

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 035**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/64** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2009 E 21200005 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024 EP 4032979**

54 Título: **Mutante de polipéptido de factor IX, sus usos y su procedimiento de producción**

30 Prioridad:

**15.09.2008 IT BO20080564**

**06.05.2009 IT BO20090275**

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

**04.11.2024**

73 Titular/es:

**UNIQUIRE BIOPHARMA B.V. (100.0%)**

**Paasheuvelweg 25a**

**1105 BP Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**SIMIONI, PAOLO**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

Observaciones:

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

ES 2 985 035 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Mutante de polipéptido de factor IX, sus usos y su procedimiento de producción

5 Campo de la invención

**[0001]** La presente invención se refiere a un polipéptido FIX modificado (factor IX), una secuencia de nucleótidos, un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos y un método para producir el polipéptido FIX modificado.

10 **[0002]** La presente invención también se refiere a preparaciones y usos farmacéuticos del factor FIX modificado y de la secuencia de nucleótidos.

Técnica anterior

15 **[0003]** El FIX de la técnica anterior es una glicoproteína dependiente de vitamina K perteneciente a la familia de las serina-proteasas, y se sintetiza en el hígado del hombre y de otros animales, incluidos los mamíferos, desempeñando un papel fundamental en las vías tanto intrínsecas como extrínsecas de la cascada de la coagulación. El FIX humano circula en plasma como un zimógeno de cadena sencilla compuesto de 415 aminoácidos. El FIX humano tiene un peso molecular de 56 kD y una concentración plasmática de aproximadamente 5 µg/ml. El zimógeno es activado tanto por el factor XI activado (FXIa) como por el factor VII activado por el complejo de factor tisular (TF) (FVIIa). La organización estructural de FIX es similar a la de otras proteínas de la coagulación dependientes de la vitamina K, como el factor VII (FVII), el factor X (FX) y la proteína C (PC). La porción amino terminal de la molécula comprende el dominio "Gla", una región rica en residuos gamma-carboxi glutámicos cuya carboxilación depende de la presencia de vitamina K. La principal función fisiológica del FIX, una vez activado, es convertir el factor X (FX) en factor X activado (FXa) en un proceso que requiere la presencia de una superficie fosfolípida, iones calcio y una proteína con efecto cofactor, concretamente el factor VIII activado. (FVIIIa). El propio FXa es capaz de convertir la protrombina en trombina, que transforma el fibrinógeno en fibrina soluble que, al polimerizarse, forma el coágulo. La acción del FXa se ve reforzada por la presencia del factor V activado (FVa).

30 **[0004]** El gen FIX humano está ubicado en el cromosoma X en la posición Xq27.1 y contiene 8 exones de longitudes que varían desde 25 pares de bases (pb) hasta 2000 pb. El ARNm de FIX humano tiene aproximadamente 3 kb de longitud y comprende 205 bases que forman la región 5' UTR, 1386 bases que codifican el polipéptido FIX y 1392 bases de la región 3' UTR. Este ARNm codifica la síntesis de 461 aminoácidos que forman el precursor del FIX humano. Este precursor (SEQ ID NO: 1) comprende los siguientes segmentos y dominios: un péptido señal hidrófobo (aminoácidos 1-28), un propéptido (aminoácidos 29-46), un dominio Gla (aminoácidos 47 a 92), un dominio similar a EGF 1 (aminoácidos 93 a 129), un dominio similar a EGF 2 (aminoácidos 130 a 171), un péptido de activación (aminoácidos 192 a 226) y un dominio de serina-proteasa (aminoácidos 227 a 461). La forma madura de FIX humano (SEQ ID NO: 2) pierde el péptido señal hidrofóbico y el propéptido. En consecuencia, las posiciones de aminoácidos correspondientes de los dominios antes mencionados se convierten en las siguientes: un dominio Gla (aminoácidos 1 a 46), un dominio similar a EGF 1 (aminoácidos 47 a 83), un dominio similar a EGF 2 (aminoácidos 84 a 125), un péptido de activación (aminoácidos 146 a 180) y un dominio serina-proteasa (aminoácidos 181 a 415). SEQ ID NO: 1 (de la cual se deriva SEQ ID NO: 2) corresponde a la secuencia en PubMed (categoría "Proteína") encontrada ingresando el número de acceso AAB59620; esta secuencia de aminoácidos comprende el péptido señal (46 AA), seguido de la secuencia de aminoácidos de la proteína madura.

45 **[0005]** Una deficiencia genética en FIX puede causar una serie de enfermedades de la coagulación (coagulopatías), por ejemplo la enfermedad hemorrágica conocida como hemofilia B en los hombres afectados (enfermedad genética ligada al sexo). La hemofilia B se puede clasificar en tres clases, cada una de las cuales se caracteriza por la presencia de diferentes concentraciones plasmáticas de FIX. En la hemofilia B grave, los niveles plasmáticos de actividad de FIX están por debajo del 1% de lo normal; en la forma moderada, los niveles oscilan entre el 1% y el 5%; en la forma leve, entre el 5 y el 25% de los niveles normales. También hay individuos portadores sanos que tienen niveles medios de actividad de FIX, entre el 25% y el 50% de lo normal, pero muchos portadores pueden tener niveles incluso superiores al 50%. Los pacientes afectados de hemofilia B grave presentan manifestaciones hemorrágicas graves que pueden controlarse o evitarse mediante la administración de concentrados de FIX de origen extractivo (proveniente de plasma humano) o recombinante, actualmente sólo disponibles en una única formulación comercial.

60 **[0006]** Los intentos de corregir el defecto genético mediante terapia génica hasta ahora han resultado infructuosos debido a diversos problemas. Entre ellos se incluyen, en primer lugar, los relacionados con la baja eficacia de expresión en el hombre de los niveles de FIX en plasma, es decir, alrededor del 1%, por lo que no es suficiente para corregir la enfermedad; los relacionados con la inmunogenicidad del tratamiento con vectores virales; finalmente aquellos relacionados con los efectos secundarios de la propia terapia génica, que incluyen hepatitis, miositis y otros.

65 **[0007]** Un aumento del FIX plasmático a niveles superiores a los normales (el rango normal de FIX en plasma es 70-120%, es decir, 70-120 U/dl, donde una unidad es la cantidad de FIX contenida en 1 mililitro de plasma normal, equivalente a aproximadamente 5 µg) se ha asociado con un mayor riesgo en humanos de desarrollar manifestaciones trombóticas en el sistema venoso. En particular, para valores superiores a 150 U/dl, se ha observado un aumento de 4,8 veces en el

riesgo trombótico (O. R. corregido 4,8; IC 95%, de 2,3 a 10,1). Sin embargo, nunca se ha identificado la base genética del aumento de los niveles de FIX en plasma de estos individuos.

