseñan para expresar grandes cantidades de proteínas recombinantes sin la necesidad de amplificación con presión de selección. La presente invención incluye la producción de células modificadas genéticamente de acuerdo con métodos estándar en la técnica y no depende del uso de ningún vector de expresión o sistema de expresión específico.
- Para crear una célula modificada genéticamente para producir grandes cantidades de una proteína del Factor IX, las células se transfectan con un vector de expresión que contiene el ADNc que codifica la proteína. En algunas modalidades, la proteína objetivo se expresa con enzimas cotransfectadas seleccionadas que provocan que se produzca una modificación postraduccional adecuada de la proteína objetivo en un sistema celular dado.
- La célula puede seleccionarse de una variedad de fuentes, pero es, de cualquier otra manera, una célula que puede transfectarse con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico, preferentemente, un ADNc que codifica una proteína del Factor IX.
- La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique de cualquier otra manera, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Ver, por ejemplo, Sambrook, y otros, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2da ed. (1989); DNA Cloning, Vols. I y II (D. N Glover, ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds. 1984); Transcription and Translation (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds. 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); las series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.), particularmente los Vols. 154 y 155 (Wu y Grossman, y Wu, eds., respectivamente); Gene Transfer Vectors

for Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos, eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology, Mayer y Walker, eds. (Academic Press, Londres, 1987); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, 2da ed. 1987 (Springer-Verlag, Nueva York); y Handbook of Experimental Immunology Vols I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds 1986).

5

Técnicas de Ingeniería Genética

Se conoce bien la producción de genes clonados, ADN recombinante, vectores, células huésped transformadas, proteínas y fragmentos de proteínas mediante ingeniería genética. Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Núm. 4,761,371 de Bell y otros de la columna 6, línea 3 a la columna 9, línea 65; Patente de Estados Unidos Núm. 4,877,729 de Clark y otros de la columna 4, línea 38 a la columna 7, línea 6; Patente de Estados Unidos Núm. 4,912,038 de Schillingde la columna 3, línea 26 a la columna 14, línea 12; y la Patente de Estados Unidos 4,879,224 de Wallner de la columna 6, línea 8 a la columna 8, línea 59.

10

15

Un vector es un constructo de ADN replicable. Los vectores se usan en la presente descripción ya sea amplificar el ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX y/o para expresar el ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX. Un vector de expresión es un constructo de ácido nucleico replicable en el que una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína del Factor IX se une operativamente a secuencias de control adecuadas capaces de efectuar la expresión de la secuencia de nucleótidos para producir una proteína del Factor IX en un huésped adecuado. La necesidad de dichas secuencias de control variará en dependencia del huésped seleccionado y el método de transformación elegido. Generalmente, las secuencias de control incluyen un promotor transcripcional, una secuencia de operador opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión ribosómica de ARNm adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción.

20

25

Los vectores comprenden plásmidos, virus (por ejemplo, adenovirus, citomegalovirus), fagos y fragmentos de ADN integrables (es decir, fragmentos integrables en el genoma del huésped mediante recombinación). El vector se replica y funciona independientemente del genoma del huésped, o puede, en algunos casos, integrarse en el propio genoma. Los vectores de expresión pueden contener un promotor y sitios de unión a ARN que se unen operativamente al gen que se expresa y son operables en el organismo huésped.

30

Las regiones de ADN o secuencias de nucleótidos se unen operativamente o se asocian operativamente cuando se relacionan funcionalmente entre sí. Por ejemplo, un promotor se une operativamente a una secuencia de codificación si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma se une operativamente a una secuencia de codificación si se coloca de manera que permita la traducción de la secuencia.

35

Las células huésped transformadas son células que se han transformado, transducido y/o transfectado con vector(es) de proteína del Factor IX construido mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

40

Las células huésped adecuadas incluyen células procariotas, levaduras o eucariotas superiores tales como células de mamífero y células de insecto. Las células derivadas de organismos multicelulares son un huésped adecuado particularmente para la síntesis de proteína del Factor IX recombinante, y se prefieren particularmente las células de mamífero. La propagación de dichas células en cultivo celular se ha convertido en un procedimiento de rutina (Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Patterson, editores (1973)). Ejemplos de líneas celulares huésped útiles son las células VERO y HeLa, las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) y las líneas celulares WI138, HEK 293, BHK, COS-7, CV y MDCK. Los vectores de expresión para dichas células incluyen normalmente (si es necesario) un origen de replicación, un promotor ubicado aguas arriba de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína del Factor IX a expresarse y asociada operativamente con este, junto con un sitio de unión a ribosoma, un sitio de empalme de ARN (si se usa ADN genómico que contiene un intrón), un sitio de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción. En una modalidad preferida, la expresión se lleva a cabo en células de ovario de hámster chino (CHO) mediante el uso del sistema de expresión de la Patente de Estados Unidos Núm. 5,888,809.

50

Las secuencias de control de la transcripción y la traducción en los vectores de expresión a usarse en células de vertebrados transformantes se proporcionan a menudo mediante fuentes virales. Por ejemplo, los promotores usados comúnmente se derivan de poliovirus, Adenovirus 2, y Virus del Simio 40 (SV40). Ver por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 4,599,308.

55

Un origen de replicación podría proporcionarse ya sea mediante la construcción del vector para incluir un origen exógeno, tal como podría derivarse del SV40 u otra fuente viral (por ejemplo, poliovirus, VSV, o BPV), o podría proporcionarse mediante el mecanismo de replicación cromosomal de la célula huésped. Si el vector se integra en el cromosoma de la célula huésped, a menudo es suficiente lo último.

60

En lugar de usar vectores que contienen orígenes virales de replicación, pueden transformarse células de mamífero mediante el método de cotransformación con un marcador seleccionable y el ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados son la dihidrofolato reductasa (DHFR) o la timidina quinasa. Este método se describe, además, en la Patente de Estados Unidos Núm. 4,399,216.

