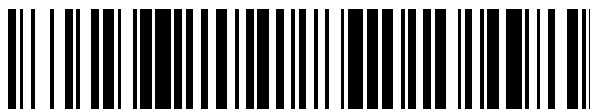


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 099**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2009 PCT/EP2009/067632**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2010 WO10070137**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2009 E 09796378 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2358874**

54 Título: **Derivados de serin proteasa y usos en la prevención o el tratamiento de y trastornos de la coagulación sanguínea**

30 Prioridad:

19.12.2008 EP 08305990

23.04.2009 EP 09305349

03.07.2009 US 222960 P

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

07.08.2017

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris Cédex 13, FR**

72 Inventor/es:

**CHRISTOPHE, OLIVIER;
DENIS, CÉCILE;
CHEREL, GHISLAINE y
GUEGUEN, PAUL**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 629 099 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

Derivados de serín proteasa y usos en la prevención o el tratamiento de trastornos de la coagulación sanguínea

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere al péptido de activación del factor X y a su uso para mejorar la semivida y la recuperación de derivados de serín proteasa, en particular derivados de la proteína C, el factor IX y el factor X y los usos de estos derivados en la prevención o el tratamiento de trastornos relacionados con la proteína C, el factor IX y el factor X, en particular trastornos de la coagulación sanguínea.

Estado de la técnica

La coagulación sanguínea es un proceso importante y complejo, que se produce en una respuesta a la lesión de los vasos sanguíneos. Consiste en una formación de coágulos para detener la hemorragia y comenzar la reparación del vaso dañado: su pared se recubre por plaquetas y fibrina que contienen el coágulo. El proceso comienza casi inmediatamente después de la lesión.

El proceso de coagulación sanguínea involucra a dos tipos de componentes: los componentes celulares llamados plaquetas y los componentes de proteínas llamados factores de coagulación. Las plaquetas forman inmediatamente un tapón en el sitio de la lesión; Esto se llama hemostasia primaria. La hemostasia secundaria ocurre simultáneamente: las proteínas en el plasma sanguíneo, llamadas factores de coagulación, responden en una cascada compleja para formar fibras de fibrina que refuerzan el tapón plaquetario.

La cascada de coagulación de la hemostasia secundaria se divide en dos vías llamadas vía intrínseca, o vía de activación de contacto, y la vía extrínseca, también llamada vía del factor tisular. Están implicados muchos factores de coagulación, pero también cofactores y reguladores, para mantener correctamente el proceso.

Por ejemplo, la Proteína C es un factor esencial de un importante mecanismo para la regulación de la coagulación, denominada "vía anticoagulante". La forma activa de la proteína C (proteína C activada) es una serín proteasa que, cuando está asociada con otro cofactor (proteína S), degrada dos factores de la cascada de coagulación esencial para la generación masiva de trombina: factores Va y VIIIa. La destrucción de estos factores regula negativamente la cantidad de trombina formada, dando como resultado un efecto anticoagulante. Esta proteína es particularmente conocida por tener actividad biológica pleiotrópica: no solo la actividad antitrombótica (Taylor et al, 1987; Gruber et al, 1990; Chesebro et al, 1992; Hanson et al, 1993; Arnljots et al, 1994; Sakamoto et al, 1994, Jang et al, 1995, Kurz et al, 1997; Gresele et al, 1998; Mizutani et al, 2000; Bernard et al 2001), sino también actividad antiinflamatoria (Emson, 2000), anti-apoptotic activity (Joyce et al, 2001) and pro-fibrinolytic activity (Comp et al, 1981; Rezaie, 2001).

El factor IX (denominado en lo sucesivo FIX) es una serín proteasa esencial de la coagulación sanguínea. La deficiencia de esta proteína provoca un trastorno hemorrágico llamado hemofilia B. Durante la coagulación sanguínea, el FIX activado (FIXa) se asocia con su cofactor activado, el factor VIIIa (en lo sucesivo denominado FVIIIa), convierte su factor X específico de sustrato (denominado en lo sucesivo FX) en su derivado activado, el factor X activado (en lo sucesivo denominado FXa).

El factor X es otro factor esencial de la cascada de coagulación. La forma activada de FX (FXa) es la única serín proteasa que, asociada con su cofactor (factor de coagulación Va), es capaz de activar la protrombina en trombina. Además, el factor X, considerado desde siempre como un espectador pasivo, ahora se presenta como un jugador directo en una amplia variedad de tipos celulares a través de la activación de sus dos receptores principales, el receptor activado por proteasa 1 (PAR-2) y PAR-2. Los hallazgos recientes sugieren que el PAR-2 desempeña un papel crucial en las enfermedades fibroproliferativas como la fibrosis, la remodelación tisular y el cáncer y apuntan al factor X como el mediador importante que coordina la interfase entre la coagulación y la progresión de la enfermedad (Borensztajn et al., 2008).

La proteína C, el factor IX y el factor X son respectivamente glicoproteínas de 62 kDa, 55 kDa y 59 kDa sintetizadas en el hígado. Antes de su secreción en el plasma, sus cadenas polipeptídicas sufren varias maduraciones postraduccionales para convertirse en proenzimas funcionales.

Los dos zimógenos de la proteína C y el factor X están compuestos de una cadena ligera amino-terminal y una cadena pesada carboxi-terminal, resultante de una escisión de la cadena peptídica, donde las cadenas ligera y pesada están conectadas por un puente disulfuro. El factor IX zimógeno es una glicoproteína de cadena sencilla.

Como la mayoría de los precursores de serín proteasa, la proteína C, el factor IX y el factor X son zimógenos que carecen de actividad catalítica. Su activación es el resultado de la escisión proteolítica en sus cadenas pesadas. En la proteína C, esta escisión tiene lugar en el extremo N-terminal de la cadena pesada, liberando un péptido de "activación" de 12 aminoácidos. En el factor X, esta escisión tiene lugar entre los restos Arg193 e Ile194 del

zimógeno, liberando también un péptido de “activación” de 52 aminoácidos. En el factor IX, tienen lugar dos escisiones liberando también un péptido de activación de un peso molecular aproximadamente igual a 11 kDa de la región interna de la molécula precursora.

- 5 La coagulación sanguínea tiene que estar bien controlada para evitar cualquier riesgo de hemorragia o de la coagulación. Por lo tanto, la desregulación del proceso de coagulación sanguínea conduce a trastornos graves como hemorragia (aumento del riesgo de hemorragia) y trombosis (aumento del riesgo de coagulación). Las patologías debido a un mayor riesgo de coagulación incluyen trastornos graves tales como trombosis venosa o arterial, en particular trombosis que afecta a vasos de gran calibre, infarto de miocardio, enfermedad trombotica, embolia pulmonar, reoclusiones coronarias después de una angioplastia o trombólisis y también anomalías de la coagulación en pacientes que padecen anomalías genéticas que afectan al gen de la proteína C o al de la trombomodulina. Se administran anticoagulantes a las personas para detener la trombosis (la coagulación sanguínea se presenta inapropiadamente en los vasos sanguíneos). Esto es útil en la prevención primaria y secundaria de la trombosis venosa profunda, la embolia pulmonar, los infartos de miocardio y los ictus en las personas con predisposición a los mismos. La hemorragia es la complicación más grave del uso de la anticoagulación oral en la prevención y tratamiento de las complicaciones tromboembólicas. Los individuos anticoagulados con warfarina o heparina se tratan típicamente con antídotos específicos tales como vitamina K o la protamina, respectivamente, si sangran o requieren cirugía. Desgraciadamente las actividades terapéuticas de la warfarina, la heparina, la vitamina K y la protamina están asociadas con efectos secundarios adversos que complican su uso. Por el contrario, no se dispone de antídotos específicos y eficaces para la reversión de los efectos anticoagulantes de las heparinas de bajo peso molecular (LMWH) o de los nuevos anticoagulantes orales dirigidos al factor Xa (fXa) (ver revisiones Harenberg, 2008, Bauer, 2008, Khoo et al., 2009). Cuando se usan estos nuevos tratamientos anticoagulantes, puede observarse una mayor hemorragia. Por lo tanto, es necesaria una acción apropiada rápida, tanto mecánica como sistémica, para controlar la hemorragia. Esto incluye el cese de la terapia anticoagulante y, si es posible, la reversión de los efectos de la anticoagulación, utilizando agentes reversibles específicos disponibles. Actualmente existe la necesidad de antídotos específicos dirigidos contra estos anticoagulantes.

- Por otro lado, las patologías del tipo hemorrágico incluyen particularmente las hemofilias A o B (deficiencias respectivamente en el factor VIII y IX). Estas enfermedades graves se complican a menudo por la presencia de “inhibidores” que son aloanticuerpos neutralizantes dirigidos contra el factor VIII o IX convencionalmente utilizados para el tratamiento.

Actualmente existe la necesidad de mejorar el tratamiento de estas patologías.

- 35 La primera estrategia de tratamiento es eludir las etapas deficientes de la cascada de la coagulación y su regulación. Otra estrategia para mejorar el tratamiento actual es mejorar la semivida de los compuestos usados, principalmente proteínas que se neutralizan fácilmente en el plasma. Otro enfoque para mejorar el tratamiento es restablecer el sistema de auto-amplificación o retro-control.

- 40 Los tratamientos administrados para los trastornos de la hipercoagulación como las deficiencias de proteína C son derivados de la proteína C, proteína C activada, derivados de la proteína C... Los tratamientos actuales para las hemofilias son la administración de factor VIII o IX para la hemofilia A y B, respectivamente.

- 45 Estos tratamientos son caros, en particular debido a la necesidad de inyecciones repetitivas debido a las semividas cortas de los compuestos, y tienen sus límites, como el desarrollo de inhibidores o aloanticuerpos neutralizantes dirigidos contra el factor VIII o IX convencionalmente usados para el tratamiento de las hemofilias A y B. Además, se ha observado que la administración de proteínas recombinantes, especialmente el factor IX para tratar la hemofilia B, se ve obstaculizada debido a una menor recuperación en comparación con la administración del producto derivado del plasma.

- 50 Se han propuesto soluciones potenciales como nuevas estrategias de tratamiento. En particular, la solicitud de patente WO03035861 describía derivados quiméricos de la proteína C y el factor X escindibles por trombina.

- 55 El documento WO2003/035861 divulga la provisión de una proteína quimérica, que es una proteína C o factor X, que comprende una secuencia escindible por trombina con un sitio de escisión para la trombina distinta de la de la cadena alfa de fibrinógeno.

- 60 El documento WO2006/018204 divulga la provisión de un método para preparar un polipéptido dependiente de la vitamina K modificado que comprende modificar el péptido de activación de un primer polipéptido dependiente de vitamina K de modo que el polipéptido dependiente de vitamina K modificado tenga una semivida aumentada en comparación con el primer polipéptido dependiente de la vitamina K, en el cual el péptido de activación no ha sido modificado, en el que el primer polipéptido dependiente de vitamina K es la proteína C humana, en el cual al menos parte del péptido de activación ha sido reemplazado por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el péptido de activación de FX.

- 65 Sin embargo, la breve semivida de estos compuestos limita su uso para los trastornos de la coagulación sanguínea.

La invención propone un nuevo enfoque para resolver este problema técnico.

Objeto de la invención

5 La invención se refiere a un polipéptido PP que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2 (péptido de activación del factor X) en el que la asparagina de la posición 39 o 49 está N-glicosilada.

10 La invención también se refiere al uso de dicho polipéptido para aumentar la semivida y la recuperación de una proteína circulante tal como un zimógeno de serín proteasa, por ejemplo el factor X, la proteína C.

La invención también se refiere a una proteína de fusión PF que comprende:

- 15 – un primer polipéptido PP y
- un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 7 a 16 de la SEQ ID NO:4.

20 La invención se refiere a un derivado quimérico del factor X o la proteína C escindible por trombina, en el que el péptido de activación nativo de dicha proteína se reemplaza por una proteína de fusión PF.

La invención se refiere a un derivado del factor X o la proteína C escindible por trombina en el que el péptido de activación nativo de dicha proteína se reemplaza por una proteína de fusión PF.

25 La invención se refiere además a un derivado quimérico del factor X o la proteína C escindible por trombina que contiene el factor X o proteína C activado o una variante conservadora de los mismos y una proteína de fusión PF.

30 La invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un derivado quimérico escindible por trombina de la invención.

La invención se refiere a un derivado quimérico del factor X de la invención para su uso en la prevención o tratamiento de las patologías de la coagulación de tipo hemorrágico.

35 La invención se refiere a un derivado quimérico del factor X de la invención para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de hemorragias inducidas por las heparinas de bajo peso molecular (LMWH, *low molecular weight*) o por un factor Xa (fXa) dirigido al anticoagulante.

40 La invención también se refiere a un derivado quimérico de la proteína C de la invención para su uso en la prevención o tratamiento de patologías que implican hipercoagulación.

La invención se refiere a composiciones farmacéuticas para la prevención o tratamiento de trastornos de la coagulación sanguínea que comprenden derivados quiméricos de la invención.

Descripción detallada de la invención

45 Trabajando en diferentes construcciones de factor X, los inventores mostraron que el péptido de activación del factor X juega un papel primordial en el proceso de eliminación del factor X y en su recuperación.

50 Más en particular, observaron que los diecinueve aminoácidos del extremo carboxi-terminal de este péptido de activación tienen un papel principal en la cinética de eliminación del factor X. Esta secuencia de diecinueve restos contiene dos sitios de N-glicosilación esenciales para el mecanismo observado.

Definiciones

55 Las “variantes conservadoras de la función” son aquéllas en las que se ha cambiado un resto de aminoácido dado en una proteína o enzima sin alterar la conformación y la función generales del polipéptido, incluyendo, pero no limitándose a, la sustitución de un aminoácido por uno que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de unión del hidrógeno, ácidas, básicas, hidrófobas, aromáticas y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína de modo que el porcentaje de similitud de la secuencia de proteínas o aminoácidos entre cualesquiera dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70 % al 99 % según se determina de acuerdo con un esquema de alineamiento, tal como el método de agrupación, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una “variante conservadora de la función” también incluye un polipéptido que tiene al menos un 60 % de identidad de aminoácidos como se determina mediante algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos 75 %, más preferiblemente al menos 85 % e incluso más preferiblemente al menos 90 % y que tiene las mismas o sustancialmente las mismas propiedades o funciones que la proteína nativa o progenitora con la que se compara.

Dos secuencias de aminoácidos son “sustancialmente homólogas” o “sustancialmente similares” cuando más del 80 %, preferiblemente más del 85 %, preferiblemente más del 90 % de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente 90 %, preferiblemente más de 95 % son similares (funcionalmente idénticas). Preferiblemente, las secuencias similares o homólogas se identifican mediante alineación usando, por ejemplo, el programa de acumulación GCG (Genetics Computer Group, Manual de programa para el paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin) o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias tales como BLAST, FASTA, etc.

De acuerdo con la invención, el término “proteína de fusión” o proteína quimérica se refiere a una proteína creada mediante la unión de dos o más genes o fragmentos de los mismos, que codificaron originalmente polipéptidos separados. La traducción de este gen de fusión da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada uno de los polipéptidos originales. Las proteínas de fusión recombinantes se crean artificialmente mediante tecnología de ADN recombinante para su uso en investigación biológica o terapéutica. Una proteína de fusión recombinante es una proteína creada a través de la ingeniería genética de un gen de fusión. Esto implica generalmente la eliminación del codón de parada de una secuencia de ADNc que codifica la primera proteína, a continuación, añadir la secuencia de ADNc de la segunda proteína en el marco a través de ligadura o PCR de extensión de solapamiento. Esa secuencia de ADN será entonces expresada por una célula como una sola proteína. La proteína se puede diseñar para incluir la secuencia completa de ambas proteínas originales, o solamente una porción de cualquiera.

El término “recuperación” se refiere al valor expresado en porcentaje de un antígeno o nivel de actividad de una molécula inyectada sobre un antígeno o actividad teórica o esperada calculada.

Por “proteína circulante”, se entiende proteínas sintetizadas por las células de los órganos del cuerpo y transportadas dentro del torrente sanguíneo. Ejemplos de proteínas circulantes son factores de coagulación sanguínea, hormonas proteínicas.

Los factores de coagulación son generalmente serín proteasas. Hay algunas excepciones. Por ejemplo, el Factor VIII y el Factor V son glicoproteínas y el Factor XIII es una transglutaminasa.

Las hormonas proteicas son una clase de proteínas que se secretan en el torrente sanguíneo y tienen funciones endocrinas en animales vivos.

La expresión “zimógeno de serín proteasa” tiene su significado general en la técnica y se refiere a un precursor inactivo de una enzima serín proteasa, que requiere que se escinda para que se convierta en una enzima activa. De acuerdo con la invención, las serín proteasas de interés se limitan a las que pertenecen a las proteínas circulantes.

