

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 394**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/64** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

**C12N 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2006 E 06753967 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 1891091**

54 Título: **Polipéptidos del factor X de coagulación con propiedades de activación modificadas**

30 Prioridad:

**01.06.2005 EP 05011773**

**09.06.2005 US 688704 P**

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

**03.03.2014**

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)  
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76  
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**SCHULTE, STEFAN;  
HAUSER, HANS-PETER;  
KALINA, UWE y  
WEIMER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 445 394 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Polipéptidos del factor X de coagulación con propiedades de activación modificadas

**Campo de la invención:**

5 La presente invención se refiere a secuencias de ADNc modificadas que codifican polipéptidos del factor X, en particular el factor X humano y sus derivados que pueden evitar la necesidad del factor VIIIa/FIXa o del factor VIIa/FT para la activación, en donde una modificación consiste en una inserción de un sitio de escisión adicional para una proteasa, y en donde el sitio de escisión adicional se inserta entre Ile235 y Val236 o entre Val236 y Gly237 o entre Gly237 y Gly238 en la cadena pesada del factor X y en donde están excluidas deleciones en la secuencia del péptido de activación del factor X - de manera que proteasas, que activan de forma natural al factor X, ya no son capaces de escindir y activar dicha variante del factor X. La invención se refiere además a vectores de expresión recombinantes que contienen tales secuencias de ADNc modificadas, a células hospedadoras transformadas con tales vectores de expresión recombinantes, a polipéptidos recombinantes y a derivados que tienen actividades biológicas de la proteína de tipo silvestre sin modificar pero que tienen propiedades de activación alteradas y a procedimientos para la preparación de tales proteínas recombinantes y sus derivados. La invención también abarca un vector de transferencia para uso en una terapia génica humana, que comprende tales secuencias de ADN modificadas.

**Antecedentes de la invención:**

20 Las proteínas dependientes de la vitamina K se usan para tratar ciertos tipos de hemofilia. La hemofilia clásica o hemofilia A es un trastorno hemorrágico hereditario. Es el resultado de una deficiencia ligada al cromosoma X del factor VIII de la coagulación sanguínea, y afecta casi exclusivamente a varones con una incidencia de entre uno y dos individuos por cada 10.000. El defecto del cromosoma X es transmitido por las mujeres portadoras siendo ellas mismas no hemofílicas. La manifestación clínica de la hemofilia A es una tendencia a la hemorragia incrementada. Antes de la introducción del tratamiento con concentrados de factor VIII, el promedio de vida de una persona con hemofilia grave era menor a 20 años. El uso de concentrados de factor VIII procedente del plasma y más tarde de formas recombinantes del factor VIII, ha mejorado considerablemente la situación de los pacientes hemofílicos, incrementando mucho el promedio de vida, proporcionando a la mayoría de ellos la posibilidad de tener una vida más o menos normal. La hemofilia B que es 5 veces menos prevalente que la hemofilia A, está causada por un factor IX no funcional o ausente y se trata con concentrados de factor IX procedente del plasma o una forma recombinante del factor IX. Tanto en la hemofilia A como en la hemofilia B el problema médico más grave en el tratamiento de la enfermedad es la generación de aloanticuerpos contra los factores de sustitución. Hasta un 30% de todos los pacientes con hemofilia A desarrollan anticuerpos contra el factor VIII. Los anticuerpos contra FIX se producen en menor medida pero con consecuencias más graves, ya que son menos susceptibles a una terapia de inducción de tolerancia inmune.

35 El modelo actual de coagulación afirma que el desencadenante fisiológico de la coagulación es la formación de un complejo entre el factor tisular (FT) y el factor VIIa (FVIIa) en la superficie de células que expresan FT, que se encuentran normalmente fuera de la vasculatura y solo se vuelven accesibles cuando se produce una lesión. El complejo de factor VIIa/FT activa el factor IX y el factor X, generando en última instancia trombina. En un bucle de retroalimentación positiva, la trombina activa el factor VIII y el factor IX que luego también activan el factor X, el denominado brazo "intrínseco" de la cascada de coagulación sanguínea, amplificando de este modo la generación de factor Xa, que es necesario para la generación de la ráfaga de trombina completa para lograr una hemostasia completa. Se mostró que mediante la administración de concentraciones suprafisiológicas de FVIIa, se consigue una hemostasia evitando la necesidad de factor VIIIa y factor IXa. La clonación del ADNc del factor VII (documento de patente de EE.UU. 4.784.950) hizo posible el desarrollo de un sustituto recombinante de ese factor de coagulación obtenido a partir del plasma. Este factor VIIa se administró con éxito por primera vez en 1988 a un paciente con un título elevado de anticuerpos inhibidores de FVIII. Desde entonces el número de indicaciones de factor VIIa ha crecido de manera constante lo que muestra un potencial para que el factor VIIa se convierta en un agente hemostático universal (Erhardtson, 2002). Desafortunadamente, el factor VIIa solo tiene una semivida en plasma de poco más de 2 horas y por lo tanto se tiene que volver a administrar con frecuencia, volviendo dicha terapia invasiva y muy costosa.

50 Existe, por ello una necesidad actual de factores de coagulación mejorados, especialmente de aquellos que son agentes hemostáticos de actividad correctora. Los agentes hemostáticos de actividad correctora son sustancias que permiten que se produzca la coagulación cuando se administran a pacientes en los que ciertos factores de coagulación están ausentes, no son funcionales o están bloqueados por anticuerpos inhibidores. La actividad de estos compuestos para corregir bloqueos en la cascada de la coagulación (actividad hemostática correctora) se puede medir mediante ensayos de coagulación conocidos en la técnica. Los agentes de actividad correctora esencialmente hemostáticos tienen la capacidad de activar los sustratos de un factor de coagulación ausente, no funcional o bloqueado, u otros sustratos en la cascada de la coagulación "aguas abajo" del factor de coagulación ausente, no funcional o bloqueado, de una forma directa de tal manera que el factor de coagulación ausente, no funcional o bloqueado ya no es necesario para la generación eficaz de trombina.

También el factor X ha sido objeto de una extensa investigación.

El ADNc del factor X se ha caracterizado (Leytus et al. 1984, PNAS, 82: 3699-3702). El factor X de coagulación es una glicoproteína dependiente de la vitamina K con un peso molecular de 58,5 kDa, que es secretada desde las células hepáticas en el plasma, como un zimógeno. Inicialmente, el factor X se produce como un prepro péptido con un péptido señal que consiste en un total de 488 aminoácidos. El péptido señal se separa por escisión con la peptidasa señal durante la exportación al retículo endoplasmático, la secuencia del propéptido se separa por escisión después de tener lugar la carboxilación gamma en los primeros 11 residuos del ácido glutámico en el extremo N-terminal de la cadena N-terminal madura. Una etapa de procesamiento adicional se produce mediante la escisión entre Arg182 y Ser183. Esta etapa del procesamiento también conduce de forma concomitante a la delección del tripéptido Arg180-Lys181-Arg182. El zimógeno del factor X secretado resultante consta de una cadena ligera N-terminal de 139 aminoácidos ( $M_r$  16.200) y una cadena pesada C-terminal de 306 aminoácidos ( $M_r$  42.000) que están ligadas covalentemente a través de un puente de disulfuro entre Cys172 y Cys342. Otras etapas de procesamiento posteriores a la traducción incluyen la  $\beta$ -hidroxilación de Asp103, así como la glicosilación de tipo N y O.

Tanto el factor VIIIa/factor IXa o el factor VIIa/FT son capaces, en condiciones fisiológicas, de activar el factor X en las superficies de plaquetas activadas mediante la escisión carboxi-terminal a Arg234, liberando de este modo el denominado péptido de activación de 52 aminoácidos desde Ser183 a Arg234.

En una escisión autocatalítica, el factor X activado (factor Xa) separa por escisión un pequeño fragmento en el extremo C-terminal de su cadena pesada carboxi-terminal a Arg464, lo que conduce al factor Xa $\beta$ . Sin embargo, la relevancia fisiológica de esta escisión no está clara ya que ambas formas del factor Xa tienen actividades catalíticas comparables.

Se han realizado diversos intentos de modificar el factor X:

Wolf et al. 1991 (JBC, 266, nº 21, págs. 13726-13730) deleccionaron el péptido de activación del factor X, sustituyéndolo con el dipéptido Arg-Lys que lleva a la introducción de 2 nuevos sitios de consenso de escisión de furina dentro de la región del péptido de activación del factor X. Tales variantes del factor X están activadas durante el procesamiento intracelular lo que conduce de este modo a la secreción de factor X activado.

Wolf et al. 1995 (Blood. 86. págs. 4153-4157) produjeron variantes inactivas aciladas del factor Xa, que se desacilan lentamente después de la inyección en el plasma sanguíneo generando de ese modo factor X activado con el paso del tiempo.

Rudolph et al. 1997 (Prot. Express and Puri. 10: 373-378) modificaron el factor X en la región del sitio de escisión del propéptido y encontraron que la sustitución de Thr39 por Arg mejoraba considerablemente la eficacia del procesamiento del propéptido en un cultivo celular.