65

Otros métodos adecuados para la adaptación a la síntesis de la proteína del Factor IX en el cultivo de células de vertebrados recombinantes incluyen los descritos en Gething y otros, *Nature* 293:620 (1981); Mantei y otros, *Nature* 281:40; y Levinson y otros, Solicitudes EPO Núms. 117,060A y 117,058A.

5 Las células huésped tales como células de insecto (por ejemplo, células cultivadas de *Spodoptera frugiperda*) y vectores de expresión tales como el vector de expresión de baculovirus (por ejemplo, vectores derivados de *Autographa californica* MNPV, *Trichoplusia ni* MNPV, *Rachiplusia ou* MNPV, o *Galleria ou* MNPV) pueden emplearse para llevar a cabo la presente invención, como se describe en las Patentes de Estados Unidos Núms. 4,745,051 y 4,879,236 de Smith y otros. En general, un vector de expresión de baculovirus comprende un genoma de baculovirus que contiene la secuencia de nucleótidos a expresar insertada en el gen de polihedrina en una posición que varía de la señal de inicio transcripcional de polihedrina hasta el sitio de inicio ATG y bajo el control transcripcional de un promotor de polihedrina de baculovirus.

15 Las células huésped procariontas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *Escherichia coli* (*E. coli*) o bacilos. Las células superiores eucariotas incluyen líneas celulares establecidas de origen de mamíferos, como se describe a continuación. Las células huésped ilustrativas son *E. coli* W3110 (ATCC 27,325), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* 294 (ATCC 31,446). Se dispone de una amplia variedad de vectores procariontas y microbianos adecuados. La *E. coli* se transforma típicamente mediante el uso de pBR322. Los promotores usados más comúnmente en los vectores de expresión microbiana recombinante incluyen los sistemas promotores de betalactamasa (penicilinasa) y lactosa (Chang y otros, *Nature* 275:615 (1978); y Goeddel y otros, *Nature* 281:544 (1979)), un sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel y otros, *Nucleic Acids Res.* 8:4057 (1980) y Solicitud de Publicación EPO Núm. 36,776) y el promotor *tac* (*De Boer y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80:21 (1983)). El promotor y la secuencia Shine-Dalgarno (para la expresión del huésped procarionta) se unen operativamente al ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX, es decir, se colocan para promover la transcripción del ARN mensajero del Factor IX a partir del ADN.

25 Los microbios eucariotas tales como los cultivos de levadura pueden transformarse, además, con vectores que codifican proteínas (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 4,745,057). El *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo huésped más comúnmente usado entre los eucariotas inferiores, aunque se dispone comúnmente de un número de otras cepas. Los vectores de levadura pueden contener un origen de replicación a partir del plásmido de levadura de 2 micras o una secuencia de replicación autónoma (ARS), un promotor, un ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX, secuencias de poliadenilación y la terminación de la transcripción, y un gen de selección. Un plásmido ilustrativo es YRp7, (Stinchcomb y otros, *Nature* 282:39 (1979); Kingsman y otros, *Gene* 7:141 (1979); Tschemper y otros, *Gene* 10:157 (1980)). Las secuencias promotoras adecuadas en vectores de levadura incluyen los promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y otros, *J. Biol. Chem.* 255:2073 (1980) u otras enzimas glucolíticas (Hess y otros, *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149 (1968); y Holland y otros, *Biochemistry* 17:4900 (1978)).
35 Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en R. Hitzeman y otros, Publicación EPO Núm. 73,657.

40 Las secuencias de codificación clonadas descritas en la presente descripción pueden codificar el FIX de cualquier especie de origen, lo que incluye ratones, ratas, perros, zarigüeyas, conejos, gatos, cerdos, caballos, ovejas, vacas, cobayas, zarigüeyas, ornitorrincos y humanos, pero codifican, preferentemente, la proteína del Factor IX de origen humano. Además, se abarca el ácido nucleico que codifica el Factor IX que puede hibridarse con el ácido nucleico que codifica las proteínas descritas en la presente descripción. La hibridación de dichas secuencias puede llevarse a cabo en condiciones de rigurosidad reducida o incluso en condiciones rigurosas (por ejemplo, condiciones rigurosas como las representadas por una rigurosidad de lavado de NaCl 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M, SDS al 0,1 % a 60 °C o incluso 70 °C) al ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX descrita en la presente descripción en un ensayo de hibridación *in situ* estándar. Ver, por ejemplo, Sambrook y otros, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2da Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory).

50 Las proteínas del FIX producidas de acuerdo con la invención pueden expresarse en animales transgénicos no humanos mediante métodos conocidos. Ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 6,344,596. En resumen, los animales transgénicos no humanos pueden incluir, pero no se limitan a, animales de granja (por ejemplo, cerdos, cabras, ovejas, vacas, caballos, conejos y similares) roedores (tales como ratones, ratas y cobayas), y mascotas domésticas (por ejemplo, gatos y perros). Se prefiere particularmente, en algunas modalidades, ganado animal, tal como cerdos, ovejas, cabras y vacas.

55 El animal transgénico no humano de esta invención se produce mediante la introducción en un embrión no humano de células individuales un polinucleótido apropiado que codifica una proteína del Factor IX humano de esta invención de manera que el polinucleótido se integra establemente en el ADN de las células de la línea germinal del animal maduro, y se hereda del modo Mendeliano normal. El animal transgénico no humano de esta invención tendría un fenotipo de producir la proteína del FIX en fluidos corporales y/o tejidos. La proteína del FIX se extraería de estos fluidos y/o tejidos y se procesaría, por ejemplo, para su uso terapéutico. (Ver, por ejemplo, Clark y otros, "Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep" *Bio/Technology* 7:487-492 (1989); Van Cott y otros, "Haemophilic factors produced by transgenic livestock: abundance can enable alternative therapies worldwide" *Haemophilia* 10(4):70-77 (2004).