Las serín proteasas incluyen varias proteasas en las cuales uno de los aminoácidos en el sitio activo es serina. De acuerdo con la invención, las serín proteasas de interés pueden ser, pero no se limitan a, factor IX, factor X o proteína C, y particularmente factor X y proteína C.

De acuerdo con la invención, la expresión “derivado quimérico de un zimógeno de serín proteasa” es una proteína de fusión obtenida mediante la unión de un zimógeno de serín proteasa o un fragmento del mismo con un polipéptido de interés. La proteína obtenida muestra las propiedades funcionales de dicha serín proteasa.

En particular, la expresión “derivado quimérico de un zimógeno de serín proteasa” es una proteína de fusión obtenida por la fusión de la serín proteasa activada o un fragmento de la misma con un polipéptido de interés.

De acuerdo con la invención, dicho derivado quimérico de un zimógeno de serín proteasa es diferente del zimógeno de serín proteasa nativa, pero muestra al menos una actividad equivalente.

El término “factor X” tiene su significado general en la técnica y se refiere a una serín proteasa secretada implicada en mecanismos de coagulación. El factor X puede ser de cualquier fuente, pero generalmente es un factor X de mamífero (por ejemplo, ser humano y primate no humano) y más particularmente un factor X humano. Generalmente, la secuencia de aminoácidos del factor X humano se proporciona mediante la SEQ ID NO:1 (figura 1).

Hay diferentes sistemas de numeración para localizar los restos de aminoácidos para el factor X:

- El sistema de numeración con referencia de la secuencia deducida del ADNc del factor X.
- El sistema de numeración con referencia de la secuencia deducida de la proteína secretada, la cual contiene la cadena ligera, el péptido de activación y la cadena pesada: el resto de aminoácido numerado 1 es el primer resto de aminoácido de la extremidad amino-terminal de la cadena ligera. Se utiliza este sistema de numeración. La posición de aminoácido en posiciones anteriores se identifica negativamente: el aminoácido C-terminal del pro-péptido se numera como -1 y el resto de aminoácido N-terminal de la proteína traducida (que es el resto de aminoácido amino terminal del pre-péptido) se numera como -40.

Como se muestra en la figura 1, la secuencia del factor X se divide en cinco regiones diferentes, que corresponden, según el sistema de numeración utilizado, a:

- el pre-péptido (o péptido señal) entre las posiciones -40 a -28,
- el pro-péptido entre las posiciones -27 a -1,
- la cadena ligera entre las posiciones 1 a 142
- el péptido de activación entre las posiciones 143 a 194
- la cadena pesada entre la posición 195 a 448.

Las expresiones “factor X” o “FX” o “FX maduro” o “zimógeno de FX” se refieren a la forma circulante en la sangre del factor X, después de su secreción por las células hepáticas productoras. El péptido señal se escinde por la peptidasa señal, la secuencia propeptídica se escinde después de que la carboxilación gamma tenga lugar en los primeros 11 restos de ácido glutámico en el extremo N terminal de la cadena N-terminal madura. Una etapa de procesamiento adicional se produce por escisión entre Arg142 y Ser143 de acuerdo con el sistema de numeración usado (Figura 1, posiciones 182-183 de la SEQ ID NO:1). Esta etapa de procesamiento también conduce concomitantemente a la delección del tripéptido Arg140-Lys141-Arg142 (posiciones 180-182 de la SEQ ID NO:1). El zimógeno del factor X secretado resultante consiste en una cadena ligera N-terminal de 139 aminoácidos y una cadena pesada C-terminal de 306 aminoácidos que están unidos covalentemente a través de un puente disulfuro entre Cys132 y Cys302. Otras etapas postraduccionales de procesamiento incluyen la beta-hidroxilación de Asp63 así como la glicosilación de tipo N y O.

La expresión “factor X activado” o “FXa” se refiere a la forma enzimáticamente activa del factor circulante X generado en caso de actividad de coagulación (por ejemplo, generación de trombina). En condiciones fisiológicas capaces de activar el factor X, el llamado péptido de activación de 52 aminoácidos de Ser143 a Arg194 se escinde del resto de la molécula escindiendo el extremo carboxi-terminal de la cadena pesada en Arg194 (figura 1).

De acuerdo con la invención, las expresiones “factor X” y “factor X activado” incluyen el factor X natural y el factor X activado, pero también abarcan variantes conservadoras de la función y formas modificadas de la misma. En particular, la invención abarca todas las variantes conservadoras de la función conocidas del factor X (zimógeno o forma activada) tales como la variante descrita en Camire et al., 2000, en la que el propéptido del factor X nativo se reemplaza por el propéptido de protrombina con el fin de obtener un mejor rendimiento de la proteína madura carboxilada y o la variante descrita en Rudolph y et al. 1997 en la que el codón correspondiente al resto -2 del factor X (ACG, que corresponde a una treonina en la posición 39 de la SEQ ID NO:1) puede cambiarse por AGG (que corresponde a una arginina) para permitir la escisión correcta del propéptido.

La expresión “péptido de activación del factor X” tiene su significado general en la técnica y se refiere al polipéptido de 52 aminoácidos que va desde las posiciones 143 a 194 del factor X de acuerdo con el sistema de numeración usado (posiciones 183-234 de la SEQ ID NO:1). El término puede incluir un péptido de activación del factor X de origen natural y variantes conservadoras de la función y sus formas modificadas. El péptido de activación tal como se define aquí corresponde al péptido de activación del factor X humano, pero puede ser de cualquier fuente, pero generalmente es un factor X de mamífero (por ejemplo, ser humano y primate no humano) y más particularmente un factor X humano. La secuencia de aminoácidos del péptido de activación del factor X humano se proporciona en la SEQ ID NO:2.

En la invención, la secuencia de los últimos 19 aminoácidos de la parte carboxi-terminal del péptido de activación del factor X corresponde a un polipéptido de interés, el cual corresponde a la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2 o a las posiciones 176 a 194 del factor X de acuerdo con el sistema de numeración utilizado (figura 1). Este polipéptido también se denomina PA176-194. Este polipéptido contiene dos sitios de glicosilación en las posiciones 39 y 49 de la SEQ ID NO:2, correspondientes a las posiciones 181 y 191 del factor X de acuerdo con el sistema de numeración utilizado.

El término “proteína C” tiene su significado general en la técnica y se refiere a una serín proteasa secretada implicada en un mecanismo principal de regulación de la coagulación llamada “vía anticoagulante”. La proteína C puede ser de cualquier fuente, pero generalmente es una proteína C de mamífero (por ejemplo, primate humano y no humano), y más particularmente una proteína C humana. Generalmente, la secuencia de aminoácidos de la proteína C humana se proporciona mediante la SEQ ID NO:3.

El péptido de activación de la proteína C es un polipéptido de doce aminoácidos encontrado entre las posiciones 200 a 211 de la secuencia SEQ ID NO:3.

Las expresiones “proteína C” o “PC” o “PC madura” o “zimógeno de PC” se refieren a la forma circulante en la sangre de la proteína C, después de su secreción por las células productoras hepáticas. El péptido señal se escinde

por la peptidasa señal, la secuencia propeptídica se escinde después de que la carboxilación gamma tenga lugar en los primeros 9 restos de ácido glutámico en el extremo N de la cadena N-terminal madura (comenzando en la alanina en la posición 43 del Secuencia SEQ ID NO:3). Una etapa de procesamiento adicional se produce por la delección del doblete Lys198-Arg199 (SEQ ID NO:3). El zimógeno de proteína C secretado resultante consiste en una

5 cadena ligera N-terminal de 155 aminoácidos y una cadena pesada C-terminal de 262 aminoácidos que están unidas covalentemente a través de un puente disulfuro. Otras etapas postraduccionales de procesamiento incluyen la beta-hidroxilación de la Asp113 (SEQ ID NO:3) así como la glicosilación de tipo N.

La expresión "proteína X activada" o "PCa" se refiere a la forma enzimáticamente activa de la proteína C circulante generada en caso de que se necesite actividad coagulante (por ejemplo, generación de trombina). En condiciones fisiológicas capaces de activar la proteína C, el llamado péptido de activación de 12 aminoácidos de Asp200 a Arg211 (SEQ ID NO:3) se escinde del resto de la molécula mediante la escisión del extremo carboxi terminal de la cadena pesada en Arg211 (SEQ ID NO:3).

De acuerdo con la invención, las expresiones "proteína C" o "proteína C activada" incluyen la proteína C natural y la proteína C activada, pero también abarcan variantes conservadoras de la función y formas modificadas de la misma. En particular, la invención abarca todas las variantes conservadoras de la función conocidas de la proteína C (zimógeno o forma activada) tales como derivados de la proteína C activada con actividad anticoagulante superior que contiene la sustitución en Asn 355 y 371 (Patente US-5.453.373), así como derivados de la proteína C activada con actividad anticoagulante reducida, que tienen la propiedad deseable de ser citoprotectores (anti-apoptóticos, anti-trastornos neurodegenerativos y protectores contra el ictus) (véase por ejemplo el documento WO/2005/007820). Estos mutantes son, por ejemplo, 3K3A-APC y 229/230-APC.

El término "fibrinopéptido A" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un péptido pequeño de 16 restos de aminoácidos eliminado del segmento N-terminal de la cadena α del fibrinógeno por la acción de la trombina. El término puede incluir fibrinopéptido A de origen natural y variantes conservadoras de la función y sus formas modificadas. El fibrinopéptido A puede ser de cualquier fuente, pero generalmente es un fibrinopéptido A de mamífero (por ejemplo, primate humano y no humano) y más particularmente un fibrinopéptido A humano. Generalmente, la secuencia de aminoácidos del fibrinopéptido A humano se proporciona en la SEQ ID NO:4.

De acuerdo con la invención, la expresión "derivado del fibrinopéptido A escindible por trombina" se refiere a un polipéptido que comprende el fibrinopéptido A o un fragmento del mismo y un sitio escindible por trombina en la parte carboxi-terminal del fibrinopéptido A. Tales derivados están definidos por las secuencias SEQ ID NO:5 (figura 3A) o SEQ ID NO:6 (figura 3B) para derivados quiméricos del factor X escindibles por trombina y por las secuencias SEQ ID NO:13 (figura 4A) o SEQ ID NO:14 (figura 4B) para los derivados quiméricos de la proteína C escindibles por trombina.

De acuerdo con la invención, la expresión "sitio escindible por trombina" se refiere a una secuencia de aminoácidos corta que puede ser reconocida y escindida por trombina, una serín proteasa principal de la coagulación.

La glicosilación es el proceso enzimático que une los sacáridos a las proteínas. La glicosilación de las proteínas está generalmente ligada al N. "Ligada al N" se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripeptidos en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. Generalmente, los oligosacáridos que están ligados al N a las proteínas están compuestos de moléculas de glucosa, manosa y 2N-acetilglucosamina que pueden ser entonces alargadas con diferentes monosacáridos incluyendo galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, fucosa y ácido siálico.

Por consiguiente, el término "N-glicosilado" se refiere a la N-glicosilación de un polipéptido sobre al menos un resto de asparagina como se ha definido anteriormente.

En su sentido más amplio, el término "prevenir" o "prevención" se refiere a la prevención de la enfermedad o afección que se produce en un paciente que aún no ha sido diagnosticado de padecerla.

En su sentido más amplio, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a revertir, aliviar, inhibir el progreso del trastorno o afección a la que se aplica tal término, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección.

El término "paciente" se refiere a cualquier sujeto (preferiblemente humano) afectado o susceptible de ser afectado con un trastorno de la coagulación sanguínea.

De acuerdo con la invención, la expresión "proteína C y trastornos relacionados con el factor X" se refiere a cualquier patología que implique el factor X o la proteína C, en particular trastornos de la coagulación sanguínea.

De acuerdo con la invención, la expresión "trastorno de la coagulación sanguínea" o "trastorno de la coagulación" se

refiere a cualquier patología debida a una desregulación de los mecanismos de coagulación sanguínea. Por lo tanto, incluye patologías que implican un exceso y un defecto en la coagulación sanguínea.

- 5 Las patologías que implican un exceso de la coagulación sanguínea o una hipercoagulación incluyen, pero no se limitan a, trombosis venosa o arterial, infarto de miocardio, enfermedad trombótica, embolismo pulmonar, reoclusiones coronarias y deficiencia de proteína C.

- 10 Las patologías que implican un defecto de la coagulación sanguínea se denominan patologías hemorrágicas y particularmente incluyen deficiencias del factor VIII, IX o XI. Estas patologías pueden ser en particular hemofilias A o B y hemofilias resultantes de la aparición de autoanticuerpos asociados con otra patología tal como enfermedad autoinmunitaria o cáncer.

Polipéptidos derivados del péptido de activación del factor X

- 15 Un primer objeto de la presente invención se refiere a un polipéptido PP que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2 en la que la asparagina en la posición 39 o 49 está N-glicosilada.

- 20 En una realización preferida, las asparaginas en las posiciones 39 y 49 están N-glicosiladas.

- En una realización, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2.

- 25 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 32 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 31 a 52 de la SEQ ID NO:2.

- 30 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 30 a 52 de la SEQ ID NO:2.

- 35 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 29 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 28 a 52 de la SEQ ID NO:2.

- 40 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 27 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 26 a 52 de la SEQ ID NO:2.

- 45 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 25 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 24 a 52 de la SEQ ID NO:2.

- 50 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 23 a 52 de la SEQ ID NO:2.

- 55 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 22 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 21 a 52 de la SEQ ID NO:2.

- 60 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 20 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 19 a 52 de la SEQ ID NO:2.

- 65 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones

18 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 17 a 52 de la SEQ ID NO:2.

5 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 16 a 52 de la SEQ ID NO:2.

10 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 15 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 14 a 52 de la SEQ ID NO:2.

15 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 13 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 12 a 52 de la SEQ ID NO:2.

20 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 11 a 52 de la SEQ ID NO:2.

25 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 10 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 9 a 52 de la SEQ ID NO:2.

30 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 8 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 7 a 52 de la SEQ ID NO:2.

35 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 6 a 52 de la SEQ ID NO:2.

40 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 5 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 4 a 52 de la SEQ ID NO:2.

45 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 3 a 52 de la SEQ ID NO:2.

En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 2 a 52 de la SEQ ID NO:2.

50 En una realización particular, dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2. En una realización alternativa, dicho polipéptido no comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.

55 Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de un polipéptido PP para aumentar la semivida de un zimógeno, particularmente la semivida de un zimógeno de serín proteasa.

Proteínas de fusión derivadas del péptido de activación del factor X

Otro objeto de la invención se refiere a una proteína de fusión PF que comprende:

- 60
- un primer polipéptido que consiste en un polipéptido PP como se ha descrito anteriormente y
 - un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 7 a 16 de la SEQ ID NO:4.
- 65

Otro objeto de la invención se refiere a una proteína de fusión PF que comprende:

- un primer polipéptido que consiste en un polipéptido PP como se ha descrito anteriormente y
- un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 7 a 16 de la SEQ ID NO:4,

en la que

- la glicina correspondiente al resto en la posición 14 de la SEQ ID NO:4 está reemplazada por una valina, una fenilalanina o una alanina y/o
- la valina correspondiente al resto en la posición 15 de la SEQ ID NO:4 está reemplazada por una prolina.

En una realización preferida, la invención se refiere a dichas proteínas de fusión en las que la región carboxi-terminal del primer polipéptido se fusiona con la región amino-terminal del segundo polipéptido.

En una realización particular, dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 7 a 16 de la SEQ ID NO:4.

En otra realización particular, dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 6 a 16 de la SEQ ID NO:4.

En otra realización particular, dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 5 a 16 de la SEQ ID NO:4.

En otra realización particular, dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 4 a 16 de la SEQ ID NO:4.

En otra realización particular, dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 3 a 16 de la SEQ ID NO:4.

En otra realización particular, dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 2 a 16 de la SEQ ID NO:4.

En otra realización particular, dicho segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4.

Derivados quiméricos de la invención

Los polipéptidos y las proteínas de fusión de la invención tal como se ha descrito anteriormente se pueden fusionar con el zimógeno o forma activa de serín proteasa, o fragmento de la misma, para mejorar la semivida y la recuperación de dicho zimógeno de serín proteasa.

Los inventores han mostrado que el péptido de activación del factor X y más particularmente un fragmento del mismo que contiene los diecinueve últimos aminoácidos del mismo tiene un papel principal en la semivida larga del factor X y en la buena recuperación de la molécula inyectada. También mostraron que el péptido de activación del factor X o un fragmento del mismo que contiene los diecinueve últimos aminoácidos del mismo puede usarse para aumentar la semivida y la recuperación de otras proteínas, tales como las proteínas circulantes.

Por lo tanto, la invención se refiere a una proteína quimérica que contiene una proteína de interés y un polipéptido PP como se ha descrito anteriormente.

Dicha proteína de interés puede ser una enzima u otra proteína que tiene una semivida corta en la sangre. En particular, puede ser una proteína circulante, tal como una serín proteasa o una hormona proteica.

