

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 273 405**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/57** (2006.01)**C12N 9/64** (2006.01)**A61K 38/48** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **98905134 .7**(86) Fecha de presentación : **27.02.1998**(87) Número de publicación de la solicitud: **1012303**(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2000**(54) Título: **Mutantes de delección de factor X y análogos de los mismos.**(30) Prioridad: **27.02.1997 AT 336/97**(73) Titular/es: **Baxter Aktiengesellschaft  
Industriestrasse 67  
1221 Wien, AT**(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.05.2007**(72) Inventor/es: **Himmelspach, Michele;  
Pfleiderer, Michael;  
Falkner, Falko-Günter;  
Eibl, Johann;  
Dorner, Friedrich y  
Schlokat, Uwe**(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.05.2007**(74) Agente: **Gil Vega, Víctor**

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

Mutantes de delección de factor X y análogos de los mismos.

5 La invención se refiere a análogos de factor X $\Delta$  con una delección de los aminoácidos Arg180 a Arg234 y una modificación en el rango de la secuencia de aminoácidos entre Gly173 a Arg179, a preparados que contienen los análogos de factor X $\Delta$  según la invención o los análogos de factor Xa, así como a procedimientos para la preparación de los análogos de factor X $\Delta$  según la invención.

10 Después de iniciar el proceso de coagulación de la sangre, la cascada de coagulación se produce mediante la activación secuencial de diferentes pro-enzimas (cimógenos) sanguíneas en sus formas activas, las serinoproteasas. Entre éstas se encuentran, entre otros, los factores XII/XIIa, XI/XIa, IX/IXa, X/Xa, VII/VIIa y protrombina/trombina. La mayoría de estas enzimas son activas en estado fisiológico solamente si están asociadas a un complejo en una superficie de membrana. En muchos de estos procesos participan iones Ca. La coagulación de la sangre sigue o bien  
15 la vía intrínseca, en la que todos los componentes proteínicos están presentes en la sangre, o bien la vía extrínseca, en la que el factor tisular tiene un papel crítico. El cierre de la herida se produce finalmente por la disociación del fibrinógeno en fibrina mediante trombina.

20 El complejo protrombinasa es responsable de la activación de la protrombina para obtener trombina. La trombina es una enzima importante que puede actuar como pro-coagulante y también como anticoagulante. El complejo protrombinasa, en el que intervienen entre otros el factor Va (como cofactor) y el factor Xa (como serinoproteasa), se ensambla en una asociación dependiente del Ca en la superficie del fosfolípido. Se está discutiendo que aquí el componente catalítico del complejo protrombinasa sea el factor Xa.

25 El factor X (Stuart/Power Factor) es una glucoproteína de coagulación dependiente de la vitamina K, proteína que se puede activar por la cascada intrínseca y extrínseca de la coagulación sanguínea. El producto de traducción primaria del factor X (pre-pro-FX) tiene 488 aminoácidos y es sintetizado por el hígado o por células hepatoma humanas, en primer lugar, como una proteína precursora de 75 kD de una sola cadena. En el plasma, el factor X está ampliamente presente como molécula de dos cadenas (Fair y col., 1984, Blood 64:194-204).

30 Durante la biosíntesis, después de disociar la pre-secuencia, se disocia, por una peptidasa señal (entre Ser23/Leu24) y los propéptidos (entre Arg40/Ala41), la molécula de factor X de una sola cadena mediante procesamiento y eliminación del tripéptido Arg180-Lys181-Arg-182 en la forma de doble cadena, compuesta de una cadena ligera de aproximadamente 22 kD y una cadena pesada de aproximadamente 50 kD unidas entre sí por un puente disulfuro (Figura 1). El factor X circula en el plasma, por tanto, como molécula de doble cadena.

35 Durante el proceso de coagulación sanguínea, el factor X del cimógeno inactivo se convierte en la proteasa activa factor Xa por proteólisis limitada, donde la activación del factor X para obtener el factor Xa se puede producir en uno de 2 complejos unidos a la membrana: el complejo extrínseco del factor VIIa/factor tisular o el complejo intrínseco de factor VIIIa-factor IXa-fosfolípido-Ca o "Complejo Tenasa" (Mertens y col., 1980, Biochem. J. 185:647-658). Una disociación proteolítica entre los aminoácidos Arg234/Ile235 conduce a la liberación de un péptido de 52 aminoácidos N-terminales de longitud de la cadena pesada y, por tanto, a la formación de la enzima activa, el factor Xa. El centro catalítico del factor Xa se localiza en la cadena pesada.

40 45 La activación a través del complejo (extrínseco) factor VIIa-TF conduce a la formación del factor Xa $\alpha$  (35 kD) y del factor Xa $\beta$  (31 kD), donde a pequeñas concentraciones de factor VIIa en el complejo también aparece un polipéptido de 42 (kD). La formación del factor Xa $\alpha$  se produce por una disociación en Arg234/Ile235 de la cadena pesada y representa la activación del factor X para obtener factor Xa. La aparición del factor Xa $\beta$  resulta, probablemente, de una disociación autocatalítica en Arg469/Gly470 en el C-terminal de la cadena pesada del factor Xa $\alpha$  y disociación de un péptido de 4,5 kD. El factor Xa $\beta$  tiene una actividad catalítica igual a la del factor Xa $\alpha$ . Sin embargo, se ha demostrado que por disociación del factor Xa $\alpha$  en el factor Xa $\beta$  se produce un sitio de enlace del receptor plasminógeno y el factor Xa $\beta$ , en caso dado, tiene actividad fibrinolítica o bien participa en la fibrinólisis como cofactor. La transformación del factor Xa $\alpha$  en el factor Xa $\beta$ , sin embargo, es más lenta que la formación de trombina, debido a lo cual se impide la iniciación de la fibrinólisis antes de la formación de un coágulo sanguíneo (Pryzdial y col., 1996, J. Biol. Chem. 271:16614-16620; Pryzdial y col., 1996, J. Biol. Chem. 271:16621-16626).

50 55 El polipéptido de 42 kD resulta de un procesamiento en el C-terminal de la cadena pesada entre Arg469/Gly470 sin procesamiento previo entre Arg234/Ile235. Este producto intermedio no tiene, igual que un fragmento del factor Xa $\gamma$  que se produce por proteólisis en Lys370, ninguna actividad catalítica (Mertens y col., 1980, Biochem. J. 185:647-658; Pryzdial y col., 1996, J. Biol. Chem. 271:16614-16620).

60 La activación del factor X vía intrínseca es catalizada por el complejo factor IXa-factor VIIIa. Durante la activación se obtienen los mismos productos de procesamiento, sin embargo, el producto del factor Xa $\beta$  se obtiene en mayor medida que otros productos de procesamiento del factor X (Jesty y col., 1974, J. Biol. Chem. 249:5614).

65 El factor X se puede activar *in vitro*, por ejemplo, mediante RVV (Russells's Viper Venom - veneno de víbora Russell) o tripsina (Bajaj y col., 1973, J. Biol. Chem. 248:7729-7741) o por activadores fisiológicos purificados como el complejo FVIIa/TF o el complejo factor IXa/factor VIIIa (Mertens y col., 1980, Biochem. J. 185:647-658).

## ES 2 273 405 T3

Los productos de factor X plasmáticos comerciales normalmente contienen una mezcla de los factores  $Xa\alpha$  y  $Xa\beta$ , debido a que, después de la activación del factor X dando el factor  $Xa$ , en primer lugar se produce el factor  $Xa\alpha$ , el cual a su vez se disocia según un proceso autocatalítico formando el factor  $Xa\beta$ .

5 Para preparar un producto uniforme de factor  $Xa$  con una gran integridad molecular, en la EP 0 651 054 se propuso activar el factor con RVV durante un período más prolongado, de manera que el producto final resultante contenía principalmente factor  $Xa\beta$ . Tanto los productos secundarios, por ejemplo factor  $Xa\alpha$ , como también las proteasas se eliminaron a continuación mediante varios pasos cromatográficos.