5 **[0008]** Los estudios de mutagénesis *in vitro* de la expresión de FIX recombinante mutado han demostrado la posibilidad de reproducir las alteraciones en la síntesis y actividad de FIX encontradas *in vivo* en pacientes con hemofilia B. Viceversa, mediante mutagénesis específica de sitio en ciertas posiciones de la molécula FIX, se han producido mutantes FIX con "ganancia de función" (aumento de actividad en relación con la molécula normal) alterando su especificidad por sustratos fisiológicos y/o modificando sus otras funciones. En el documento WO 99/03496 se describe el mutante de arginina 338 alanina de FIX recombinante que dio como resultado una ganancia de función cuyos niveles de actividad son 2-3 veces superiores a los encontrados en FIX de tipo salvaje. Estos mutantes de ganancia de función (en particular con actividad proteasa aumentada hacia el sustrato fisiológico, es decir, aún no se ha descubierto que existan FX, o con una mayor capacidad de interacción con FVIIIa, un cofactor de FIXa), ni se han probado en el hombre. Más explícitamente, no hay evidencia de: 1) la existencia de un portador humano de FIX mutado (mutante de FIX natural) con ganancia de función caracterizada por una mayor actividad funcional en comparación con el FIX normal (WT) con cualquier ganancia de función en actividad funcional; 2) pruebas realizadas *in vivo* en humanos con administraciones de FIX recombinante modificado; 3) pruebas realizadas *in vivo* en humanos con administraciones de FIX recombinante modificado con ganancia de función para la profilaxis y el tratamiento de pacientes afectados de hemofilia (genética o adquirida) u otras coagulopatías; 4) pruebas realizadas *in vivo* en el hombre con administraciones de FIX recombinante modificado que demuestran la ausencia de efectos secundarios.

20 **[0009]** El documento WO 99/03496 describe un factor antihemofílico del factor IX con actividad de coagulación aumentada. Kurachi y Davie enseñan el aislamiento y caracterización de un ADNc que codifica el factor IX humano (PNAS. 1982 noviembre; 79(21): 6461-6464). Graham et al. enseñan el polimorfismo de Malmo del factor IX de coagulación, un polimorfismo inmunológico debido al dimorfismo del residuo 148 que está en desequilibrio de ligamiento con otros dos polimorfismos F.IX (Am J Hum Genet. 1988; 42(4) 573-80).

Resumen de la invención

30 **[0010]** La presente invención proporciona un vector viral para uso en un tratamiento de terapia génica de hemofilia B grave y/o moderada en un paciente humano, en donde el vector viral comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido FIX modificado, que tiene al menos la siguiente secuencia:

35 YNSGKLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTE FWKQYVLDGQ  
 CESNPCLNGG SCKDDINSYE CWCDFGFEGK NCELDVTCNI KNGRCEQFOK  
 NSADNKVVCS CTEGYRLAEN QKSCEPAVFF FCGRVSVSQT SKLTRAEXVF  
 PDVDYVNSTE AETILDNITQ STQSFNDFTR VVGGEDAKPG QFPNQVVLNG  
 40 KVDAFCGSSI VNEKWIIVTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE TEHTEQKRNV  
 IRIIFHHNYN AAINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTFICI ADKEYTNI FL  
 NFGSGYVSGW GRVFKGRSA LVLQYLRVFL VDRATCLLST KFTIYNNMFC  
 45 AGFHEGGFDS CQGDSEGGFHV TEVREGTSFLF GIISWGEECA MKGNYGIYTK  
 VSRYVNWIKE KTKLT,

50 donde X representa A.

**[0011]** En algunas formas de realización, el ácido nucleico codifica un polipéptido FIX modificado que tiene la siguiente secuencia:

NQFVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSABCTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG  
 KLEEFVOGNL ERECMSEKCS FEEAREVPEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN  
 5 PCLNGGSCKD DINSYECWCP FGFEGKNCCL DVTCHIKNGR CEQFCNSAD  
 NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EFAVPPFCGR VSVSQTSKLT RAEKVFPDVE  
  
 YVNSTEARTI LDNITQSTQS FNDFTRVVGQ EDAKPGQFFW QVYLNKEVDA  
 10 FCGSSIVNEK NIVTAANQVE TGVKITVVAG EHNIEETENT EQKBNVIRII  
 EHNHYNAAIN KYNHDIALLE LDEFVLVNSY VFFICIADKE YTNIFLKFQS  
 GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLSVFLVDRA TCLLSTKFTI YNNMFCAGFH  
 15 EGGSDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMKCK YGIYTKVSRV  
 VNWIKETKL T,

donde X representa A.

20 **[0012]** En algunas formas de realización, el vector viral es un virus adenoasociado. En algunas formas de realización, el polipéptido FIX modificado muestra una actividad funcional 8-9 veces mayor en comparación con el FIX de tipo salvaje.

Descripción detallada de la invención

25 **[0013]** La presente invención se refiere a un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido FIX modificado para uso en un tratamiento de terapia génica de hemofilia B grave y/o moderada en un paciente humano.

30 **[0014]** Los polipéptidos de FIX modificados descritos en este documento muestran una ganancia de función de al menos 5 veces mayor que la de la molécula de FIX de tipo salvaje. Este aumento en el nivel de actividad es inesperadamente incluso mayor que el descrito para el mutante de arginina 338 alanina FIX recombinante conocido.

**[0015]** A menos que se especifique explícitamente lo contrario, los siguientes términos tienen los significados que se indican a continuación.

35 **[0016]** En el presente texto, los términos "porcentaje de identidad" y "% de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos (péptidos) o ácidos nucleicos (nucleótidos) significan el porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos en posiciones correspondientes en las dos secuencias óptimamente alineadas.

40 **[0017]** Para determinar el "porcentaje de identidad" de las dos secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, las secuencias se alinean entre sí. Para lograr una coincidencia óptima, se pueden introducir espacios en la secuencia (es decir, eliminaciones o inserciones que también pueden colocarse en los extremos de la secuencia). A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos y nucleótidos en las posiciones correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo aminoácido o residuo de nucleótido que ocupa la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas dividido por las secuencias [es decir, % identidad = (número de posiciones idénticas / número total de posiciones) x 100]

45 **[0018]** Ventajosamente, las secuencias tienen la misma longitud. Ventajosamente, las secuencias comparadas no presentan espacios (o inserciones).

50 **[0019]** El porcentaje de identidad se puede obtener mediante el uso de algoritmos matemáticos. Un ejemplo no limitante de un algoritmo usado para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 2264-2268] modificado por Karlin y Altschul [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 5873-5877]. Dicho algoritmo está incorporado en los programas BLASTn y BLASTp de Altschul [Altschul et al, J. Mol. Bio. 215 (1990) 403-410].

55 **[0020]** Con el propósito de lograr alineamientos incluso en presencia de uno o más espacios (o inserciones) se pueden usar métodos que asignan una penalización relativamente alta para cada espacio (o inserción) y una penalización menor para cada aminoácido o residuo de nucleótido adicional en el espacio (este residuo de aminoácido o nucleótido adicional se define como extensión del espacio). Las penalizaciones elevadas obviamente conducirán a que las alineaciones se optimicen con el menor número de espacios.

60 **[0021]** Un ejemplo de un programa capaz de lograr este tipo de alineación es el programa BLAST como se describe en Altschul et al., Nucleic Acids Res. (1997) 3389-3402. Para ello, se pueden utilizar los programas BLASTn y BLASTp con los parámetros predeterminados. Cuando se utiliza el programa BLAST, normalmente se emplea la matriz BLOSUM62.