Generalmente, dicha proteína de interés puede ser proteína C, factor VII, factor VII activado, factor IX, insulina, eritropoyetina, ligando de glicoproteína de selectina P soluble... pero no es el factor X nativo.

Dicha proteína se puede usar en su forma zimógena o en su forma activada.

En una realización particular, la invención se refiere a dicha proteína en cuanto que el polipéptido PP se fusiona con la proteína de interés en el extremo carboxi-terminal, el extremo amino-terminal o en la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés.

En una realización particular, la invención se refiere a dicha proteína quimérica en cuanto a que el polipéptido PP se fusiona con la proteína de interés en el extremo carboxi-terminal, el extremo amino-terminal o en la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés.

En una realización particular, la invención se refiere a dicha proteína quimérica en cuanto a que el péptido de activación del zimógeno de interés se reemplaza por un polipéptido PP.

En otra realización particular, la invención se refiere a dicha proteína quimérica en cuanto a que dicho polipéptido PP se fusiona con la forma activada de la proteína de interés en el sitio de localización de su péptido de activación nativo.

En una realización particular, la invención se refiere a dicha proteína quimérica en cuanto a que el polipéptido PP consiste en la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2 en la que la asparagina en la posición 39 o 49 está N-glicosilada.

Generalmente, la invención se refiere a dicha proteína quimérica en la que dicho polipéptido PP comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2 en la que la asparagina en la posición 39 o 49 está N-glicosilada y tiene una longitud máxima de 19 aminoácidos, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos.

En una realización particular, la invención se refiere a dicha proteína quimérica en cuanto a que el polipéptido PP no consiste en el péptido activo nativo del factor X (SEQ ID NO:2).

En una realización particular, la invención se refiere a dicha proteína quimérica la cual no es una de las proteínas descritas en la solicitud de patente WO2006018204.

En una realización particular, la invención se refiere a una proteína quimérica que comprende la proteína C y un polipéptido PP, con la condición de que la secuencia de dicho péptido no consista en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.

En una realización más particular, la invención se refiere a una proteína quimérica que comprende la proteína C y un polipéptido PP en el que dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2 en la que la asparagina en la posición 39 o 49 está N-glicosilada.

En una realización particular, la invención se refiere a una proteína quimérica que comprende la proteína C en la que el péptido de activación de la proteína C se sustituye por un polipéptido PP, con la condición de que la secuencia de dicho péptido no consista en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 .

En una realización más particular, la invención se refiere a una proteína quimérica que comprende la proteína C en la que el péptido de activación de la proteína C se reemplaza por un polipéptido PP que consiste en la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2 en la que la asparagina en la posición 39 o 49 está N-glicosilada.

En una realización particular, la invención se refiere a una proteína quimérica que comprende la proteína C activada y un polipéptido PP, con la condición de que la secuencia de dicho péptido no consista en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.

En una realización más particular, la invención se refiere a una proteína quimérica que comprende la proteína C activada y un polipéptido PP que consiste en la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2 en la que la asparagina en la posición 39 o 49 está N-glicosilada.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2 en la que la asparagina en la posición 39 o 49 está N-glicosilada es la fusión en la parte N-terminal de la cadena pesada de la proteína C activada.

La presente invención se refiere a un derivado quimérico de un zimógeno de serín proteasa que comprende un polipéptido PP.

En particular, dichos derivados quiméricos del zimógeno serín proteasa son derivados quiméricos de la proteína C y del factor X. En particular, los derivados quiméricos escindibles por trombina descritos en la solicitud de patente WO03035861 o en Louvain-Quintard et al., 2005, se utilizan y se modifican.

Por lo tanto, la invención se refiere a un derivado quimérico del factor X escindible por trombina, en el que el péptido de activación nativo de dicha proteína se reemplaza por una proteína de fusión PF como se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con la invención, la invención también abarca las variantes conservadoras de la función de los derivados quiméricos escindibles por trombina del factor X de la invención.

En una realización particular, la invención se refiere además a un derivado quimérico del factor X escindible por

trombina en el que los aminoácidos correspondientes a los tres primeros restos de la cadena pesada del factor X nativo (Ile-Val-Gly, posiciones 235-237 de la SEQ ID NO:1) se pueden modificar de acuerdo con las modificaciones descritas en Toso R et al., 2008 y en las solicitudes de patente WO03035861 y WO04005347.

5 En particular, la invención se refiere a dicho derivado quimérico del factor X escindible por trombina en el que:

- la isoleucina correspondiente al resto en la posición 235 de la SEQ ID NO:1 puede reemplazarse por una alanina, una serina o una leucina;
- la valina correspondiente al resto en la posición 236 de la SEQ ID NO:1 puede reemplazarse por una fenilalanina o una alanina.

En otra realización particular, la invención se refiere además a un derivado quimérico del factor X escindible por trombina en el que los aminoácidos correspondientes a los tres últimos restos del fibrinopéptido A (Gly-Val Arg, las posiciones 14-16 de la SEQ ID NO:4) también puede modificarse de acuerdo con las modificaciones descritas en Gustafsson D et al., 2004 y la solicitud de patente WO04005347.

En particular, la invención se refiere a dicho derivado quimérico del factor X escindible por trombina en el que:

- la glicina correspondiente al resto en la posición 14 de la SEQ ID NO:4 puede reemplazarse por una valina, una fenilalanina o una alanina,
- la valina correspondiente al resto en la posición 15 de la SEQ ID NO:4 puede reemplazarse por una prolina.

De acuerdo con la invención, dichas modificaciones se usan para mejorar la escisión por trombina o la eficacia del derivado del factor X activado y no alteran la actividad de los derivados quiméricos escindibles por trombina de la invención.

De acuerdo con ello, la invención se refiere a un derivado quimérico del factor X escindible por trombina en el que el péptido de activación nativo de dicha proteína se reemplaza por una proteína de fusión que comprende:

- un polipéptido PP y
- un derivado del fibrinopéptido A escindible por trombina definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6.

En una realización, dicho derivado quimérico del factor X escindible por trombina se caracteriza por que dicho polipéptido es el péptido de activación del factor X nativo (SEQ ID NO:2).

En otra realización, dicho derivado quimérico del factor X escindible por trombina se caracteriza por que dicho derivado del fibrinopéptido A escindible por trombina se define por una secuencia de aminoácidos seleccionada por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12.

En una realización particular, la invención se refiere a dicho derivado quimérico del factor X escindible por trombina en el que:

- dicho polipéptido es el péptido de activación del factor X nativo (SEQ ID NO:2) y
- dicho derivado del fibrinopéptido A escindible por trombina se define por la secuencia de aminoácidos DFLAEGGGVRIVG (SEQ ID NO:7).

La invención se refiere también a un derivado quimérico de la proteína C escindible por trombina, en el que el péptido de activación nativo de dicha proteína se reemplaza por una proteína de fusión PF.

De acuerdo con la invención, la invención también abarca las variantes conservadoras de la función de derivados quiméricos de la proteína C escindibles por trombina de la invención.

En una realización particular, en dichos derivados quiméricos de la proteína C escindibles por trombina, los aminoácidos correspondientes a los tres primeros restos de la cadena pesada de proteína C nativa (Leu-Ile-Asp, posiciones 212-214 de la SEQ ID NO:3) se pueden modificar de acuerdo con las modificaciones descritas en la solicitud de patente WO03035861.

En particular, en el derivado quimérico de la proteína C escindible por trombina de la invención:

- la leucina correspondiente al resto en la posición 212 de la SEQ ID NO:3 puede reemplazarse por una alanina o una serina;
- la isoleucina correspondiente al resto en la posición 213 de la SEQ ID NO:3 puede reemplazarse por una fenilalanina;
- el aspartato correspondiente al resto en la posición 214 de la SEQ ID NO:3 puede reemplazarse por una glicina.

En otra realización particular, la invención se refiere además a un derivado quimérico de la proteína C escindible por trombina, en el que los aminoácidos correspondientes a los tres últimos restos del fibrinopéptido A (Gly-Val-Arg, posiciones 14-16 de la SEQ ID NO:4) también pueden modificarse de acuerdo con las modificaciones descritas en Gustafsson D et al., 2004 y la solicitud de patente WO04005347.

En particular, la invención se refiere a dicho derivado quimérico del factor X escindible por trombina en el que:

- la glicina correspondiente al resto en la posición 14 de la SEQ ID NO:4 puede reemplazarse por una valina, una fenilalanina o una alanina,
- la valina correspondiente al resto en la posición 15 de la SEQ ID NO:4 puede reemplazarse por una prolina.

De acuerdo con la invención, dichas modificaciones se usan para mejorar la escisión por trombina o la eficacia del derivado de la proteína C activado y no alteran la actividad de los derivados quiméricos escindibles por trombina de la invención.

La invención también se refiere a un derivado quimérico de la proteína C escindible por trombina, en el que el péptido de activación de dicha proteína nativa se reemplaza por una proteína de fusión que comprende:

- un polipéptido PP y
- un derivado de fibrinopéptido A escindible por trombina definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14.

En una realización, dicho polipéptido es el péptido de activación del factor X nativo (SEQ ID NO:2).

En otra realización, dicho derivado del fibrinopéptido A escindible por trombina se define por una secuencia de aminoácidos seleccionada por una secuencia de aminoácidos seleccionada para el grupo de la SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26.

En una realización particular, la invención se refiere a dicho derivado quimérico de la proteína C escindible por trombina, en el que:

- dicho polipéptido es el péptido de activación nativo del factor X (SEQ ID NO:2) y
- dicho derivado del fibrinopéptido A escindible por trombina se define por la secuencia de aminoácidos DFLAEGGGVRLID (SEQ ID NO:15).

Otro objeto de la invención se refiere a un derivado quimérico de la proteína C en el que un polipéptido PP se fusiona en la parte amino-terminal del péptido de activación de la proteína C nativa.

Otra divulgación de la invención se refiere a un derivado quimérico de un zimógeno de serín proteasa caracterizado por que contiene dicha serín proteasa activada o una variante conservadora de la función y un polipéptido PP.

En particular, la invención se refiere a un derivado quimérico escindible por trombina de una serín proteasa de interés, caracterizado por que contiene dicha serín proteasa activada o una variante conservadora de la función y una proteína de fusión PF.

En una realización particular, la invención se refiere a un derivado quimérico del factor X escindible por trombina que contiene el factor X activado o una variante conservadora de la función y una proteína de fusión PF.

En una realización preferida, la invención se refiere a un derivado quimérico del factor X escindible por trombina que contiene el factor X activado o una variante conservadora de la función del mismo y una proteína de fusión PF en la que la parte carboxi-terminal de la proteína de fusión PF se fusiona con la parte amino-terminal de la cadena pesada del factor X activado.

De acuerdo con la invención, algunos aminoácidos pueden ser sustituidos, suprimidos o añadidos para mejorar la actividad del derivado quimérico del factor X escindible por trombina de la invención. En particular, los aminoácidos correspondientes a los tres últimos aminoácidos del fibrinopéptido A (posiciones 14 a 16 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4) y los tres primeros aminoácidos de la cadena pesada del factor X activado (posiciones 235 a 237 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1) se pueden modificar como se ha detallado anteriormente.

En particular, la invención se refiere a dicho derivado quimérico del factor X escindible por trombina de la invención, en el que:

- la isoleucina correspondiente al resto en la posición 235 de la SEQ ID NO:1 puede reemplazarse por una alanina, una serina o una leucina;
- la valina correspondiente al resto en la posición 236 de la SEQ ID NO:1 puede reemplazarse por una fenilalanina

- o una alanina,
- la glicina correspondiente al resto en la posición 14 de la SEQ ID NO:4 puede reemplazarse por una valina, una fenilalanina o una alanina,
- la valina correspondiente al resto en la posición 15 de la SEQ ID NO:4 puede reemplazarse por una prolina.

5 De acuerdo con la invención, dichas modificaciones se usan para mejorar la escisión por trombina o la eficacia del derivado del factor X activado y no alteran la actividad de los derivados quiméricos escindibles por trombina de la invención.

10 En una realización particular, la invención se refiere a un derivado quimérico de la proteína C escindible por trombina que contiene la proteína C activada o una variante conservadora de la función de la misma y una proteína de fusión PF.

15 En una realización preferida, la invención se refiere a un derivado quimérico de la proteína C escindible por trombina que contiene la proteína C activada o una variante conservadora de la función de la misma y una proteína de fusión PF en la que la parte carboxi-terminal de la proteína de fusión PF se fusiona con la parte amino-terminal de la cadena pesada de la proteína C activada.

20 De acuerdo con la invención, algunos aminoácidos pueden ser sustituidos, suprimidos o añadidos para mejorar el derivado quimérico de la proteína C escindible por trombina de la invención. En particular, los aminoácidos correspondientes a los tres primeros aminoácidos de la cadena pesada de la proteína C activada (posiciones 212-214 de la SEQ ID NO:3) pueden modificarse como se ha detallado anteriormente.

En particular, en el derivado quimérico de la proteína C escindible por trombina de la invención:

- 25 - la leucina correspondiente al resto en la posición 212 de la SEQ ID NO:3 puede reemplazarse por una alanina o una serina;
- la isoleucina correspondiente al resto en la posición 213 de la SEQ ID NO:3 puede reemplazarse por una fenilalanina;
- 30 - el aspartato correspondiente al resto en la posición 214 de la SEQ ID NO:3 puede reemplazarse por una glicina;
- la glicina correspondiente al resto en la posición 14 de la SEQ ID NO:4 puede reemplazarse por una valina, una fenilalanina o una alanina;
- la valina correspondiente al resto en la posición 15 de la SEQ ID NO:4 puede reemplazarse por una prolina.

35 De acuerdo con la invención, dichas modificaciones se usan para mejorar la escisión por trombina o la eficacia del derivado de la proteína C activado y no alteran la actividad de los derivados quiméricos escindibles por trombina de la invención.

Ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras recombinantes

40 Otro objetivo de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptidos y derivados quiméricos de acuerdo con la invención.

45 En una realización, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un derivado quimérico del factor X escindible por trombina tal como se ha descrito anteriormente.

En otra realización, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un derivado quimérico de la proteína C, escindible por trombina, tal como se ha descrito anteriormente.

50 Una "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima. Es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia codificadora para una proteína puede incluir un codón de inicio (normalmente ATG) y un codón de parada.

55 Estas moléculas de ácido nucleico pueden obtenerse por métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia, en particular por mutagénesis dirigida al sitio del gen que codifica la proteína nativa.

60 Generalmente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede estar incluida en un vector adecuado, tal como un plásmido, un cósmido, un episoma, un cromosoma artificial, un fago o un vector viral.

65 Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención se refiere a un vector y un casete de expresión en el cual una molécula de ácido nucleico de la invención está asociada con elementos adecuados para controlar la transcripción (en particular promotor, potenciador y opcionalmente terminador) y opcionalmente la traducción y también los vectores recombinantes en los cuales se inserta una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Estos vectores recombinantes pueden ser, por ejemplo, vectores de clonación, o vectores de expresión.

Los términos “vector”, “vector de clonación” y “vector de expresión” significan el vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula hospedadora, con el fin de transformar el hospedador y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

Se puede usar cualquier vector de expresión para células animales, siempre y cuando pueda insertarse y expresarse un gen que codifica un polipéptido o derivado quimérico de la invención. Ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H et al. 1990) y similares.

Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como por ejemplo pUC, pcDNA, pBR y similares.

Otros ejemplos de vectores virales incluyen vectores adenovirales, retrovirales, herpesvirus y AAV. Tales virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como transfectando células empaquetadoras o por transfección transitoria con plásmidos auxiliares o virus. Ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv +, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectuosos de replicación pueden encontrarse, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

Ejemplos de promotores y potenciadores utilizados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor temprano y el potenciador de SV40 (Mizukami T. et al., 1987), promotor LTR y potenciador del virus de la leucemia de ratón Moloney (Kuwana Y et al., 1987), promotor Mason JO et al., 1985) y el potenciador (Gillies SD et al., 1983) de la cadena H de la inmunoglobulina y similares.

La invención también incluye sistemas de administración de genes que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención, que puede usarse en terapia génica in vivo o ex vivo. Esto incluye, por ejemplo, vectores de transferencia vírica tales como los derivados de retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus, los cuales se usan convencionalmente en terapia génica. Esto incluye también sistemas de administración de genes que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención y un vehículo de administración de genes no vírico. Ejemplos de vehículos de administración de genes no víricos incluyen liposomas y polímeros tales como polietileniminas, ciclodextrinas, polímeros de histidina/lisina (HK), etc.

Un objeto de la presente invención se refiere también a una célula hospedadora procariota o eucariota transformada genéticamente con al menos una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

El término “transformación” significa la introducción de una secuencia de gen, de ADN o de ARN “extraña” (es decir extrínseca o extracelular) a una célula hospedadora, de manera que la célula hospedadora expresará el gen o secuencia introducido para producir una sustancia deseada, generalmente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducidos. Una célula hospedadora que recibe y expresa el ADN o ARN introducido ha sido “transformada”.