10 Se aisló el ADNc para el factor X y se caracterizó (Leytus y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU, 82:3699-3702; Fung y col., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 82:3591-3595). Se expresó el factor X humano *in vitro* en diferentes tipos celulares, como células renales embrionarias humanas o células CHO (Rudolph y col., 1997, Prot. Expr. Purif. 10: 373-379, Wolf y col., 1991, J. Biol. Chem. 266:13726-13730). Sin embargo, se observó que en la expresión recombinante del factor X humano, el procesamiento en la posición Arg40/Ala41 se produce de forma poco eficiente frente a la situación *in vivo* y se producen diferentes N-terminales en la cadena ligera del factor X (Wolf y col., 1991, J. Biol. Chem. 266:13726-13730). El factor X recombinante (FXr) se activó por RVV *in vitro* obteniéndose el factor  $rXa$  (FXar) o se expresó directamente FXar, sometiéndose el péptido de activación a delección desde el aminoácido 183 al aminoácido 234 y se sustituyó por un tripéptido para hacer posible un procesamiento directo a una forma FXar de doble cadena. El FXr purificado se procesó en aproximadamente un 70% en cadena ligera y pesada, mientras que el 30% restante representaba FXr de una sola cadena de 75 kD. Aunque la expresión directa de FXar condujo a la formación del factor  $Xa$  activo, también aparecieron productos intermedios inactivos. Wolf y col. (1991, J. Biol. Chem. 266:13726-13730) siguieron observando una actividad reducida del factor X recombinante que atribuyeron a la escasa capacidad de activación del FXr por RVV, así como a la población inactiva de proteínas y polipéptidos de las moléculas precursoras de una sola cadena. Encontraron, especialmente, una gran inestabilidad de FXar durante la expresión por células recombinantes, lo que atribuyeron al alto porcentaje de autoproteólisis.

30 Para investigar la función del péptido C-terminal del factor  $Xa\alpha$ , Eby y col. (1992, Blood 80 (Suppl. 1): 1214 A) introdujeron un codón de parada en la posición Gly430 de la secuencia del factor X. Sin embargo, no encontraron ninguna diferencia entre el porcentaje de activación del factor  $Xa$  ( $FXa\alpha$ ) con un péptido  $\beta$  o con un mutante de delección sin péptido  $\beta$  ( $FXa\beta$ ).

35 El factor  $Xa$  es un componente importante del complejo de protrombinasa y, por tanto, es tema de discusión como mediador primario hemostático rápido en caso de hemorragias, por lo que parece adecuado para el tratamiento de pacientes con trastornos de coagulación sanguínea, por ejemplo en casos de hemofilia.

40 En particular, el tratamiento de pacientes hemofílicos con deficiencia de los factores VIII o IX con concentrados de factores preparados con plasma se complica cuando se emplean tiempos más prolongados de terapia, con frecuencia debido a que se forman anticuerpos de inhibición contra estos factores. Por esta razón, se desarrolló una serie de alternativas para tratar pacientes hemofílicos con factores con una actividad "bypass". Así, se propuso la utilización de un concentrado de complejo de protrombina, un complejo parcialmente activado de protrombinasa (APPC), factor VIIa ó FEIBA. Por ejemplo FEIBA® o Autoplex® son preparados comerciales con actividad bypass de factor VIII (FEIBA). FEIBA por ejemplo, contiene unidades comparables de los factores II, VII, IX, X y FEIBA, pequeñas cantidades de factor VIII y de factor V, así como trazas de factores activados de coagulación como trombina y factor  $Xa$ , o bien un factor con actividad similar al factor X (Elsinger, 1982, Activated Prothrombin Complex Concentrates, Ed. Mariani, Russo, Mandelli, pp. 77-87). Elsinger destaca especialmente la importancia de una actividad "similar al factor  $Xa$ " en FEIBA. Giles y col. (1988, British J. Haematology 9:491-497) demostró la actividad bypass del factor VIII para una combinación de factor  $Xa$  purificado y fosfolípidos en modelos animales.

50 Por tanto, existe una gran necesidad y en diferentes campos de aplicación de factor  $X/Xa$  o de proteínas similares al factor  $X/Xa$ , bien sólo o como componente de un complejo de coagulación para la terapia hemostática.

55 La semivida biológica del factor  $Xa$  se reduce fuertemente en comparación con el cimógeno tanto *in vivo* como *in vitro*. Así, por ejemplo, el factor X puede conservarse de forma estable en glicerina durante 18 meses, mientras que el factor  $Xa$  es estable bajo las mismas condiciones solamente durante 5 meses (Bajaj y col., 1973, J. Biol. Chem. 248:7729-2241) o bien en glicerina y a 4°C presenta, después de 8 meses, una reducción de la actividad de más del 60% (Teng y col., 1981, Thrombosis Res. 22:213-220). La semivida biológica del factor  $Xa$  es de únicamente 30 segundos en suero.

60 Debido a la inestabilidad del factor  $Xa$ , se propuso administrar preparados de factor X (US 4.501.731). En caso de hemorragias peligrosas, especialmente en caso de pacientes hemofílicos, sin embargo, la administración de factor X es poco eficaz debido a que, por la falta del "complejo tenasa" funcional en la vía intrínseca de coagulación sanguínea, no se puede producir ninguna activación suficiente de factor X para dar factor  $Xa$  y porque la activación por la vía extrínseca, con frecuencia, es demasiado lenta como para tener un efecto rápido. Además, en el caso de los pacientes hemofílicos existe suficiente factor X, el cual, sin embargo, tiene una actividad protrombinasa 1.000 veces menor si se compara con el factor  $Xa$ . En estos casos es necesario administrar el factor  $Xa$  activado directamente, en caso dado junto con fosfolípidos, como se describe en Giles y col. (1988, British J. Haematology 9:491-497) o junto con otros factores de coagulación, por ejemplo con la actividad bypass de factor VIII.

# ES 2 273 405 T3

Hasta la fecha, al preparar el factor Xa a partir del factor X la activación se producía principalmente a través de activadores no fisiológicos de origen animal como RVV o tripsina, donde, sin embargo, había que garantizar absolutamente que el producto final estuviera completamente libre de estas proteasas. Como ya se ha mencionado más arriba, durante la activación del factor X para obtener el factor Xa se forman múltiples productos intermedios, parcialmente

5 tambiéen inactivos (Bajaj y col., 1973, J. Bio. Chem. 248:7729-7741, Mertens y col., 1980, Biochem. J. 195:647-658). La presencia de tales productos intermedios conduce a una reducción de la actividad específica del producto y, en caso dado, tambiéen a que tales productos intermedios puedan actuar como antagonistas de la serinoproteasa. Para la preparación de un producto puro uniforme con una alta actividad específica son necesarios, por tanto, con los métodos convencionales, procedimientos costosos de activación y de purificación cromatográfica.

10 Por tanto, el objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un preparado que contiene un polipéptido con actividad de factor X/Xa con una alta estabilidad y que puede activarse formando factor Xa sin utilizar ninguna de las proteasas usuales, en especialmente aquellas de origen animal, por ejemplo RVV o tripsina. Otro objetivo consiste en proporcionar un preparado farmacéutico con actividad bypass de factor VIII.

15 Este objetivo se alcanza según la invención proporcionando un análogo de factor X que presenta una delección de los aminoácidos Arg180 a Arg234 de la secuencia de aminoácidos del factor X, así como una modificación de este mutante de delección de factor X en el área de la secuencia de aminoácidos entre Gly173 y Arg179. Por delección de la secuencia de aminoácidos de Arg180 a Arg234 se deleciónan tanto el tripéptido Arg180 a Arg182 como tambiéen el péptido de 20 activación Ser183 a Arg234 y se produce una fusión directa entre la cadena ligera y la cadena pesada del factor X y los aminoácidos Arg179 e Ile235. Sin embargo, esta secuencia de fusión no contiene ningún sitio de disociación de origen natural para una proteasa. Modificando el área de la secuencia del factor X entre los aminoácidos Gly173 y Arg179 y, en caso dado de Ile235, se consigue un mutante de delección de factor X de acuerdo con la invención que tiene un nuevo sitio de reconocimiento o de procesamiento para la proteasa que no existe en esta posición en 25 el polipéptido y que normalmente no disocia el polipéptido en este sitio. La modificación consiste aquí en, como mínimo un cambio de al menos un aminoácido entre las posiciones Gly173 y Arg179 y, en caso dado Ile235, de la secuencia de aminoácidos del factor X. La posición de los aminoácidos citada es tal, en referencia a la numeración según la secuencia representada en la Figura 1, que comienza con Met1 y termina con Lys488. Para el mutante de delección de factor X modificado según la invención se mantiene la numeración de aminoácidos especificada para la 30 secuencia completa del factor X para simplificar la nomenclatura, sin embargo y en lo que sigue el mutante de delección modificado de factor X se designa como análogo de factor X $\Delta$ .

35 La modificación puede ser aquí una sustitución de como mínimo un aminoácido o una inserción de una secuencia de péptidos que representa un sitio de reconocimiento de proteasa o bien un sitio de disociación. La modificación en el análogo del factor X $\Delta$  según la invención es tal que representa una secuencia de reconocimiento o bien de disociación para una proteasa del grupo de las endoproteasas, por ejemplo Kexin/Kex2, Furina/PACE, PCI/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7 (tal como se describe en Barr y col., 1991, Cell 66:1-3 ó en US 5.460.950), de las serinoproteasas, por ejemplo los factores IIa, VIIa, IXa, XIIa, XIa, Xa ó factor de calicreína o un derivado de estas proteasas.