Camire et al. 2000 (Biochemistry. 39 págs.14322-14329) consiguieron un mayor grado de carboxilación gamma en un cultivo celular mediante la sustitución del prepro péptido del factor X por el de trombina. Sin embargo, aunque la tasa de carboxilación gamma aumentó, un 10-30% del factor X se mantuvo sin carboxilar.

Rudolph et al. 2002 (Thromb Haemost., 88:756-62) crearon variantes del factor X con el péptido de activación deleccionado. Se pudo observar que tales variantes del factor X se activaban automáticamente de una manera independiente del cofactor y el artículo llega a la conclusión de que la función primaria del péptido de activación es evitar una activación falsa de FX.

Thiec et al. 2003 (JBC, 12. págs. 10393-10399) sustituyeron el dominio Gla y el primer dominio de EGF del factor X por el dominio correspondiente de FIX para investigar la capacidad de tales quimeras para interactuar de manera productiva con el complejo FT/FVIIa.

El documento WO 98/38317 (Prioridad: 27 de Febrero 1997) reivindica análogos del factor X con una modificación en el sitio natural de escisión para la activación entre Gly228 e Ile235 de modo que proteasas que no activan de forma natural el factor X, pueden escindir y activar tales análogos del factor X.

El documento WO 98/38318 (Prioridad: 27 de Febrero 1997) describe análogos del factor X en los que se eliminan los aminoácidos Arg180 a Arg234 y los aminoácidos de Gly173 a Arg179 se modifican de tal manera que proteasas, que no activan naturalmente FX, pueden escindir la secuencia modificada activando de este modo los análogos del factor X descritos anteriormente.

El documento WO 01/10896 (Prioridad: 10 de Agosto 1999) describe análogos del factor X, que tienen sustituciones de al menos uno de los aminoácidos entre Glu226 e Ile235. En el ejemplo se muestra la introducción de un sitio de escisión para la activación obtenido a partir de FIX que hace que la variante del factor X se pueda escindir con FXI.

El documento WO 03/035861 (Prioridad: 19 de Octubre 2001) reivindica variantes del factor X en las que el péptido de activación se ha eliminado y se ha reemplazado por los aminoácidos P<sub>10</sub> a P<sub>1</sub> de fibrinopéptido A, creando un sitio de escisión quimérico para trombina, haciendo que esta variante del factor X se pueda acti-

var con trombina.

El documento WO 2004/005347 (Prioridad: 3 de Julio 2002) describe variantes del factor X que se pueden activar con trombina modificando los residuos P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>' que son en el factor X de tipo silvestre Leu-Thr-Arg-Ile-Val-Gly a X-Pro-Arg-Ala-Y-Z.

- 5 Volkel et al. (2005). Mol. Biotechnol. 29(1):19-30 describen la introducción de un nuevo sitio de escisión para proteasa en el péptido de activación de FX, de tal manera que el antígeno específico de la próstata activa específicamente dicha variante de FX.

10 Aunque algunos autores han sugerido que el factor X activado (FXa) se podría utilizar como un agente hemostático de actividad correctora (Ni et al., 1992 (Thromb. Haemost. 67:264-271); Himmelsbach et al., 2002 (Thromb. Haemost. 88:1003-1011)), sigue habiendo alguna preocupación porque tales preparaciones farmacéuticas pueden ser trombogénicas y podrían conducir a una coagulación intravascular diseminada (CID).

15 El uso terapéutico del zimógeno del factor X no activado parece ser un enfoque mucho más seguro. El documento de patente de EE.UU. 4.501.731 (prioridad de 27 de junio 1983) sugiere el uso del factor X solo como un agente hemostático de actividad correctora. En el documento WO 03/006054 (prioridad: 10 de julio 2001) se ha mostrado además que el factor X es capaz en composiciones farmacéuticas, en combinación con FVIIa, de mejorar sinérgicamente la eficacia hemostática de FVIIa.

20 Sin embargo, como la eficacia de la activación del factor X a través de la vía intrínseca de la coagulación se ve gravemente comprometida en pacientes con inhibidores, mientras que la vía extrínseca de la coagulación (debido a la disponibilidad limitada de factor tisular) parece estar limitada a la fase de iniciación de la coagulación, es ventajoso modificar el factor X de tal manera que se facilite su activación en situaciones en las que se necesite una coagulación y evitar la necesidad de cofactores con disponibilidad y/o actividad limitadas. El zimógeno de la variante del factor X debe ser estable para que pueda ser producido y administrado sin activación, pero que en caso de que sea necesaria una actividad coagulante (por ejemplo, generación de trombina), la activación se produzca a velocidades más elevadas sin necesidad de los activadores naturales de la vía intrínseca y la extrínseca de la coagulación.

25 Se ha descrito que varios autores intentaron generar variantes del factor X que se pueden activar con proteasas que no escinden de forma natural ni activan FX. Estas variantes del factor X, que consistían en deleciones del péptido de activación y/o en la modificación de la secuencia del péptido de activación anterior al sitio de escisión en Arg234, opcionalmente también permitían la modificación de Ile235. Como también se ha mostrado (Rudolph et al., 2002 (Thromb Haemost., 88:756-62) que un efecto primario del péptido de activación del factor X es evitar la autoactivación a FXa, las variantes del factor X con deleciones y modificaciones del péptido de activación son susceptibles de una activación prematura. Las composiciones farmacéuticas que comprenden tales variantes de FX podrían, por tanto, suponer un riesgo trombogénico.

35 Uno de los problemas abordados en la presente invención es identificar agentes hemostáticos de actividad correctora. En particular, existe una necesidad de agentes hemostáticos de actividad correctora, que se puedan utilizar para tratar pacientes que tienen un título elevado de inhibidores del factor VIII.

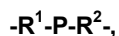
40 En la presente invención se ha encontrado sorprendentemente que variantes del factor X biológicamente activas que tienen una actividad hemostática correctora mejorada, se pueden obtener insertando un sitio adicional de escisión para una proteasa C-terminal a Ile235, en la cadena pesada del factor X, en donde el sitio de escisión adicional se inserta entre Ile235 y Val236, o entre Val236 y Gly237 o entre Gly237 y Gly238 en la cadena pesada del factor X y en donde están excluidas las deleciones en la secuencia del péptido de activación del factor X - de manera que proteasas, que activan de forma natural el factor X, ya no son capaces de escindir y activar dicha variante del factor X.

45 La escisión mediante dicha proteasa del sitio de escisión adicional conduce a la activación de la variante del factor X además de la activación potencial a través de la escisión del sitio de escisión natural. Las variantes del factor X de la presente invención pueden tener modificaciones adicionales, en particular, en otras regiones de la secuencia del factor X. Por consiguiente, la inserción en la cadena pesada del factor X puede ser una de varias modificaciones en la secuencia de aminoácidos, en comparación con la secuencia de tipo silvestre tal y como se muestra en SEQ ID NO: 2.

50 De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, el nuevo sitio de escisión para una proteasa en la cadena pesada de dicha variante del factor X modificado se puede escindir con una proteasa de serina. Más preferiblemente, la proteasa de serina se selecciona a partir del grupo que consiste en factor IIa, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, proteína C activada, elastasa o caliceína. Las secuencias de aminoácidos que son reconocidas y escindidas por estas proteasas de serina son conocidas por un experto normal en la técnica (por ejemplo, tal y como se describe en "Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice", cuarta edición, Colman et al. 2001 factor IIa: p34-35, p176, factor IXa: p40-41, factor Xa: p34-35, factor XIa p128-129, factor XIIa: p194, aPC: p34-35, p159, caliceína: p103-104 o elastasa (O'Reilly et al., 1999; "Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin": Science, 285,1926-1928).

55 La inserción en la cadena pesada del factor X puede comprender uno o varios aminoácidos adicionales, que no son

necesarios para la escisión. Estos aminoácidos adicionales pueden estar en el extremo N-terminal y/o en el extremo C-terminal de la inserción. Por consiguiente, la inserción en la cadena pesada se puede representar por la siguiente fórmula:



5 en la que P designa la secuencia de aminoácidos reconocida y escindida por la proteasa de escisión (es decir, el sitio de escisión),

R<sup>1</sup> designa un enlace químico o uno o varios aminoácidos (por ejemplo, de 1 a 10 aminoácidos), y

R<sup>2</sup> designa un enlace químico o uno o varios aminoácidos (por ejemplo, 1 a 5 aminoácidos).

10 P tiene una longitud de al menos 3 aminoácidos y preferiblemente no más de 20 aminoácidos. Preferiblemente, R<sup>1</sup> es un enlace químico o consiste en 1, 2 o 3 aminoácidos. Se prefiere además que R<sup>2</sup> sea un enlace químico o que consista en 1 o 2 aminoácidos. Lo más preferido es que el aminoácido C-terminal al enlace químico que se escinde cuando el sitio de escisión de una proteasa recién introducido se escinde, sea isoleucina. También se prefiere valina en lugar de dicha isoleucina. Otros aminoácidos preferidos C-terminales en lugar de dicha isoleucina son alanina, serina o treonina.