65 Las moléculas de ADN pueden introducirse en embriones no humanos mediante una variedad de medios que incluyen, pero no se limitan a, microinyección, precipitación mediada por fosfato de calcio, fusión de liposomas, o infección retroviral

de células madre totipotentes o pluripotentes. Las células transformadas pueden entonces introducirse en embriones no humanos e incorporarse a ellos para formar animales transgénicos no humanos. Los métodos para obtener animales transgénicos no humanos se describen, por ejemplo, en Transgenic Animal Generation and Use por L. M. Houdebine, Harwood Academic Press, 1997. Los animales transgénicos pueden generarse, además, mediante el uso de métodos de transferencia nuclear o clonación mediante el uso de líneas celulares embrionarias o adultas como se describe, por ejemplo, en Campbell y otros, Nature 380:64-66 (1996) y Wilmut y otros, Nature 385:810-813 (1997). Además, puede usarse una técnica que usa la inyección citoplasmática de ADN como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5,523,222.

Pueden obtenerse animales transgénicos no humanos productores del Factor IX mediante la introducción de un constructo quimérico que comprende secuencias que codifican el Factor IX. Se conocen bien los métodos para obtener animales transgénicos. Ver, por ejemplo, Hogan y otros, MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, (Cold Spring Harbor Press 1986); Krimpenfort y otros, Bio/Technology 9:88 (1991); Palmiter y otros, Cell 41:343 (1985), Kraemer y otros, GENETIC MANIPULATION OF THE EARLY MAMMALIAN EMBRYO, (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1985); Hammer y otros, Nature 315:680 (1985); Wagner y otros, Patente de Estados Unidos 5,175,385; Krimpenfort y otros, Patente de Estados Unidos Núm. 5,175,384, Janne y otros, Ann. Med. 24:273 (1992), Brem y otros, Chim. Oggi. 11:21 (1993), Clark y otros, Patente de Estados Unidos Núm. 5,476,995.

En algunas modalidades, pueden usarse regiones reguladoras que actúan en cis que son "activas" en el tejido mamario, porque los promotores son más activos en el tejido mamario que en otros tejidos en las condiciones fisiológicas en que se sintetiza la leche. Dichos promotores incluyen, pero no se limitan a, los promotores de la proteína ácida de suero (WAP) corta y larga, caseína α , β y κ corta y larga, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina ("BLG"). Las secuencias señal pueden usarse, además, de acuerdo con esta invención que dirige la secreción de las proteínas expresadas a otros fluidos corporales, particularmente sangre y orina. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen los péptidos señal de factores de coagulación secretados, lo que incluye péptidos señal del Factor IX, proteína C y activador de plasminógeno de tipo tejido.

Entre las secuencias útiles que regulan la transcripción, además de los promotores analizados anteriormente, están los potenciadores, las señales de empalme, las señales de terminación de la transcripción, los sitios de poliadenilación, las secuencias reguladoras, las secuencias de procesamiento de ARN y otras secuencias que regulan la expresión de transgenes.

Preferentemente, el sistema de expresión o constructo incluye una región no traducida de 3' aguas abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante deseada. Esta región puede aumentar la expresión del transgén. Entre las regiones no traducidas de 3' útiles con respecto a esto están las secuencias que proporcionan una señal poli A.

Pueden derivarse secuencias no traducidas de 3' heterólogas adecuadas, por ejemplo, a partir del antígeno t pequeño de SV40, la región no traducida de 3' de caseína, u otras secuencias no traducidas de 3' que se conocen bien en esta técnica. Los sitios de unión del ribosoma también son importantes para aumentar la eficiencia de expresión del FIX. Igualmente, las secuencias que regulan la modificación postraduccional del FIX son útiles en la invención.

Las secuencias de codificación del Factor IX, junto con los vectores y las células huésped para la expresión de estas, se describen en la solicitud de Patente Europea núm. 373012, solicitud de Patente Europea núm. 251874, solicitud de Patente PCT núm. 8505376, solicitud de Patente PCT núm. 8505125, solicitud de Patente Europea núm. 162782, y solicitud de Patente PCT núm. 8400560.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. (Ejemplo comparativo)

Resumen de la invención. El Factor IX (FIX) tiene una vida media inusual; alrededor del 50-70 % desaparece de la circulación dentro de ~ 5 minutos después de la inyección. En la práctica, la vida media se calcula a partir de la segunda disminución exponencial del FIX que permanece en circulación. Este estudio muestra que el FIX protege a ratones con hemofilia B del sangrado después de que sus niveles en sangre están más abajo del 1 %. Se cree que este efecto protector se debe a la unión del FIX específica y reversiblemente al colágeno tipo IV y que aún se encuentra disponible para la coagulación a pesar de que ha desaparecido de la sangre. Consistente con esto, el FIXK5R, que se une más estrechamente al colágeno tipo IV que el FIXK5A, protege mejor 7 días después de la inyección que como lo hace el FIXK5A.

Este estudio demuestra una correlación entre la afinidad del FIX por el colágeno tipo IV y su capacidad para proteger a ratones con hemofilia B del sangrado mediante un modelo de sangrado por la vena safena.

Modelo de sangrado por la vena safena. En este estudio se usaron ratones con fondo C57BL/6 con hemofilia B de seis a ocho semanas de edad. Las proteínas variantes del FIX se inyectaron en ratones a través de la vena de la cola con una dosis de 0,9 μ g/g de peso corporal. Después de 7 días, se realizó el modelo de sangrado por la vena safena. Brevemente, los ratones se anestesiaron con Avertin al 2,5 % y se realizó una incisión longitudinal en la vena safena izquierda. La sangre se evacuó suavemente con un papel tisú hasta que se produjo la hemostasia. Después, el coágulo se rompió y la

sangre se evacuó de nuevo hasta que se produjo la hemostasia. La ruptura del coágulo se repitió después de cada incidencia de hemostasia durante 30 minutos después de la lesión inicial. Se registró el número de rupturas del coágulo observadas para cada ratón.

5 Los datos proporcionados en la presente descripción muestran que, no solo el FIXK5R protege durante más tiempo de lo que cabría esperar de su vida media, sino que el FIXWT protege, además, a ratones con hemofilia B del sangrado durante mucho más tiempo de lo que cabría esperar de su vida media observada. La Figura 1 muestra que los ratones inyectados con el FIX humano todavía se protegen significativamente contra el sangrado siete días después de la inyección. El potencial de coagulación se evalúa mediante la medición del número de rupturas del coágulo para cada ratón. Esta protección se presenta a pesar del hecho de que la vida media del FIX humano en ratones con hemofilia B es de aproximadamente 7 horas; esto significa que han transcurrido 24 vidas medias desde la inyección, y que el nivel del FIX circulante es inferior al 1 % desde ~el día 2,5.