Preferiblemente, para la expresión y producción de los polipéptidos y derivados quiméricos y en particular la proteína C y los derivados del factor X de acuerdo con la invención, se elegirán células eucariotas, en particular células de mamífero y más particularmente células humanas.

Generalmente, se podrían usar líneas celulares tales como CHO, BHK-21, COS-7, C127, PER.C6 o HEK293, por su capacidad para procesar las modificaciones post-traduccionales correctas de los derivados.

La presente invención también se refiere a animales transgénicos, en particular mamíferos no humanos transgénicos que alojan al menos un transgén que comprende un casete de expresión de la invención. Dichos animales transgénicos pueden usarse para producir proteínas quiméricas de la invención, como ya se ha descrito por ejemplo por Brink et al., 2000.

La construcción de vectores de expresión de acuerdo con la invención, la transformación de las células hospedadoras y la producción de animales transgénicos puede llevarse a cabo usando técnicas convencionales de biología molecular. Los derivados quiméricos de la invención, y en particular los derivados de la proteína C o del factor X, se pueden obtener, por ejemplo, cultivando células transformadas genéticamente de acuerdo con la invención y recuperando del cultivo el derivado expresado por dicha célula. Pueden entonces, si es necesario, purificarse por procedimientos convencionales, conocidos en sí mismos por los expertos en la materia, por ejemplo por precipitación fraccionada, en particular precipitación con sulfato de amonio, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc.

En particular, pueden usarse métodos convencionales para preparar y purificar proteínas recombinantes para producir las proteínas de acuerdo con la invención. Por ejemplo, para producir los derivados de la proteína C de

acuerdo con la invención, se pueden usar métodos tales como los descritos en la patente US 4 992 373 o en la patente US 4 981 952.

Métodos terapéuticos y usos

- 5 Un tercer objeto de la invención se refiere a un derivado quimérico de acuerdo con la invención para su uso en la prevención o tratamiento de trastornos relacionados con la proteína C y el factor X, en particular trastornos de la coagulación sanguínea.
- 10 En una realización, la invención se refiere a un derivado quimérico del factor X de la invención como un agente procoagulante.
- En una realización particular, la invención se refiere a un derivado quimérico del factor X para su uso en la prevención o tratamiento de patologías de la coagulación de tipo hemorrágico, en particular resultante de una
- 15 deficiencia de factor VIII, IX o XI.
- Estas patologías pueden ser en particular hemofilias A o B, que pueden o no complicarse por la presencia de inhibidores (aloanticuerpos neutralizantes dirigidos contra el factor VIII o IX convencionalmente utilizados para el tratamiento); también se pueden adquirir hemofilias resultantes de la aparición de autoanticuerpos asociados con
- 20 otra patología (enfermedad autoinmunitaria, cáncer, síndrome linfoproliferativo, trastorno idiopático, etc.).
- En una realización particular, la invención se refiere a un derivado quimérico del factor X para su uso en la prevención o tratamiento de hemofilias A o B.
- 25 En otra divulgación, la invención se refiere a un derivado quimérico del factor IX para su uso en la prevención o tratamiento de la hemofilia B.
- En otra realización, la invención se refiere a un derivado quimérico del factor X para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades fibroproliferativas tales como remodelación de tejido de fibrosis y cáncer.
- 30 La invención se refiere a un derivado quimérico del factor X de la invención para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de hemorragias inducidas por las heparinas de bajo peso molecular (LMWH) o por un anticoagulante dirigido al factor Xa (fXa).
- 35 Los anticoagulantes dirigidos al factor Xa son bien conocidos (véase para revisiones Harenberg, 2008, Bauer, 2008, Khoo et al., 2009). Ejemplos de anticoagulantes dirigidos al factor Xa son rivaroxaban y betrixaban.
- En una realización preferida, la serina de dicho derivado quimérico del factor X correspondiente al resto en la posición 419 de la SEQ ID NO:1 se reemplaza por una alanina.
- 40 En otra realización, la arginina, la lisina y la serina de dicho derivado quimérico del factor X correspondientes respectivamente a los restos en las posiciones 387, 391 y 419 de la SEQ ID NO:1 están reemplazados por una alanina.
- 45 Estos derivados quiméricos del factor X de la invención han sido modificados de manera que se unen, directa o indirectamente, a un inhibidor del factor Xa.
- Estructuralmente, estos derivados se modifican para proporcionar o bien actividad no procoagulante o actividad procoagulante reducida y no se ensamblan en el complejo de protrombinasa para esta última realización.
- 50 En otra realización, la invención se refiere a un derivado quimérico de la proteína C como un agente antitrombótico, anti-inflamatorio, anti-neurodegeneración y anti-apoptótico.
- En una realización particular, la invención se refiere a un derivado quimérico de la proteína C para su uso en la prevención o tratamiento de patologías que implican hipercoagulación.
- 55 Tales patologías incluyen, aunque sin limitación, trombosis venosa o arterial, en particular trombosis que afectan a los vasos de gran calibre, infarto de miocardio, enfermedad trombótica, embolismo pulmonar, reoclusión coronaria después de una angioplastia o una trombólisis, accidente cerebrovascular y también anomalías de la coagulación en
- 60 pacientes que sufren anomalías genéticas que afectan al gen de la PC o de la trombomodulina.
- En una realización particular, la invención se refiere a un derivado quimérico de la proteína C para su uso en la prevención o tratamiento de las hemofilias A o B.
- 65 En otra realización, la invención se refiere a un derivado quimérico de la proteína C para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades respiratorias e inflamatorias.

Preferiblemente, dicho derivado quimérico se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del derivado quimérico de la invención para tratar o prevenir los trastornos relacionados con la proteína C y con el factor X en una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico asistente dentro del alcance de un juicio médico acertado. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado y factores similares bien conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, está dentro de la técnica iniciar dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y para aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variarse en una amplia gama de 0,01 a 1.000 mg por adulto y por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente a tratar. Un medicamento contiene generalmente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del principio activo. Normalmente se suministra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

Composiciones farmacéuticas

Otro objeto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden derivados quiméricos de la invención para la prevención o tratamiento de trastornos relacionados con la proteína C y el factor X, en particular trastornos de la coagulación sanguínea.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de relleno, diluyente, material encapsulante o agente auxiliar de la formulación, no tóxico, sólido, semisólido o líquido, de cualquier tipo.

En una realización, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado quimérico del factor X para el tratamiento de patologías de la coagulación de tipo hemorrágico, fibroproliferativo como se ha detallado anteriormente.

En otra realización, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado quimérico de la proteína C para la prevención o el tratamiento de patologías que implican hipercoagulación, enfermedades inflamatorias o respiratorias, como se ha detallado anteriormente.

Los derivados quiméricos del zimógeno de serín proteasa se pueden combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, como mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublinguales y bucales, aerosoles, implantes, subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que después de la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Las formas farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones

de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las soluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Los derivados quiméricos del zimógeno de serín proteasa de la invención pueden formularse en una composición en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y las cuales están formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como los ácidos acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo puede ser también un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diferentes otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada previamente esterilizada del mismo.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación del fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe ser adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido se hace primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, se puede disolver una dosis en 1 ml de solución de NaCl isotónica y se añade a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o se inyecta en el sitio de infusión propuesto. Cierta variación en la dosificación necesariamente ocurrirá dependiendo de la condición del sujeto que se esté tratando. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para cada sujeto.

Los derivados quiméricos del zimógeno de serín proteasa de la invención se pueden formular dentro de una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente de 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente de 0,001 a 0,1 miligramos o aproximadamente de 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis aproximadamente. También se pueden administrar dosis múltiples.

Además de los compuestos de la invención formulados para administración parenteral, tales como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ej., comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación en el tiempo y cualquier otra forma actualmente utilizada.

Descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática de diferentes partes de la secuencia de aminoácidos del zimógeno del factor X.

El pre-péptido (o péptido señal) se define por la secuencia de aminoácidos entre las posiciones -40 a -18 y el

pro-péptido por la secuencia de aminoácidos entre las posiciones -17 a -1. La cadena ligera corresponde a la secuencia entre las posiciones de aminoácidos 1 a 142 y la cadena pesada entre las posiciones de aminoácidos 195 a 448. El péptido de activación (posiciones 143 a 194) está encajonado y los sitios de N-glicosilación de interés están marcados con un *. El sistema de numeración utilizado aparece en la misma línea que la secuencia y el otro sistema de referencia aparece en gris en la línea debajo de la secuencia.

Figura 2: Representación esquemática de derivados del fibrinopéptido A escindibles por trombina para derivados del factor X escindibles por trombina.

A. Dichos derivados del fibrinopéptido A escindibles por trombina contienen la secuencia de aminoácidos del fibrinopéptido A, en la que los aminoácidos en las posiciones 14 o 15 pueden modificarse de acuerdo con la figura. En la parte carboxi-terminal, se añaden 3 aminoácidos más para formar un sitio escindible por trombina de 6 aminoácidos con los 3 últimos aminoácidos del fibrinopéptido A (o derivado).

B. En un modo preferido de la invención, solo se utilizan los 10 últimos aminoácidos del fibrinopéptido A y se fusionan con un péptido de 3 aminoácidos para formar un sitio escindible por trombina.

Figura 3: Representación esquemática de derivados del fibrinopéptido A escindibles por trombina para derivados de la proteína C escindibles por trombina.

A. Dichos derivados del fibrinopéptido A escindibles por trombina contienen la secuencia de aminoácidos del fibrinopéptido A y se añaden 3 aminoácidos en la parte carboxi terminal para formar un sitio escindible por trombina de 6 aminoácidos con los 3 últimos aminoácidos del fibrinopéptido A (o derivado).

B. En un modo preferido de la invención, solo se utilizan los 10 últimos aminoácidos del fibrinopéptido A y se fusionan con un péptido de 3 aminoácidos para formar un sitio escindible por trombina.

Figura 4: Representación esquemática de construcciones variantes del FX.

Existen siete proteínas Factor X (FX) recombinantes. Los dominios proteicos son los siguientes: en gris la cadena ligera, en blanco el péptido de activación (AP) y en negro el dominio catalítico del Factor X. El péptido de activación es el sitio de diferencias entre las diferentes variantes. *FpA* corresponde al derivado del fibrinopéptido A escindible por trombina definido por la SEQ ID NO:7, *ap* a los restos 176-194 del extremo carboxi terminal del péptido de activación del FX y las líneas negras indican el sitio de las mutaciones N181A y N191A en el péptido de activación del FX.

Figura 5: Representación esquemática de las construcciones variantes de la proteína C.

Existen tres proteínas C recombinantes. Los dominios proteicos son los siguientes: en gris la cadena ligera, en blanco el péptido de activación (AP) y en negro el dominio catalítico de la proteína C. *FpA* corresponde al derivado del fibrinopéptido A escindible por trombina definido por la SEQ ID NO:7, *PP* a los restos 176-194 del extremo carboxi-terminal del péptido de activación del FX.

Figura 6: Eliminación bifásica del wt-FX del plasma.

Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con wt-FX purificado (10 µg/ratón). En los momentos indicados, se tomaron muestras de sangre. La cantidad de antígeno wt-FX residual en plasma se cuantificó en un ELISA (véase "Procedimiento Experimental"). Se representa gráficamente el porcentaje de antígeno residual en el plasma con relación a la cantidad presente 2 min después de la inyección frente al tiempo después de la inyección. Los parámetros farmacocinéticos derivados de estos datos se resumen en la Tabla I. Los datos representan los valores medios ± D.E. de 3 ratones para cada punto temporal.

Figura 7: Eliminación monofásica de FX/delAP-FpA del plasma.

Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con FX/delAP-FpA purificado (10 µg/ratón). En los momentos indicados, se tomaron muestras de sangre. La cantidad de antígeno FX/delAP-FpA residual en el plasma se cuantificó en un ELISA (véase "Procedimiento Experimental"). Se representa gráficamente el porcentaje de antígeno residual en el plasma con relación a la cantidad presente 2 min después de la inyección frente al tiempo después de la inyección. Los parámetros farmacocinéticos derivados de estos datos se resumen en la Tabla I. Los datos representan los valores medios ± D.E. de 3 ratones para cada punto temporal.

Figura 8: Eliminación bifásica de FX/AP-FpA del plasma.

Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con FX/AP-FpA purificado (10 µg/ratón). En los momentos indicados, se tomaron muestras de sangre. La cantidad de antígeno FX/AP-FpA residual en plasma se cuantificó en un ELISA (véase "Procedimiento Experimental"). Se representa gráficamente el porcentaje de antígeno residual en el plasma con relación a la cantidad presente 2 min después de la inyección frente al tiempo después de la inyección. Los parámetros farmacocinéticos derivados de estos datos se resumen en la Tabla I. Los datos representan los valores medios ± D.E. de 3 ratones para cada punto temporal.

Figura 9: Eliminación bifásica de FX/AP176-194 del plasma.

Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con **FX/AP176-194** purificado (10 µg/ratón). En los momentos indicados, se tomaron muestras de sangre. La cantidad de antígeno **FX/AP176-194** residual en plasma se cuantificó en un ELISA (véase "Procedimiento Experimental"). Se representa gráficamente el porcentaje de antígeno residual en el plasma con relación a la cantidad presente 2 min después de la inyección frente al tiempo después de la inyección. Los parámetros farmacocinéticos derivados de estos datos se resumen en la Tabla I. Los datos representan los valores medios ± D.E. de 3 ratones para cada punto temporal.

Figura 10: Liberación monofásica de FX/AP176-194-N181A-N191A del plasma.

Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con FX/AP176-194-N181A-N191A purificado (10 µg/ratón). En los momentos indicados, se tomaron muestras de sangre. La cantidad de antígeno FX/AP176-194-N181A-N191A residual en plasma se cuantificó en un ELISA (véase "Procedimiento Experimental"). Se representa gráficamente

el porcentaje de antígeno residual en el plasma con relación a la cantidad presente 2 min después de la inyección frente al tiempo después de la inyección. Los parámetros farmacocinéticos derivados de estos datos se resumen en la Tabla I. Los datos representan los valores medios $\pm$ D.E. de 3 ratones para cada punto temporal.

Figura 11: Eliminación bifásica de FX/AP176-194-N181A del plasma.

Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con FX/AP176-194-N181A purificado (10 μ g/ratón). En los momentos indicados, se tomaron muestras de sangre. La cantidad de antígeno FX/AP176-194-N181A residual en el plasma se cuantificó en un ELISA (véase "Procedimiento Experimental"). Se representa gráficamente el porcentaje de antígeno residual en el plasma con relación a la cantidad presente 2 min después de la inyección frente al tiempo después de la inyección. Los parámetros farmacocinéticos derivados de estos datos se resumen en la Tabla I. Los datos representan los valores medios $\pm$ D.E. de 3 ratones para cada punto temporal.

Figura 12: Eliminación monofásica de FX/AP176-194-N191A del plasma.

Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con FX/AP176-194-N191A purificado (10 μ g/ratón). En los momentos indicados, se tomaron muestras de sangre. La cantidad de antígeno FX/AP176-194-N191A residual en el plasma se cuantificó en un ELISA (véase "Procedimiento Experimental"). Se representa gráficamente el porcentaje de antígeno residual en el plasma con relación a la cantidad presente 2 min después de la inyección frente al tiempo después de la inyección. Los parámetros farmacocinéticos derivados de estos datos se resumen en la Tabla I. Los datos representan los valores medios $\pm$ D.E. de 3 ratones para cada punto temporal.

EJEMPLO

Material y Métodos

Material

Los riñones de hámster bebé (BHK) eran de ATCC (Rockville, EE.UU.). El suero de ternera fetal (FCS) y la seroalbúmina bovina (libre de proteasa BSA) se adquirieron en PAA Laboratories (Les Mureaux, Francia). El medio Eagle/F12 modificado por Dulbecco, penicilina/estreptomicina, fungizona (anfotericina B desoxicolato) se obtuvo de Invitrogen (Cergy Pontoise, Francia). La benzamidina y el fluoruro de fenilsulfonilo (PMSF) procedían de Calbiochem (Meudon, Francia). El metotrexato, la vitamina K1, el polietilenglicol 8000 (PEG) se adquirieron en Sigma (Saint Quentin Fallavier, Francia). El N-benciloxycarbonil-D-arginil-L-arginina-p-nitroanilida dihidrocloruro (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-p-NA) denominado S-2765 era de Chromogenix (Mölnal, Suecia). La L-alfa-fosfatidil-L-serina (de cerebro bovino) y la L-alfa-fosfatidilcolina (de yema de huevo) procedían de Avanti Polarlipids (Albaster, EE.UU.). Se obtuvieron columnas QAE Sephadex A-50, HiTrapTM Q, Heparin HiTrap de GE Healthcare (Orsay, Francia). La matriz de afinidad anti-proteína C se adquirió en Roche Diagnostics (Meylan, Francia).