15 Secuencias de aminoácidos adecuadas que se pueden insertar en la cadena pesada incluyen, pero no se limitan a las que pueden ser reconocidas y escindidas por proteasas de serina que se enumeran en la tabla 1 a continuación:

**Tabla 1: Ejemplos de inserciones de sitios de escisión**

Sitio de escisión obtenido a partir de	secuencia	SEQ ID NO
FVII humano	NASKPQGRI	SEQ ID NO 17
	KRNASKPQGRI	SEQ ID NO 18
	LEKRNASKPQGRI	SEQ ID NO 19
	NASKPQGRV	SEQ ID NO 20
	KRNASKPQGRV	SEQ ID NO 21
FIX humano	TQSTQSFNDFTRV	SEQ ID NO 22
	TQSFNDFTRV	SEQ ID NO 23
	SFNDFTRV	SEQ ID NO 24
	NDFTRV	SEQ ID NO 25
	FTRV	SEQ ID NO 26
	TQSTQSFNDFTRI	SEQ ID NO 27
	TQSFNDFTRI	SEQ ID NO 28
	SFNDFTRI	SEQ ID NO 29
	NDFTRI	SEQ ID NO 30
	FTRI	SEQ ID NO 31
FIX bovino	NQSFDEFSRI	SEQ ID NO 32
FIX canino	TQPLNDFTRI	SEQ ID NO 33
FIX de murido	SESLNDFTRI	SEQ ID NO 34
FIX de conejo	SQSSDDFTRI	SEQ ID NO 35
bucle del sitio reactivo de ATIII humano	GSEAAASTAV VIAGRI	SEQ ID NO 36
	GSEAAASTAV VIAGRSI	SEQ ID NO 37

Sitio de escisión obtenido a partir de	secuencia	SEQ ID NO
	GSEAAASTAV VIAGRV	SEQ ID NO 38

La secuencia de aminoácidos insertada (-R<sup>1</sup>-P-R<sup>2</sup>-), abarca por lo menos 3 aminoácidos. Preferiblemente, la inserción de aminoácidos que comprende el sitio de escisión consiste en 3 a 50, más preferiblemente de 4 a 30, más preferiblemente de 4 a 20, más preferiblemente de 5 a 15. Otros fragmentos de sitios de escisión de proteasa también se incluyen en la invención, tal y como se ejemplifica en una serie de mutantes por delección del sitio de escisión de la proteasa del factor IX (SEQ ID NO 22 a SEQ ID NO 31 en la tabla 1), siempre y cuando la variante de FX que comprende dicho sitio de escisión fragmentado de una proteasa siga siendo susceptible a una escisión y dicha variante de FX todavía tenga actividad biológica.

Las variantes del factor X de la invención tienen actividad biológica. La expresión "actividad biológica", tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a actividad de factor X. Una proteína que tiene actividad de factor X significa que la proteína en su forma de zimógeno se puede activar mediante escisión con una proteasa y tiene en su forma activada, actividad de factor Xa. La actividad de factor X se puede determinar en un ensayo de coagulación *in vitro*. Por ejemplo, la actividad de factor X se puede determinar en un ensayo de tiempo de protrombina (PT) midiendo la actividad de la vía de coagulación extrínseca, tal como se describe en el Ejemplo 4. La actividad de factor X, expresada como actividad de coagulación en una muestra, se proporciona como mU/ml.

La actividad de factor X así determinada se puede referir a la cantidad de antígeno del factor X presente en la muestra, obteniendo de este modo la "actividad específica" de la variante, expresada de modo ejemplar en U/mg o mU/μg de proteína. La actividad específica de las variantes de la invención es preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 75% de la actividad de factor X de una molécula de factor X recombinante que tiene la secuencia de tipo silvestre tal y como se muestra en SEQ ID NO: 2.

Las variantes del factor X de la invención tienen además una actividad hemostática correctora. Esta actividad se puede determinar tal y como se describe en el Ejemplo 4, midiendo la actividad coagulante (aPTT) usando plasma con FVIII o FIX disminuidos. La actividad coagulante en tales ensayos se incrementa preferiblemente más de 70 veces, más preferiblemente 100 veces, lo más preferiblemente más de 500 veces la del factor X recombinante que tiene la secuencia de tipo silvestre.

Las variantes del factor X recombinantes modificadas, biológicamente activas preferidas de acuerdo con la invención son variantes del factor X que tienen actividad hemostática correctora mejorada, en comparación con variantes del factor X con una modificación dentro de la secuencia del péptido de escisión de activación del factor X de origen natural, representando dicha modificación un sitio de escisión de una proteasa que no corta de forma natural en esta zona de la secuencia del factor X y que, tras la escisión de dicho sitio de escisión adicional, activa dicha variante del factor X.

Otro aspecto de la invención es un método para producir un agente hemostático de actividad correctora, que comprende la inserción de un sitio de escisión de proteasa en la cadena pesada de la secuencia de aminoácidos del factor X. Preferiblemente, el sitio de escisión se inserta de forma C-terminal a Ile235. Las realizaciones preferidas de este método corresponden a las realizaciones preferidas de la variante del factor X descritas en el presente documento.

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica un factor X humano modificado, tal y como se describe en esta solicitud. El término "polinucleótido(s)" se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. El polinucleótido puede ser ADN monocatenario o bicatenario, ARN monocatenario o bicatenario. Tal y como se emplea en esta memoria, el término "polinucleótido(s)" incluye también ADNs o ARNs que comprenden una o varias bases modificadas y/o bases inusuales, tales como inosina. Se apreciará que se puede realizar una variedad de modificaciones en el ADN y el ARN que cumplen muchas funciones útiles, conocidas por los expertos en la técnica. El término "polinucleótido(s)", tal y como se emplea en este documento, abarca tales formas de polinucleótidos modificados de forma química, enzimática o metabólica, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo, por ejemplo, células simples y complejas.

El experto en la materia comprenderá que debido a la degeneración del código genético, un polipéptido dado puede estar codificado por diferentes polinucleótidos. Estas "variantes" están incluidas en esta invención.

Preferiblemente, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido aislado. El término polinucleótido "aislado" se refiere a un polinucleótido que está sustancialmente exento de otras secuencias de ácidos nucleicos, tales como y sin estar limitadas a las mismas, otros ADNs y ARNs cromosómicos y extracromosómicos. Los polinucleótidos aislados se pueden purificar a partir de una célula hospedadora. Los métodos de purificación convencionales de ácido nucleico conocidos por los expertos en la técnica se pueden utilizar para obtener polinucleótidos aislados. El término también incluye polinucleótidos recombinantes y polinucleótidos sintetizados químicamente.

Aún otro aspecto de la invención es un plásmido o un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el plásmido o el vector es un vector de expresión. En una realización particular, el vector es un vector de transferencia para uso en terapia génica humana.

5 Todavía otro aspecto de la invención es una célula hospedadora que comprende un polinucleótido de la invención o un plásmido o un vector de la invención.

Las células hospedadoras de la invención se pueden emplear en un método para producir un homólogo modificado del factor X humano, que es parte de esta invención. El método comprende:

- a) cultivar células hospedadoras de la invención en condiciones tales que el homólogo modificado del factor X humano se expresa; y
- 10 b) recuperar opcionalmente el homólogo modificado del factor X humano a partir de las células hospedadoras o del medio de cultivo.

15 El grado y la ubicación de la glicosilación o de otras modificaciones posteriores a la traducción pueden variar dependiendo de las células hospedadoras escogidas y de la naturaleza del entorno celular del hospedador. Cuando se hace referencia a secuencias específicas de aminoácidos, las modificaciones posteriores a la traducción de tales secuencias están incluidas en esta solicitud.

El "factor X", tal y como se usa en esta solicitud significa un producto que consiste en la forma no activada (factor X). El "factor X" de la definición anterior incluye proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos del factor X humano natural. También incluye proteínas con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, un extremo N-terminal modificado que incluye deleciones o adiciones de aminoácidos N-terminales, siempre que esas proteínas conserven sustancialmente la actividad de factor Xa. El "factor X" de la definición anterior también incluye variaciones alélicas naturales que pueden existir y presentarse de un individuo a otro. El "factor X" de la definición anterior incluye además variantes del factor X. Tales variantes difieren en uno o varios residuos de aminoácidos de la secuencia de tipo silvestre. Ejemplos de tales diferencias pueden incluir el truncamiento del extremo N-terminal y/o C-terminal a través de uno o varios residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1 a 10 residuos de aminoácidos), o la adición de uno o varios residuos extra en el extremo N-terminal y/o C-terminal, por ejemplo, la adición de un residuo de metionina en el extremo N-terminal, así como sustituciones conservadoras de aminoácidos, es decir, sustituciones realizadas dentro de grupos de aminoácidos con características similares, por ejemplo, (1) aminoácidos pequeños, (2) aminoácidos ácidos, (3) aminoácidos polares, (4) aminoácidos básicos, (5) aminoácidos hidrófobos, (6) aminoácidos aromáticos. Ejemplos de tales sustituciones conservadoras se muestran en la tabla 2.