40 Preferentemente, la modificación se selecciona de manera que el procesamiento por una de estas proteasas conduce a un polipéptido que, en su actividad biológica, corresponde a un factor Xa nativo y tiene actividad de factor Xa. Para conseguir un procesamiento óptimo en algunos casos puede ser necesario cambiar tambiéen el aminoácido Ile235. De preferencia, sin embargo, el aminoácido isoleucina NH<sub>2</sub>-terminal de la cadena pesada debería mantenerse después de la activación, ya que la isoleucina representa uno de aquellos aminoácidos que tienen una función esencial en la 45 formación de la bolsa de enlace al sustrato (Watzke y col., 1995, Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis, ed. Katherine High & Harold Roberts). Los análogos del factor X $\Delta$  según la invención presentan diferencias estructurales, en particular a nivel de aminoácidos, en comparación con la secuencia del factor X nativa, sin embargo, después de la activación presentan una actividad comparable al factor X de origen natural o al factor Xa.

50 La invención proporciona aquí, a modo de ejemplo, un cierto número de análogos de factor X $\Delta$  que presentan una delección y que además tienen una modificación entre Gly173 y Arg179 y, en caso dado, de Ile235. Las modificaciones pueden presentarse en una o varias posiciones en el área entre los aminoácidos Gly173 y Arg179 y, en caso dado, Ile235, con referencia a la secuencia de factor X numerada desde Met1 a Lys488 de la Figura 1. Las sustituciones de aminoácidos pueden estar aquí en la posición Ile 235 (R1), Arg179, Glu178(R2), Leu177 (R3), Thr176 (R4), Gln175 (R5) y Lys174 (R6), preferentemente permaneciendo Arg179 inalterado.

55 Preferentemente, los análogos del factor X $\Delta$  según la invención incluyen una secuencia de factor X con Gly173-R6-R5-R4-R3-R2-Arg179-R1, donde R1 = Ile, Val, Ala, Ser ó Thr, R2 = Glu, Thr, Pro, Gly, Lys ó Arg; R3 = Leu, Phe, Lys, Met, Gln, Ser, Val, Arg ó Pro; R4 = Thr, Asn, Asp, Ile, Ser, Pro, Arg ó Lys; R5 = Asn, Lys, Ser, Glu, Gln, Ala, His ó Arg y R6 = Arg, Asp, Phe, Thr, Leu ó Ser.

60 Las formas de realización preferentes de análogos de factor X según la invención son aquellos análogos de factor X que tienen una modificación con

- 65 a) R1 = Ile, R2 = Thr, R3 = Leu, R4 = Asn y en caso dado R5 = Asn y/o R6 = Asp y se procesan por el factor VIIa o el factor IXa.

## ES 2 273 405 T3

b) R1 = Val, R2 = Thr, R3 = Phe, R4 = Asp y en caso dado R5 = Asn y/o R6 = Phe y/o R1 = Ile ó Val (Figura 2A) y se procesan por el factor XIa.

c) R1 = Ile ó Val, R2 = Phe, R3 = Lys, R4 = Ile y en caso dado R5 = Lys y/o R6 = Thr (Figura 2C) ó

R1 = Ile, R2 = Thr, R3 = Ser, R4 = Thr y en caso dado R5 = Lys y/o R6 = Thr (Figura 2I) y se procesan por el factor XIIa.

d) R1 = Ile ó Val, R2 = Thr, R3 = Met, R4 = Ser y en caso dado R5 = Ser y/o R6 = Leu (Figura 2 D) y se procesan por calicreina.

e) R1 = Ile, R2 = Gly, R3 = Gln, R4 = Pro y en caso dado R5 = Lys y/o R6 = Ser (Figura 2H) o

R1 = Ile, R2 = Gly, R3 = Glu, R4 = Ile (Figura 2F) ó

R1 = Ile, R2 = Thr, R3 = Lys, R4 = Met (Figura 2 E) y se procesan por el factor Xa.

f) R1 = Ile, R2 = Lys, R3 = Arg, R4 = Arg y en caso dado R5 = Glu y/o R6 = Leu ó R1 = Ile, R2 = Thr, R3 = Val, R4 = Arg y en caso dado R5 = Ala y/o R6 = Leu

o R1 = Ile, R2 = Arg, R3 = Val, R4 = Arg y en caso dado R5 = Gln y/o R6 = Leu o

R1 = Ile, R2 = Arg, R3 = Arg, R4 = Arg y en caso dado R5 = His y/o R6 = Leu ó R1 = Ile, R2 = Lys, R3 = Pro, R4 = Arg y en caso dado R5 = Asn y/o R6 = Ley ó

R1 = Ile, R2 = Lys, R3 = Arg, R4 = Ile y en caso dado R5 = Arg y/o R6 = Ley ó

R1 = Ile, R2 = Lys, R3 = Ser y R4 = Arg ó

R1 = Ile, R2 = Thr, R3 = Val y R4 = Arg ó

R1 = Ile, R2 = Lys, R3 = leu y R4 = Arg (véanse todas las Fig. 2G)

donde las secuencias nombradas bajo f) pueden procesarse por una endoproteasa bibásica, por ejemplo Kexin/Kex2, Furina/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7 o por un derivado de estas proteasas.

En la Figura 2 se muestra una posible selección de modificaciones e intercambiadores de aminoácidos que conducen a una especificidad de proteasa modificada.

Las modificaciones pueden realizarse aquí, por ejemplo, por mutagénesis dirigida *in vitro* o PCR o mediante otros métodos técnicos genéticos conocidos de la técnica actual y adecuados para modificar específicamente una secuencia de ADN con el fin de realizar cambios de aminoácidos precisos.

La activación del análogo del factor X $\Delta$  según la invención para obtener un análogo de factor Xa se realiza según la presente invención, por tanto, preferentemente por medio de una proteasa seleccionada de entre el grupo de las endoproteasas, por ejemplo Kexin/Kex2, Furina/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, de las serinoproteasas, por ejemplo los factores IIa, VIIa, IXa, XIIa, XIa, Xa o de calicréfina o por un derivado de estas proteasas.

Los análogos de factor X $\Delta$  según la invención se presentan como polipéptidos de una sola cadena en una forma enzimáticamente inactiva. Sólo por disociación por una proteasa para obtener la forma en dos cadenas se obtiene un análogo activo de factor Xa. Por tanto, la modificación permite una activación del polipéptido del análogo de factor X $\Delta$  de una sola cadena para obtener la forma activa, de dos cadenas.

Una de las dificultades de la preparación de factor Xa activo es su inestabilidad, debido a que por autocatálisis, además, de los factores Xaa $\alpha$  y Xaa $\beta$  también aparecen otros productos intermedios inactivos.

Por tanto, para la obtención de factor X/Xa activo esencialmente intacto o bien moléculas similares al factor X/Xa, sería deseable obtener solamente aquellas proteínas que conducen a productos finales estables.

Es conocido que un sitio de disociación preferente para el procesamiento del factor Xaa (FXaa) para obtener el factor Xaa $\beta$  (FXaa $\beta$ ) se sitúa entre Arg469/Gly470. En base a las investigaciones de Eby y col., (1992, Blood. Vol. 80, Suppl. 1, 1214) se encontró, además de un péptido carboxiterminal prominente (restos aminoácidos 476-487) de factor X, otro péptido más corto (restos de aminoácidos 474 a 477) que se produce por autocatálisis del factor Xaa. Para enfocar un procesamiento preciso del factor X intacto a un factor Xa esencialmente activo sin obtenerse productos intermedios inactivos de procesamiento, los análogos de factor X $\Delta$  según la invención presentan, si es el caso, otras modificaciones.

# ES 2 273 405 T3

Por tanto, los análogos de factor X $\Delta$  según la invención tienen, según un tipo de realización especial, otra modificación en el área C-terminal de la secuencia de aminoácidos del factor X.

Según un tipo de ejecución, un análogo de factor X $\Delta$  del tipo arriba descrito tiene un péptido  $\beta$  intacto (FX $\Delta$ a). En

5 especial, los análogos de factor X $\Delta$  según la invención tienen una modificación en la zona del sitio de disociación del péptido  $\beta$  C-terminal que impide que después de la activación del factor X $\Delta$  a análogo de factor Xa se produzca una disociación del péptido  $\beta$  del factor X. Así se obtiene una molécula de factor Xa que se puede aislar hasta en un 100% como molécula intacta de factor Xaa $\alpha$ .

10 La modificación puede ser una mutación, una delección o una inserción en la zona de la secuencia de aminoácidos de factor X entre la posición de los aminoácidos Arg469 y Ser476 y, en caso dado de Lys370. Se prefiere, sin embargo, una sustitución de aminoácidos con la que se evita, debido al cambio del aminoácido, se produzca un plegado del polipéptido que afecta a la función y a la actividad de la proteína.