Construcción de derivados del FX recombinantes

El plásmido de expresión en mamíferos pKG5 que contiene ADNc del factor X humano (Christophe, et al., 2001), el plásmido que contiene ADNc de insulina humana y el plásmido que contiene ADNc de proteína C humana se usaron como plantillas para la mutagénesis de PCR estándar para generar ADNc que codifica respectivamente el factor X humano de longitud completa, la insulina humana de longitud completa y la proteína C humana de longitud completa con una etiqueta HPC-4 el extremo C terminal (restos EDQVDPRLIDGK, SEQ ID NO:27). Los ADNc de longitud completa mutados clonados en el vector de expresión pNUT se verificaron por análisis de la secuencia de ADN utilizando el ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystems Applera, Courtaboeuf, Francia) en un secuenciador de ADN ABI PRISM 310 de acuerdo con Las especificaciones del fabricante. La construcción del FX se usó como molde para la mutagénesis estándar de PCR (véase la tabla de cebadores I) para generar ADNc que codifican variantes del factor X con delecciones parciales y mutaciones específicas en el péptido de activación denominado FX/AP176-194, FX/delPA-FpA, FX/AP-FpA, FX/AP176-194-N181A, FX/AP176-194-N191A y FX/AP176-194-N181A-N191A (Fig. 4). La construcción de insulina se usó como molde para la mutagénesis estándar de PCR para generar ADNc que codifica una variante de insulina que contiene un polipéptido PP que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2 (péptido de activación de factor X). De manera similar, la construcción de la proteína C se usó como molde para generar ADNc que codifican variantes de la proteína C (Fig. 5). Las construcciones clonadas en el vector de expresión pNUT se secuenciaron por completo.

Tabla I: Cebadores utilizados para generar las diferentes variantes del factor X

Cebadores mutados	Secuencias (sentido 5' $\rightarrow$ 3')
FX/AP ¹⁷⁶⁻¹⁹⁴ sentido	CTGGAACGCCGGAAGAGGGACCTGCTTGACTTCAACCAGACGCAG (SEQ ID NO:28)
FX/AP ¹⁷⁶⁻¹⁹⁴ antisentido	GTTGAAGTCCAGCAGGTCCCTCTCCGACGTTCCAGTGTCTGTTT (SEQ ID NO:29)
FX/delAP-FpA sentido	GACTTTCTAGCTGAAGGAGGAGGCGTGCATCGTGGGAGGCCAGGAATGC (SEQ ID NO:30)

FX/delAP-FpA anisentido	CCTCCTCCTTCTGCTAGAAAGTCTCTCTTTCTGCGTTCCAGGGTCTGTTT (SEQ ID NO:31)
FX/AP-FpA sentido	GACTTTCTAGCTGAAGGAGGAGGCGTGCGTATCGTGGGAGGCCAGGAATGC (SEQ ID NO:30)
FX/AP-FpA anisentido	CCTCCTCCTTCTGCTAGAAAGTCCCTGGTCAGGTTGTTGTCTG (SEQ ID NO:32)
FX/AP ^{176-194-N181A} sentido	CTTGACTTCGCCCAGACGCAGCCT (SEQ ID NO:33)
FX/AP ^{176-194-N181A} anisentido	AGGCTGCGTCTGGGGGAAGTCAAG (SEQ ID NO:34)
FX/AP ^{176-194-N191A} sentido	GGCGACAATGCTCTCACCAGGATCGT (SEQ ID NO:35)
FX/AP ^{176-194-N191A} anisentido	GATCCTGGTGAGAGCATTGTCGCCCT (SEQ ID NO:36)

Obtención de líneas celulares que expresan los derivados recombinantes

- Las construcciones de pNUT se transfectaron en células de riñón de hámster bebé (BHK) usando el reactivo jetPEI (Qbiogen, Ozyme, Francia) según lo especificado por el proveedor. Después de la selección de células transfectadas con medio que contenía metotrexato (Sigma) a una concentración de 100 μ M, se escogieron clones individuales y se propagaron en medio selectivo para obtener líneas celulares estables. La producción de antígeno del factor X se ensayó mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) utilizando anticuerpos policlonales contra el factor X conjugado y no con peroxidasa de rábano picante obtenido de Dako (Dakopatts, Glostrup, Dinamarca). Se utilizó como referencia el factor X derivado del plasma humano purificado (pd-FX) de Kordia (Leiden, Holanda). La producción de insulina se ensayó mediante el kit ELISA de insulina humana de Dako. La producción de proteína C se ensayó mediante un ELISA de dos sitios con anticuerpo monoclonal de ratón purificado de afinidad para el revestimiento (Roche, Meylan, Francia) y anticuerpos policlonales contra la proteína conjugada con peroxidasa de rábano picante obtenida de Dako. Se seleccionaron líneas celulares productoras de factor X, insulina y proteína C.

Producción y purificación de derivados del factor X, la insulina y la proteína C recombinantes

- Las líneas celulares estables que producen derivados del factor X, la insulina y la proteína C recombinantes, así como el factor X, la insulina y la proteína C de tipo silvestre se mantuvieron en matraces de 300 cm² para la producción de proteínas en DMEM/F-12 suplementado con FCS al 10 %, metotrexato 50 μ M, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 μ g/ml y 5 μ g/ml de vitamina K1 (no para insulina). La proteína de interés contenida en el medio se cosechaba cada 48 horas. Se añadieron benzamidina y PMSF a una concentración final de 10 y 2 mM, respectivamente, y el medio se centrifugó (6.000 g), se pasó sobre membranas de acetato de celulosa (0,45 μ m) para eliminar los restos celulares y se almacenó a -20 °C hasta su uso. El medio acondicionado se descongeló a 37 °C. Se añadió EDTA a una concentración final de 5 mM. El medio se diluyó en agua destilada y en Tris (pH 7,4), para llevar la concentración final de Tris y NaCl a 25 y 60 mM, respectivamente. La mezcla se agitó luego a temperatura ambiente durante 30 minutos con perlas de QAE Sephadex A-50 para alcanzar una concentración final de 0,25 % (peso/volumen). Las perlas se lavaron antes de la elución con Tris 50 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM y benzamidina 10 mM. Las proteínas recombinantes contenidas en las fracciones eluidas (ELISA) se dializaron inmediatamente contra Tris 25 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM, que contenía benzamidina 10 mM, y se almacenaron a -20 °C antes de su uso. Las proteínas concentradas se descongelaron a 37 °C. Se añadió calcio a una concentración final de 5 mM. La purificación de las proteínas recombinantes se realizó por cromatografía de afinidad utilizando HPC-4-agarosa (Roche, Meylan, Francia) según las instrucciones del proveedor. Una hora antes de su uso como zimógeno, los derivados del factor X se incubaron con PMSF 1 mM para neutralizar cualquier traza de factor X activado que pudiera haber sido generado durante la producción o purificación de la proteína recombinante. Se aplicó el mismo tratamiento a los derivados de la proteína C. Los experimentos de control indicaron que después de 30 minutos en tampón Tris-HCl, el PMSF estaba completamente hidrolizado y no interferiría con otras reacciones. La pureza de la proteína se evaluó usando un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 10 % de las proteínas recombinantes en condiciones reductoras (ditiotritol 100 mM, concentración final) y condiciones no reductoras seguido de tinción con azul de Coomassie R-250. La identificación del factor X, la insulina y la proteína C se llevó a cabo después de que las proteínas recombinantes purificadas se redujeron y se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10 %. Las proteínas resueltas se transfirieron a una membrana Immobilon y se transfirieron utilizando anticuerpos policlonales contra el factor X, la insulina y la proteína C conjugados con peroxidasa de rábano picante (Dakopatts, Glostrup, Dinamarca). Los derivados purificados se dividieron en partes alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. La concentración de la alícuota se estima por su absorbancia a 280 nm, tomando 1,16, 1,05 y 1,45 como el coeficiente de extinción (E280 nm 0,1 %) del factor X, la insulina y la proteína C.

Ratones

Se usaron ratones macho de tipo silvestre en un fondo C57BL/6 (Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia) a lo largo de este estudio y tenían entre 8 y 9 semanas de edad. El alojamiento y los experimentos se realizaron según lo recomendado por la reglamentación francesa y las directrices sobre experimentación de la Comunidad Europea. Se usaron 24 ratones para cada análisis de eliminación.

Eliminación, recuperación y biodistribución de derivados del factor X en ratones

Los ratones no anestesiados se colocaron en un dispositivo de restricción y su cola se sumergió en un baño de agua a 40 °C durante 3 min. A continuación, se inyectaron 200 µl de derivados del factor X diluido a 50 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en la vena caudal del ratón. En diferentes momentos (2, 6, 10 y 30 min y 1, 2, 4 y 8 h después de la inyección) los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/kg, Ceva Santé Animale, Libourne, Francia) y se recogió sangre del plexo venoso retro-orbital en tubos de plástico que contenían citrato trisódico (9 volúmenes de sangre a 1 volumen de citrato trisódico 0,138 M). Se usaron tres ratones para cada punto temporal y cada ratón se sangró solo una vez. Para obtener plasma pobre en plaquetas, las muestras de sangre se centrifugaron a 1000 g durante 20 minutos a temperatura ambiente. La concentración de los derivados del factor X en el plasma se midió con un ensayo inmunoabsorbente utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón llamado HPC-4 (Roche) recubierto con tampón carbonato (pH 9,6) y un anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano picante anti-factor X humano (Dako). Se utilizó como referencia el factor X de tipo silvestre purificado y cuantificado recombinante etiquetado con HPC4 (véase más arriba). Los resultados se expresaron como porcentaje de factor X recombinante humano inyectado. Para los experimentos de biodistribución y la determinación de la recuperación, las variantes FX recombinantes altamente purificadas se marcaron con Na¹²⁵I (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, Francia) usando Iodo Gen (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, EE.UU.) como se describe (Fracker y Speck, BBRC 1978). Las radioactividades específicas variaron de 2 a 10 x 10⁴ cpm/µg de variantes del FX. El yodo libre en las preparaciones finales fue inferior al 5 % determinado por precipitación con ácido tricloroacético al 20 %. La recuperación representa el porcentaje de FX presente en el plasma 5 min después de la inyección en relación con la cantidad inyectada.

Eliminación de la proteína C y las variantes de la insulina en ratones

Para cada variante de la proteína C y la insulina, se usan 24 ratones WT machos de 8 semanas de edad. Se inyectan en la vena caudal 10 µg de proteína recombinante purificada diluida en PBS por ratón. En diferentes puntos temporales después de la inyección, los ratones se anestesian con tribromoetanol (60 mg/kg de peso corporal) y la sangre se recoge mediante extracción venosa retro-orbital en hirudina (Diagnostica Stago, Asnieres, Francia) (100 UI, concentración final). Se usan tres ratones por punto temporal y cada ratón se sangra solo una vez. Se prepara plasma y se analiza la concentración residual de antígeno inyectado por ELISA o por la actividad residual.

Análisis de los datos

Las curvas de eliminación se refieren a la cantidad de antígeno residual de los derivados del factor X, la proteína C y la insulina en plasma de ratón en relación con la cantidad inyectada (% de la concentración inyectada) en función del tiempo. Los datos se ajustaron a

- una ecuación monoexponencial:

$$C_p = A e^{-\alpha t} \quad \text{ecuación 1}$$

- o una ecuación biexponencial:

$$C_p = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t} \quad \text{ecuación 2}$$

Los parámetros A, α, B y β se determinaron utilizando el software KaleidaGraph (KaleidaGraph versión 4.02 para Mac OS X, Synergy Software, Reading, EE.UU.). C_p se refiere a la cantidad de derivado del factor X residual en plasma con relación a la cantidad inyectada. Estos parámetros son necesarios para calcular el tiempo medio de residencia (MRT).

- en un proceso de eliminación bifásico:

$$MRT = (A/\alpha^2 + B/\beta^2) / (A/\alpha + B/\beta) \quad \text{ecuación 3}$$

- en un mecanismo de eliminación monofásica:

$$MRT = (A/\alpha^2) / (A/\alpha) \quad \text{ecuación 4}$$

Además, se utilizaron α y β para calcular las semividas de la fase inicial y final, respectivamente, empleando $T_{1/2\alpha} = \ln 2/\alpha$, et $T_{1/2\beta} = \ln 2/\beta$.

Ensayo de generación de trombina

La generación de trombina se midió de acuerdo con el método descrito por Hemker et al (Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, y col. Pathophysiol Haemost Thromb 2003; 33: 4-15), en un fluorómetro Fluoroscant Ascent (Thermolabsystems OY, Helsinki, Finlandia) equipado con un dispensador. En pocas palabras, se distribuyeron 80 μ l de plasma suplementado con solución salina (control) o con una concentración indicada de anticoagulante fondaparinux (Arixtra®, GlaxoSmithKline, Brentford, Reino Unido) y varias concentraciones de derivados del factor X recombinantes en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo. Veinte μ l de una mezcla que contenía FT (factor de tejido humano lipídado recombinante, Innovin®, obtenido de Dade Behring) y vesículas de fosfolípidos (FL) se añadió a la muestra de plasma para obtener una concentración final de 1 pM de FT y 4 μ M de vesículas de FL. Las vesículas de FL preparadas a partir de L- α -fosfatidil-L-serina (PS) y L- α -fosfatidilcolina (PC) (Avanti Polarlipids, Alabaster, Alabama, EE.UU.) y de 100 nm de diámetro nominal (PC: PS, 3:1) se sintetizaron por el método de extrusión de membrana (Olson, F., Hunt, C.A., Szoka, F.C., Vail, W.J., y Papahadjopoulos, D. (1979) Biochim Biophys Acta 557(1), 9-23). La concentración de fosfolípidos se determinó por análisis de fosfato. Finalmente, se desencadenó la generación de trombina añadiendo 20 μ l de reactivo de partida que contenía sustrato fluorogénico y CaCl_2 . El sustrato fluorogénico I-1140 (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) era de Bachem AG (Bubendorf, Suiza). La cinética de la generación de trombina en plasma de coagulación se monitorizó durante 60 minutos a 37 °C usando un trombograma automatizado calibrado y se analizó utilizando el software Thrombinoscope™ (Thrombinoscope B.V., Maastricht, Holanda). Se necesitaron tres pocillos para cada experimento, dos pocillos para medir la generación de trombina de una muestra de plasma y un pocillo para la calibración. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se dio el valor medio. Se determinó el potencial de trombina endógena (ETP), es decir, el área bajo la curva, la trombina máxima y el tiempo de retardo para la detección de trombina.

Resultados

Eliminación bifásica del factor X recombinante de tipo silvestre

Para investigar la eliminación del factor X del plasma, se inyectaron ratones por vía intravenosa con factor X recombinante de tipo silvestre. En los puntos temporales indicados después de la inyección, se sangraron los ratones y se analizó el plasma para el antígeno del factor X. La representación gráfica de los valores del antígeno en función del tiempo después de la inyección reveló que el factor X de tipo silvestre se eliminaba de la sangre según una eliminación bifásica caracterizada por unas semividas lentas de 43 y 305 min, respectivamente (Fig. 6). Además, se calculó que el TMR era de 380 minutos (Tabla II).

Tabla II: Parámetros farmacocinéticos que describen la eliminación y la recuperación del wt-factor X y sus variantes del plasma. N.A. = no aplicable. N.D. = no determinado.

	Recuperación	TMR	$T_{1/2\alpha}$	$T_{1/2\beta}$
wt-FX	69 %	380 min	43 min	304 min
FX/delAP-FpA	N.D.	58 min	40 min	N.A.
FX/AP-FpA	N.D.	345 min	38 min	266 min
FX/AP ¹⁷⁶⁻¹⁹⁴	67 %	330 min	44 min	255 min
FX/AP ^{176-194-N181A-N191A}	29 %	69 min	48 min	N.A.
FX/AP ^{176-194-N181A}	61 %	191 min	15 min	140 min
FX/AP ^{176-194-N191A}	76 %	140 min	96 min	N.A.

Eliminación monofásica de FX/delAP-FpA recombinante

Para determinar el papel del péptido de activación en la cinética de eliminación del factor X, se diseñó, produjo y purificó una variante del factor X que carecía de su péptido de activación. Esta variante llamada FX/delAP-FpA no tiene ningún péptido de activación del factor X y en su lugar tiene 10 restos correspondientes al extremo carboxi-terminal del fibrinopéptido A. La secuencia de los restos de fibrinopéptido A es diferente de los restos correspondientes presentes en el péptido de activación de FX. Al contrario de lo que sucede con el factor X de tipo silvestre, después de la inyección a los ratones de FX/delAP-FpA, estos mostraron un patrón monofásico de eliminación con una semivida aparente de 40 minutos (Fig. 7). Además, el TMR se redujo 6 veces para la molécula troncada en comparación con el factor X de tipo silvestre (Tabla II). En conclusión, estos datos sugieren que el péptido de activación del factor X tiene un papel crucial en la tasa de eliminación del factor X en el plasma.