65

[0022] Un ejemplo ventajoso y no limitante de un programa para lograr una alineación óptima es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, EE.UU.; Devereux et. al., 1984, Nucleic Acid Research 12:387). Los parámetros predeterminados se utilizan nuevamente, es decir, para una secuencia de aminoácidos permiten una penalización de -12 por un espacio y una penalización de -4 por cada extensión.

[0023] En el presente texto, el término "posición correspondiente" significa una posición en una secuencia de polipéptido o ácido nucleico que, después de una alineación, corresponde (o está enfrentada) a una posición precisa en una secuencia de referencia. Por ejemplo, se puede determinar una posición correspondiente a una posición precisa en el polipéptido FIX que presenta la SEQ ID NO: 2 alineando la SEQ ID NO: 2 con un polipéptido de interés; la alineación se puede llevar a cabo manualmente o como se explicó anteriormente en relación con la determinación de identidad porcentual.

[0024] En el presente texto, el término "prometer" significa una porción de ADN de un gen que controla (activa) la transcripción de una secuencia de nucleótidos a la que está operativamente unido (pero no necesariamente flanqueándolo). El promotor incluye una o más secuencias de ADN, que son reconocidas por la ARN polimerasa y se unen a la ARN polimerasa de modo que la propia ARN polimerasa inicia la transcripción.

[0025] En el presente texto, el término "tratar" o "tratamiento" de una patología significa la profilaxis y/o terapia y/o curación de esta patología. El término profilaxis significa ventajosamente detener al menos parcialmente el desarrollo de una enfermedad potencial y/o prevenir el empeoramiento de los síntomas o la progresión de una enfermedad. Ventajosamente, el término terapia significa un alivio parcial o total de los síntomas de la enfermedad.

[0026] En el presente texto el término "vector" significa un elemento utilizado para introducir un ácido nucleico en una célula para la expresión o replicación de dicho ácido nucleico. Un ejemplo de vectores son los episomas, que son capaces de replicarse extracromosómicamente. Los vectores también pueden integrarse en los cromosomas del huésped. Los vectores suelen estar en forma de plásmidos, generalmente ADN circular de doble hélice.

[0027] En el presente texto "vehículo que presenta un ácido nucleico" significa: un vector que incluye ácido nucleico; una célula que incluye ácido nucleico; o un excipiente farmacéuticamente aceptable combinado con el ácido nucleico mediante mezcla. Ventajosamente, el vehículo se elige entre un vector o una célula.

[0028] El polipéptido FIX modificado comprende el aminoácido leucina en una posición correspondiente a la posición 338.

[0029] El polipéptido FIX modificado debe poder llevar a cabo su función dentro de la cascada de coagulación.

[0030] Ejemplos de polipéptidos de FIX incluyen (pero no se limitan a) FIX de tipo salvaje no modificado (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2), precursores de dicho FIX de tipo salvaje (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 1), variantes polimórficas naturales (tales como: un polipéptido que presenta una alanina en una posición correspondiente a la posición T148 o a un polipéptido precursor de la misma).

[0031] En el presente texto, los *loci* (posiciones) de las secuencias de aminoácidos modificadas o no modificadas se identifican mediante referencia a la numeración de aminoácidos en las posiciones correspondientes de un polipéptido FIX maduro no modificado, como se identifica por SEQ ID NO: 2. Las posiciones correspondientes pueden determinarse mediante alineación de residuos no modificados (ver arriba). A modo de ejemplo, presentamos a continuación las secuencias y numeraciones relativas del polipéptido FIX maduro (SEQ ID NO: 2) y del precursor del polipéptido FIX (SEQ ID NO: 1).

SEQ ID NO: 1

MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG  
 KLEEFVQGNL ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN  
 PCLNGGSKD DINSYECWCP FGFEGKNCLE DVTCNIKNGR CEQFCKNSAD  
 NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR VSVSQTSLT RAEAVFPDVD  
 YVNSTEAETI LDNITQSTQS FNDFTRVVG EDAPGQFPW QVVLNGKVDA  
 FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRNVIIR  
 PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIADKE YTNIFLKFGS  
 GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH  
 EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMKGGK YGIYTKVSRV  
 VNWIKEKTKL T

en negrita subrayada Arg 384 correspondiente a Arg 338 en SEQ ID NO: 2

SEQ ID NO: 2

5 YNSGKLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTE FWKQYVDGDQ  
 CESNPCLNGG SCKDDINSYE CWCPFGFEGK NCELDVTCNI KNGRCEQFCK  
 NSADNKVVCS CTEGYRLAEN QKSCEPAVVPF PCGRVSVSQT SKLTRAETVF  
 10 PDVDYVNSTE AETILDNITQ STQSFNDFTR VVGGEDAKPG QFPWQVVLNG  
 KVDAFCGGS! VNEKWIVTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE TEHTEQKRNV  
 IRIIFHHNYN AAINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNIFL  
 15 KFGSGYVSGW GRVFKGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLRST KFTIYNNMFC  
 AGFHEGGRDS CQGDSGGPHV TEVEGTSFLT GIISWGEECA MKGKYGIYTK  
 VSRVYVNIKE KTKLT

20 en negrita subrayada Arg 338.

[0032] Asimismo, las posiciones de las secuencias de nucleótidos modificadas o no modificadas se identifican, salvo que se indique lo contrario, mediante referencia a la numeración de nucleótidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de nucleótidos identificada con el número de acceso K02402 (GenBank). La secuencia de nucleótidos K02402 cede al precursor del polipéptido FIX (SEQ ID NO: 1) e incluye algunas regiones intrón (a este respecto, véase Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, Brownlee GG. The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. The EMBO Journal 1984;3:1053-1060).

[0033] La secuencia de nucleótidos cede para el polipéptido FIX modificado.

[0034] Un polipéptido FIX no modificado puede codificarse mediante una secuencia de ARN con la secuencia desde la posición 31 hasta la posición 1411 (SEQ ID NO: 3) (ventajosamente desde la posición 169 hasta la posición 1411 - SEQ ID NO: 4) del polinucleótido de la figura 2 en el artículo de Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA y Brownlee GG. The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. The EMBO Journal 1984; 3: 1053-1060. En este caso (es decir, con referencia a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4), los números de posición se refieren a la numeración reportada en la figura 2 antes mencionada.

[0035] La secuencia de ARN puede unirse, en la cabeza y/o en la cola, a cadenas de nucleótidos adicionales que no están traducidas o se traducen por separado.

[0036] Un polipéptido FIX no modificado puede codificarse mediante una secuencia de nucleótidos con la secuencia general de regiones exónicas en la secuencia (SEQ ID NO: 5) de la figura 4 en el artículo de Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA y Brownlee GG. La estructura genética del factor IX antihemofílico humano. The EMBO Journal 1984;3:1053-1060.