15 Según un tipo de realización, los análogos de factor X $\Delta$  según la invención presentan un cambio de uno de los aminoácidos en la posición Arg469 y/o Gly470, donde preferentemente Arg 469 se cambia por Ser, Ala, Val ó Thr.

20 Los análogos de factor X $\Delta$  según la invención pueden tener, además de una mutación en la posición Arg469 y/o Gly470, otra mutación en la posición Lys370 y/o Lys475 y/o Ser476. Por sustitución del aminoácido en esta(s) posición(es) se evita un procesamiento de análogos de factor Xaa $\alpha$  al análogo del factor Xaa $\beta$  o bien análogos de factor Xa truncados en el C-terminal, debido a que la/las secuencia/s de origen natural se ha/han modificado de manera que ya no se puede producir, si es el caso, una disociación autocatalítica de un péptido carboxiterminal.

25 Según otro tipo de realización, los análogos de factor X según la invención tienen una delección del péptido  $\beta$  carboxiterminal (FX $\Delta$  $\beta$ ). Un análogo de factor X de este tipo puede prepararse mediante la expresión de un ADNC que codifica un análogo de factor X $\Delta$  en un sistema de expresión recombinante, clonándose solamente aquellas secuencias que codifican los aminoácidos Met1 a Arg179/Ile235 a Arg469.

30 Según otro tipo de realización, los análogos de factor X $\Delta$  según la invención tienen una señal de parada de traducción en el área C-terminal de la secuencia de factor X. Preferentemente, la señal de parada de traducción se encuentra en una posición contigua a un aminoácido C-terminal que se produce después del procesamiento natural. Por tanto, la señal de parada de traducción se encuentra preferentemente en la posición del aminoácido 470 de la secuencia de factor X, para que se conserve el Arg469 terminal del factor X $\Delta$  $\beta$ . Para este fin se sustituye el codón GGC que codifica el aminoácido Gly470 por TAA, TAG o TGA.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a análogos de factor X $\Delta$  que se activan a análogos de factor Xa mediante tratamiento con una proteasa adecuada *in vitro*, es decir análogos de factor X $\Delta$  activados. Dependiendo del análogo de factor X $\Delta$  que se utiliza y activa, se obtiene un análogo de factor Xaa $\Delta$  que tiene en el extremo C-terminal de la cadena ligera las correspondientes modificaciones de aminoácidos frente a la secuencia natural de factor Xa. 40 Las modificaciones, sin embargo, se eligen según la invención de manera que no afecten negativamente a la actividad biológica.

45 En caso de que un análogo de factor X de este tipo tenga además una señal de parada de traducción en el área C-terminal del péptido  $\beta$ , se obtienen moléculas modificadas de factor Xaa $\beta$ . Si, por el contrario, se utiliza un análogo de factor X que tiene una modificación (modificaciones) dentro de la secuencia del péptido  $\beta$  debido a la/s cual/es no se disocia el péptido  $\beta$ , se obtiene un análogo de factor Xaa $\alpha$  con un intercambio de aminoácidos en el C-terminal de la molécula.

50 Los análogos de factor X $\Delta$  según la invención tienen exclusivamente modificaciones que modifican la especificidad para la activación y no afectan de manera significativa a la actividad. Por esta razón, en cada caso se obtienen moléculas funcionalmente activas de factor Xa o bien análogos de factor Xa.

55 La activación *in vitro* puede producirse mediante una proteasa seleccionada del grupo de las endoproteasas, por ejemplo Kexin/Kex2, Furina/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, de las serinproteasas, por ejemplo los factores IIa, VIIa, IXa, XIIa, Xla, Xa o de calicreína, o un derivado de estas proteasas. Sin embargo, se considera dentro del alcance de la presente invención la utilización de cualquier proteasa, excepto RVV o tripsina, siempre que sea adecuada para procesar el análogo de factor X $\Delta$  según la invención y obtener el análogo de factor Xa.

60 Aunque, por ejemplo, Wolf y col. (1991, J. Biol. Chem. 266:13726-137309) sospechó que una endopeptidasa como Kex2, Furina o PACE participaba en el procesamiento del mutante de delección descrito del factor Xa, no indicó nada sobre la influencia de una de estas proteasas en el procesamiento del factor X. En la US 5.660.950 también se describe la preparación recombinante de PACE y la utilización de la proteasa para perfeccionar el procesamiento de proteínas dependientes de la vitamina K. En una serie de enumeraciones con otros factores sanguíneos se menciona también el factor X faltando, sin embargo, datos que verifican esta declaración.

65 Dentro del marco de la presente invención, se demostró por primera vez de forma inequívoca que una proteasa necesaria para el proceso de maduración del factor X es una endoproteasa bíbásica, especialmente una furina de origen endógeno. La endoproteasa facilita *in vivo*, en primer lugar, la disociación de la molécula de una sola cadena

## ES 2 273 405 T3

de factor X en la forma madura compuesta de cadena pesada y ligera. *In vitro* proporciona, además, la disociación de la secuencia de propéptidos del factor X (Ejemplo 2).

Según un tipo de realización especial, se proporciona un análogo de factor X $\Delta$  que preferentemente se presenta en

- 5 forma purificada como molécula de cadena simple. Los análogos de factor X $\Delta$  que tienen en el área modificada un punto de intersección para una proteasa que no existe en células recombinantes, se obtienen después de la expresión como molécula de una sola cadena. La molécula de una cadena de factor X $\Delta$  destaca en especial por su gran estabilidad e integridad molecular. Hasta la fecha no había sido posible aislar una molécula inactiva de una sola cadena de factor X $\Delta$  en forma purificada debido a que se procesa en las células recombinantes en el factor Xa y en una serie de otros 10 productos intermedios también inactivos (Wolf y col., 1991, J. Biol. Chem. 266:13726-13730). El análogo aislado de una sola cadena de factor X $\Delta$  puede activarse directamente por un procesamiento específico para obtener la forma de cadena doble de factor Xa. Esto se puede llevar a cabo poniendo en contacto una molécula de factor X $\Delta$  de una sola cadena, aislada de una célula recombinante, con una proteasa que disocia el sitio de activación existente en el 15 análogo de factor X $\Delta$ . Por ejemplo, si se expresa un análogo de factor X $\Delta$  con un sitio de activación de furina en una célula deficiente en furina, se puede aislar como análogo de factor X $\Delta$  de una sola cadena y procesar por la entrada en contacto con una proteasa bíbásica, por ejemplo furina/PACE o Kex 2, para obtener análogos activos de dos cadenas de factor X $\Delta$ a. Análogos de factor X $\Delta$  con un sitio de procesamiento para una serinoproteasa o calicreína también 20 pueden aislarse, en células expresadas de furina, como moléculas en una sola cadena y procesarse, a continuación, con la serinoproteasa para obtener análogos activos de factor Xa.

20 Un análogo del factor Xa así obtenido tiene, debido a la reacción de procesamiento selectiva y dirigida, una gran estabilidad e integridad estructural y, en especial, está libre de productos intermedios inactivos de análogos de factor X/Xa y de productos de desintegración autoproteolíticos.

25 El análogo de factor X $\Delta$  según la invención se pone a disposición según la presente invención tanto en forma de factor X $\Delta$ a con un péptido  $\beta$  intacto como también en forma de un análogo de factor X $\Delta$  con una delección de péptidos  $\beta$ .

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere al ADN recombinante que codifica el análogo de factor X $\Delta$  según la invención. El ADN recombinante resultante, después de expresión en un análogo de factor X $\Delta$ , con una secuencia de aminoácidos correspondiente al factor X humano, excepto una delección de los aminoácidos desde Arg180 a Arg234 y una modificación que hace posible un procesamiento y una activación en el análogo activo de factor Xa tanto con el péptido  $\beta$  intacto como también con éste delecionado.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a un preparado que contiene un análogo purificado de factor X $\Delta$  que presenta una delección de aminoácidos desde Arg180 a Arg234 y una modificación de los aminoácidos en la zona entre Gly173 y Arg179 y, dado el caso de Ile235. La modificación conduce aquí a un nuevo sitio de reconocimiento o bien de disociación para una proteasa, sitio que no existe de forma natural en esta posición en el polipéptido, proteasa que normalmente no procesa el polipéptido en este sitio. El preparado puede ser aquí un preparado purificado que contiene 40 un análogo de factor X $\Delta$  de una sola cadena, donde los polipéptidos se obtienen de un sistema de cultivo celular o de un extracto de un cultivo celular. Un análogo recombinante de factor X $\Delta$  purificado previamente procedente de un sistema de cultivo celular puede seguir purificándose mediante procedimientos conocidos en el estado actual de la técnica. Para este fin son especialmente adecuados los procedimientos cromatográficos, como filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico o de afinidad.