30 **Tabla 2: Ejemplos de sustituciones conservadoras**

(1)	Alanina	Glicina		
(2)	Ácido aspártico	Ácido glutámico		
(3a)	Asparagina	Glutamina		
(3b)	Serina	Treonina		
(4)	Arginina	Histidina	Lisina	
(5)	Isoleucina	Leucina	Metionina	Valina
(6)	Fenilalanina	Tirosina	Triptófano	

El término "recombinante" significa, por ejemplo, que la variante se ha producido en un organismo hospedador mediante técnicas de ingeniería genética.

**Expresión de las variantes propuestas:**

35 La producción de proteínas recombinantes a niveles elevados en células hospedadoras adecuadas, requiere el ensamblaje de los ADNc modificados mencionados anteriormente en las unidades transcripcionales eficaces, junto con elementos reguladores adecuados, en un vector de expresión recombinante que se pueden propagar en diferentes sistemas de expresión de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los elementos reguladores de la transcripción eficaces se podrían obtener a partir de virus que tienen células animales como hospedadores naturales de los mismos o a partir del ADN cromosómico de células animales. Preferiblemente, se pueden utilizar las combinaciones de promotor-potenciador obtenidas a partir del virus de simio 40, adenovirus, virus de polioma BK, ci-

5 tomealgavirus humano o la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, o combinaciones de promotor-potenciador que incluyen genes transcritos ampliamente de forma constitutiva en células animales, como beta-actina o GRP78. Con el fin de lograr niveles altos estables de ARNm transcrito a partir de los ADNc, la unidad transcripcional debe contener en su parte 3' proximal, una región de ADN que codifica una secuencia de terminación de la transcripción-poliadenilación. Preferiblemente, esta secuencia se obtiene a partir de la región de transcripción temprana del virus de simio 40, del gen de beta-globina de conejo o del gen activador de plasminógeno tisular humano.

10 Los ADNc se integran a continuación en el genoma de una línea celular hospedadora adecuada para la expresión de la variante del factor X. Preferiblemente, esta línea celular debería ser una línea celular animal de origen vertebrado a fin de asegurar un plegamiento correcto, una síntesis del dominio Gla, una formación de enlace disulfuro, una glicosilación ligada a asparagina, una glicosilación ligada a O, y otras modificaciones posteriores a la traducción, así como la secreción en el medio de cultivo. Ejemplos de otras modificaciones posteriores a la traducción son la hidroxilación y el procesamiento proteolítico de la cadena de polipéptido naciente. Ejemplos de líneas celulares que se pueden utilizar son células COS de mono, células L de ratón, células C127 de ratón, células BHK-21 de hámster, células 293 embrionarias humanas de riñón y preferiblemente células CHO de hámster.

15 El vector de expresión recombinante que codifica los ADNc correspondientes se puede introducir en una línea celular animal de varias formas diferentes. Por ejemplo, los vectores de expresión recombinantes se pueden crear a partir de vectores basados en diferentes virus animales. Ejemplos de éstos son vectores basados en baculovirus, virus vaccinia, adenovirus y preferentemente virus del papiloma bovino.

20 Las unidades de transcripción que codifican los ADNc correspondientes también se pueden introducir en células animales junto con otro gen recombinante que puede actuar como un marcador seleccionable dominante en estas células, con el fin de facilitar el aislamiento de clones de células específicas que han integrado el ADN recombinante en su genoma. Ejemplos de este tipo de genes marcadores seleccionables dominantes son la fosfotransferasa de amino-glicósido Tn5, que confiere resistencia a la geneticina (G418), la fosfotransferasa de higromicina, que confiere resistencia a la higromicina, y la acetil transferasa de puromicina, que confiere resistencia a la puromicina. El vector de expresión recombinante que codifica un marcador seleccionable de este tipo puede residir ya sea en el mismo vector que el que codifica el ADNc de la proteína deseada, o puede estar codificado en un vector distinto que se introduce simultáneamente y se integra en el genoma de la célula hospedadora, dando como resultado frecuentemente una ligación física fuerte entre las diferentes unidades de transcripción.

25 Otros tipos de genes marcadores seleccionables, que se pueden utilizar junto con el ADNc de la proteína deseada, se basan en diversas unidades de transcripción que codifican la reductasa de dihidrofolato (dhfr). Después de la introducción de este tipo de gen en células que carecen de actividad dhfr endógena, preferentemente células CHO (DUKX-B11, DG-44), será posible que crezcan en medios que carecen de nucleósidos. Un ejemplo de un medio de este tipo es F12 de Ham sin hipoxantina, timidina y glicina. Estos genes dhfr se pueden introducir junto con unidades de transcripción de ADNc del factor de coagulación en células CHO del tipo anterior, ligados en el mismo vector o en diferentes vectores, creando de este modo líneas celulares positivas para dhfr que producen proteína recombinante.

30 Si las líneas celulares anteriores se cultivan en presencia de metotrexato citotóxico inhibidor de dhfr, se pondrán de manifiesto nuevas líneas celulares resistentes al metotrexato. Estas líneas celulares pueden producir proteína recombinante con una tasa incrementada debido al número amplificado de dhfr ligada y las unidades de transcripción de la proteína deseada. Cuando estas líneas celulares se propagan en concentraciones crecientes de metotrexato (1-10000 nM), se pueden obtener nuevas líneas celulares que producen la proteína deseada con una tasa muy elevada.

35 Las líneas celulares anteriores que producen la proteína deseada se pueden cultivar a gran escala, ya sea en cultivo en suspensión o sobre diversos soportes sólidos. Ejemplos de estos soportes son microsoportes que se basan en matrices de dextrano o de colágeno, o soportes sólidos en forma de fibras huecas o diversos materiales cerámicos. Cuando se cultiva en un cultivo celular en suspensión o en microsoportes, el cultivo de las líneas celulares anteriores se puede realizar ya sea como un cultivo en un baño o como un cultivo por perfusión, con una producción continua de medio condicionado durante periodos de tiempo prolongados. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, las líneas celulares anteriores son muy adecuadas para el desarrollo de un procedimiento industrial para la producción de las proteínas recombinantes deseadas.

40 La proteína recombinante, que se acumula en el medio de células secretoras de los tipos anteriores, se puede concentrar y purificar mediante una variedad de métodos bioquímicos y cromatográficos, incluyendo métodos que utilizan diferencias en el tamaño, la carga, la hidrofobicidad, la solubilidad, la afinidad específica, etc., entre la proteína deseada y otras sustancias en el medio de cultivo celular.

45 Un ejemplo de tal purificación es la adsorción de la proteína recombinante a un anticuerpo monoclonal, que está inmovilizado sobre un soporte sólido. Después de la desorción, la proteína se puede purificar adicionalmente por una variedad de técnicas cromatográficas basadas en las propiedades anteriores.

Se prefiere purificar la variante modificada del factor X biológicamente activa de la presente invención hasta tener  $\geq 80\%$  de pureza, más preferiblemente  $\geq 95\%$  de pureza, y se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente

puro, que es superior a 99,9% puro con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y está exento de agentes infecciosos y pirógenos. Preferiblemente, una variante modificada del factor X biológicamente activa, aislada o purificada de la invención está sustancialmente exenta de otros polipéptidos.

- 5 Las proteínas recombinantes descritas en esta invención se pueden formular en preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. Las proteínas purificadas se pueden disolver en soluciones tampón acuosas fisiológicamente compatibles convencionales a las que se puede añadir, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas.

10 Tales vehículos y excipientes farmacéuticos así como formulaciones farmacéuticas adecuadas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)). En particular, la composición farmacéutica que comprende la variante de polipéptido de la invención se puede formular en forma liofilizada o soluble estable. La variante de polipéptido se puede liofilizar a través de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes del uso  
15 mediante la adición de uno o varios diluyentes farmacéuticamente aceptables, tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

Las formulaciones de la composición se suministran al individuo a través de cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen varios sistemas de entrega y se pueden utilizar para administrar la composición por cualquier vía conveniente. Preferentemente las composiciones de la invención se administran sistémicamente. Para uso sistémico, las variantes del factor X de la invención se formulan para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmica) o entérica (por ejemplo, oral, vaginal o rectal) de acuerdo con métodos convencionales. La ruta de administración más preferida es la administración intravenosa. Las formulaciones se pueden administrar continuamente mediante infusión o inyección en bolo. Algunas formulaciones incluyen sistemas de liberación lenta.

25 Las variantes modificadas del factor X biológicamente activas de la presente invención se administran a pacientes en una dosis terapéuticamente eficaz, lo que significa una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados, prevenir o disminuir la gravedad o la extensión del trastorno o la indicación que se está tratando, sin llegar a alcanzar una dosis que produzca efectos secundarios adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores como, por ejemplo, la indicación, la formulación, el modo de administración y se tiene que determinar en ensayos preclínicos y clínicos para cada indicación respectiva.  
30

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar sola o junto con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden incorporar como parte del mismo agente farmacéutico.