15 Además, en la Figura 1 puede verse que después de 7 días, el FIXK5R protege mejor significativamente a ratones con hemofilia del sangrado que el FIXK5A ($P < 0,05$, prueba t no pareada). El FIXK5R se une al colágeno tipo IV más fuertemente que el FIXWT, mientras que FIXK5A tiene una afinidad muy reducida al colágeno.

20 En resumen, la cantidad del FIX medida en sangre es mucho menor que la cantidad total del FIX disponible para la coagulación. Además, el FIX protege del sangrado mucho más tiempo de lo que cabría esperar basado en su vida media medida.

Ejemplo 2.

25 La secuencia de ADN del FIX 24 optimizado en codón con sitios de glicosilación adicionales se sintetizó por Blueheron Biotech, LLC. La secuencia sintetizada se insertó en el vector pDEF38 y se transfirió en células CHO DG44. Los clones individuales se escogieron por CDI Bioscience, Inc. Se recolectó el medio acondicionado de estos clones y se examinó mediante transferencia de Western con anticuerpo anti-FIX.

30 Como se muestra en la Figura 2, con la adición de más sitios de glicosilación, el tamaño del FIX aumenta. El FIX 24 tiene el mayor peso molecular. Las proteínas del Factor IX modificadas de esta invención se usarán en estudios de vida media en ratones y en perros, de acuerdo con protocolos conocidos. Las proteínas del Factor IX de esta invención se evaluarán, además, en un estudio de modelo por vena safena en ratones durante períodos de tiempo más largos (por ejemplo, 3 semanas) para determinar cuánto tiempo las proteínas protegen a los ratones. La tasa de activación de las proteínas del Factor IX modificadas se determinará por el FVIIa-TF y por el factor Xia. Además, se determinarán las actividades específicas, así como también el estado de glicosilación y carboxilación, de acuerdo con métodos conocidos.

Ejemplo 3.

40 *Resumen de la invención.* El Factor IX (FIX) tiene una vida media inusual; alrededor del 50-70 % desaparece de la circulación dentro de ~ 5 minutos después de la inyección. En la práctica, la vida media se calcula a partir de la segunda disminución exponencial del FIX que permanece en circulación. Este estudio muestra que el FIX protege a ratones con hemofilia B del sangrado después de que sus niveles en sangre están más abajo del 1 %. Se cree que este efecto protector se debe a la unión del FIX específica y reversiblemente al colágeno tipo IV y que aún se encuentra disponible para la coagulación a pesar de que ha desaparecido de la sangre. Consistente con esto, el FIXK5R, que se une más estrechamente al colágeno tipo IV que el FIXK5A, protege mejor 7 días después de la inyección que como lo hace el FIXK5A.

50 Este estudio demuestra una correlación entre la afinidad del FIX por el colágeno tipo IV y su capacidad para proteger a ratones con hemofilia B del sangrado mediante un modelo de sangrado por la vena safena.

55 Modelo de sangrado por la vena safena. En este estudio se usaron ratones con fondo C57BL/6 con hemofilia B de seis a ocho semanas de edad. Las proteínas variantes del FIX se inyectaron en ratones a través de la vena de la cola con una dosis de 0,9 ug/g de peso corporal. Después de 7 días, se realizó el modelo de sangrado por la vena safena. Brevemente, los ratones se anestesiaron con Avertin al 2,5 % y se realizó una incisión longitudinal en la vena safena izquierda. La sangre se evacuó suavemente con un papel tisú hasta que se produjo la hemostasia. Después, el coágulo se rompió y la sangre se evacuó de nuevo hasta que se produjo la hemostasia. La ruptura del coágulo se repitió después de cada incidencia de hemostasia durante 30 minutos después de la lesión inicial. Se registró el número de rupturas del coágulo observadas para cada ratón.

60 Los datos proporcionados en la presente descripción muestran que, no solo el FIXK5R protege durante más tiempo de lo que cabría esperar de su vida media, sino que el FIXWT protege, además, a ratones con hemofilia B del sangrado durante mucho más tiempo de lo que cabría esperar de su vida media observada. La Figura 3 muestra que los ratones inyectados con el FIX humano todavía se protegen significativamente contra el sangrado siete días después de la inyección. El potencial de coagulación se evalúa mediante la medición del número de rupturas del coágulo para cada ratón. Esta protección se presenta a pesar del hecho de que la vida media del FIX humano en ratones con hemofilia B es de

aproximadamente 7 horas; esto significa que han transcurrido 24 vidas medias desde la inyección, y que el nivel del FIX circulante es inferior al 1 % desde ~el día 2,5.

Además, en la Figura 3 puede verse que después de 7 días, el FIXK5R protege mejor significativamente a ratones con hemofilia del sangrado que el FIXK5A ($P < 0,05$, prueba t no pareada). El FIXK5R se une al colágeno tipo IV más fuertemente que el FIXWT, mientras que FIXK5A tiene una afinidad muy reducida al colágeno.

En resumen, la cantidad del FIX medida en sangre es mucho menor que la cantidad total del FIX disponible para la coagulación. Además, el FIX protege del sangrado mucho más tiempo de lo que cabría esperar basado en su vida media medida.

Los estudios que se describen en la presente descripción se diseñaron para evaluar si el FIX infundido podría proteger a ratones con hemofilia B del sangrado por más tiempo de lo esperado basado en la vida media y si el FIX_{K5R} protege mejor que el FIX_{K5A}. **La Figura 3** revela que el FIX infundido protege mucho más tiempo de lo que se predeciría por su vida media; por lo tanto, existe una buena protección 7 días después de la inyección, aun cuando los niveles plasmáticos de todas las moléculas del FIX infundidas estuvieron más abajo del uno por ciento hacia el día 3 después de la infusión. Estos resultados demuestran que el FIX unido al colágeno IV extravascular, proporciona una función coagulante importante en ausencia del FIX circulante. Además, existe un claro gradiente de protección que se correlaciona con la afinidad de las moléculas por el colágeno IV.