45 Según un tipo de realización, el preparado según la invención incluye el análogo de factor X $\Delta$  como molécula de una sola cadena en forma enzimáticamente inactiva, presentando el análogo de factor X $\Delta$  un grado de pureza de como mínimo un 80%, preferentemente de como mínimo un 90%, en especial de como mínimo un 95%, y donde el preparado purificado no contiene productos intermedios inactivos proteolíticos de análogo de factor X/Xa.

50 Según un aspecto especial, el preparado contiene análogos de factor X $\Delta$  de una sola cadena con una modificación que permite una activación para obtener análogos de factor Xa mediante una de las proteasas del grupo de endoproteasas bíbásicas, por ejemplo Kexin/Kex2, Furina/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, de las serinoproteasas, por ejemplo los factores IIa, VIIa, IXa, XIIa, XIa, Xa o de calicreína o un derivado de estas proteasas. La activación 55 se produce aquí por la puesta en contacto del análogo de factor X $\Delta$  con la correspondiente proteasa, que disocia en la secuencia modificada, obteniéndose un análogo de factor Xa.

En el preparado según la invención, el análogo de factor X $\Delta$  puede estar presente bien como factor X $\Delta$ a (FX $\Delta$ a) con el péptido  $\beta$  intacto o con una deleción del péptido  $\beta$  como factor X $\Delta$  $\beta$  u otra deleción C-terminal.

60 Según otro tipo de realización, preferentemente el preparado según la invención contiene el análogo de factor X $\Delta$  como molécula de una sola cadena en forma aislada. Para este fin, por ejemplo se obtiene mediante preparación recombinante el análogo de factor X $\Delta$  como molécula de una sola cadena con una modificación que permite una activación, para obtener *in vitro* el análogo de factor Xa. La activación de análogos de factor X $\Delta$  en análogos de factor Xa puede producirse aquí por la puesta en contacto del análogo de factor X con una proteasa seleccionada de entre el grupo de las endoproteasas bíbásicas, por ejemplo Kexin/Kex2, Furina/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, de las serinoproteasas, por ejemplo los factores IIa, VIIa, IXa, XIIa, XIa, Xa o de calicreína o un derivado de estas proteasas. Aquí, la proteasa puede estar inmovilizada en un portador.

El preparado según la invención puede servir como material de partida para la producción y obtención de análogos de factor Xa. Con este fin, el preparado se pone en contacto con proteasas, en caso dado inmovilizadas, en una mezcla básica industrial que contiene análogos de factor X $\Delta$  de una sola cadena bajo condiciones que permiten una activación óptima del análogo de factor X $\Delta$  a análogo de factor Xa, obteniéndose análogo de factor Xa. El análogo de factor Xa así obtenido puede purificarse a continuación siguiendo métodos bien conocidos y formularse en una composición farmacéutica con actividad de factor Xa.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un preparado que contiene un análogo de factor Xa con una gran estabilidad e integridad estructural, en especial, libre de productos intermedios inactivos de análogo de factor X/Xa y de productos de desintegración autoproteolíticos y mediante la activación de un análogo de factor X $\Delta$  del tipo arriba descrito se puede obtener y formular en un correspondiente preparado.

Según una realización especial, el preparado que incluye el análogo de factor X $\Delta$  purificado, de una o dos cadenas, contiene un portador fisiológicamente aceptable y se formula, si es el caso, como preparado farmacéutico. La formulación puede realizarse de forma conocida y mezclarse con una sustancia tampón que contiene sales como NaCl, CaCl<sub>2</sub> y aminoácidos como glicina y/o lisina, a un pH en el rango de 6 a 8 y formularse como un preparado farmacéutico. El preparado purificado que contiene el análogo de factor X puede proporcionarse como una solución final, liofilizado o estar congelado hasta su uso consistiendo en un producto que se puede almacenar. Preferentemente, el preparado se almacena en su forma liofilizada y se disuelve en una solución de reconstitución adecuada para obtener una solución transparente a la vista.

Sin embargo, el preparado según la presente invención también puede ponerse a disposición como preparado líquido o bien en forma de líquido congelado.

El preparado según la invención es especialmente estable, es decir, también se puede guardar en su forma disuelta durante un tiempo prolongado antes de su aplicación. Se ha demostrado que el preparado según la invención no muestra ninguna pérdida de actividad durante varias horas a días.

El preparado según la invención puede presentarse en un sistema adecuado, preferentemente en un dispositivo de aplicación, en combinación con una proteasa seleccionada de entre el grupo de endoproteasas, por ejemplo Kexin/Kex2, Furina/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, de serinoproteasas, por ejemplo los factores IIa, VIIa, IXa, XIIa, XIa, Xa o de calicreína o un derivado de estas proteasas.

El preparado según la invención que contiene un análogo de factor X $\Delta$  en combinación con una proteasa capaz de activar el análogo de factor X $\Delta$  y convertirlo en un análogo de factor Xa puede ponerse a disposición como preparado combinado compuesto en un recipiente que contiene una proteasa inmovilizada en un portador, en caso dado en forma de una mini-columna o de una jeringa equipada con una proteasa inmovilizada, y un recipiente que contiene el preparado farmacéutico con el análogo de factor X $\Delta$ . Para activar el análogo de factor X $\Delta$ , por ejemplo se empuja la solución que lo contiene por encima de la proteasa inmovilizada. Preferentemente, la solución que contiene el análogo de factor X $\Delta$  está separada del espacio de la proteasa inmovilizada durante el almacenamiento del preparado. El preparado según la invención puede estar en el mismo recipiente que la proteasa, sin embargo, los componentes están en espacios separados por una pared de separación impermeable que se puede retirar fácilmente en caso de utilización. Las soluciones también pueden conservarse en un recipiente independiente y se ponen en contacto solamente poco antes de la aplicación.

En un tipo de realización especial, la proteasa utilizada para la activación es una serinoproteasa que participa de forma natural en la coagulación sanguínea, por ejemplo factor XIIa, no teniendo que separarse entonces antes de la aplicación del análogo activado del factor Xa, sino que puede aplicarse junto con el mismo.

La activación de análogos de factor X $\Delta$  a análogos de factor Xa puede realizarse poco antes de la utilización directa, es decir antes de la administración al paciente. La activación puede llevarse a cabo poniendo en contacto con una proteasa inmovilizada o mezclando soluciones que contienen, por un lado, una proteasa y, por otro, el análogo de factor X $\Delta$ . Esto hace posible que se puedan conservar los componentes por separado en solución y luego mezclarlos en un dispositivo adecuado, momento en que los componentes entran en contacto, y mediante lo cual se activa el análogo de factor X $\Delta$  obteniéndose análogo de factor Xa. Así, al paciente se le administra una mezcla de factor Xa y una serinoproteasa que ha causado la activación. Aquí hay que prestar especial atención a la dosificación ya que, al administrar adicionalmente una serinoproteasa también se activa el factor X endógeno, y de esta manera se puede reducir el tiempo de coagulación.

Según un tipo de realización preferente, el preparado farmacéutico se pone a disposición en un dispositivo adecuado, preferentemente un dispositivo de aplicación, bien en forma líquida congelada o en forma liofilizada. Un dispositivo de aplicación adecuado puede ser un cuerpo de inyección de doble cámara tal como se describe en la AT 366 916 o AT 382 783.

Según otro aspecto de la invención, el preparado según la invención contiene como otro componente, en caso dado, un factor sanguíneo en forma de cimógeno o de serinoproteasa activa. Preferentemente se utilizan otros ingredientes tales como aquellos con actividad FEIB. Entre éstos se citan en especial el factor II, factor VII, factor IX, factor VIII, factor V y/o la correspondiente serinoproteasa activa. Sin embargo, otros componentes pueden ser también fosfolí-

# ES 2 273 405 T3

pidos, iones Ca, entre otros. Según un tipo de realización especial de la invención, el preparado según la invención contiene como mínimo otro componente con actividad FEIB.

El preparado según la invención puede ponerse a disposición como un preparado farmacéutico con actividad de factor Xa en forma de un preparado de un solo componente o en combinación con otros factores en forma de un preparado multicomponente.

Antes del acondicionamiento para obtener un preparado farmacéutico, la proteína purificada se somete a los controles de calidad usuales y se transforma en una forma que se puede administrar terapéuticamente. En especial, en la producción recombinante se comprueba el preparado purificado en cuanto a la ausencia de ácidos nucleicos celulares o procedentes del vector de expresión, preferentemente de acuerdo con un procedimiento tal como el descrito en EP 0 714 987.