[0037] La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido FIX modificado puede comprender una timina en una posición correspondiente a la posición 34099 (o en la posición correspondiente 32318 según la numeración dada en SEQ ID NO: 5; o en la posición correspondiente 31134 según la numeración dada en la Base de datos de mutaciones de Hemofilia B (Giannelli et al., Hemophilia B: Database of point mutations and short additions and deletions. Nucleic Acids Research 1990;18:4053-9); o un uracilo en la posición correspondiente 11180 de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4). En otras palabras, la secuencia de nucleótidos antes mencionada se diferencia de la secuencia que tiene el número de acceso K02402 (GenBank) por al menos el hecho de portar una mutación de guanina a timina en la posición 34099 (G34099T) o en la posición correspondiente (por ejemplo, la posición 32318 según la numeración de SEQ ID NO: 5; o de guanina a uracilo en la posición correspondiente 11180 de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4).

[0038] En este caso la secuencia de nucleótidos cede a una leucina en una posición correspondiente a la posición 338.

[0039] La secuencia de nucleótidos, en las posiciones correspondientes a 34098, 34099 y 34100, podrá presentar triplete elegido del grupo formado por: TTA, UUA, TTG, UUG, CTT, CUU, CTC, CUC, CTA, CUA, CTG, CUG. En particular, cuando la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN, el triplete se elige entre el grupo formado por TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG. Ventajosamente, el triplete es CTA. En estos casos, la secuencia cede para una leucina en una posición correspondiente a la posición 338.

[0040] El ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos como se describe en el presente documento.

[0041] El ácido nucleico puede comprender un promotor en enlace operativo con la secuencia de nucleótidos.

- 5  
**[0042]** La presente invención proporciona un vector viral que comprende un ácido nucleico como se describe en el presente documento. En particular, el vector viral comprende una secuencia de nucleótidos como se describe en el presente documento.
- [0043]** En particular, el vector viral puede ser elegido entre: un adenovirus, un retrovirus, un herpesvirus, un lentivirus, un poxvirus, un citomegalovirus.
- 10  
**[0044]** El polipéptido FIX modificado está destinado al tratamiento de la hemofilia B grave y/o moderada en pacientes humanos.
- [0045]** La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido FIX modificado se proporciona para su uso como medicamento para tratar la hemofilia B grave y/o moderada.
- 15  
**[0046]** La secuencia de nucleótidos se puede utilizar para tratar una patología sola o en combinación con otros compuestos activos.
- [0047]** En lugar de administrar el polipéptido FIX modificado, es posible administrar la secuencia de nucleótidos que lo codifica.
- 20  
**[0048]** La secuencia de nucleótidos puede insertarse en células o tejidos mediante cualquier método conocido. La secuencia de nucleótidos se incorpora a un vector para manipulaciones posteriores.
- [0049]** Por ejemplo, ciertas células podrían diseñarse para expresar el polipéptido FIX modificado, integrando la secuencia de nucleótidos mencionada anteriormente en una ubicación genómica unida operativamente con las secuencias promotoras. Dichas células pueden administrarse a un paciente de forma local o sistémica.
- 25  
**[0050]** Los vectores virales utilizables incluyen poxvirus, herpesvirus, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y otros virus adecuados para terapia génica.
- 30  
**[0051]** Los vectores pueden permanecer como episomales o pueden integrarse en los cromosomas del individuo tratado. Los serotipos de adenovirus están disponibles comercialmente en la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville).
- 35  
**[0052]** Los vectores virales, en particular los adenovirus, se utilizan ex vivo; por ejemplo, se aíslan células de un paciente y se transducen con un adenovirus que expresa el polipéptido FIX modificado. Después de un período adecuado de cultivo, las células transducidas se administran al paciente de forma local o sistémica.
- 40  
**[0053]** Alternativamente, los virus, en particular los adenovirus, que expresan el polipéptido FIX modificado se aíslan y se formulan con un excipiente farmacéuticamente aceptable y se administran al paciente. Normalmente, los adenovirus se administran en dosis de 1 a 10<sup>14</sup> partículas por kilogramo de peso del paciente, generalmente de 10<sup>6</sup> a 10<sup>12</sup> partículas por kilogramo de peso del paciente. Ejemplos adicionales de tipos de células para la expresión y liberación del polipéptido FIX modificado son los fibroblastos y las células endoteliales (Palmer et al. (1989) Blood 73:483-445; Yao y al. (1991) PNAS 88:8101-8105).
- 45  
**[0054]** La secuencia de nucleótidos y/o los fármacos y/o vehículos que presentan dicha secuencia de nucleótidos se utilizan para el tratamiento de las patologías mencionadas anteriormente en relación con el péptido FIX modificado.
- [0055]** La secuencia de nucleótidos antes mencionada se utiliza para el tratamiento de pacientes humanos.
- 50  
**[0056]** Los polipéptidos y secuencias de nucleótidos de FIX pueden detectarse utilizando métodos conocidos en el estado de la técnica, y pueden adaptarse a aquellos polimorfismos en estudio para incluir, por ejemplo, ensayos inmunoenzimáticos, pruebas de actividad de proteínas de la coagulación (incluida la actividad de FIX), pruebas coagulométricas y cromogénicas.
- 55  
**[0057]** El método puede comprender una etapa de amplificación por PCR parte de una molécula de ácido nucleico (en la que se requiere verificar la presencia de la secuencia de nucleótidos).
- [0058]** Ventajosamente, la etapa de amplificación está precedida por una etapa de purificación, en particular de aislamiento, de la molécula de ácido nucleico.
- 60  
**[0059]** Ventajosamente, la etapa de amplificación va seguida de una etapa de secuenciación.
- [0060]** A modo de ejemplo, se pueden seguir los métodos de los ejemplos 2 y 3 siguientes para detectar la secuencia de nucleótidos mencionada anteriormente.
- 65

[0061] El método para detectar la secuencia de proteínas y/o nucleótidos se puede utilizar para ayudar en la identificación de aquellos individuos que muestran una alta tendencia a desarrollar enfermedades de la sangre tales como trombosis.

5 [0062] Otras características de la presente invención se desprenderán de la siguiente descripción de algunos ejemplos que son meramente ilustrativos y no limitativos.

**Ejemplo 1 - Pruebas de laboratorio de rutina realizadas en el Proband**

10 [0063] Se llevaron a cabo pruebas de coagulación de laboratorio de rutina con respecto a la detección de trombofilia en un individuo (definido como Proband) que presentaba episodios de trombosis venosa profunda pero ningún otro problema de salud.

15 [0064] En particular se realizaron: tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina, niveles de factor IX, niveles de factor VIII y XI, niveles de antitrombina (actividad y antígeno), niveles de proteína C (actividad coagulométrica y cromogénica, antígeno), niveles de proteína S ( antígeno total, antígeno libre y actividad), resistencia a proteína C activada, análisis de ADN para factor V Leiden, análisis de ADN para la variante de protrombina G20210A, anticuerpos antifosfolípidos, plasminógeno, pruebas de fibrinólisis. Se encontró que todas las pruebas de coagulación realizadas en Proband estaban dentro de los límites normales, excepto la actividad de FIX (consulte el ejemplo 4 a continuación).