Eliminación bifásica del FX/AP-FpA recombinante

Para comprobar que el efecto observado sobre el patrón de eliminación y los parámetros farmacocinéticos de FX/delAP-FpA no se debían a la presencia de los restos de fibrinopéptido A sino a la delección del péptido de activación del factor X, FX/AP-FpA fue diseñado, producido, purificado y caracterizado. Esta variante del factor X

contiene los 52 restos del péptido de activación del factor X unidos en su extremo carboxi terminal a 10 restos del fibrinopéptido A. La variante purificada se administró a ratones por inyección en la vena caudal. Se observó un patrón de eliminación similar al del factor X de tipo silvestre (Fig. 8). Como se resume en la Tabla II, se obtuvieron parámetros farmacocinéticos similares para esta variante y para el wt-FX. Por tanto, la velocidad rápida de eliminación de FX/delAP-FpA previamente observada (véase más arriba) era independiente de la presencia de la secuencia FIX pero se debía a la ausencia de los 52 restos del péptido de activación del FX.

Eliminación bifásica del FX/AP176-194 recombinante

Se tenía interés en identificar los restos del péptido de activación que contribuyen a la eliminación del factor X. Para ello, se construyó una variante del factor X denominada FX/AP176-194 con solo 19 restos del extremo carboxi-terminal del péptido de activación del factor X. La variante purificada se administró a ratones por inyección en la vena caudal. Los ratones se sangraron en diferentes puntos temporales y se analizó el plasma para detectar el antígeno del factor X. Estos experimentos revelaron que FX/AP176-194 se eliminaba del plasma de una manera similar al factor X de tipo silvestre (Fig. 9). De hecho, se pudieron calcular parámetros farmacocinéticos similares a partir de los datos experimentales (Tabla II). Estos datos demuestran que los restos dentro del extremo carboxi terminal del péptido de activación del factor X desempeñan un papel crucial en la velocidad de eliminación del factor X.

Implicación de la N-glicosilación en el péptido de activación en la eliminación del FX de la circulación.

Dado que el extremo carboxi-terminal del factor X contiene dos sitios de N-glicosilación (Asn 181 y 191), se estudió el posible papel de estas modificaciones postraduccionales sobre la vida circulatoria del factor X usando FX/AP176-194 mutado en uno o en ambos sitios de N-glicosilación. Se produjeron dos variantes, una de mutación única y una doble mutada, llamadas FX/AP176-194-N181A, FX/AP176-194-N191A y FX/AP176-194-N181A-N191A, se purificaron y se estudió su eliminación. El mutante doble FX/AP176-194-N181A-N191A se eliminó de la circulación más rápidamente que el factor X de tipo silvestre y, curiosamente, con un patrón de eliminación similar a FX/delAP-FpA, la variante del factor X sin péptido de activación del factor X (Fig. 10). Como se indica en la Tabla II, se obtuvieron parámetros farmacocinéticos similares para FX/AP176-194-N181A-N191A y FX/delAP-FpA. Estos datos demuestran que las N-glicosilaciones en las posiciones 181 y 191 en el péptido de activación juegan un papel crucial en la supervivencia del factor X. Para la variante FX/AP176-194-N181A, se observó una eliminación bifásica (Figura 11) como para el factor X de tipo silvestre. Sin embargo, su eliminación de la circulación fue más rápida que para wt-FX como se indica en la tabla II. Para la variante FX/AP176-194-N191A, se observó una eliminación monofásica (Fig. 12) como para FX/delAP-FpA. Por el contrario, su eliminación fue más larga que para FX/delAP-FpA pero con un TRM similar comparado con FX/AP176-194-N181A. Estos datos indican que la N-glicosilación en la posición 181 es responsable del patrón monofásico de la eliminación del factor X mientras que la N-glicosilación en la posición 191 es responsable del patrón bifásico. Además, ambas N-glicosilaciones juegan un papel importante en los parámetros farmacocinéticos del factor X.

REFERENCIAS

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

- Arnljots B, Bergqvist D, Dahlbäck B. Inhibition of microarterial thrombosis by activated protein C in a rabbit model. *Thromb Haemost.* 1994; 72(3):415-20.
- Bauer KA. New anticoagulants. *Curr Opin Hematol.* 2008 ; 15(5):509-15.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001; 344(10):699-709.
- Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends Mol Med.* 2008; 14(10):429-40.
- Brady G, Jantzen HM, Bernard HU, Brown R, Schutz G, Hashimoto-Gotoh T. New cosmid vectors developed for eukaryotic DNA cloning. *Gene.* 1984 Feb;27(2):223-32.
- Brink MF, Bishop MD, Pieper FR. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology.* 2000; 53(1):139-48.
- Camire RM, Larson PJ, Stafford DW, High KA. Enhanced gamma-carboxylation of recombinant factor X using a chimeric construct containing the prothrombin propeptide. *Biochemistry.* 2000; 39(46):14322-9.
- Chesebro JH, Webster MW, Zoldhelyi P, Roche PC, Badimon L, Badimon JJ. Antithrombotic therapy and progression of coronary artery disease. Antiplatelet versus antithrombins. *Circulation.* 1992;86(6 Suppl):III100-10.
- Christophe OD, Lenting PJ, Cherel G, Boon-Spijker M, Lavergne JM, Boertjes R, Briquel ME, de Goede-Bolder A, Goudemand J, Gaillard S, d'Oiron R, Meyer D, Mertens K. Functional mapping of anti-factor IX inhibitors developed in patients with severe hemophilia. *Blood.* 2001; 98(5):1416-23.
- Comp PC, Esmon CT. Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs. *J Clin Invest.* 1981; 68(5): 1221-8.
- Esmon CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1477(1-2):349-60.
- Gillies SD, Morrison SL, Oi VT, Tonegawa S. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the

major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell*. 1983 Jul;33(3):717-28.

Gresele P, Momi S, Berrettini M, Nenci GG, Schwarz HP, Semeraro N, Colucci M. Activated human protein C prevents thrombin-induced thromboembolism in mice. Evidence that activated protein c reduces intravascular fibrin accumulation through the inhibition of additional thrombin generation. *J Clin Invest*. 1998;101(3):667-76.

Gruber A, Griffin JH, Harker LA, Hanson SR. Inhibition of platelet-dependent thrombus formation by human activated protein C in a primate model. *Blood*. 1989; 15;73(3):639-42.

Gustafsson D, Bylund R, Antonsson T, Nilsson I, Nyström JE, Eriksson U, Bredberg U, Teger-Nilsson AC. A new oral anticoagulant: the 50-year challenge. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3(8):649-59.

Hanson SR, Griffin JH, Harker LA, Kelly AB, Esmon CT, Gruber A. Antithrombotic effects of thrombin-induced activation of endogenous protein C in primates. *J Clin Invest*. 1993; 92(4):2003-12.

Harenberg J. Development of new anticoagulants: present and future. *Semin Thromb Hemost*. 2008 ; 34(8):779-93.

Jang Y, Guzman LA, Lincoff AM, Gottsauner-Wolf M, Forudi F, Hart CE, Courtman DW, Ezban M, Ellis SG, Topol EJ. Influence of blockade at specific levels of the coagulation cascade on restenosis in a rabbit atherosclerotic femoral artery injury model. *Circulation*. 1995; 92(10):3041-50.

Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem*. 2001; 276(14):11199-203.

Kurz KD, Smith T, Wilson A, Gerlitz B, Richardson MA, Grinnell BW. Antithrombotic efficacy in the guinea pig of a derivative of human protein C with enhanced activation by thrombin. *Blood*. 1997; 89(2):534-40.

Khoo CW, Tay KH, Shantsila E, Lip GY. Novel oral anticoagulants. *Int J Clin Pract*. 2009; 63(4):630-41.

Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, Nakanishi M, Arata Y, Itoh S, Nagase F, Kurosawa Y. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987 Dec 31;149(3):960-8.

Louvain-Quintard VB, Bianchini EP, Calmel-Tareau C, Tagzirt M, Le Bonniec BF. Thrombin-activable factor X re-establishes an intrinsic amplification in tenase-deficient plasmas. *J Biol Chem*. 2005; 280(50):41352-9.

Mason JO, Williams GT, Neuberger MS. Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell*. 1985 Jun;41(2):479-87.

Miyaji H, Mizukami T, Hosoi S, Sato S, Fujiyoshi N, Itoh S. Expression of human beta-interferon in Namalwa KJM-1 which was adapted to serum-free medium. *Cytotechnology*. 1990 Mar;3(2):133-40.

Mizukami T, Itoh S. A new SV40-based vector developed for cDNA expression in animal cells. *J Biochem (Tokyo)*. 1987 May;101(5):1307-10.

Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Noguchi T. Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood*. 2000; 95(12):3781-7.

O'Hare K, Benoist C, Breathnach R. Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Mar;78(3):1527-31.

Rezaie AR. Vitronectin functions as a cofactor for rapid inhibition of activated protein C by plasminogen activator inhibitor-1. Implications for the mechanism of profibrinolytic action of activated protein C. *J Biol Chem*. 2001; 276(19):15567-70.

Rudolph AE, Mullane MP, Porche-Sorbet R, Miletich JP. Expression, purification, and characterization of recombinant human factor X. *Protein Expr Purif*. 1997; 10(3):373-8.

Taylor FB Jr, Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest*. 1987; 79(3):918-25.

Toso R, Zhu H, Camire RM. The conformational switch from the factor X zymogen to protease state mediates exosite expression and prothrombinase assembly. *J Biol Chem*. 2008; 283(27):18627-35.

Sakamoto T, Ogawa H, Yasue H, Oda Y, Kitajima S, Tsumoto K, Mizokami H. Prevention of arterial reocclusion after thrombolysis with activated protein C. Comparison with heparin in a canine model of coronary artery thrombosis. *Circulation*. 1994; 90(1):427-32

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

<120> DERIVADOS DE SERÍN PROTEASA Y USOS PARA LA PREVENCIÓN Y/O EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA

<130> BIO08687 CHRISTOPHE / MP

<160> 36

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 488

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 629 099 T3

<400> 1

```

Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly
1           5           10           15

Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn
20           25           30

Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met
35           40           45

Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr
50           55           60

Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe
65           70           75           80

Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln
85           90           95

Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys
100          105          110

Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu
115          120          125

Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln
130          135          140

Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn
145          150          155          160

Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr

```

ES 2 629 099 T3

	165		170		175
Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly	180		185		190
Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu	195		200		205
Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln	210		215		220
Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu	225		230		235
Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu	245		250		255
Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu	260		265		270
Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val	275		280		285
Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu	290		295		300
Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp	305		310		315
Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met	325		330		335
Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr	340		345		350
Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His	355		360		365
Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr	370		375		380
Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln	385		390		395
Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln	405		410		415

ES 2 629 099 T3

Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe
420 425 430

Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys
435 440 445

Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg
450 455 460

Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu
465 470 475 480

Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
485

<210> 2
<211> 52
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile
1 5 10 15

Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro
20 25 30

Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn
35 40 45

Asn Leu Thr Arg
50

<210> 3
<211> 461
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

245 250 255

Glu Ser Lys Lys Leu Leu Val Arg Leu Gly Glu Tyr Asp Leu Arg Arg
260 265 270

Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu Asp Ile Lys Glu Val Phe Val His
275 280 285

ES 2 629 099 T3

35	40	45
Glu Leu Arg His Ser Ser Leu Glu Arg Glu Cys Ile Glu Glu Ile Cys 50 55 60		
Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Gln Asn Val Asp Asp Thr Leu 65 70 75 80		
Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp Gly Asp Gln Cys Leu Val Leu Pro 85 90 95		
Leu Glu His Pro Cys Ala Ser Leu Cys Cys Gly His Gly Thr Cys Ile 100 105 110		
Asp Gly Ile Gly Ser Phe Ser Cys Asp Cys Arg Ser Gly Trp Glu Gly 115 120 125		
Arg Phe Cys Gln Arg Glu Val Ser Phe Leu Asn Cys Ser Leu Asp Asn 130 135 140		
Gly Gly Cys Thr His Tyr Cys Leu Glu Glu Val Gly Trp Arg Arg Cys 145 150 155 160		
Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Lys Leu Gly Asp Asp Leu Leu Gln Cys His 165 170 175		
Pro Ala Val Lys Phe Pro Cys Gly Arg Pro Trp Lys Arg Met Glu Lys 180 185 190		
Lys Arg Ser His Leu Lys Arg Asp Thr Glu Asp Gln Glu Asp Gln Val 195 200 205		
Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Met Thr Arg Arg Gly Asp Ser Pro 210 215 220		
Trp Gln Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Lys Lys Leu Ala Cys Gly Ala 225 230 235 240		
Val Leu Ile His Pro Ser Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Met Asp 245 250 255		
Glu Ser Lys Lys Leu Leu Val Arg Leu Gly Glu Tyr Asp Leu Arg Arg 260 265 270		
Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu Asp Ile Lys Glu Val Phe Val His 275 280 285		

ES 2 629 099 T3

Pro Asn Tyr Ser Lys Ser Thr Thr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu His
290 295 300

Leu Ala Gln Pro Ala Thr Leu Ser Gln Thr Ile Val Pro Ile Cys Leu
305 310 315 320

Pro Asp Ser Gly Leu Ala Glu Arg Glu Leu Asn Gln Ala Gly Gln Glu
325 330 335

Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg Glu Lys Glu Ala
340 345 350

Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu Asn Phe Ile Lys Ile Pro Val Val
355 360 365

Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val Met Ser Asn Met Val Ser Glu Asn
370 375 380

Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly Asp Arg Gln Asp Ala Cys Glu Gly
385 390 395 400

Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Ala Ser Phe His Gly Thr Trp Phe Leu
405 410 415

Val Gly Leu Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Gly Leu Leu His Asn Tyr
420 425 430

Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Leu Asp Trp Ile His Gly His
435 440 445

Ile Arg Asp Lys Glu Ala Pro Gln Lys Ser Trp Ala Pro
450 455 460

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg
1 5 10 15

<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X es G o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X es V o P

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> X es I, A o S
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> X es V o F
 10
 <400> 5

 Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Xaa Xaa Arg
 1 5 10 15

 Xaa Xaa Gly
 15
 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Polipéptido

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X es V o G
 25

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X es V o P
 30

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> X es I, A o S
 35

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> X es V o F
 40
 <400> 6

 Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Gly
 1 5 10
 45

 <210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50

 <220>
 <223> Polipéptido
 55
 <400> 7

 Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ile Val Gly
 1 5 10

 <210> 8

	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Polipéptido	
	<400> 8	
10		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ala Val Gly 1 5 10
	<210> 9	
	<211> 13	
	<212> PRT	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Polipéptido	
20	<400> 9	
		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ser Val Gly 1 5 10
25	<210> 10	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Polipéptido	
	<400> 10	
		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ile Phe Gly 1 5 10
35	<210> 11	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Polipéptido	
	<400> 11	
45		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ala Phe Gly 1 5 10
	<210> 12	
	<211> 13	
50	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Polipéptido	
55	<400> 12	
		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ser Phe Gly 1 5 10

<210> 13
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> X es L, A o S
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> X es I o F
 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> X es G o D
 <400> 13
 25
 Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa
 <210> 14
 <211> 13
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (11)..(11)
 <223> X es L, A o S
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (12)..(12)
 <223> X es I o F
 45 <220>
 <221> MISC_FEATURES
 <222> (13)..(13)
 <223> X es G o D
 50 <400> 14
 Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Polipéptido

ES 2 629 099 T3

	<400> 15	
		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Leu Ile Asp 1 5 10
5	<210> 16 <211> 13 <212> PRT <213> Artificial	
10	<220> <223> Polipéptido	
15	<400> 16	
		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Leu Ile Gly 1 5 10
20	<210> 17 <211> 13 <212> PRT <213> Artificial	
25	<220> <223> Polipéptido	
	<400> 17	
		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ala Ile Asp 1 5 10
30	<210> 18 <211> 13 <212> PRT <213> Artificial	
35	<220> <223> Polipéptido	
	<400> 18	
40		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ala Ile Gly 1 5 10
45	<210> 19 <211> 13 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> Polipéptido	
50	<400> 19	
		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ser Ile Asp 1 5 10
55	<210> 20 <211> 13 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	

	<223> Polipéptido	
	<400> 20	
5		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ser Ile Gly 1 5 10
	<210> 21	
	<211> 13	
10	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Polipéptido	
15	<400> 21	
		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ala Phe Asp 1 5 10
	<210> 22	
20	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> Polipéptido	
	<400> 22	
		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ala Phe Gly 1 5 10
30	<210> 23	
	<211> 13	
	<212> PRT	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Polipéptido	
	<400> 23	
40		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ser Phe Asp 1 5 10
	<210> 24	
	<211> 13	
45	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Polipéptido	
50	<400> 24	
		Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Ser Phe Gly 1 5 10
55	<210> 25	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	