Puesto que en principio todos los materiales biológicos pueden estar contaminados con gérmenes infecciosos, para la producción de un preparado seguro, éste se somete, dado el caso, a un tratamiento de inactivación o de empobrecimiento viral.

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de un preparado del tipo arriba descrito para la producción de un medicamento. Un medicamento que contiene un análogo de factor X $\Delta$  según la invención y el análogo de factor X correspondiente activado es particularmente adecuado para el tratamiento de pacientes con trastornos de coagulación sanguínea, por ejemplo en pacientes hemofílicos o en pacientes que han desarrollado anticuerpos de inhibición del producto terapéutico administrado, por ejemplo contra el factor VIII o el factor IX.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación del análogo de factor X $\Delta$  y de un preparado que contiene el análogo de factor X $\Delta$  según la invención. Para este fin, la secuencia que codifica el análogo de factor X $\Delta$  se introduce en un sistema de expresión adecuado y se transfectan las correspondientes células con el ADN recombinante. Preferentemente, se establecen líneas celulares permanentes que expresan el análogo de factor X $\Delta$ . Las células se cultivan bajo las condiciones óptimas para la expresión del gen y el análogo de factor X se aísla bien de un extracto de un cultivo celular o bien del sobrenadante del cultivo. La molécula recombinante puede seguir purificándose por todos los procedimientos cromatográficos conocidos, por ejemplo cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de afinidad o inmunoafinidad, o una combinación de las mismas.

Para preparar el análogo de factor X $\Delta$  según la invención, se clona el ADNc completo que codifica el factor X en un vector de expresión. Esto se lleva cabo siguiendo técnicas de clonación bien conocidas. A continuación, la secuencia de nucleótidos que codifica el factor X se modifica de manera que se someten a delección las secuencias que codifican los aminoácidos Arg180 a Arg234 y se modifican los aminoácidos en la zona entre Gly173 y Arg179, dado el caso Ile235, obteniéndose así una molécula de factor X $\Delta$  del tipo arriba descrito. Esto se lleva a cabo con métodos de técnicas genéticas conocidas del estado actual de la técnica, por ejemplo delección de secuencias dirigidas de mutagénesis *in vitro*, por digestión de restricción por endonucleasas e inserción de otras secuencias modificadas o por PCR. Los mutantes de factor X $\Delta$  así preparados se insertan y expresan en un sistema de expresión adecuado para la expresión recombinante.

Los análogos de factor X $\Delta$  según la invención pueden prepararse también por síntesis química.

Preferentemente, los análogos de factor X $\Delta$  se preparan por expresión recombinante. La producción según técnicas genéticas puede realizarse con todos los sistemas de expresión usuales, por ejemplo en líneas celulares permanentes o en sistemas de expresión viral. Las líneas celulares permanentes se preparan por integración estable del ADN extraño en el cromosoma de la célula huésped de, por ejemplo, Vero MRC5, CHO, BHK, 293, Sk-Hepl, especialmente de células hepáticas y renales, o por un vector episomal derivado, por ejemplo, del virus del papiloma. También se pueden utilizar sistemas de expresión viral, por ejemplo el virus Vaccinia, baculovirus o sistemas retrovirales. Como líneas celulares normalmente se utilizan Vero, MRC5, CHO, BHK, 293, Sk-Hepl, células de ganglios, de hígado y de riñón. Como sistemas de expresión eucarióticos también se pueden utilizar levaduras, ganglios endógenos (por ejemplo ganglios de animales transgénicos) y otros tipos de células. Naturalmente también se pueden utilizar animales transgénicos no humanos para la expresión de los polipéptidos según la invención o de sus derivados. Para la expresión de las proteínas recombinantes han dado buen resultado, especialmente, células CHO-DHFR<sup>-</sup> (Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 77:4216-4220, 1980).

Para la preparación recombinante del análogo de factor X $\Delta$  según la invención también se pueden utilizar sistemas de expresión procarióticos. Para este fin son especialmente adecuados los sistemas que permiten la expresión en *E. coli* ó *B. subtilis*.

Los análogos de factor X $\Delta$  se expresan en los correspondientes sistemas de expresión bajo el control de un promotor adecuado. Para ello, en el caso de la expresión en eucariotas son adecuados todos los promotores conocidos, por ejemplo promotor SV40, CMV, RSV, HSV, EBV,  $\beta$ -actinía, hGH o promotores inducibles, por ejemplo el promotor hsp ó de metalotionefna. Preferentemente se expresan los análogos de factor X bajo el control del promotor  $\beta$ -actina en células CHO-DHFR<sup>-</sup>.

# ES 2 273 405 T3

Según un tipo de realización de la invención, el procedimiento para la producción del preparado según la invención comprende los pasos de: poner a disposición un ADN que codifica un análogo de factor  $X\Delta$ , transformar una célula con el ADN recombinante, expresar el análogo de factor X, en caso dado, en presencia de una proteasa, aislar el análogo de factor X y, eventualmente, purificar mediante un procedimiento cromatográfico.

5 Según un tipo de realización del procedimiento, el análogo de factor Xa se aísla directamente en forma de una molécula de dos cadenas. Para este fin se expresa en una célula un análogo de factor  $X\Delta$  que tiene una modificación que permite un procesamiento por una proteasa bibásica, como furina, y se procesa el análogo de factor  $X\Delta$  a un análogo de factor Xa de dos cadenas. Preferentemente, la célula es tal que expresa una proteasa capacitada para el procesamiento, por ejemplo una proteasa bibásica tal como furina o un derivado de la misma. En caso dado, para aumentar o mejorar la eficacia del procesamiento, se puede modificar la célula de manera que exprima a la proteasa de forma intensificada. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, por la coexpresión de una endoproteasa bibásica adecuada, por ejemplo furina/PACE, Kex2 o un derivado de las mismas. El análogo de factor  $X\Delta$  según la invención también se puede expresar en una célula que tiene una concentración de una proteasa endógena normal o, por ello, subóptima para el procesamiento, produciéndose un procesamiento incompleto para la forma activa de dos cadenas. El siguiente procesamiento para obtener el análogo de factor Xa se lleva a cabo, en este caso, cuando se ha segregado un análogo de factor X de una sola cadena en el sobrenadante del cultivo celular, según se describe más arriba, por cocultivo con células que expresan proteasas o por puesta en contacto con una proteasa, en caso dado inmovilizada. El sobrenadante celular puede bombarse también a través de una matriz portadora a la que se encuentra unida una proteasa, con lo cual en el eluato se obtiene un análogo de factor Xa de dos cadenas.

25 El análogo de factor Xa así obtenido puede aislarse, purificarse y formularse para su posterior utilización, según se describe más arriba, en caso dado, como compuesto farmacéutico, y almacenarse de forma estable. Las condiciones de reacción para la reacción de procesamiento y la activación pueden ser optimizadas por el técnico según la descripción del ensayo de las condiciones marco dadas. Tiene especial importancia para la duración del contacto la velocidad de flujo de los reactivos existentes. Ésta debería oscilar entre 0,01 ml/min y 1 ml/min. Otros parámetros importantes son la temperatura, el pH y las condiciones de elución. Después del ciclo, se puede seguir purificando el análogo de factor Xa, en caso dado mediante cromatografía selectiva. La realización del procedimiento, en cada caso, con una proteasa enlazada a un portador es especialmente ventajosa debido a que la disposición de reacción posibilita un paso adicional de purificación mediante un portador, preferentemente mediante columnas cromatográficas.

30 Según un tipo de realización, la activación se produce mediante un paso cromatográfico en el que se ha inmovilizado la proteasa en un portador. Para ello, el análogo de factor  $X\Delta$  purificado de una sola cadena es conducido a través de una matriz en la que enlaza la proteasa y se aísla el análogo de factor Xa purificado a partir del eluato.

35 Según un aspecto de la invención, se obtiene un preparado que contiene un análogo activo de factor Xa sometiendo a un análogo de factor  $X\Delta$  a un paso de procesamiento/activación según se ha descrito anteriormente, y se procesa el polipéptido activado en un preparado purificado, en caso dado formulado como un compuesto farmacéutico.

40 Según otro aspecto para la producción de un preparado que contiene análogos de factor  $X\Delta$  de una sola cadena, se expresa en una célula deficiente en endoproteasas, por ejemplo, el análogo de factor  $X\Delta$  con una secuencia de procesamiento para una proteasa bibásica. Preferentemente, la célula tiene una deficiencia en una endoproteasa bibásica, por ejemplo en kexina, furina, PACE o sus derivados homólogos. De una célula mutante deficiente en endoproteasa de este tipo se puede aislar el análogo de factor  $X\Delta$  en forma de molécula de una sola cadena. Los análogos de factor  $X\Delta$  que tienen un sitio de procesamiento para una serinaproteasa pueden expresarse en cualquier célula tradicional, también en una célula positiva en furina, y aislarse como molécula de una sola cadena.