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

[0065] El aislamiento de FIX a partir de plasma o de medio de cultivo se logró mediante la técnica de columna de inmunoafinidad, utilizando una resina (sefarosa 4B) a la que se le añadió el anticuerpo monoclonal anti-FIX AHIX-5041 [Haematologic Technologies, Inc. (Essex Junction, VT, EE. UU.)] se unió covalentemente (3,5 mg de anticuerpo monoclonal por 3 ml de resina de sefarosa). Brevemente, la columna se equilibró con tampón que contenía Tris 20 mM, NaCl 150 mM, benzamidina 1 mM (mM = milimolar). A partir del plasma se precipitaron factores dependientes de la vitamina K añadiendo cloruro de bario. Después de la centrifugación, el sedimento se resuspendió en una solución que contenía EDTA 0,2 M. La preparación así obtenida se dializó extensamente (2 veces, durante al menos 2 horas) en una solución que contenía Tris 20 mM y NaCl 150 mM. Después de la diálisis, se dejó que la preparación pasara a través de la columna a una velocidad de 0,5 ml/min. Después de un lavado exhaustivo de la columna (10 volúmenes de columna) con tampón Tris/NaCl, la elución se llevó a cabo utilizando una solución de glicina ácida (pH 2,45). El pH del eluato se neutralizó inmediatamente añadiendo Tris 2 M a pH 7,5. Las fracciones de eluato que contenían proteína (probadas mediante el ensayo de proteína de Bradford) se combinaron y se dializaron frente a una solución de Tris-NaCl, luego se concentró el FIX a través de una microcolumna de 200 µl de sefarosa Q de flujo rápido (intercambio iónico). La pureza de la preparación se evaluó aplicando la técnica de tinción con plata sobre el gel SDS-PAGE.

**Ejemplo 3 - El estudio genético de FIX**

40 [0066] La amplificación por PCR y la secuenciación directa de los exones y los sitios de empalme del gen Proband FIX se llevaron a cabo usando técnicas y cebadores estandarizados como se informa en la literatura (De: Methods in Molecular Medicine, Vol 31: Hemostasis and Thrombosis Protocols. Editado por D.J. Perry y K.J. Pasi. Humana Press Inc. Totowa, Nueva Jersey. Chapter 16: Hemophilia B mutational analysis. Por Peter Green). Brevemente, la amplificación se llevó a cabo utilizando pares de cebadores de intrones que flanquean cada uno de los ocho exones del gen FIX. La secuenciación se realizó con un secuenciador ABI PRISM 310 (Perkin Elmer, Foster City, CA) utilizando el kit ABI PRISM BigDye Terminator para reacciones de secuenciación de ciclos. Los datos de la secuencia se analizaron utilizando el programa Sequencing Analysis 3.0 (Perkin Elmer, CA). La secuencia obtenida se comparó con la secuencia FIX informada en la base de datos GenBank (número de acceso: K02402).

50 [0067] El análisis de la secuencia de nucleótidos del gen Proband FIX ha documentado una única mutación en el exón VIII del gen FIX en comparación con la secuencia normal. Se descubrió que el paciente era portador de una mutación de G a T en la posición 34099 del gen FIX (secuencia normal del gen FIX, número de acceso al banco de genes: K02402) (o en la posición correspondiente 31134 según la numeración indicada en la base de datos de mutaciones de la hemofilia B (Giannelli et al., Hemophilia B: Database of point mutations and short additions and deletions. Nucleic Acids Research 1990;18:4053-9) capaz de cambiar el codón 338 de arginina a leucina. Por lo tanto, la molécula de FIX presente en el plasma del Proband (FIX mutado) se diferencia de la molécula de FIX normal sólo por la presencia de una sustitución de aminoácidos en la posición 338, donde hay leucina en lugar de arginina.

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

60 [0068] La mutagénesis específica del sitio se llevó a cabo según técnicas estándar descritas por Kunkel (Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection; Proc Natl Acad Sci, EE.UU. 1985, 82:488-492). Se llevó a cabo la secuenciación del ADNc para garantizar que la mutación era correcta y que no se habían introducido nuevas mutaciones. La expresión del FIX recombinante se obtuvo utilizando la "línea celular de riñón embrionario humano 293" y los métodos ya descritos en la literatura (Chang JL, Jin JP, Lollar P, et al. Changing residue 338 in human factor IX from arginine to alanine causes an increase in catalytic activity. J. Biol. Chem. 1998;273:12089-12094). El FIX

recombinante se aisló del sobrenadante (medio de cultivo) mediante una columna de inmutafinidad, como se describió anteriormente. Brevemente, el sobrenadante del cultivo celular se recogió cada 24 horas durante 10 días y se conservó a -20°C. Para la purificación, se descongeló el sobrenadante y se añadieron benzamidina y EDTA hasta una concentración final de 5 milimoles y 4 milimoles respectivamente. Después de la filtración a través de un filtro Millipore, el sobrenadante se incubó con resina Sepharose Q de flujo rápido durante 12 horas a 4°C. A continuación, se volvió a equilibrar la resina en Tris, NaCl y tampón de benzamidina y se cargó en la columna. La elución se realizó con un gradiente de calcio de 0-60 nM. A continuación, se dializó el eluato en un tampón Tris-NaCl. A continuación, se aplicó la preparación a la columna de inmutafinidad siguiendo el método descrito en el ejemplo 2 (en la expresión "in vitro" de la proteína recombinante). A partir del medio de cultivo se procedió igual que para el plasma, excepto por el procedimiento de precipitación con BaCl. El medio de cultivo se centrifugó a 4000 g durante 20 minutos, luego se sometió a diálisis en Tris-NaCl y se cargó en la columna de inmutafinidad a una velocidad de 0,5 ml/min. Los pasos restantes fueron los mismos que los realizados para el plasma.

[0069] El FIX con la mutación del gen G34099T que da como resultado la sustitución del aminoácido 338Leu, se obtuvo mediante mutagénesis *in vitro* y técnicas de expresión. Se encontró que el nivel de expresión en cultivo celular era similar al que se puede obtener con FIX (molécula normal) recombinante no mutado. Específicamente, el nivel de expresión del FIX recombinante no mutado estaba entre 750 y 880 ng/ml, mientras que para el factor IX recombinante con la mutación genética G34099T que resulta en la sustitución del aminoácido 338Leu, el nivel estaba entre 590 y 629 ng/ml.

### 20 Ejemplo 5 Ensayo funcional de FIX

[0070] El ensayo funcional de FIX se llevó a cabo en el plasma de Proband con una prueba coagulométrica usando Actina (Dade Behring, Marburg, Alemania) y plasma deficiente en FIX (Dade Behring, Marburg, Alemania). Brevemente, para la prueba coagulométrica se utilizó una variante del tiempo de tromboplastina parcial (PTT) en un sistema que contenía plasma deficiente en FIX. Después de añadir el cloruro de calcio, se midió el tiempo de coagulación en segundos. Este tiempo de coagulación se comparó con los de una curva de calibración obtenida mediante diluciones seriadas de una combinación de plasma normal como referencia que contenía FIX en una cantidad de 5 µg/ml (es decir, 100%), y el porcentaje de FIX presente en la muestra se calcula sobre el 100% del pool de plasma normal (según métodos estandarizados comunes).