Para el FIX, la vida media terminal (β) se considera generalmente el parámetro relevante, mientras que la vida media de distribución (α) se ignora. El objetivo de la profilaxis en pacientes con hemofilia B grave es mantener niveles mínimos de actividad del FIX en la circulación por encima del 1 %.

En conclusión, en la presente descripción se proporciona evidencia de que el FIX previene eficazmente el sangrado incluso después de que su nivel en sangre ha estado muy por debajo del uno por ciento durante varios días. Además, siete días después de una infusión en bolo, una variante del FIX que se une más fuertemente al colágeno IV proporciona una protección hemostática mejor significativamente en ratones con hemofilia B que una molécula de FIX con menor afinidad por el colágeno IV. Esto demuestra que la unión al colágeno IV por el FIX proporciona un reservorio extravascular más duradero del FIX en una ubicación funcional hemostáticamente. Además, estos resultados sugieren que un enfoque terapéutico limitado al aumento de la vida media plasmática terminal del FIX solo a expensas de su distribución tisular puede no ser el enfoque óptimo para el tratamiento de la hemofilia B.

Ejemplo 4.

La secuencia de ADN del FIX 24 optimizado en codón con sitios de glicosilación adicionales se sintetizó por Blueheron Biotech, LLC. La secuencia sintetizada se insertó en el vector pDEF38 y se transfectó en células CHO DG44. Los clones individuales se escogieron por CDI Bioscience, Inc. Se recolectó el medio acondicionado de estos clones y se examinó mediante transferencia de Western con anticuerpo anti-FIX.

Con la adición de más sitios de glicosilación, el tamaño del FIX aumenta. Las proteínas del Factor IX modificadas de esta invención se usarán en estudios de vida media en ratones y en perros, de acuerdo con protocolos conocidos. Las proteínas del Factor IX de esta invención se evaluarán, además, en un estudio de modelo por vena safena en ratones durante periodos de tiempo más largos (por ejemplo, 3 semanas) para determinar cuánto tiempo las proteínas protegen a los ratones. La tasa de activación de las proteínas del Factor IX modificadas se determinará por el FVIIa-TF y por el factor Xia. Además, se determinarán las actividades específicas, así como también el estado de glicosilación y carboxilación, de acuerdo con métodos conocidos.

La invención se define mediante las siguientes reivindicaciones, donde se incluyen los equivalentes de las reivindicaciones.

Tabla 1

Aminoácidos	Símbolo de una letra	Abreviatura Común
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly

ES 2 744 903 T3

5	Histidina	H	His
	Isoleucina	I	Ile
	Leucina	L	Leu
	Lisina	K	Lys
	Fenilalanina	F	Phe
10	Prolina	P	Pro
	Serina	S	Ser
	Treonina	T	Thr
15	Triptófano	W	Trp
	Tirosina	Y	Tyr
	Valina	V	Val

20 Listado de secuencias

<110> University of North Carolina at Chapel Hill
 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA PROTEÍNAS DEL FACTOR IX MODIFICADAS
 <130> 5470-643WO
 25 <150> US 61/879,394
 <151> 2013-09-18
 <150> US 61/728,469
 <151> 2012-11-20
 <160> 11
 30 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 1

40

45

50

55

60

65

ES 2 744 903 T3

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

ES 2 744 903 T3

Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 165 170 175

5 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 180 185 190

10 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

80 <210> 2
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de proteína del Factor IX modificado

85 <220>
 <221> caract._misceláneas

ES 2 744 903 T3

<222> (388)..(388)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 2

5 Tyr Asn Ser Gly Arg Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 1 5 10 15

10 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
 20 25 30

15 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
 35 40 45

20 Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
 50 55 60

25 Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
 65 70 75 80

30 Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
 85 90 95

35 Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
 100 105 110

40 Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
 115 120 125

45 Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 130 135 140

50 Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 145 150 155 160

55 Ala Glu Gly Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ala Asn Ala Thr Gly Pro Ser
 165 170 175

ES 2 744 903 T3

Gly Glu Gly Ser Ala Pro Ser Glu Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Thr
 180 185 190
 5 Ser Gly Gly Ser Pro Ala Asn Ser Thr Gly Gly Ser Pro Ala Glu Gly
 195 200 205
 Ser Pro Gly Ser Glu Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser
 210 215 220
 10 Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly
 225 230 235 240
 15 Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys
 245 250 255
 20 Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys
 260 265 270
 Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile
 275 280 285
 25 Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile
 290 295 300
 30 Pro His His Asn Tyr Asn Ala Thr Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile
 305 310 315 320
 Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr
 325 330 335
 35 Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe
 340 345 350
 40 Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg
 355 360 365
 45 Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala
 370 375 380
 Thr Cys Leu Xaa Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys
 385 390 395 400
 50 Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly
 405 410 415
 55 Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile
 420 425 430

60

65

ES 2 744 903 T3

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

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

10 Thr
465

<210> 3
<211> 415
<212> PRT
15 <213> Artificial
<220>
<223> Secuencia de proteína del Factor IX modificado
<220>
20 <221> caract. misceláneas
<222> (338)..(338)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<400> 3

Tyr Asn Ser Gly Arg Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

25 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30

30 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

35 Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60

40 Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65 70 75 80

45 Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
85 90 95

50 Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
100 105 110

55 Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
115 120 125

60 Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
130 135 140

65

ES 2 744 903 T3

Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 145 150 155 160
 5 Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 165 170 175
 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 180 185 190
 10 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 195 200 205
 15 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 210 215 220
 20 Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 225 230 235 240
 Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 245 250 255
 25 His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 260 265 270
 30 Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 275 280 285
 35 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 290 295 300
 Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 305 310 315 320
 40 Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 325 330 335
 45 Leu Xaa Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 340 345 350
 Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 355 360 365
 50 His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 370 375 380
 55 Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
 385 390 395 400
 60 Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 405 410 415