45 A continuación, un análogo de factor X así aislado y, eventualmente purificado, se pone en contacto con una proteasa seleccionada de entre el grupo de endoproteasas, por ejemplo kexin/kex2, furin/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4 LPC/PC7, de serinaproteasas, por ejemplo los factores IIa, VIIa, IXa, XIIa, XIa, Xa o de calicreína, o un derivado de estas proteasas, en condiciones bajo las cuales se disocia y activa el análogo de factor X de una sola cadena en el análogo de factor Xa.

50 Con los análogos de factor  $X\Delta$  según la invención, que se activan según los procesos descritos anteriormente, se obtienen análogos de factor Xa, análogos de factor Xa purificados con una gran estabilidad e integridad estructural y, en especial, libres de productos intermedios inactivos de factor X/Xa.

55 Con ayuda de los siguientes ejemplos y Figuras se describe más en detalle la invención, no quedando limitada la misma, no obstante, a estos ejemplos de ejecución en particular.

60 El Ejemplo 1 describe la construcción y expresión de un Factor Xr; el Ejemplo 2 describe el procesamiento del Factor Xr en cadena pesada y ligera por furina; el Ejemplo 3 describe el procesamiento del profactor X por medio de una proteasa inmovilizada; el Ejemplo 4 describe la actividad del Factor Xr procesado *in vitro*; el Ejemplo 5 describe la expresión del factor Xr en células deficientes en furina; el Ejemplo 6 describe la construcción y expresión de análogos de factor  $X\Delta r$ ; el Ejemplo 7 describe la determinación de los N-terminales de los productos de procesamiento del factor X; el Ejemplo 8 describe la expresión y caracterización de los análogos FX con el sitio Arg-Val-Thr-Arg/Ile ( $FX\Delta r^{RVTR/I}$ ); el Ejemplo 9 describe la activación *in vitro* de la proteína  $FX\Delta r^{RVTR/I}$  por derivados de furina-r.

# ES 2 273 405 T3

## Descripción de las figuras

Figura 1: secuencia de nucleótidos y aminoácidos del factor X.

5 Figura 2: representación esquemática del análogo de factor X $\Delta$  con puntos de intersección modificados.

Figura 3: representación esquemática del vector de expresión phAct-FXr.

10 Figura 4: análisis Westernblot del factor Xr expresado en células CHO antes y después de la amplificación.

Figura 5: análisis Westernblot del factor Xr después de la disociación *in vitro* con derivados de furina.

15 Figura 6: análisis Westernblot de moléculas de factor Xr expresadas en células con contenido en furina y con deficiencia en furina.

Figura 7: representación esquemática de las estructuras de análogos de factor X $\Delta$ r con C-terminales modificados de la cadena pesada.

20 Figura 8: representación esquemática de los N-terminales de los productos de procesamiento del factor Xr de células de CHO, CHO/furina-r y células deficientes en furina.

Figura 9: análisis Westernblot del factor X $\Delta$ <sup>RVTR/I</sup> r expresado en células de CHO.

25 Figura 10: análisis Westernblot del factor X $\Delta$ <sup>RVTR/I</sup>r después de la activación *in vitro* con un derivado de furina.

30 Los vectores de expresión se obtuvieron por medio de técnicas de clonación estándar (Maniatis y col., "Molecular Cloning"-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU, 1983). La producción de fragmentos de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se lleva a cabo por métodos generales (Clackson y col., 1991, PCR A practical approach. ED. McPherson, Quirke, Taylor, p. 187-214).

## Ejemplo 1

### *Expresión y procesamiento de FXr de una sola cadena a FXr de cadena ligera/pesada*

#### a. Preparación del vector de expresión de FXr

Para preparar el FX recombinante (FXr) se aisló ADNc de FX de un banco Lambda-cDNA de hígado humano tal como se describe en Messier y col., (1991, Gene 99: 291-294). De un clon positivo se amplificó un fragmento de ADN por PCR con el oligonucleótido #2911

40 (5' ATTACTCGAGAAGCTTACCATGGGGCGCCCACTG-3')

(SEQ. ID. No. 1),

como 5'-cebador y oligonucleótido #2912

45 (5'-ATTACAATTGCTGCAGGGATCCAC-3')

(SEQ. ID. No. 2)

50 como 3'-cebador un fragmento de ADN amplificado que contiene la secuencia de codificación de FX de 1,467 kb así como 39 pb de la región 3' no traducida flanqueada por un punto de intersección XhoI en el extremo 5' y un punto de intersección MfeI en el extremo 3'. Además se incorporó mediante el cebador #2911 la secuencia ACC por delante de ATG de FX, de manera que se produjo una secuencia óptima de iniciación de traducción Kozak. A continuación se clonó este producto PCR como fragmento XhoI/MfeI en el vector phAct cortado con SalI y EcoRI. El plásmido de expresión resultante se designó como phAct-FXr (Figura 3). El vector de expresión pHAct comprende el promotor humano de beta-actina, de 78 pb 5' UTR, así como el intrón, un punto de intersección de clonación múltiple y el sitio de poliadenilación SV40.

#### b. Expresión de FXr en células CHO

55 Para establecer una línea celular de expresión estable de FXr se cotransfectaron células CHO deficientes en dhfr con el plásmido de expresión phAct-FXr y el plásmido marcador de selección pSV-dhfr. Para todos los demás análisis de expresión y función se incubaron los cultivos celulares con medios de selección libres de suero en presencia de 10  $\mu$ g/ml de vitamina K24 durante 24 horas. La expresión de FXr en los clones celulares resultantes se demostró con ayuda de la cantidad de antígeno (ELISA, Asserachrom, Boehringer Mannheim) y se caracterizó la proteína recombinante a continuación con SDS-PAGE (Figura 4A y 4B). En los clones iniciales y sus subclones de los mismos aparece, como se puede reconocer en el Western Blot (Figura 4), la proteína FX recombinante en forma de una cadena ligera (LC) de 22 kD y una cadena pesada (HC) de aproximadamente 50 kD, idénticas a la proteína plasmática del factor X. Además, se puede reconocer una banda de proteína en 75 kD que corresponde a la molécula (SC) de una sola cadena y cuya presencia en las células CHO transfectadas de FX (Wolf y col., J. Biol. Chem. 266: 13726-13730, 1991) así como en plasma humano (Fair y col., Blood 64:194-204, 1984) ya se ha descrito. Para la producción de clones altamente

## ES 2 273 405 T3

expresados se amplificaron los clones iniciales con cantidades cada vez mayores de metotrexato y, a continuación, se subclonaron para su estabilización. Fue posible incrementar la expresión de aproximadamente 200-500 ng/10<sup>6</sup> células o bien 1 µg/ml a 78 µg/10<sup>6</sup> células o bien 120 µg/ml por cada 24 horas. El análisis Western Blot de estos sobrenadantes de clones celulares altamente expresados (Figura 4B y Figura 5A banda 2) muestra un enriquecimiento de la molécula de FXr de una sola cadena así como la presencia de formas adicionales de la cadena ligera. Además de la forma de 22 kD de la cadena ligera, que corresponde a la forma plasmática (completamente carboxilada y sin propéptidos), existen otras tres variantes de la cadena ligera de aproximadamente 21 kD, 22,5 kD y 20 kD. La heterogeneidad de la cadena ligera en estos clones pudo atribuirse, por medio de secuenciación N-terminal del material recombinante, a una disociación incompleta del propéptido (aprox. un 50% del material FXr), así como a la deficiente carboxilación (aprox. un 50% de FXr). La proteína de 21 kD es una forma libre con contenido en propéptidos deficiente en carboxilación y la proteína de 20 kD es una forma libre de propéptidos con falta de carboxilación de cadena ligera, mientras que la banda de 22,5 kD representa la forma LC completamente carboxilada pero con contenido en propéptidos.

### Ejemplo 2

#### 15 Procesamiento de FXr de una sola cadena en FXr de cadena ligera/pesada por derivados de furina-r

Debido a la similitud de los sitios de disociación entre el propéptido de factor X/N-terminal de la cadena ligera (RVTR↓A) y doble cadena ligera/pesada (RRKR↓S) con la secuencia de reconocimiento de consenso de furina (RXK/RR↓X) existía la posibilidad de mejorar *in vitro*, por derivados de furina-r, el procesamiento tanto de moléculas de FXr de una sola cadena como también de aquellas con contenido en propéptidos. En la literatura, para los dos pasos de procedimiento se suponen proteasas, sin embargo no se trata de furina (Rehemtulla y col., 1992, Blood 79:2349-2355); Wallin y col., 1994, Throm. Res. 1994: 395-403).