[0071] El rango de normalidad de la prueba se había obtenido previamente analizando, con el mismo método, a 100 individuos sanos de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 70 años.

[0072] Se encontró que los niveles de actividad de FIX en Proband eran iguales al 776% (rango normal en 100 individuos sanos, 80-120%).

### Ejemplo 6 - Ensayo del antígeno FIX

[0073] El antígeno FIX se determinó con la prueba ELISA usando un primer anticuerpo monoclonal anti-FIX (Affinity Biologicals, Ontario, Canadá) recubierto (unido) sobre la placa para la captura y un segundo anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Affinity Biologicals, Canadá) para la detección de FIX. La curva de referencia se construyó diluyendo una mezcla de plasma normal de 1:100 a 1:3200 en un tampón para las muestras, según procedimientos estandarizados. Brevemente, el primer anticuerpo se unió a la placa después de la dilución en tampón de bicarbonato de sodio a pH básico (pH = 9,0) a una concentración final de 4 µg/ml. Después de un lavado extenso de la placa con tampón Tris-NaCl-Tween20, las muestras, diluidas 1:100 y 1:200 en el mismo tampón, se cargaron en los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de retirar las muestras de los pocillos y lavarlos exhaustivamente con el tampón, se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µL de una solución que contenía el segundo anticuerpo conjugado con HRP y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Después de más lavados, se añadieron 100 µL de una solución que contenía tetrametilbencidina (TMB) y se midió el color desarrollado mediante un espectrofotómetro con un filtro de 450 nanómetros. El nivel de antígeno FIX se calculó usando la curva de referencia y se expresó como porcentaje del conjunto de plasma normal. El rango de normalidad de la prueba se obtuvo previamente mediante el mismo método analizando a 100 individuos sanos de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 70 años.

[0074] Se encontró que los niveles de antígeno FIX eran iguales al 92% (rango normal 80-120%). Este resultado combinado con el obtenido en el ejemplo 5) fue compatible con la presencia de cantidades normales de un FIX circulante sintetizado, pero siendo su función procoagulante alrededor de 8-9 veces mayor que la de la molécula de FIX normal.

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

[0075] Después de aislar el FIX del plasma del Proband, este FIX se usó para reconstituir un plasma deficiente en FIX (Dade-Behring, Milán, Italia) con una concentración final de FIX de 5 µg/ml (igual al 100% de lo normal). Las mediciones de actividad de FIX y antígeno en el plasma así reconstituido fueron del 740% y del 95% respectivamente, siendo por tanto comparables con las del plasma de Proband.

[0076] Para ensayar la actividad del FIX recombinante obtenido de acuerdo con el ejemplo 4, se usó el mismo sistema después de la recomposición de un plasma deficiente en FIX con una cantidad de FIX recombinante mutado (rFIX 338Leu) tal como para restaurar la concentración normal de FIX en plasma humano normal, es decir, 5 µg/ml (correspondiente al 100% de lo normal) (µg = microgramos). Las mediciones de actividad del factor IX recombinante y de antígenos fueron del 780% y del 90% respectivamente, siendo por tanto comparables con las del plasma de Proband. Esto indica que la proteína recombinante así obtenida, que contiene la sustitución de aminoácidos también presente en el factor IX de Proband, tiene una actividad biológica al menos 8-9 veces mayor que la del factor IX normal.

#### Ejemplo 8 - SDS-PAGE e inmunotransferencia de FIX

[0077] La SDS-PAGE y la inmunotransferencia (transferencia Western) de FIX se llevaron a cabo en un gel con gradiente lineal del 5-15% según procedimientos estándar. Brevemente, las muestras que contenían FIX normal o FIX recombinante se cargaron en los pocillos del gel de poliacrilamida y se sometieron a electroforesis.

[0078] A continuación, el FIX se sometió a transttransferencia en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando un aparato semiseco (Novablot, GE-Healthcare, Milán, Italia). El FIX se detectó en la membrana de PVDF después de la transttransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FIX conjugado con HRP (Affinity Biologicals, Ontario, Canadá). La Figura 1 muestra que el FIX aislado de Proband, el FIX recombinante 338Leu y el FIX normal exhiben la misma movilidad electroforética y el mismo patrón de inmunotransferencia (en la Figura 1, 1 indica marcadores de peso molecular, 2 indica FIX normal, 3 indica FIX modificado natural, 4 indica el FIX recombinante modificado).

[0079] Por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas (ni cuantitativas ni cualitativas) entre el FIX humano normal, el FIX humano mutante natural de 338 Leu y el FIX recombinante de 338 Leu utilizando esta técnica.

[0080] De lo descrito anteriormente, queda claro que la presencia de una leucina en una posición correspondiente a la posición 338 aumenta sorprendentemente la actividad del polipéptido FIX casi ocho veces.

[0081] Esta es una mejora particular con respecto al estado de la técnica, ya que proporciona un polipéptido FIX modificado que *in vivo* en el hombre no causa ningún efecto secundario aparte de un aumento de la actividad de coagulación.

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

[0082] La mutagénesis específica de sitio se llevó a cabo según técnicas estándar descritas por Kunkel (Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection; Proc Natl Acad Sci EE. UU. 1985, 82: 488-492) insertando una guanina en lugar de citosina en la posición 34098, y una alanina en lugar de guanina en la posición 34099 y una timina en lugar de alanina en la posición 34100 (la mutagénesis también se realizó repetido insertando una guanina en lugar de citosina en la posición 34098, una adenina en lugar de guanina en la posición 34099 y una guanina en lugar de adenina en la posición 34100).

[0083] Se llevó a cabo la secuenciación del ADNc para garantizar que la mutación era correcta y que no se habían introducido nuevas mutaciones. La expresión del FIX recombinante se obtuvo utilizando la "línea celular de riñón embrionario humano 293" y los métodos ya descritos en la literatura (Chang JL, Jin JP, Lollar P, et al. Changing residue 338 in human factor IX from arginine to alanine causes an increase in catalytic activity. J. Biol. Chem. 1998;273:12089-12094). El FIX recombinante se aisló del sobrenadante (medio de cultivo) mediante una columna de inmunoafinidad, como se describió anteriormente. Brevemente, el sobrenadante del cultivo celular se recogió cada 24 horas durante 10 días y se conservó a -20°C. Para la purificación, se descongeló el sobrenadante y se añadieron benzamidina y EDTA hasta una concentración final de 5 milimoles y 4 milimoles respectivamente. Después de la filtración a través de un filtro Millipore, el sobrenadante se incubó con resina Sepharose Q de flujo rápido durante 12 horas a 4°C. A continuación, se volvió a equilibrar la resina en Tris, NaCl y tampón de benzamidina y se cargó en la columna. La elución se realizó con un gradiente de calcio de 0-60 nM. A continuación, se dializó el eluato en un tampón Tris-NaCl. La preparación se aplicó a la columna de inmunoafinidad siguiendo el método descrito en el ejemplo 2 (en la expresión "in vitro" de la proteína recombinante). A partir del medio de cultivo se procedió igual que para el plasma, excepto por el procedimiento de precipitación con BaCl. El medio de cultivo se centrifugó a 4000 g durante 20 minutos, luego se sometió a diálisis en Tris-NaCl y se cargó en la columna de inmunoafinidad a una velocidad de 0,5 ml/min.