	<220>	
	<223> Polipéptido	
5	<400> 25	
	Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Leu Phe Asp	
	1 5 10	
10	<210> 26	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Polipéptido	
	<400> 26	
	Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Leu Phe Gly	
	1 5 10	
20	<210> 27	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Polipéptido	
	<400> 27	
30		
	Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys	
	1 5 10	
35	<210> 28	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Cebadores	
	<400> 28	
	ctggaacgcc ggaagaggga cctgcttgac ttcaaccaga cgcag	45
45	<210> 29	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Cebadores	
	<400> 29	
	gltgaagtcc agcagggtccc tcttcgacg ttccagtgtc tgttt	45
55	<210> 30	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebadores	

	<400> 30 gactttctag ctgaaggagg aggcgtgcgt atcgtgggag gccaggaatg c	51
5	<210> 31 <211> 50 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebadores	
15	<400> 31 cctcctcctt ctgctagaaa gtctctctt ctgcgtcca gggctctgtt	50
20	<210> 32 <211> 42 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebadores	
25	<400> 32 cctcctcctt ctgctagaaa gtcctggtc aggttggtg cg	42
30	<210> 33 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebadores	
35	<400> 33 ctgacttcg cccagacgca gcct	24
40	<210> 34 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebadores	
50	<400> 34 aggctgcgtc tgggggaagt caag	24
55	<210> 35 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebadores	
60	<400> 35 ggcgacaatg ctctaccag gatcgt	26
65	<210> 36 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebadores	

<400> 36

gatcctgggtg agagcattgt cgcccct

27

5

REIVINDICACIONES

1. Un derivado quimérico del factor X escindible por trombina en el que el péptido de activación de dicho factor X nativo está reemplazado por una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2, en la que la asparagina en la posición 39 y/o 49 está N-glicosilada, y un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 7 a 16 de la SEQ ID NO:4 o un derivado quimérico del factor X escindible por trombina que contiene el factor X activado o una variante conservadora de la función del mismo y una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2 en la que la asparagina en la posición 39 o 49 está N-glicosilada y un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 7 a 16 de la SEQ ID NO:4.
2. El derivado quimérico del factor X escindible por trombina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
 - la isoleucina correspondiente al resto en la posición 235 de la SEQ ID NO:1 está reemplazada por una alanina, una serina o una leucina y/o
 - la valina correspondiente al resto en la posición 236 de la SEQ ID NO:1 está reemplazada por una fenilalanina o una alanina y/o
 - la glicina correspondiente al resto en la posición 14 de la SEQ ID NO:4 está reemplazada por una valina, una fenilalanina o una alanina y/o
 - la valina correspondiente al resto en la posición 15 de la SEQ ID NO:4 está reemplazada por una prolina.
3. Un derivado quimérico del factor X de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la serina de dicho derivado quimérico del factor X correspondiente al resto en la posición 419 de la SEQ ID NO:1 está reemplazada por una alanina.
4. Un derivado quimérico del factor X de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la arginina y la lisina de dicho derivado quimérico del factor X correspondiente a los restos en la posición 387 y 391, respectivamente, de la SEQ ID NO:1, están reemplazadas por una alanina.
5. Un derivado quimérico del factor X de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en medicina.
6. Un derivado quimérico del factor X de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en la prevención o tratamiento de patologías de la coagulación del tipo hemorrágico, preferiblemente para su uso en la prevención o tratamiento de las hemofilias A o B.
7. Un derivado quimérico del factor X de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de hemorragias inducidas por heparinas de bajo peso molecular (LMWH) o por un anticoagulante dirigido al factor Xa.
8. Un derivado quimérico de la proteína C escindible por trombina, en el que el péptido de activación de dicha proteína C nativa está reemplazado por una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2 en la que la asparagina en la posición 39 y/o 49 está N-glicosilada y un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 7 a 16 de la SEQ ID NO:4 o un derivado quimérico de la proteína C escindible por trombina que contiene la proteína C activada o una variante conservadora de la función de la misma y una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 33 a 52 de la SEQ ID NO:2, en la que la asparagina en la posición 39 o 49 está N-glicosilada y un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 7 a 16 de la SEQ ID NO:4.
9. El derivado quimérico de la proteína C escindible por trombina de acuerdo con la reivindicación 8, en el que:
 - la leucina correspondiente al resto en la posición 212 de la SEQ ID NO:3 está reemplazada por una alanina o una serina y/o
 - la isoleucina correspondiente al resto en la posición 213 de la SEQ ID NO:3 está reemplazada por una fenilalanina y/o
 - el aspartato correspondiente al resto en la posición 214 de la SEQ ID NO:3 está reemplazada por una glicina y/o
 - la glicina correspondiente al resto en la posición 14 de la SEQ ID NO:4 está reemplazada por una valina, una fenilalanina o una alanina y/o
 - la valina correspondiente al resto en la posición 15 de la SEQ ID NO:4 está reemplazada por una prolina.
10. Un derivado quimérico de la proteína C de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-9 para su uso en medicina.

11. Un derivado quimérico de la proteína C de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-9 para su uso en la prevención o tratamiento de patologías que implican hipercoagulación.

5 12. Un derivado quimérico de la proteína C de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso en la prevención o tratamiento de la trombosis.

13. Una molécula de ácido nucleico que codifica un derivado quimérico escindible por trombina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 8-9.

10

-40	<u>Met-Gly-Arg-Pro-Leu-His-Leu-Val-Leu-Leu-Ser-Ala-Ser-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Leu-Leu</u>	-21
1		20
-20	<u>Gly-Glu-Ser-Leu-Phe-Ile-Arg-Arg-Glu-Gln-Ala-Asn-Asn-Ile-Leu-Ala-Arg-Val-Thr-Arg</u>	-1
21		40
1	<u>Ala-Asn-Ser-Phe-Leu-Glu-Glu-Met-Lys-Lys-Gly-His-Leu-Glu-Arg-Glu-Cys-Met-Glu-Glu</u>	20
41		60
21	<u>Thr-Cys-Ser-Tyr-Glu-Glu-Ala-Arg-Glu-Val-Phe-Glu-Asp-Ser-Asp-Lys-Thr-Asn-Glu-Phe</u>	40
61		80
41	<u>Trp-Asn-Lys-Tyr-Lys-Asp-Gly-Asp-Gln-Cys-Glu-Thr-Ser-Pro-Cys-Gln-Asn-Gln-Gly-Lys</u>	60
81		100
61	<u>Cys-Lys-Asp-Gly-Leu-Gly-Glu-Tyr-Thr-Cys-Thr-Cys-Leu-Glu-Gly-Phe-Glu-Gly-Lys-Asn</u>	80
101		120
81	<u>Cys-Glu-Leu-Phe-Thr-Arg-Lys-Leu-Cys-Ser-Leu-Asp-Asn-Gly-Asp-Cys-Asp-Gln-Phe-Cys</u>	100
121		140
101	<u>His-Glu-Glu-Gln-Asn-Ser-Val-Val-Cys-Ser-Cys-Ala-Arg-Gly-Tyr-Thr-Leu-Ala-Asp-Asn</u>	120
141		160
121	<u>Gly-Lys-Ala-Cys-Ile-Pro-Thr-Gly-Pro-Tyr-Pro-Cys-Gly-Lys-Gln-Thr-Leu-Glu-Arg-Arg</u>	140
161		180
141	<u>Lys-Arg-Ser-Val-Ala-Gln-Ala-Thr-Ser-Ser-Ser-Gly-Glu-Ala-Pro-Asp-Ser-Ile-Thr-Trp</u>	160
181		200
161	<u>Lys-Pro-Tyr-Asp-Ala-Ala-Asp-Leu-Asp-Pro-Thr-Glu-Asn-Pro-Phe-Asp-Leu-Leu-Asp-Phe</u>	180
201		220
181	<u>Asn*-Gln-Thr-Gln-Pro-Glu-Arg-Gly-Asp-Asn-Asn*-Leu-Thr-Arg-Ile-Val-Gly-Gly-Gln-Glu</u>	200
221		240
201	<u>Cys-Lys-Asp-Gly-Glu-Cys-Pro-Trp-Gln-Ala-Leu-Leu-Ile-Asn-Glu-Glu-Asn-Glu-Gly-Phe</u>	220
241		260
221	<u>Cys-Gly-Gly-Thr-Ile-Leu-Ser-Glu-Phe-Tyr-Ile-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Leu-Tyr-Gln</u>	240
261		280
241	<u>Ala-Lys-Arg-Phe-Lys-Val-Arg-Val-Gly-Asp-Arg-Asn-Thr-Glu-Gln-Glu-Glu-Gly-Gly-Glu</u>	260
281		300
261	<u>Ala-Val-His-Glu-Val-Glu-Val-Val-Ile-Lys-His-Asn-Arg-Phe-Thr-Lys-Glu-Thr-Tyr-Asp</u>	280
301		320
281	<u>Phe-Asp-Ile-Ala-Val-Leu-Arg-Leu-Lys-Thr-Pro-Ile-Thr-Phe-Arg-Met-Asn-Val-Ala-Pro</u>	300
321		340
301	<u>Ala-Cys-Leu-Pro-Glu-Arg-Asp-Trp-Ala-Glu-Ser-Thr-Leu-Met-Thr-Gln-Lys-Thr-Gly-Ile</u>	320
341		360
321	<u>Val-Ser-Gly-Phe-Gly-Arg-Thr-His-Glu-Lys-Gly-Arg-Gln-Ser-Thr-Arg-Leu-Lys-Met-Leu</u>	340
361		380
341	<u>Glu-Val-Pro-Tyr-Val-Asp-Arg-Asn-Ser-Cys-Lys-Leu-Ser-Ser-Ser-Phe-Ile-Ile-Thr-Gln</u>	360
381		400
361	<u>Asn-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Asp-Thr-Lys-Gln-Glu-Asp-Ala-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly</u>	380
401		420
381	<u>Gly-Pro-His-Val-Thr-Arg-Phe-Lys-Asp-Thr-Tyr-Phe-Val-Thr-Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly</u>	400
421		440
401	<u>Glu-Gly-Cys-Ala-Arg-Lys-Gly-Lys-Tyr-Gly-Ile-Tyr-Thr-Lys-Val-Thr-Ala-Phe-Leu-Lys</u>	420
441		460
421	<u>Trp-Ile-Asp-Arg-Ser-Met-Lys-Thr-Arg-Gly-Leu-Pro-Lys-Ala-Lys-Ser-His-Ala-Pro-Glu</u>	440
461		480
441	<u>Val-Ile-Thr-Ser-Ser-Pro-Leu-Lys</u>	460

Figura 1

Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly X1 X2 Arg X3 X4 Gly

Derivado del fibrinopéptido A

Sitio escindible por trombina

X1 = Val o Gly
X2 = Val o Pro
X3 = Ile, Ala o Ser
X4 = Val o Phe

Figura 2A

Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly X1 X2 Arg X3 X4 Gly

Derivado del fibrinopéptido A (últimos 10 aminoácidos)

Sitio escindible por trombina

X1 = Val o Gly
X2 = Val o Pro
X3 = Ile, Ala o Ser
X4 = Val o Phe

Figura 2B

Figura 2

Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Val Arg X1 X2 X3

Derivado del fibrinopéptido A

Sitio escindible por trombina

X1 = Leu, Ala o Ser

X2 = Ile o Phe

X3 = Gly, Asp

Figura 3A

Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Val Arg X1 X2 X3

Derivado del fibrinopéptido A (últimos 10 aminoácidos)