Otro aspecto de la invención es el uso de un homólogo modificado del factor X humano, tal y como se describe en el presente documento, de un polinucleótido de la invención, de un plásmido o un vector de la invención o de una célula hospedadora de la invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno de la coagulación sanguínea. Los trastornos de la coagulación sanguínea incluyen pero no se limitan a hemofilia A, hemofilia B, o déficit de FVII/FVIIa. Preferiblemente, estas enfermedades se producen por anticuerpos autoinmunes contra los factores de coagulación respectivos o las formas congénitas se agravan por anticuerpos autoinmunes contra los factores de coagulación respectivos. En una realización específica, los pacientes que se van a tratar tienen anticuerpos inhibidores contra el factor VIII. Preferiblemente, el tratamiento comprende una terapia génica humana.  
35  
40

La invención también se refiere a un método de tratamiento de un individuo que padece un trastorno de la coagulación sanguínea, tal como hemofilia A, hemofilia B o un déficit de FVII/FVIIa, preferiblemente estas enfermedades son causadas por anticuerpos autoinmunes contra los factores de coagulación respectivos o las formas congénitas se agravan por anticuerpos autoinmunes contra los factores de coagulación respectivos. El método comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del homólogo modificado del factor X humano, tal y como se ha descrito en el presente documento. En otra realización, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del polinucleótido de la invención o de un plásmido o vector de la invención. Alternativamente, el método puede comprender administrar al individuo una cantidad eficaz de las células hospedadoras de la invención descritas en el presente documento.  
45  
50

#### Descripción de las tablas y los dibujos:

##### Figura 1:

Esquema de la secuencia de ácido nucleico que codifica el sitio de escisión insertado para una proteasa de la variante de FX codificada por la estructura artificial pFX 619, tal y como se describe en el ejemplo 1.

##### 55 Figura 2:

Esquema de FX de tipo silvestre y de variantes de FX con sitios de escisión para proteasa introducidos recientemente

te. Los números se refieren a la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO 2, en donde el péptido de activación se define como la secuencia de aminoácidos entre Arg182 e Ile235. Secuencias de activación ajenas obtenidas a partir del factor IX, se describen en negrita. Los aminoácidos subrayados indican mutaciones puntuales que hacen que la molécula respectiva del factor X no se pueda activar con el complejo tenasa y el factor VIIa/factor tisular, respectivamente. La estructura artificial "pFX-532" se corresponde a la secuencia del factor X de tipo silvestre.

### Figura 3:

Secuencia de nucleótidos y secuencia proteica del factor X de tipo silvestre.

### Ejemplos:

#### Ejemplo 1: Construcción de plásmidos de expresión

La secuencia que codifica el factor X se amplificó mediante PCR a partir de una genoteca de ADNc de hígado humano (Ambion) usando los cebadores We1292 y We1293 (SEQ ID NO 3 y 4). En una segunda ronda de PCR utilizando los cebadores We1354 y We1355 (SEQ ID NO 5 y 6) se introdujo un sitio de corte para la endonucleasa de restricción NheI en el extremo 5' y un sitio de corte para la endonucleasa de restricción NotI se introdujo en el extremo 3' del fragmento. El fragmento de PCR se insertó a continuación en los sitios NheI / NotI de pIRESpuro3 (BD Biosciences). El plásmido resultante se designó pFX-445.

Para mejorar el procesamiento del propéptido, el sitio de corte se mejoró mediante la sustitución del aminoácido treonina en la posición 39 (SEQ ID NO 2) por arginina (Rudolph et al., 1997 (Protein Expression and Purification 10:373-378)). Para ello, pFX-445 fue sometido a mutagénesis dirigida al sitio utilizando los oligonucleótidos We1482 y We1483 (SEQ ID NO 7 y 8) de acuerdo con métodos convencionales (kit para mutagénesis dirigida al sitio de Quickchange XL, Stratagene). El plásmido resultante se denominó pFX-532.

Todas las mutaciones descritas a continuación se realizaron con un kit de mutagénesis disponible comercialmente (QuickChange XL "Site Directed Mutagenesis Kit", Stratagene). Basándose en pFX-532, se generaron estructuras artificiales con sitios de escisión para el factor XIa. La mutagénesis por sustitución utilizando los oligonucleótidos We1444 y We1445 (SEQ ID NO 9 y 10) dio como resultado el plásmido pFX-535 con una sustitución de 8 aminoácidos de la región de activación del factor X (aminoácidos 225-233 de SEQ ID NO 2) por 8 aminoácidos de la región de activación de FIX (Figura 3).

La mutagénesis por inserción que emplea los oligonucleótidos We1561a y We1562a (SEQ ID NO 11 y 12) dio como resultado el plásmido pFX-619 con una inserción de 10 aminoácidos de la región de activación de FIX entre la posición de aminoácidos 235 y 236 del factor X (SEQ ID NO 2).

La mutagénesis dirigida al sitio que emplea los oligonucleótidos We1567 y We1568 (SEQ ID NO 13 y 14) en pFX-532, se utilizó para generar el plásmido pFX-641. Contenia dos mutaciones en el péptido de activación del factor X, Leu232Asp y Thr233Asp, generando de este modo una molécula de factor X que no se podía activar. De manera similar, los cebadores We1587 y We1588 (SEQ ID NO 15 y 16) se aplicaron sobre el plásmido pFX-619, generando de este modo el plásmido pFX-635 (Figura 2)

#### Ejemplo 2: Transfección y expresión de moléculas modificadas del factor X

Los plásmidos se dejaron crecer en TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) y se purificaron utilizando protocolos convencionales (Qiagen). Las células HEK 293 se transfectaron usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se dejaron crecer en medio exento de suero (Invitrogen 293 Express) en presencia de 50 ng/ml de vitamina K y 4 µg/ml de pueromicina. Aproximadamente cuatro semanas después de la transfección se recogió el material sobrenadante para la caracterización bioquímica.

#### Ejemplo 3: Caracterización de las variantes recombinantes del factor X

La expresión de las variantes del factor X se controló mediante ELISA cuantitativo usando anticuerpos monoclonales contra el factor X. La integridad de las proteínas recombinantes se analizó posteriormente mediante SDS-PAGE y transferencia Western. Las muestras se analizaron en condiciones reducidas y no reducidas. El factor X plasmático sirvió como un testigo natural del peso molecular. El factor Xa se utilizó para detectar y comparar cualquier variante recombinante activada del factor X, en caso de activación automática. Tal y como se visualizaba en transferencias Western, todas las variantes recombinantes del factor X se expresaron con el peso molecular correcto de aproximadamente 58 kDa, y migraron a una posición comparable a la del factor X plasmático. Cuando se reducían, las variantes recombinantes del factor X se disgregaban en una cadena pesada (HC) de aproximadamente 40 kDa y una cadena ligera (LC) de aproximadamente 20 kDa. La banda de 58 kDa representaba un factor X de una sola cadena sin procesar (OC). No se detectó ni factor Xa ni ningún agregado del factor X en las transferencias Western.

#### Ejemplo 4: Investigación de las actividades *in vitro* de las variantes recombinantes del factor X en plasmas que carecen de factor X humano, factor VIII humano y factor IX humano, así como en plasma humano inhibidor

La actividad del factor X se determinó en un ensayo de tiempo de protrombina (PT) midiendo la actividad de la vía de coagulación extrínseca. Se mezclaron 100 µl de plasma carente de factor X con 100 µl de material sobrenadante de un cultivo celular de variante del factor X o de proteína purificada. Después de una incubación durante 60 segundos a 37°C, 200 µl de Thromborel (Dade Behring), que contenían tromboplastina obtenida a partir de plasma humano, CaCl<sub>2</sub> y fosfolípidos, se añadieron a la mezcla y se determinó el tiempo de coagulación en segundos mediante el uso de un temporizador de la coagulación de Schnittger & Gross. Para la determinación de la actividad del factor X, el ensayo se calibró usando un patrón del factor X plasmático. El material sobrenadante del cultivo celular de pFX-641 con factor X mutado, puede servir como testigo negativo para este ensayo. Este mutante alberga un sitio de corte inutilizado dentro del péptido de activación del factor X de tipo silvestre como el de pFX635. Como era de esperar, cuando el mutante se sometió a ensayo con niveles de antígeno equivalentes a 216,4 U/ml de factor X, la actividad de coagulación alcanzó solo 0,5 mU/ml.

El factor X recombinante de tipo silvestre obtenido a partir de pFX532, así como las variantes de factor X obtenidas a partir de pFX535, pFX619, y pFX635 se purificaron y el antígeno se determinó por ELISA utilizando anticuerpos específicos de antígeno del factor X, con concentraciones en el intervalo de 2,8 hasta 4,3 U/ml. Para excluir la perturbación de la medición del factor X por el factor Xa, el factor Xa se determinó mediante un ensayo cromogénico (Dade Behring). Todas las variantes del factor X purificadas solo contenían niveles de factor Xa de 0,028 hasta 0,051 mU/ml (Tabla 3), sin interferir significativamente con la determinación del factor X.

Con el fin de comparar entre sí las variantes expresadas del factor X, se determinaron las actividades coagulantes del factor X y se ajustaron a aproximadamente 1,5 mU/ml. Todas las variantes sometidas a ensayo eran funcionalmente activas, lo que daba como resultado unas actividades coagulantes entre 1,48 y 1,72 mU/ml (Tabla 3).