[0084] Los pasos restantes fueron los mismos que los dados para el plasma.

[0085] El FIX con la sustitución del aminoácido 338Asp se obtuvo mediante mutagénesis *in vitro* y técnicas de expresión. Se encontró que el nivel de expresión en cultivo celular era similar al que se puede obtener con FIX (molécula normal) recombinante no mutado. Específicamente, el nivel de expresión del FIX recombinante no mutado estaba entre 750 y 880 ng/ml mientras que para el factor IX recombinante con la sustitución del aminoácido 338Asp, el nivel estaba entre 650 y 740 ng/ml.

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

[0086] Para el ensayo de la actividad del FIX recombinante obtenido de acuerdo con el ejemplo 9, se usó el mismo sistema después de la recomposición de un plasma deficiente en FIX con una cantidad de FIX recombinante mutado (rFIX 338Asp) tal que restablezca la concentración normal de FIX en plasma humano normal, es decir, 5 µg/ml (correspondiente al 100% de lo normal) (µg = microgramos). Las mediciones de actividad y antígenos del factor IX recombinante fueron del 460 % y el 98 % respectivamente. Esto indica que la proteína recombinante así obtenida (FIX 338 Asp), tiene una actividad biológica al menos 5 veces mayor que la del factor IX normal.

**Ejemplo 11 SDS-PAGE e inmunotransferencia de FIX**

[0087] La SDS-PAGE y la inmunotransferencia (transferencia Western) de FIX se llevaron a cabo en un gel con gradiente lineal del 5-15% según procedimientos estándar. Brevemente, las muestras que contenían FIX normal o FIX recombinante se cargaron en los pocillos del gel de poli(acrilamida) y se sometieron a electroforesis.

[0088] A continuación, el FIX se sometió a transttransferencia en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando un aparato semiseco (Novablot, GE-Healthcare, Milán, Italia). El FIX se detectó en la membrana de PVDF después de la transttransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FIX conjugado con HRP (Affinity Biologicals, Ontario, Canadá).

[0089] El FIX recombinante 338Asp y el FIX normal exhiben la misma movilidad electroforética y el mismo patrón de inmunotransferencia. Por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas (ni cuantitativas ni cualitativas) entre el FIX humano normal y el FIX recombinante 338Asp utilizando esta técnica.

[0090] A partir de lo descrito anteriormente, está claro que la presencia de un ácido aspártico en una posición correspondiente a la posición 338 aumenta sorprendentemente la actividad del polipéptido FIX casi ocho veces.

[0091] Esta es una mejora particular con respecto al estado de la técnica, ya que proporciona un polipéptido FIX modificado que *in vivo* en el hombre no causa ningún efecto secundario aparte de un aumento de la actividad de coagulación.

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

[0092] La mutagénesis específica de sitio se llevó a cabo según técnicas estándar descritas por Kunkel (Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis; Proc Natl Acad Sci EE. UU. 1985, 82: 488-492) insertando una adenina en lugar de guanina en la posición 34099 (la mutagénesis también se repitió insertando una adenina en lugar de guanina en la posición 34099, y una guanina en lugar de adenina en posición 34100). Se llevó a cabo la secuenciación del ADNc para garantizar que la mutación era correcta y que no se habían introducido nuevas mutaciones. La expresión del FIX recombinante se obtuvo utilizando la "línea celular de riñón embrionario humano 293" y los métodos ya descritos en la literatura (Chang JL, Jin JP, Lollar P, et al. Changing residue 338 in human factor IX from arginine to alanine causes an increase in catalytic activity. J. Biol. Chem. 1998;273:12089-12094). El FIX recombinante se aisló del sobrenadante (medio de cultivo) mediante una columna de inmutofinidad, como se describió anteriormente. Brevemente, el sobrenadante del cultivo celular se recogió cada 24 horas durante 10 días y se conservó a -20°C. Para la purificación, se descongeló el sobrenadante y se añadieron benzamidina y EDTA hasta una concentración final de 5 milimoles y 4 milimoles respectivamente. Después de la filtración a través de un filtro Millipore, el sobrenadante se incubó con resina Sepharose Q de flujo rápido durante 12 horas a 4°C. A continuación, se volvió a equilibrar la resina en Tris, NaCl y tampón de benzamidina y se cargó en la columna. La elución se realizó con un gradiente de calcio de 0-60 nM. A continuación, se dializó el eluato en un tampón Tris-NaCl. A continuación, se aplicó la preparación a la columna de inmutofinidad siguiendo el método descrito en el ejemplo 2 (en la expresión "in vitro" de la proteína recombinante). A partir del medio de cultivo se procedió igual que para el plasma, excepto por el procedimiento de precipitación con BaCl. El medio de cultivo se centrifugó a 4000 g durante 20 minutos, luego se sometió a diálisis en Tris NaCl y se cargó en la columna de inmutofinidad a una velocidad de 0,5 ml/min. Los pasos restantes fueron los mismos que los realizados para el plasma.

[0093] El FIX con la sustitución del aminoácido 338Gln se obtuvo mediante mutagénesis *in vitro* y técnicas de expresión. Se encontró que el nivel de expresión en cultivo celular era similar al que se puede obtener con FIX (molécula normal) recombinante no mutado. Específicamente, el nivel de expresión del FIX recombinante no mutado estaba entre 750 y 880 ng/ml mientras que para el factor IX recombinante con la sustitución del aminoácido 338Gln, el nivel estaba entre 600 y 720 ng/ml.

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

[0094] Para el ensayo de la actividad del FIX recombinante obtenido según el ejemplo 12, se utilizó el mismo sistema después de la recomposición de un plasma deficiente en FIX con una cantidad de FIX recombinante mutado (rFIX 338Gln)

tal que restablezca la concentración normal de FIX en plasma humano normal, es decir, 5 µg/ml (correspondiente al 100% de lo normal) (µg = microgramos). Las mediciones de actividad y antígenos del factor IX recombinante fueron del 1.360 % y del 99 % respectivamente. Esto indica que la proteína recombinante así obtenida (FIX 338 Gln) tiene una actividad biológica al menos 13 veces mayor que la del factor IX normal.

5

#### Ejemplo 14 - SDS-PAGE e inmunotransferencia de FIX

[0095] La SDS-PAGE y la inmunotransferencia (transferencia Western) de FIX se llevaron a cabo en un gel con gradiente lineal del 5-15% según procedimientos estándar. Brevemente, las muestras que contenían FIX normal o FIX recombinante se cargaron en pocillos de gel de poliacrilamida y se sometieron a electroforesis.

10

[0096] A continuación, el FIX se sometió a transtransferencia en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando un aparato semiseco (Novablot, GE-Healthcare, Milán, Italia). El FIX se detectó en la membrana de PVDF después de la transtransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FIX conjugado con HRP (Affinity Biologicals, Ontario, Canadá).