Sitio escindible por trombina

X1 = Leu, Ala o Ser

X2 = Ile o Phe

X3 = Gly, Asp

Figura 3B

Figura 3

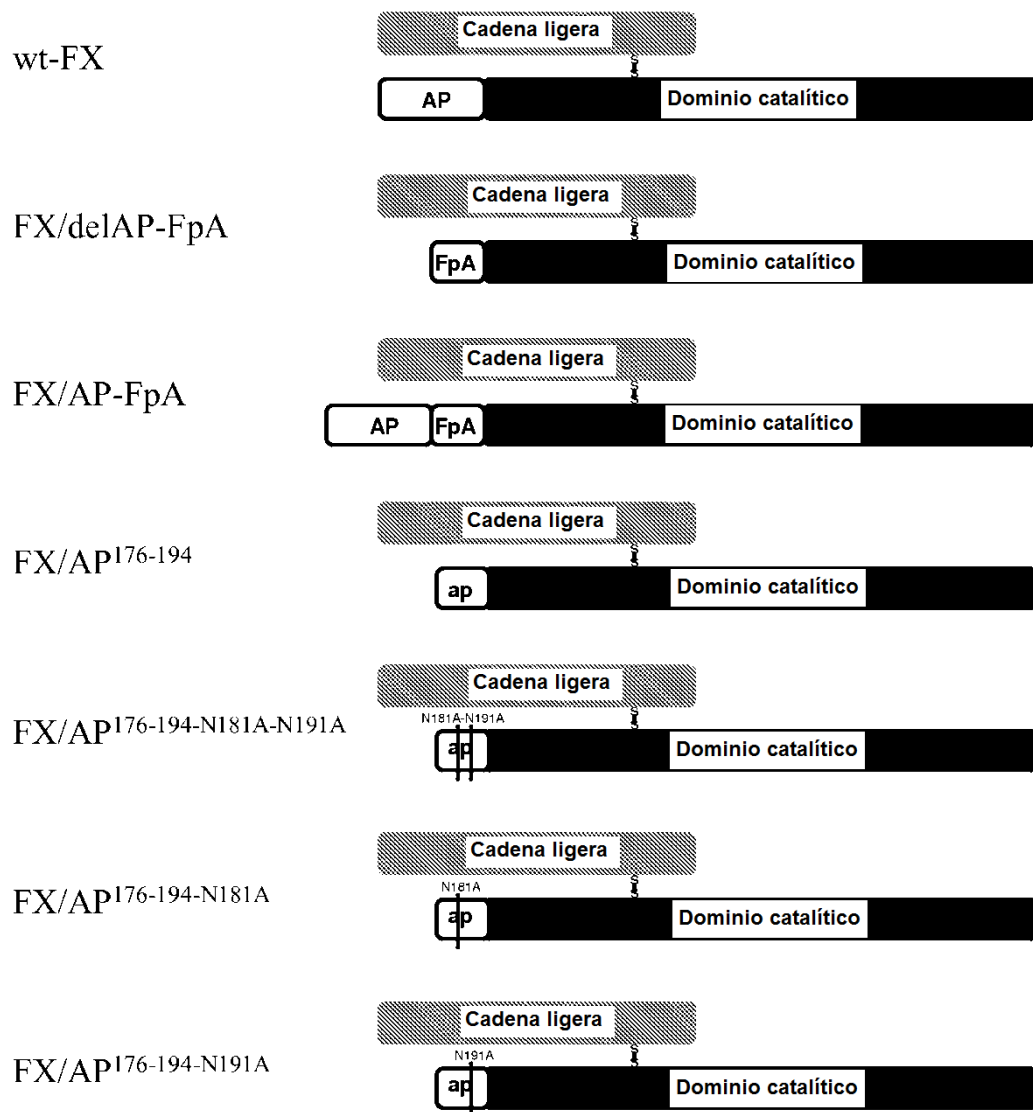


Figura 4

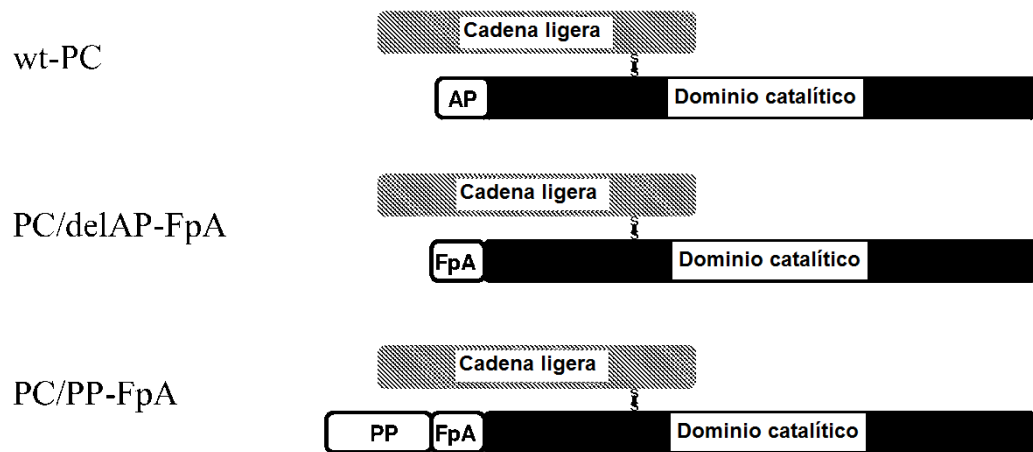


Figura 5

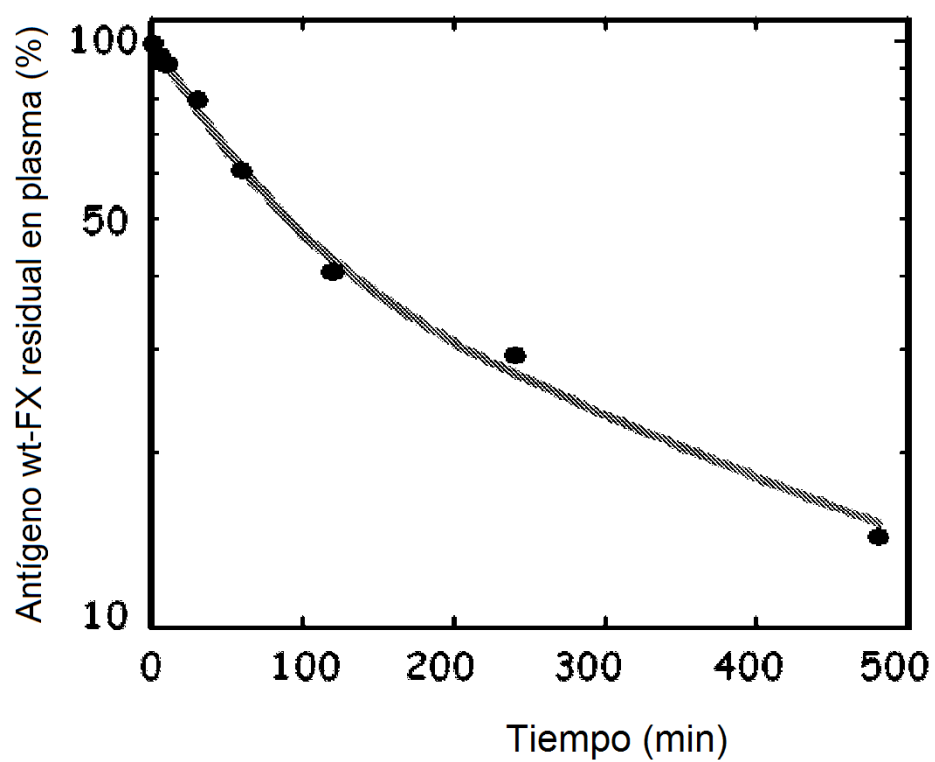


Figura 6

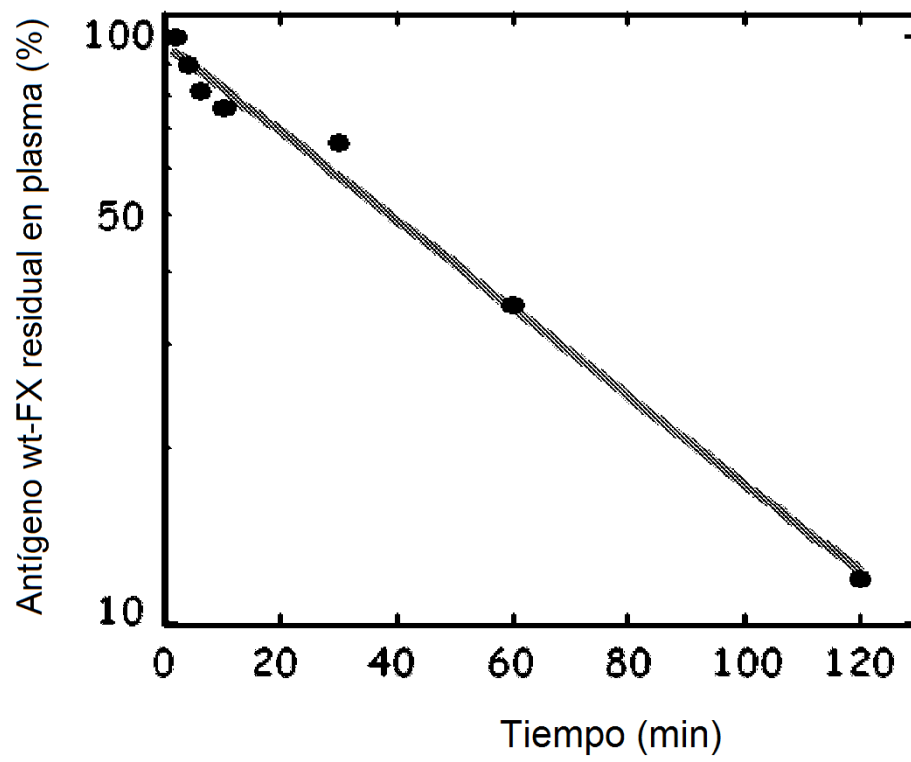


Figura 7

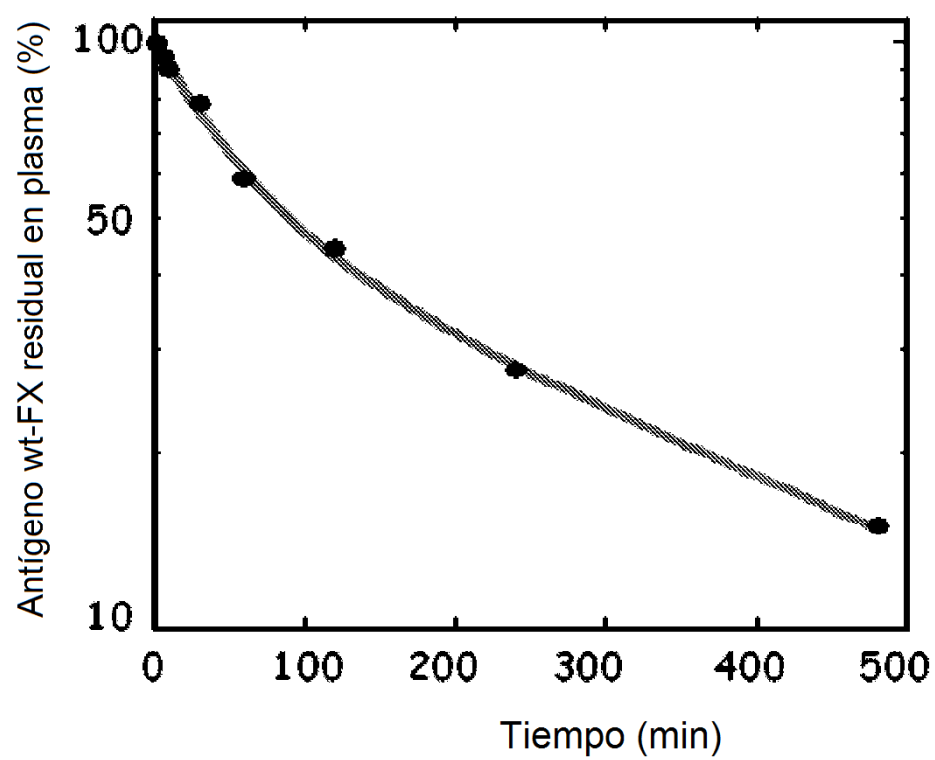


Figura 8

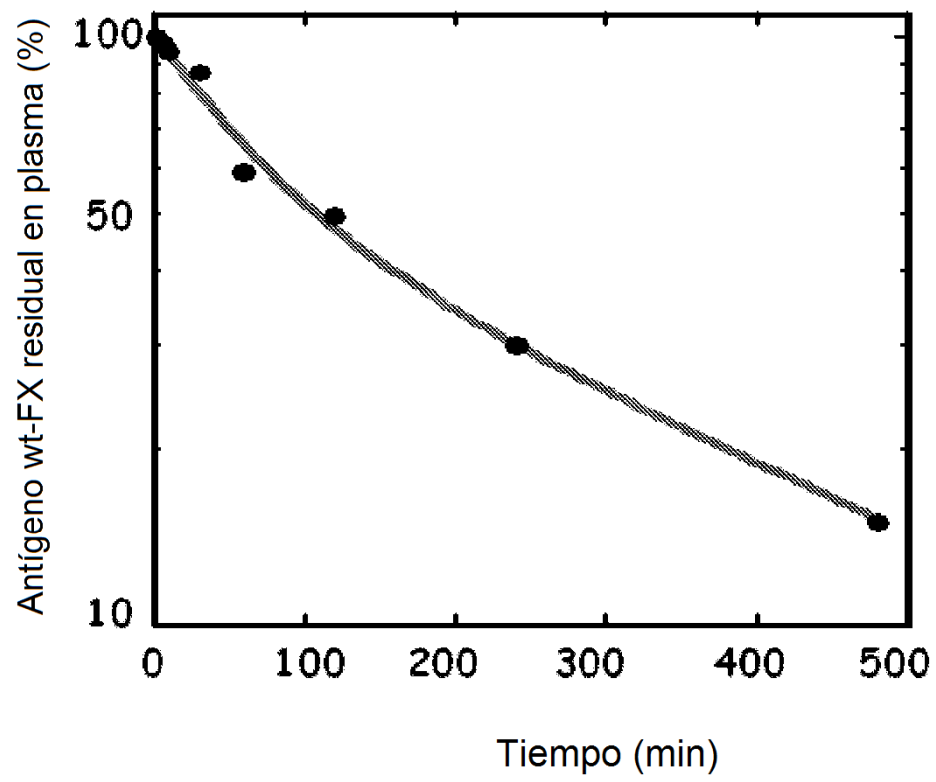


Figura 9

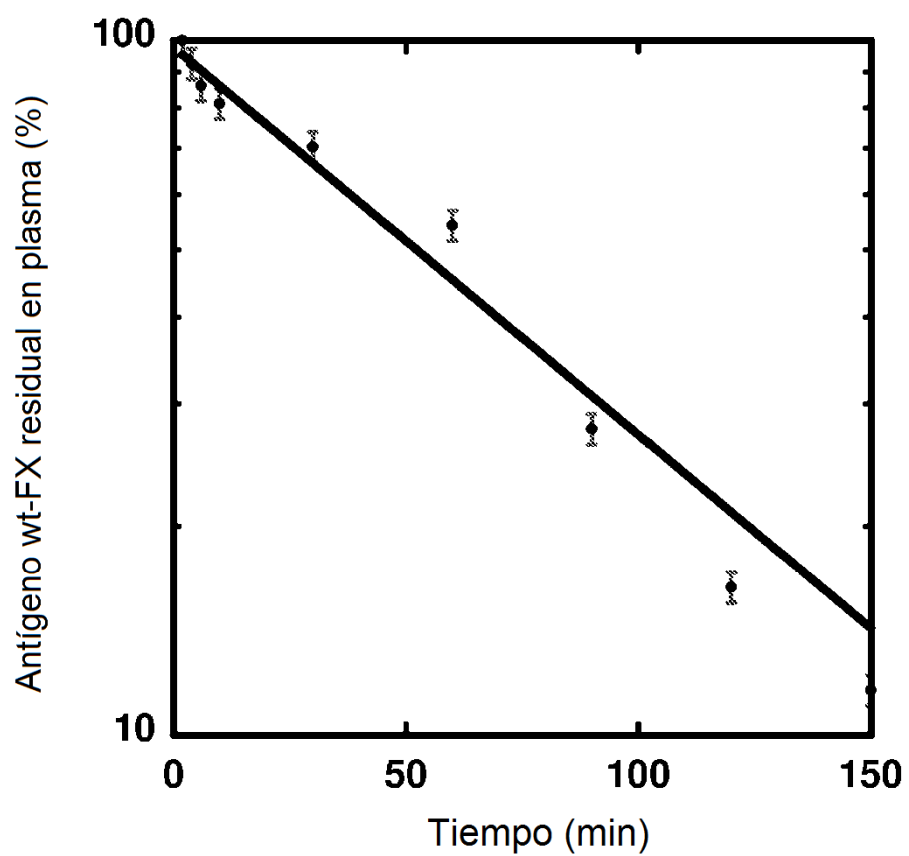


Figura 10

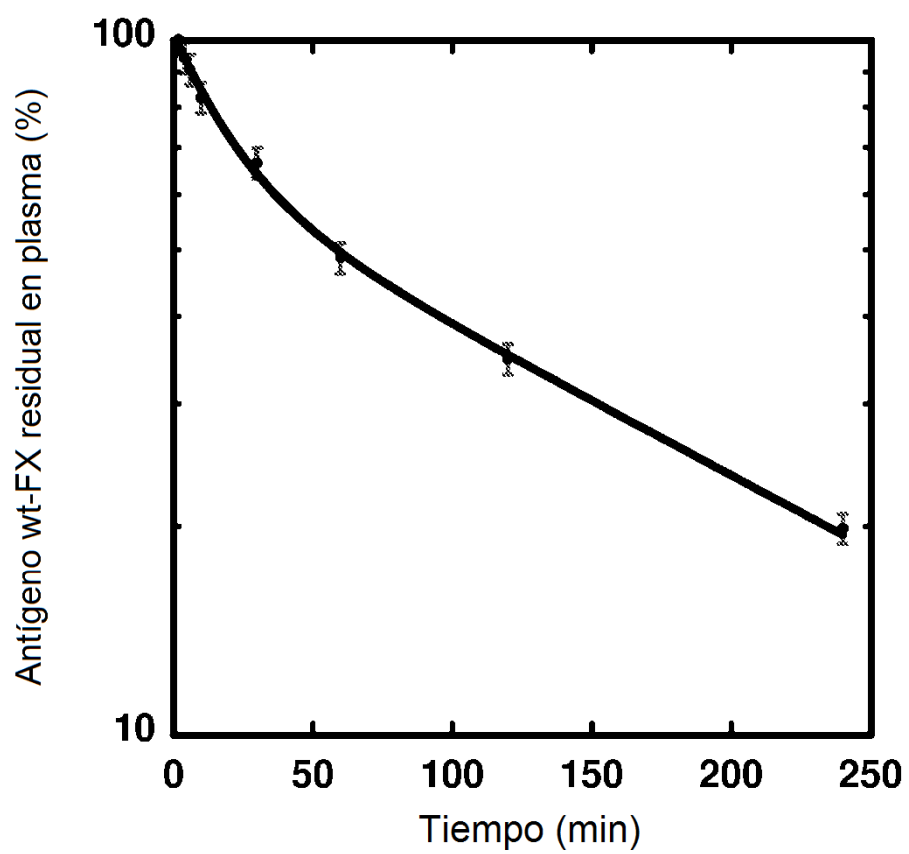


Figura 11

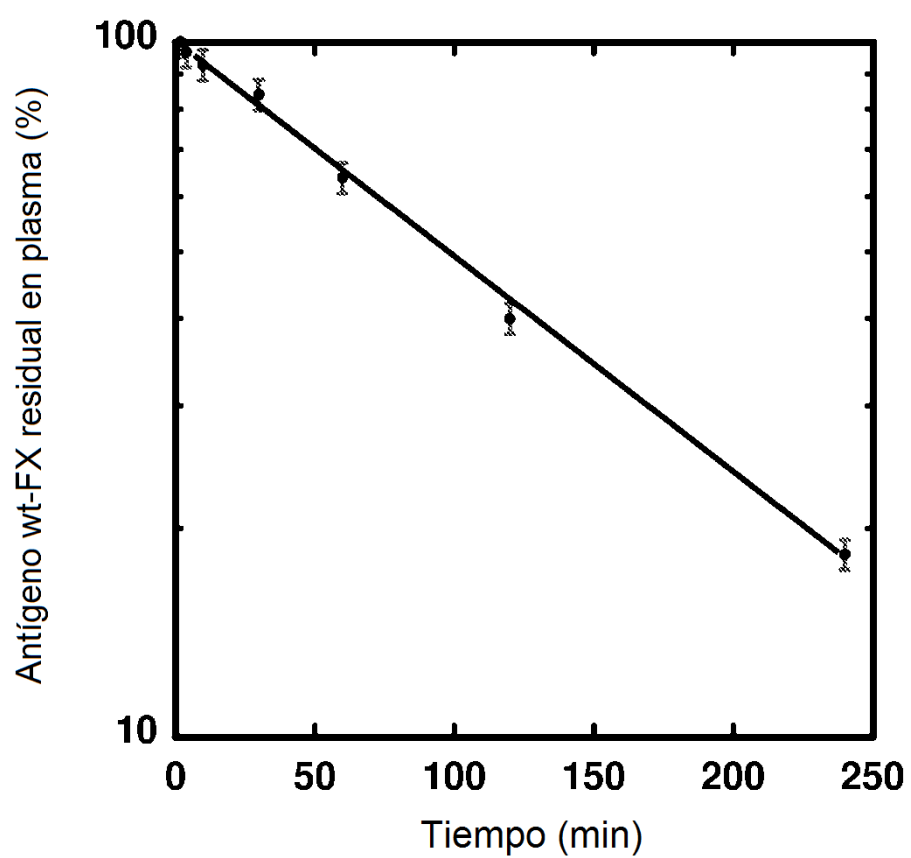


Figura 12