La funcionalidad de las variantes recombinantes del factor X en plasmas carentes de FIX y FVIII se sometió a ensayo en tiempo de protrombina parcial activado (aPTT) midiendo la actividad de la cascada de coagulación intrínseca. Se mezclaron 100 µl de plasma con FVIII o FIX disminuido con 100 µl de material sobrenadante de un cultivo celular con variante del factor X o de proteína purificada. Después de incubar durante 6 minutos a 37°C, se añadieron 100 µl de Pathromptin (Dade Behring) que contenía SiO<sub>2</sub>, fosfolípidos y NaCl 40 mM así como 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 25 mM para iniciar la reacción de coagulación. El tiempo de coagulación en segundos se determinó mediante el uso de un temporizador de la coagulación de Schnittger & Gross. La actividad se expresó como equivalentes respectivos de la coagulación de FX en comparación con plasma humano convencional.

El factor X recombinante de tipo silvestre alcanzó actividades coagulantes de solo 6,6 mU/ml en plasma con factor VIII disminuido y de tan solo 5,8 mU/ml en plasma con FIX disminuido, tal y como se esperaba. Por el contrario, las variantes del factor X alcanzaban actividades coagulantes en el intervalo de 423,7 hasta 8545,8 mU/ml en plasma con factor VIII disminuido y de 272,3 mU/ml a 4620,2 mU/ml en plasma con FIX disminuido. Esto demuestra la funcionalidad del sitio de escisión insertado del factor XIa, que cambia FX en un agente hemostático de actividad coorrectora activo para la coagulación (Tabla 3).

Sorprendentemente, y aunque todas las variantes recombinantes del factor X se ajustaron a las actividades coagulantes del factor X, las variantes del factor X obtenidas a partir de pFX-619 y pFX635 desarrollaron fuertes actividades coagulantes de 8545,8 y 2692,0 mU/ml, respectivamente, mientras que la variante del factor X obtenida a partir de pFX535 alcanzaba solo 423,7 en plasma con FVIII disminuido (Tabla 2). Las variantes obtenidas a partir de pFX619 y pFX635 difieren de pFX535 en que la nueva secuencia de activación del factor IX en pFX-619 y pFX-635 se ha insertado en el extremo amino de la cadena pesada, C-terminal a Ile235, manteniendo la secuencia completa del péptido de activación del factor X. La variante del factor X obtenida a partir de pFX535 se corresponde a las variantes del factor X descritas en el documento WO 01/10896 que tienen la nueva secuencia de activación del factor IX insertada dentro de la región del péptido de activación de FX de tipo silvestre N-terminal a Ile235, mientras que pFX619 y pFX635 son variantes del factor X de la presente invención. Curiosamente, las variantes del factor X codificadas por pFX619 y pFX635 desarrollaron también una fuerte actividad coagulante de 4620,2 y 1644,8 mU/ml, respectivamente en plasma con FIX disminuido, mientras que la variante del factor X obtenida a partir de pFX535 solo alcanzaba 272,3 mU/ml, confirmando los resultados obtenidos en el ensayo de coagulación de FVIII o FIX basado en plasma con FVIII o FIX disminuidos, respectivamente. (Tabla 2).

La determinación de la actividad funcional se llevó a cabo adicionalmente usando plasma que contenía inhibidor de FVIII procedente de un paciente con hemofilia A. El plasma del paciente contenía aproximadamente 300 unidades Bethesda de inhibidores de FVIII por ml. La coagulación se determinó en aPTT y las muestras se ajustaron a la coagulación del factor X, tal y como se ha descrito anteriormente.

Mientras que el testigo de tampón de la muestra utilizado para la dilución de los patrones y las muestras de ensayo alcanzaba tiempos de coagulación de 156,5 segundos, el factor X recombinante de tipo silvestre llegó a tiempos de coagulación de 111,4 segundos. Confirmando los resultados sorprendentes en el ensayo de coagulación de FVIII o FIX basado en plasma con FVIII o FIX disminuidos, las variantes del factor X obtenidas a partir de pFX619 y pFX635 alcanzaron en un ensayo FEIBA basado en un plasma que contenía anticuerpos inhibidores de FVIII, tiempos de coagulación de 33,7 y 38,4 segundos, siendo significativamente más cortos que los tiempos de coagulación respectivos obtenidos cuando se utilizó la variante del factor X pFX535 con 51,1 segundos.

Resumiendo, se mostró que las variantes del factor X eran funcionalmente activas como agentes hemostáticos de actividad correctora, y que estas variantes del factor X mostraban actividad coagulante en el plasma de pacientes con hemofilia A que contenía inhibidores del factor VIII. Para nuestra sorpresa, variantes del factor X codificadas por pFX619 y pFX635 mostraron una actividad coagulante mucho más fuerte en plasma con el factor VIII y el factor IX disminuidos, que cuando se compararon con la variante del factor X codificada por pFX535 cuando se ajustaba a los mismos equivalentes de coagulación del factor X.

**Tabla 3: Determinación de las actividades de antígeno y de coagulación de pFX532, pFX535, pFX619 y pFX635**

	Equivalencia con FX			Actividades correctoras		
	Antígeno de FX (ELISA)	Actividad de FX (PT)	Actividad de FXa (ensayo cromogénico)	Actividad (aPPT) en plasma con FVIII disminuido	Actividad (aPPT) en plasma con FIX disminuido	Actividad FEIBA (en plasma que contiene inhibidor de FVIII)
Proteínas expresadas	IU/ml	IU/ml	mIU/ml	mIU/ml	mIU/ml	Tiempo de coagulación (s)
pFX532 (de tipo silvestre)	4,3	1,72	0,028	6,6	5,8	111,4
pFX535 (comparación con el documento WO 01/10896)	3,5	1,62	0,023	423,7	272,3	51,1
pFX619 (ejemplo)	2,8	1,52	0,028	8545,8	4620,2	33,7
pFX635 (ejemplo)	3,4	1,48	0,051	2692,0	1644,8	38,4

#### 10 **Ejemplo 5: Purificación de las variantes recombinantes del factor X mediante cromatografía de afinidad con anticuerpo monoclonal**

La purificación de la variante del factor X recombinante pFX635 sirve como un ejemplo para todas las variantes del factor X purificadas. Anticuerpos monoclonales FX-13 (ZLB Behring), específicos del factor X, se acoplaron a Sefarosa activada con CNBr. La resina de afinidad resultante se vertió en una columna cromatográfica de Pharmacia XK 16 para formar una matriz de afinidad de 1,6 cm de diámetro y 1,8 cm de altura, lo que daba como resultado 3,6 ml de gel. La matriz de afinidad se almacenó en NaCl 2,5 M, di-sodio-hidrógeno-fosfato 10 mM. Antes de su uso, el gel se equilibró con 10 volúmenes de gel de citrato tri-sódico 20 mM, NaCl 0,15 M a pH 7,0-HCl.

El material sobrenadante del cultivo celular que contenía más de 100 mIU/ml de factor X-antígeno se dializó utilizando un tipo de tubo VISKING 32/36, en 2-4 l de tampón de equilibrio a 4-8°C durante una noche.

20 El gel de afinidad se cargó con 10 ml de material sobrenadante dializado con un caudal de 1 ml/min. El gel se lavó con 10 volúmenes de tampón de equilibrio y se eluyó posteriormente con glicina 0,1 M, pH 2,5-HCl. El material eluido se neutralizó con NaOH y se estabilizó con NaCl 1,0 M y caprilato de sodio 0,1 mg/ml.

25 Las muestras de material sobrenadante del cultivo celular de la variante del factor X pFX635, procedentes de la fracción de flujo a través y del material eluido se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior tinción con plata. Una banda proteica de 58 kDa se purificó por el método descrito anteriormente. La banda de 58 kDa se parece a la variante 635 del factor X, según se confirmó por transferencia Western analizada con anticuerpos anti-factor X.