<210> 4
 <211> 1536
 <212> ADN
 65 <213> Artificial
 <220>

ES 2 744 903 T3

<223> Secuencia de codificación optimizada en codón del Factor IX 24-K5R con secuencia de propéptido
<400> 4

	atgcagcggg tgaatatgat catggctgag agtccaggac ttatcaccat atgcttgctg	60
5	gggtatctcc tctccgctga gtgcaccgta ttcctcgatc acgagaacgc caacaaaatc	120
	cttaacagac gtaggcgata caacagtggc cgactggagg agtttgtcca aggtaacctg	180
	gaacgggaat gtatggagga gaagtgtagt ttcgaggagg ctcgaggagt gtttgagaac	240
10	acagaaagaa caaccgaatt ttggaagcaa tatgtcgatg gtgaccaatg tgagtctaac	300
	ccttgtctta atggaggctc atgcaaagac gacattaaca gttatgaatg ttggtgtccc	360
15	tttggtctcg agggaaagaa ttgtgagctg gacgtgacct gcaatattaa gaacggaagg	420
	tgcgagcagt tttgcaaaaa cagtgtgat aacaaggtgg tatgttcttg caccgaaggt	480
	taccgtcttg ctgaaaatca gaagagctgt gaaccagccg ttcctttcc ctgtggacgt	540
20	gtaagcgttt ctacagacatc aaaactgacc cgggctgaga ctgtgttccc tgacgtcgat	600
	tacgttaact ctaccgaagc cgaaggaagc cccggcagcg ggtcagctaa cgcaaccggc	660
	cctagcggtg aaggctccgc tccttcogaa ggaaacgcaa cgggaccagg tacctcggga	720
25	ggaagcccag ccaactccac aggggggtcc cctgccgagg ggagccctgg cagtgagatc	780
	ctggataaca tcacacagag cacacagagc tttaatgact tcacccgtgt ggtgggaggc	840
	gaggatgcaa agcccggaca gtttccatgg cagggtgtcc tgaacggcaa ggtggatgcc	900
30	ttttgcgag gatctatcgt gaatgaaaag tggattgtga ctgctgcca ctgtgtggag	960
	actggtgtga aaatcactgt ggtagcagga gaacacaata ttgaggagac cgagcatacc	1020
35	gagcagaagc gcaatgtgat ccgcatcata cctcaccata actacaatgc aacaattaat	1080
	aagtacaacc atgacatcgc cctgttgagg ctggatgagc ccctggtgct caattcttat	1140
	gtgacaccaa tctgcatagc tgacaaggaa tacactaaca ttttcctgaa gtttggcagt	1200
40	ggatacgtgt caggatgggg cagagtgttc cacaaggagc gctctgctct cgtgcttcag	1260
	tacctgcgag tgcctttggt ggatcgggca acatgtttga ggagcacaaa atttactatt	1320
	tacaacaata tgttttgcgc cggcttcac gaaggaggc gagattcatg ccagggagac	1380
45	agtggcggtc cacacgtgac tgaagtogaa ggcacctctt ttttgaccgg aatcatctct	1440
	tggggtgaag agtgtgccat gaaaggaaag tatggcatat acacaaagggt gtcccgtat	1500
50	gtgaactgga tcaaggagaa gaccaaactc acctag	1536

<210> 5

<211> 1536

<212> ADN

<213> Artificial

55 <220>

<223> Secuencia de codificación optimizada en codón del Factor IX 24-K5R con secuencia de propéptido y cualquier sustitución en R338

<220>

<221> caract._misceláneas

60 <222> (1300)..(1302)

<223> n puede ser a, c, g, o t, siempre que el codón que comprende los nucleótidos 1300-1302 no codifique para Arg

<400> 5

65

ES 2 744 903 T3

atgcagcggg tgaatatgat catggctgag agtccaggac ttatcaccat atgcttgctg 60
 gggatatctcc tctccgctga gtgcaccgta ttcctcgatc acgagaacgc caacaaaatc 120
 5 cttaacagac gtaggcgata caacagtggc cgactggagg agtttgtcca aggtaacctg 180
 gaacgggaat gtatggagga gaagtgtagt ttcgaggagg ctcgggaggt gtttgagaac 240
 acagaaagaa caaccgaatt ttggaagcaa tatgtcgatg gtgaccaatg tgagtctaac 300
 10 ccttgtctta atggaggctc atgcaaagac gacattaaca gttatgaatg ttggtgtccc 360
 tttggcttcg agggaaagaa ttgtgagctg gacgtgacct gcaatattaa gaacggaagg 420
 tgcgagcagt tttgcaaaaa cagtgtgat aacaaggtgg tatgttcttg caccgaaggt 480
 15 taccgtcttg ctgaaaatca gaagagctgt gaaccagccg ttcctttcc ctgtggacgt 540
 gtaagcgttt ctgagacatc aaaactgacc cgggctgaga ctgtgttccc tgacgtcgat 600
 20 tacgttaact ctaccgaagc cgaaggaagc cccggcagcg ggtcagctaa cgcaaccggc 660
 cctagcggtg aaggctccgc tccttccgaa ggaaacgcaa cgggaccagg tacctccgga 720
 ggaagcccag ccaactccac aggggggtcc cctgccgagg ggagccctgg cagtgagatc 780
 25 ctggataaca tcacacagag cacacagagc ttaaatgact tcacccgtgt ggtgggaggc 840
 gaggatgcaa agcccggaca gtttccatgg caggtggctc tgaacggcaa ggtggatgcc 900
 ttttgccggag gatctatcgt gaatgaaaag tggattgtga ctgctgcca ctgtgtggag 960
 30 actggtgtga aaatcactgt ggtagcagga gaacacaata ttgaggagac cgagcatacc 1020
 gagcagaagc gcaatgtgat ccgcatcata cctcaccata actacaatgc aacaattaat 1080
 aagtacaacc atgacatcgc cctgttgagg ctggatgagc ccctggtgct caattcttat 1140
 35 gtgacaccaa tctgcatagc tgacaaggaa tacactaaca ttttccctgaa gtttggcagt 1200
 ggatacgtgt caggatgggg cagagtgttc cacaaggagc gctctgctct cgtgcttcag 1260
 tacctgagag tgcctttggt ggatcgggca acatgtttgn nnagcacaaa atttactatt 1320
 40 tacaacaata tgttttgagc cggcttcac gaaggaggc gagattcatg ccaggagagc 1380
 agtggcggtc cacacgtgac tgaagtogaa ggcacctctt ttttgaccgg aatcatctct 1440
 45 tggggtgaag agtgtgcat gaaaggaaag tatggcatat acacaaagggt gtcccgtat 1500
 gtgaactgga tcaaggagaa gaccaaactc acctag 1536