15

[0097] El FIX recombinante 338Gln y el FIX normal exhibieron la misma movilidad electroforética y el mismo patrón de inmunotransferencia. Por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas (ni cuantitativas ni cualitativas) entre el FIX humano normal y el FIX recombinante 338Gln utilizando esta técnica.

20

[0098] De lo descrito anteriormente, queda claro que la presencia de una glutamina en una posición correspondiente a la posición 338 aumenta sorprendentemente la actividad del polipéptido FIX casi trece veces.

[0099] Esta es una mejora particular con respecto al estado de la técnica, ya que proporciona un polipéptido FIX modificado que *in vivo* en humanos no causa ningún efecto secundario aparte de una mayor actividad de coagulación.

25

[0100] Por lo tanto, se proporciona evidencia de que:

- 1) se ha descubierto un mutante de FIX de origen natural (arginina 338 leucina) con una actividad funcional 8-9 veces mayor en comparación con el FIX de tipo salvaje;
- 2) polipéptidos FIX modificados recombinantes (no conocidos antes) con 5 veces (FIX arginina 338 ácido aspártico), 8 a 9 veces (FIX arginina 338 leucina), 13 veces (FIX arginina 338 glutamina) la actividad funcional aumentada (procoagulante), respectivamente, en comparación con FIX de tipo salvaje, se puede generar.

30

[0101] El uso de estos mutantes, que muestran una actividad funcional específica de 5 veces o más, y en particular de 8 a 9 veces en comparación con FIX de tipo salvaje, para uso médico y en particular para la profilaxis y el tratamiento de pacientes con hemofilia B; dicho uso de estos mutantes nunca se había considerado antes. Nunca antes se había considerado el uso de estos mutantes, que muestran una actividad funcional específica de 5 veces o más, y en particular de 8 a 9 veces en comparación con el FIX de tipo salvaje, para la terapia génica de pacientes con hemofilia B.

40

[0102] El uso de estos mutantes, que muestran una actividad funcional específica de 5 veces o más, y en particular de 8 a 9 veces en comparación con el FIX de tipo salvaje, para la profilaxis y el tratamiento de coagulopatías hemorrágicas distintas de la hemofilia B o para la terapia génica de tales enfermedades nunca antes había sido considerado.

[0103] Cabe señalar que se considera el uso de estos mutantes, que muestran una actividad funcional específica de 5 veces o más, y en particular de FIX arginina 338 leucina, que muestra una actividad funcional de 8 a 9 veces mayor en comparación con el FIX de tipo salvaje. Óptimo para el tratamiento de pacientes con hemofilia B debido a la presencia de un mutante natural idéntico en humanos (nunca descrito antes) que no genera anticuerpos neutralizantes. Además, los niveles de actividad funcional de FIX expresados por FIX arginina 338 leucina, es posiblemente la mejor opción al ser superiores a los de FIX arginina 338 alanina (anteriormente conocido y descrito en el documento WO 99/03496, con un modesto aumento de actividad de 2 a 3 veces mayor que el del FIX de tipo salvaje) y no demasiado alto como para causar complicaciones trombóticas en pacientes con hemofilia B o pacientes con otras coagulopatías hemorrágicas.

50

[0104] FIX arginina 338 leucina, es también la mejor opción para el uso de mutantes FIX en terapia génica mediante el uso de vectores virales, dada la eficiencia y rendimiento real del método para el tratamiento (corrección parcial) de la Hemofilia B.

55

#### BIBLIOGRAFÍA

60 [0105]

- Ameri A, Kurachi S, Sueishi K, Kuwahara M, Kurachi K. Myocardial fibrosis in mice with overexpression of human blood coagulation factor IX. *Blood*. 1 de marzo de 2003; 101 (5): 1871-3. Epub 24 de octubre de 2002.
- Chang JL, Jin JP, Lollar P, et al. Changing residue 338 in human factor IX from 5 arginine to alanine causes an increase in catalytic activity. *J Biol Chem* 1998;273:12089-12094.
- Lowe GDO. Factor IX and thrombosis. *British Journal of Haematology*, 2001, 115, 507- 513.

65

## ES 2 985 035 T3

- Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci EE. UU. 1985, 82:488-492.
- Kurachi K, Davie EW. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. Proc Natl Acad Sci EE. UU. 1982;79:6461-6464.
- 5 - Murphy SL, High KA. Gene therapy for haemophilia. Br J Haematol. 2008 Mar;140(5):479-87.
- Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, et al. Nucleotide Sequence of thr Gene for Human Factor IX (Antihemophilic Factor B). Biochemistry 1985;24:3736-3750.
- Toomey JR, Valocik RE, Koster PF, Gabriel MA, McVey M, Hart TK, Ohlstein EH, Parsons AA, Barone FC. Inhibition of factor IX(a) is protective in a rat model of thromboembolic stroke. Stroke. 2002 Feb;33(2):578-85.

10

REIVINDICACIONES

1. Un vector viral para uso en un tratamiento de terapia génica de hemofilia B grave y/o moderada en un paciente humano, en el que el vector viral comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido FIX modificado, que tiene al menos la siguiente secuencia

5

```

YNSGKLEEFV QGNLERECME ERCSFEEARE VFENTERTTE FWKQYVDGDQ
CESNPCLNGG SCKDDINSYE CWCPFGFEGK NCELDVTCNI KNGRCRQFCK
NSADNKVVCS CTEGYRLAEN QKSCEPAVEF PCGRVSVSQT SKLTRAEXVF
PDVDYVNSTE AETILDNITQ STQSFNDFTR VVGGEDAKPG QFPWQVVLNG
KVDAFCGGSI VNEKWIIVTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE TEHTEQKRNV
IRIIFHHNYN AAINKYNNHI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNIFL
KFGSGYVSGW GRVFNKGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLLST KFTIYNNMFC
AGFHEGGRDS CQGDSSGGPHV TEVEGTSFLT GIISWGEECA MKGKYGIYTK
VSRVYVNIKE KTKLT,
    
```

10

15

20

donde X representa A.

2. El vector viral para uso según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico codifica un polipéptido FIX modificado que tiene la siguiente secuencia:

25

```

MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG
KLEEFVQGNL ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFNKQ YVDGDQCESN
PCLNGGSCKD DINSYECWCF FGFEKNCNEL DVTCHIKNGF CEQFCNKSAD
NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EFAVVFPCGR VSVSQTSKLT RAEKVFFOVD

YVNSTEARTI LDNITQSTQS FNDFTRVVGG EDAPGQFPW QVVLNGRVDA
FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVAG EHNIBETENT EQKRNVIRII
PHHYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLSY VEPICIIDKE YTNIFLKFGS
GYVSGWGRVF HNGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLLSTKFTI YNNMFCAGFH
EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEKCAMKCK YGIYTKVSRV
VNIKEKTEL T,
    
```

30

35

40

donde X representa A.

45

3. El vector viral para uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el vector viral es un virus adenoasociado.

4. El vector viral para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polipéptido FIX modificado muestra una actividad funcional 8-9 veces mayor en comparación con el FIX de tipo salvaje.