#### **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> ZLB BEHRING GMBH

<120> Polipéptidos del factor X de coagulación con propiedades de activación modificadas

<130> 2005\_M003\_A95

<150> 05011773.8

<151> 2005-06-01

<160> 38

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1467

<212> ARN

<213> Homo sapiens

10 <220>

<221> ADN

<222> (1)..(1467)

<400> 1

```

atggggcgcc cactgcacct cgtcctgctc agtgcctccc tggctggcct cctgctgctc      60
gggaaagtc tgttcatccg caggagcag gccacaaca tcctggcgag ggtcacgagg      120
gccaattcct ttcttgaaga gatgaagaaa ggacacctcg aaagagagtg catggaagag      180
acctgctcat acgaagaggc ccgcgaggtc tttagggaca gcgacaagac gaatgaattc      240
tggataaat acaaagatgg cgaccagtgt gagaccagtc cttgccagaa ccagggcaaa      300
tgtaagacg gcctcgggga atacacctgc acctgtttag aaggattcga aggcataaac      360
tgtgaattat tcacacggaa gctctgcagc ctggacaacg gggactgtga ccagttctgc      420
cacgaggaac agaactctgt ggtgtgctcc tgcgcccgcg ggtacacctt ggctgacaac      480
ggcaaggcct gcattcccac agggccctac cctgtggga aacagacctt ggaacgcagg      540
aagaggtcag tggcccaggc caccagcagc agcggggagg cccctgacag catcacatgg      600
aagccatatg atgcagccga cctggacccc accgagaacc ccttcgacct gcttgacttc      660
aaccagacgc agcctgagag gggcgacaac aacctacca ggatcgtggg aggccaggaa      720
tgcaaggacg gggagtgtcc ctggcaggcc ctgctcatca atgaggaaaa cgagggtttc      780
tgtggtggaa ccattctgag cgagttctac atcctaaccg cagcccactg tctctaccaa      840
gccaagagat tcaaggtgag ggtaggggac cggaacacgg agcaggagga gggcgggtgag      900
gcggtgcacg aggtggaggt ggtcatcaag cacaaccggt tcacaaagga gacctatgac      960
ttcgacatcg ccgtgctccg gctcaagacc cccatcacct tccgcatgaa cgtggcgcct     1020
gcctgcctcc ccgagcgtga ctgggccgag tccacgctga tgacgcagaa gacggggatt     1080
gtgagcggct tcgggcgcac ccacgagaag ggcggcagc ccaccaggct caagatgctg     1140
gaggtgccct acgtggaccg caacagctgc aagctgtcca gcagcttcat catcacccag     1200
aacatgttct gtgccggcta cgacaccaag caggaggatg cctgccaggg ggacagcggg     1260
ggcccgcacg tcaccgcctt caaggacacc tacttctgta caggcatcgt cagctgggga     1320
gagggtctgt cccgtaaggg gaagtacggg atctacacca aggtcaccgc cttcctcaag     1380
tggatcgaca ggtccatgaa aaccaggggc ttgcccaagg ccaagagcca tgccccggag     1440
gtcataacgt cctctccatt aaagtga

```

<210>

15

<211> 488  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 5 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(488)

<400> 2

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  
 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  
 225 230 235 240  
 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  
 290 300  
 Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp  
 305 310 315 320  
 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  
 385 390 395 400  
 Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln  
 405 410 415  
 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> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <220>  
 <221> Cebador  
 10 <222> (1)..(20)  
  
 <400> 3  
 cagggacata gtactcggcc 20  
  
 <210> 4  
 <211> 22  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <220>  
 <221> Cebador  
 20 <222> (1)..(22)  
  
 <400> 4  
 gagtgggatc tcactttaat gg 22  
  
 <210> 5  
 <211> 28  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <220>  
 <221> Cebador  
 30 <222> (1)..(28)  
  
 <400> 5  
 gcggctagca tggggcgccc actgcacc 28  
  
 35 <210> 6  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <222> (1)..(36)  
  
 <400> 6  
 45 gcggcggcgc ctcactttaa tggagaggac gttatg 36  
  
 <210> 7  
 <211> 27

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 5 <220>  
 <221> Cebador  
 <222> (1)..(27)  
  
 <400> 7  
 cctggtgagg gtcaggaggg ccaattc 27  
  
 10 <210> 8  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 15 <223> Cebador  
  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <222> (1)..(27)  
  
 <400> 8  
 20 gaattgccc tcctgacct cgccagg 27  
  
 <210> 9  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <222> (1)..(50)  
  
 30 <400> 9  
 cagacgcagc ctaccaatc atitaatgac ttcactcgga tcgtgggagg 50  
  
 <210> 10  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <222> (1)..(50)  
  
 40 <400> 10  
 cctcccacga tccgagtga gtcattaaat gattgggtag gctgctctg 50  
 <210> 11  
 <221> 55  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <220>  
 50 <221> Cebador  
 <222> (1)..(55)

ES 2 445 394 T3

<400> 11  
 caacctcacc aggatcacc agagcttcaa cgacttcacc cgcattgtgg gaggc 55  
  
 <210> 12  
 <211> 55  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <220>  
 10 <221> Cebador  
 <222> (1)..(55)  
  
 <400> 12  
 gectcccaca atgcgggtga agtcggtgaa gctctgggtg atcctggtga ggtg 55  
  
 <210> 13  
 15 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <220>  
 20 <221> Cebador  
 <222> (1)..(28)  
  
 <400> 13  
 ggcgacaaca acgacgacag gatcgtgg 28  
  
 25 <210> 14  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Cebador  
  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <222> (1)..(28)  
  
 <400> 14  
 35 ccacgatcct gtcgctgtg ttgtcgcc 28  
  
 <210> 15  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 40 <223> Cebador  
  
 <220>  
 <221> Cebador  
 <222> (1)..(30)  
  
 <400> 15  
 45 ggcgacaaca acgatgacag gatcaccag 30  
  
 <210> 16  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>

<223> Cebador

<220>  
<221> Cebador  
<222> (1)..(30)

5 <400> 16  
ctgggtgatc ctgtcatcgt tgttgcgcc 30

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> sitio

<220>  
<221> SITIO  
15 <222> (1)..(9)

<400> 17  
**Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile**  
1 5

<210> 18  
<211> 11  
20 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sitio

<220>  
<221> Sitio  
25 <222> (1)..(11)

<400> 18  
**Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile**  
1 5 10

<210> 19  
<211> 13  
30 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> sitio

35 <220>  
<222> Sitio  
<222> (1)..(13)

<400> 19  
**Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile**  
1 5 10

40 <210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> sitio

<220>  
<221> Sitio  
<222> (1)..(9)

<400> 20  
**Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Val**  
 1 5

5 <210> 21  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sitio

10 <220>  
 <221> Sitio  
 <222> (1)..(11)

<400> 21  
**Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Val**

15 1 5 10

<210> 22  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sitio

<220>  
 <221> Sitio  
 <222> (1)..(13)

25 <400> 22  
**Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val**  
 1 5 10

<210> 23  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sitio

<220>  
 <221> sitio  
 35 <222> (1)..(10)

<400> 23  
**Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val**  
 1 5 10

<210> 24  
 <211> 8  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sitio

<220>  
 45 <221> Sitio  
 <222> (1)..(8)

<400> 24  
**Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val**  
 1 5

<210> 25  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sitio

<220>  
 <221> Sitio  
 <222> (1)..(6)

10 <400> 25  
**Asn Asp Phe Thr Arg Val**  
**1 5**

<210> 26  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Sitio

<220>  
 <221> Sitio  
 <222> (1)..(4)

20 <400> 26  
**Phe Thr Arg Val**  
**1**

<210> 27  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Sitio

<220>  
 <221> Sitio  
 <222> (1)..(13)

30 <400> 27  
**Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Ile.**  
**1 5 10**

<210> 28  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Sitio

<220>  
 <221> sitio  
 <222> (1)..(10)

40 <400> 28  
**Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Ile**  
**1 5 10**

45 <210> 29  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sitio

<220>  
<221> Sitio  
<222> (1)..(8)

5 <400> 29  
**Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Ile**  
**1 5**

<210> 30  
<211> 6  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sitio

<220>  
<221> Sitio  
15 <222> (1)..(6)

<400> 30  
**Asn Asp Phe Thr Arg Ile**  
**1 5**

<210> 31  
<211> 4  
20 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sitio

<220>  
<221> Sitio  
25 <222> (1)..(4)

<400> 31  
**Phe Thr Arg Ile**  
**1**

<210> 32  
30 <211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> sitio

35 <220>  
<221> Sitio  
<222> (1)..(10)

<400> 32  
**Asn Gln Ser Phe Asp Glu Phe Ser Arg Ile**  
**1 5 10**

40 <210> 33  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Sitio

<220>  
<221> Sitio  
<222> (1)..(10)

<400> 33  
**Thr Gln Pro Leu Asn Asp Phe Thr Arg Ile**  
**1 5 10**

<210> 34  
 <211> 10  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sitio

<220>  
 10 <221> Sitio  
 <222> (1)..(10)

<400> 34  
**Ser Glu Ser Leu Asn Asp Phe Thr Arg Ile**  
**1 5 10**

<210> 35  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sitio

<220>  
 20 <221> Sitio  
 <222> (1)..(10)

<400> 35  
**Ser Gln Ser Ser Asp Asp Phe Thr Arg Ile**  
**1 5 10**

<210> 36  
 <211> 16  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> Sitio

<220>  
 <221> Sitio  
 <222> (1)..(16)

<400> 36  
**Gly Ser Gln Ala Ala Ala Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Ile**  
**1 5 10 15**

<210> 37  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 40 <223> Sitio

<220>  
 <221> Sitio  
 <222> (1)..(17)

<400> 37  
**Gly Ser Gln Ala Ala Ala Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Ser**  
**1 5 10 15**

Ile

<210> 38  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Sitio

<220>  
<221> Sitio  
<222> (1)..(16)