<210> 6
 <211> 511
 50 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de proteína del Factor IX con secuencia de propéptido
 <400> 6
 55
 60
 65

ES 2 744 903 T3

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

ES 2 744 903 T3

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
 165 170 175
 5 Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
 180 185 190
 Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
 195 200 205
 10 Gly Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ala Asn Ala Thr Gly Pro Ser Gly Glu
 210 215 220
 15 Gly Ser Ala Pro Ser Glu Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Thr Ser Gly
 225 230 235 240
 20 Gly Ser Pro Ala Asn Ser Thr Gly Gly Ser Pro Ala Glu Gly Ser Pro
 245 250 255
 Gly Ser Glu Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 260 265 270
 25 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 275 280 285
 30 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 290 295 300
 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 305 310 315 320
 35 Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 325 330 335
 40 Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 340 345 350
 His Asn Tyr Asn Ala Thr Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 355 360 365
 45 Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 370 375 380
 50 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 385 390 395 400
 55 Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 405 410 415
 60
 65

ES 2 744 903 T3

Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 420 425 430
 5 Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 435 440 445
 10 Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 450 455 460
 15 His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 465 470 475 480
 20 Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
 485 490 495
 Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 500 505 510
 <210> 7
 <211> 511
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de proteína del Factor IX con secuencia de propéptido con sustitución K51R y sustitución R434X
 <220>
 <221> caract._misceláneas
 30 <222> (434)..(434)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 7
 Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
 1 5 10 15
 35 Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
 20 25 30
 40 Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Arg Arg Arg Tyr Asn
 35 40 45
 45 Ser Gly Arg Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
 50 55 60
 50 Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
 65 70 75 80
 55
 60
 65

ES 2 744 903 T3

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
 85 90 95
 5 Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
 100 105 110
 Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
 115 120 125
 10 Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
 130 135 140
 15 Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
 145 150 155 160
 20 Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
 165 170 175
 Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
 180 185 190
 25 Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
 195 200 205
 30 Gly Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ala Asn Ala Thr Gly Pro Ser Gly Glu
 210 215 220
 Gly Ser Ala Pro Ser Glu Gly Asn Ala Thr Gly Pro Gly Thr Ser Gly
 225 230 235 240
 35 Gly Ser Pro Ala Asn Ser Thr Gly Gly Ser Pro Ala Glu Gly Ser Pro
 245 250 255
 40 Gly Ser Glu Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 260 265 270
 Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 275 280 285
 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 290 295 300
 50 Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 305 310 315 320
 55 Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 325 330 335
 60
 65

ES 2 744 903 T3

Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
 340 345 350

5 His Asn Tyr Asn Ala Thr Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
 355 360 365

10 Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
 370 375 380

15 Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
 385 390 395 400

20 Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
 405 410 415

25 Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
 420 425 430

30 Leu Xaa Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
 435 440 445

35 Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 450 455 460

40 His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
 465 470 475 480

45 Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
 485 490 495

50 Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 500 505 510

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Secuencia del sitio de glicosilación
 <400> 8
 Val Phe Ile Gln Asp Asn Ile Thr Asp
 1 5

60 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> Secuencia del sitio de glicosilación
 <400> 9
 Val Phe Ile Gln Asp Asn Ile Thr Asn
 1 5

<210> 10
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia del sitio de glicosilación

ES 2 744 903 T3

<400> 10

Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Asn
1 5 10 15

5

Glu Thr Ile Gln Asp Asn Ile Thr Asp Asn Glu Thr Ile Leu Asp Asn
20 25 30

10

Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg
35 40 45

<210> 11

<211> 35

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido de activación del FIX

<400> 11

20

Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala
1 5 10 15

25

Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp
20 25 30

Phe Thr Arg
35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína del Factor IX (FIX) aislada que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3, en donde Xaa es leucina.
2. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína del FIX aislada de conformidad con la reivindicación 1.
- 10 3. La molécula de ácido nucleico aislada de conformidad con la reivindicación 2, en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5
4. Un vector o célula transformada que comprende el ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 2.
- 15 5. Un animal transgénico no humano que comprende el ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 2 o el vector o célula transformada de conformidad con la reivindicación 4.
- 20 6. La proteína del Factor IX aislada de conformidad con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico, seleccionada opcionalmente del grupo que consiste en una deficiencia del FIX, hemofilia B y enfermedad de Christmas.
7. La molécula de ácido nucleico aislada de conformidad con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico, seleccionada opcionalmente del grupo que consiste en una deficiencia del FIX, hemofilia B y enfermedad de Christmas.
- 25 8. El vector o célula transformada de conformidad con la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico, seleccionado opcionalmente del grupo que consiste en una deficiencia del FIX, hemofilia B y enfermedad de Christmas.

Sangrado vena safena (7 días después de la inyección)

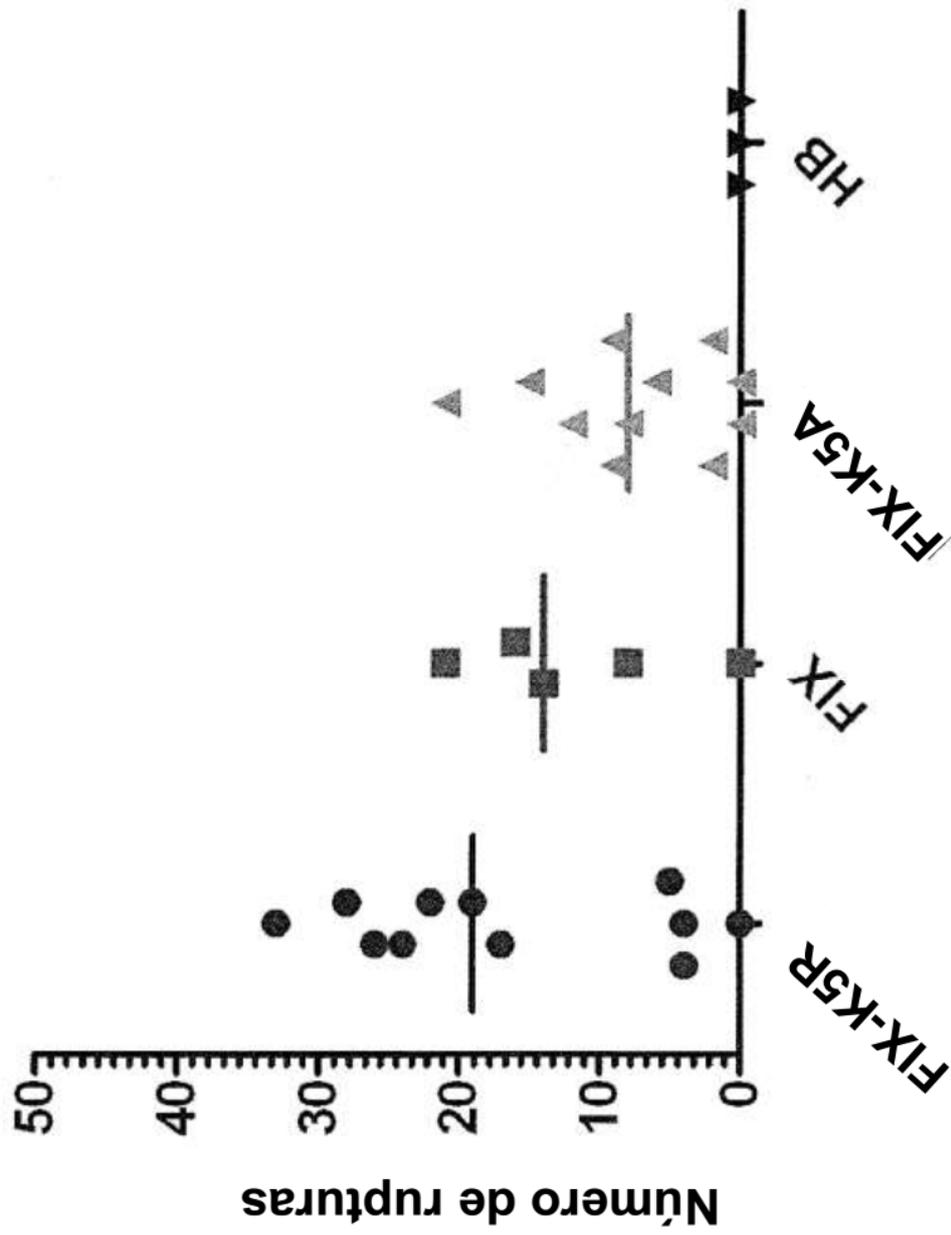


Figura 1

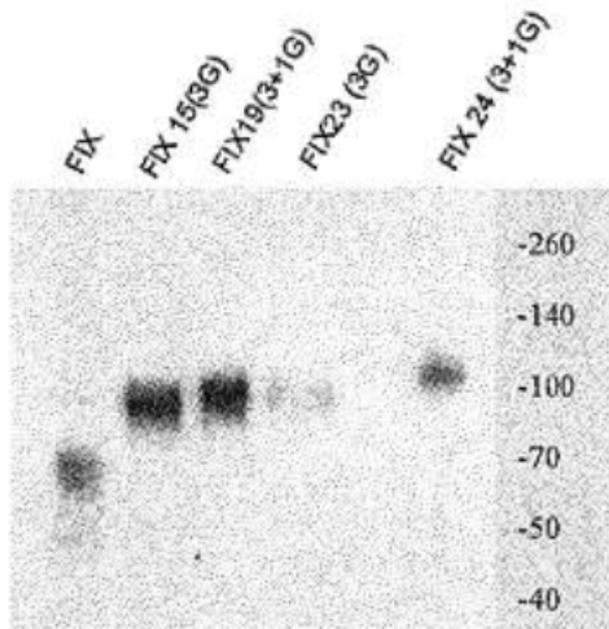


Figura 2

Sangrado vena safena (7 días después de la inyección)

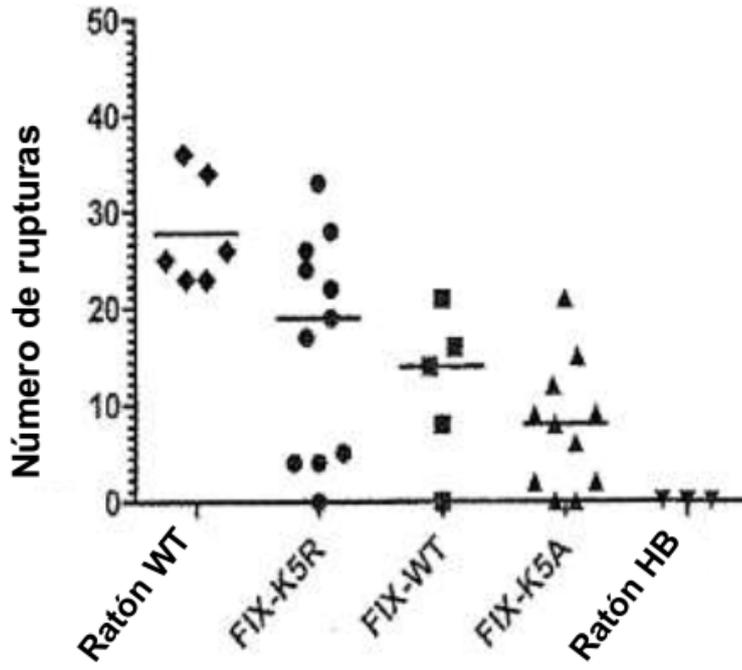


Figura 3