10 <400> 38  
Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Val  
1 5 10 15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una variante del factor X recombinante modificada biológicamente activa en la que una modificación consiste en una inserción de un sitio de escisión adicional para una proteasa, y en donde el sitio de escisión adicional se inserta entre Ile235 y Val236 o entre Val236 y Gly237 o entre Gly237 y Gly238 en la cadena pesada del factor X y en donde están excluidas deleciones en la secuencia del péptido de activación del factor X - de manera que proteasas que activan de forma natural al factor X, ya no son capaces de escindir y activar dicha variante del factor X.
2. Una variante del factor X recombinante modificada biológicamente activa según la reivindicación 1, que se activa después de la escisión de dicho sitio de escisión adicional por dicha proteasa.
- 10 3. Una variante del factor X recombinante modificada biológicamente activa según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha proteasa no activa de forma natural el factor X.
4. Una variante del factor X recombinante modificada biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el sitio de escisión insertado para una proteasa permite la activación de dicha variante modificada del factor X con una proteasa de serina.
- 15 5. Una variante del factor X recombinante modificada biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la secuencia de escisión insertada para una proteasa permite la activación de dicha variante del factor X modificada a través del factor IIa, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, proteína C activada, elastasa o calicreína.
- 20 6. Una variante del factor X recombinante modificada biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el sitio de escisión insertado incluye al menos 3 aminoácidos.
- 25 7. Variante del factor X recombinante modificada biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha variante del factor X tiene una actividad hemostática correctora mejorada en comparación con variantes del factor X con una modificación dentro de la secuencia del péptido de escisión de activación del factor X presente en la naturaleza, representando dicha modificación un sitio de procesamiento de una proteasa que no escinde de forma natural en esta zona de la secuencia del factor X y que después de la escisión de dicho sitio de escisión adicional, activa dicha variante del factor X.
8. Un polinucleótido que codifica una variante del factor X recombinante biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un plásmido o un vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 8.
- 30 10. Un plásmido o un vector según la reivindicación 9, que es un vector de expresión.
11. Un plásmido o un vector según la reivindicación 9, que es un vector de transferencia para uso en terapia génica humana.
12. Una célula hospedadora que comprende un polinucleótido según la reivindicación 9 o un plásmido o un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.
- 35 13. Un método para producir una variante del factor X recombinante biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:
  - cultivar células hospedadoras según la reivindicación 12 en condiciones tales que la variante del factor X recombinante modificada se expresa; y
  - 40 opcionalmente recuperar la variante del factor X recombinante modificada a partir de las células hospedadoras o del medio de cultivo.
14. Una composición farmacéutica que comprende una variante del factor X recombinante biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, o un plásmido o un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.
- 45 15. El uso de una variante del factor X recombinante biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, de un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8, de un plásmido o de un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, o de una célula hospedadora según la reivindicación 13, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno de la coagulación sanguínea.
16. El uso según la reivindicación 15, en el que el trastorno de la coagulación sanguínea es hemofilia A.
- 50 17. El uso según la reivindicación 16, en el que la hemofilia A está causada o agravada por autoanticuerpos contra FVIII.

18. El uso según la reivindicación 15, en el que el trastorno de la coagulación sanguínea es hemofilia B.
19. El uso según la reivindicación 18, en el que la hemofilia B está causada o agravada por autoanticuerpos contra FIX.
- 5 20. El uso según la reivindicación 15, en el que el trastorno de la coagulación sanguínea es un déficit de FVII y/o FVIIa.
21. El uso según la reivindicación 20, en el que el déficit de FVII y/o FVIIa está causado o agravado por autoanticuerpos contra FVII y/o FVIIa.
22. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en el que el tratamiento comprende una terapia génica humana.
- 10 23. El uso de una variante del factor X recombinante biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, de un polinucleótido según la reivindicación 8, de un plásmido o un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, o de una célula hospedadora según la reivindicación 12, para la preparación de un medicamento con propiedades procoagulantes.

Figura 1:

	Péptido de activación	Cadena pesada
pFX-532	...TTC AAC CAG ACG CCG CCG CTT G A G A G G G G G C A C A A C A A C C T C A C C A G G ... F N Q T Q P E R G D N N L T R <sub>234</sub>	ATC I <sub>235</sub>
pFX-619	...TTC AAC CAG ACG CCG CCG CTT G A G A G G G G G C A C A A C A A C C T C A C C A G G ... F N Q T Q P E R G D N N L T R	GTGGGAGGC... V G G ... ATCACCAGAGCTTCAACGACTTCACCCGCAITGTGGAGGC... I T Q S F N D F T R I V G G ...

Figura 2:

Cadena ligera	Péptido de activación	Cadena pesada
DEX-532..R	SVA...FNQTQPERGDNNLTR <sub>234</sub>	I <sub>235</sub> VGG...
DEX-535..R	SVA...FNQTQPTQSFNDFTR	I VGG...
DEX-641..R	SVA...FNQTQPERGDNNDDR	I VGG...
DEX-619..R	SVA...FNQTQPERGDNNLTR	ITQSFNDFTRIVGG...
DEX-635..R	SVA...FNQTQPERGDNNDDR	ITQSFNDFTRIVGG...

Figura 3: ADNc del factor X de tipo silvestre y secuencia de aminoácidos

atg ggg cgc cca ctg cac ctc gtc ctg ctc agt gcc tcc ctg gct ggc	48
Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly	
1 5 10 15	
ctc ctg ctg ctc ggg gaa agt ctg ttc atc cgc agg gag cag gcc aac	96
Leu Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn	
20 25 30	
aac atc ctg gcg agg gtc acg agg gcc aat tcc ttt ctt gaa gag atg	144
Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met	
35 40 45	
aag aaa gga cac ctc gaa aga gag tgc atg gaa gag acc tgc tca tac	192
Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr	
50 55 60	
gaa gag gcc cgc gag gtc ttt gag gac agc gac aag acg aat gaa ttc	240
Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe	
65 70 75 80	
tgg aat aaa tac aaa gat ggc gac cag tgt gag acc agt cct tgc cag	288
Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln	
85 90 95	
aac cag gcc aaa tgt aaa gac ggc ctc ggg gaa tac acc tgc acc tgt	336
Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys	
100 105 110	
tta gaa gga ttc gaa ggc aaa aac tgt gaa tta ttc aca cgg aag ctc	384
Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu	
115 120 125	
tgc agc ctg gac aac ggg gac tgt gac cag ttc tgc cac gag gaa cag	432
Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln	
130 135 140	
aac tct gtg gtg tgc tcc tgc gcc cgc ggg tac acc ctg gct gac aac	480
Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn	
145 150 155 160	
ggc aag gcc tgc att ccc aca ggg ccc tac ccc tgt ggg aaa cag acc	528
Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr	
165 170 175	
ctg gaa cgc agg aag agg tca gtg gcc cag gcc acc agc agc agc ggg	576
Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly	
180 185 190	
gag gcc cct gac agc atc aca tgg aag cca tat gat gca gcc gac ctg	624
Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu	
195 200 205	
gac ccc acc gag aac ccc ttc gac ctg ctt gac ttc aac cag acg cag	672
Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln	
210 215 220	

Figura 3: (continuado)

cct gag agg ggc gac aac aac ctc acc agg atc gtg gga ggc cag gaa Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu 225 230 235 240	720
tgc aag gac ggg gag tgt ccc tgg cag gcc ctg ctc atc aat gag gaa Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu 245 250 255	768
aac gag ggt ttc tgt ggt gga acc att ctg agc gag ttc tac atc cta Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu 260 265 270	816
acg gca gcc cac tgt ctc tac caa gcc aag aga ttc aag gtg agg gta Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val 275 280 285	864
ggg gac cgg aac acg gag cag gag gag gcc ggt gag gcg gtg cac gag Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu 290 295 300	912
gtg gag gtg gtc atc aag cac aac cgg ttc aca aag gag acc tat gac Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp 305 310 315 320	960
ttc gac atc gcc gtg ctc cgg ctc aag acc ccc atc acc ttc cgc atg Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met 325 330 335	1008
aac gtg gcg cct gcc tgc ctc ccc gag cgt gac tgg gcc gag tcc acg Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr 340 345 350	1056
ctg atg acg cag aag acg ggg att gtg agc gcc ttc ggg cgc acc cac Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His 355 360 365	1104
gag aag ggc cgg cag tcc acc agg ctc aag atg ctg gag gtg ccc tac Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr 370 375 380	1152
gtg gac cgc aac agc tgc aag ctg tcc agc agc ttc atc atc acc cag Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln 385 390 395 400	1200
aac atg ttc tgt gcc ggc tac gac acc aag cag gag gat gcc tgc cag Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln 405 410 415	1248
ggg gac agc ggg ggc ccg cac gtc acc cgc ttc aag gac acc tac ttc Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe 420 425 430	1296
gtg aca ggc atc gtc agc tgg gga gag gcc tgt gcc cgt aag ggg aag Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys 435 440 445	1344

**Figura 3: (continuado)**

tac ggg atc tac acc aag gtc acc gcc ttc ctc aag tgg atc gac agg	1392
Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg	
450 455 460	
tcc atg aaa acc agg ggc ttg ccc aag gcc aag agc cat gcc ccg gag	1440
Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu	
465 470 475 480	
gtc ata acg tcc tct cca tta aag tga	1467
Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys *	
485	