25 Se mezclaron, en una relación 1:1, sobrenadantes de cultivos celulares CHO-FXr y CHO-furina-r ΔTM6xHis (solicitud de patente EP 0 775 750) así como CHO-FXr y CHO no transfectado (como control negativo) y se incubaron a 37°C. Antes de la incubación (t = 0) se ensayaron alícuotas de las fórmulas de reacción y tras diferentes tiempos de incubación (t = 2, 4, 6 horas), por medio de análisis Western Blot, en cuanto al FXr procesado (Figura 5). La prueba del FXr en los sobrenadantes de cultivos celulares se realizó mediante un antisero FX anti-humano (Figura 5) o con 30 un anticuerpo monoclonal específicamente para la cadena ligera de FX (Figura 5 B).

Al contrario que la mezcla CHO-FXr/CHO, la CHO-FXr/CHO-furina-r tiene, incluso después de dos horas de incubación a 37°C (Figura 5, banda 7; Figura 5B, banda 8), un procesamiento casi completo. El FXr de una sola cadena se ha convertido en gran parte en la forma de cadena ligera y pesada. En la zona de la cadena ligera se encontraron ya 35 solamente las formas libres de propéptidos procesadas de 22 kD (formas carboxiladas) y de 20 kD (formas deficientes en carboxilación) en una relación de aproximadamente 50:50. Optimizando las condiciones del cultivo celular se puede mejorar esta relación a favor de la forma carboxilada. La disociación correcta de la pro-secuencia entre Arg-1 y Ala+1 y la homogeneidad del N-terminal de la cadena ligera se determinaron por medio de secuenciación N-terminal. En el experimento control, en el que se mezclaron CHO-FXr y sobrenadantes de CHO, tampoco se pudo observar, tras 40 una incubación de 6 horas, un cambio en la banda FXr (Figura 5, banda 5; Figura 5B banda 6). Así se demostró que la furina-r es biológicamente activa en el sobrenadante celular CHO y se puede realizar tanto el procesamiento del propéptido como también de la cadena pesada/ligera de FXr.

### Ejemplo 3

#### 45 Procesamiento del factor X por medio de furina-r inmovilizada en un Tenta gel quelato

Para poder determinar si un sustrato puede disociarse mediante un derivado de furina-r ligado en una columna, se analizó si se puede utilizar como matriz de columna, en lugar de Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa, en una fórmula experimental, 50 Fractogel EMD®-Tentakelgel (firma Merck). Debido a que los iones del metal están más distanciados en el espacio de la matriz de columna mismo en comparación con Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa, podría facilitarse la posibilidad de un acceso estérico mejor del derivado de furina-r. En la presente formulación se procesó el profactor X con un derivado de furina-r ligado al gel Tentakel.

55 El fractogel EMD®-Tentakelgel se cargó con iones Ni<sup>2+</sup> según la especificación del fabricante y se equilibró con medios de cultivo frescos de células libres de suero. A continuación se cargó la columna con un sobrenadante libre del derivado de furina-r-CHO. Los pasos de lavado se realizaron con un medio de cultivo celular libre de suero que contenía concentraciones crecientes de imidazol de hasta 40 mM. A continuación se condujo el profactor X como sobrenadante de CHO libre de suero por encima de la columna. Por medio de análisis Western Blot con antisero de 60 factor X específico se demostró el procesamiento del profactor X y la obtención de factor X de dos cadenas al pasar por la columna.

### Ejemplo 4

#### 65 Actividad del factor X recombinante procesado *in vitro*

Se incubaron precursores de factor X recombinante con y sin furina-r a 4°C. En diferentes momentos se tomaron muestras y se congelaron a -20°C. Tras terminar la incubación (después de 4 días) se examinaron todas las muestras por

## ES 2 273 405 T3

medio del FX-Coatest Kit (firma Chromogenix) en cuanto a la actividad de FX. Para ello, se mezclaron 50  $\mu$ l de cada sobrenadante con 50  $\mu$ l de plasma humano deficiente en FX y se transformaron según el protocolo del fabricante con veneno de serpiente (RVV), en presencia de CaCl<sub>2</sub>, en FXar; el FXar hidroliza a continuación el sustrato cromógeno (S-2337) y conduce a la liberación de para-nitroanilina, de color amarillo. Debido a que la cantidad de FXar y la intensidad del color son proporcionales, se puede determinar la cantidad activable de FXr/ml del sobrenadante de cultivo celular con ayuda de una recta de calibración, interpolando los valores de una serie de diluciones de plasma.

5 Con estos resultados y con la cantidad conocida de antígeno de FXr (datos ELISA) se puede calcular en % la parte del factor Xr activado a factor Xa. En la Tabla 1 se representan los resultados.

10 Para poder excluir una actividad proteolítica no específica en los sobrenadantes de CHO y CHO-furina-r también se examinó la mezcla de estos dos sobrenadantes del cultivo celular.

15 El CHO-FXr incubado con sobrenadantes de CHO (sin furina-r) como control no mostró, ni siquiera después de aproximadamente 800 mU/ml y correspondía a un 50% - 60% de FXr funcional. Para comparar, se incubó CHO-FXr con CHO-furina, produciéndose durante el tiempo de incubación un incremento constante de la actividad de FXr que aumentó en aproximadamente un 60% (momento T = 0) hasta un 86% (Tabla 1). Así, se demostró que por el procesamiento *in vitro* de CHO-FXr a partir de clones de alta expresión por medio del derivado de furina-r se mejora considerablemente la parte de FXr que se puede activar a FXar funcional.

20

TABLA 1

	<b>Incubación (días)</b>	<b>Actividad (mU)</b>	<b>Cantidad de antígeno (<math>\mu</math>g/ml)</b>	<b>Parte funcional de FXr (%)</b>
25	CHO-FXr+	0	814	14
	CHO	1	847	14
		2	835	14
		3	790	14
		4	763	14
30	CHO-FXr +	0	853	14
	CHO-furina-r	1	1.018	14
		2	1.099	14
		3	1.135	14
		4	1.198	14
35	CHO +		0	
	CHO- furina-r			
40	Plasma FX			
	500 mU	585		
45				
50				

55

### Ejemplo 5

#### *Expresión del factor X recombinante en células deficientes en furina*

60 Como se ha mostrado en los ejemplos precedentes, en la proteína precursora de factor X, la disociación del propeptido, al igual que la disociación de la cadena individual en una cadena ligera/pesada, es proporcionada *in vitro* por furina. Esto hace suponer que estos pasos también se efectúan con diferente eficacia en la célula de forma endógena por furina presente ubicua dependiendo de la cantidad correspondiente del factor Xr expresado. Esto a su vez conduce a la producción de una mezcla de formas heterogéneas de factor Xr.

65

Una posibilidad para generar una forma de moléculas de factor Xr lo más homogéneas posibles y además estables es impedir la disociación del factor Xr por proteasas endógenas, especialmente por furina, y, por tanto, producir

# ES 2 273 405 T3

precursores funcionalmente inactivos de factor Xr (los cuales más tarde pueden convertirse en su forma funcionalmente activa por procesamiento corriente abajo, preferentemente directamente antes de su utilización).

Este procedimiento es especialmente útil para generar mutantes de delección de FX que contienen un sitio de disociación de furina en lugar del sitio de activación original. En estas estructuras, la activación de un mutante FXr recombinante de este tipo puede producirse *in vivo* por la furina endógena y conducir a la secreción de formas activas inestables de FXr. La degradación de estas formas por proteasas CHO, por ejemplo bajo condiciones de cultivo celular con una gran lisis de células, durante el almacenamiento de los sobrenadantes del cultivo celular o durante el procedimiento de purificación podría llevar a productos de desintegración inactivos (Wolf y col., 1991).

Este objetivo se puede alcanzar, por ejemplo, suplementando el medio de cultivo celular con agentes que pueden reducir o bien suprimir la actividad intracelular de la furina.

Otra posibilidad es utilizar, *a priori*, células deficientes en furina (Möhring y col., 1983, Infect. Immun. 41:998-1009; Ohnishi y col., J. Virol. 68:4075-4079; Gordon y col., 1995, Infect. Immun. 63:82-87).

Para ello, se cotransfrió un clón celular CHO FD11 deficiente en furina (Gordon y col., 1995, Infect. Immun. 63:82-87) con 20 µg de pHAct-FX y 1 µg de pUCSV-neo (que contiene el gen de resistencia a la neomicina en el vector pUC bajo el control del promotor SV40). Para obtener clones estables se suplementó el medio con 0,8 µg de G418/ml. Al comparar la molécula de factor Xr segregado en sobrenadantes libres de suero de un clón CHO con contenido en furina con uno deficiente en furina se demostró, en el análisis Westernblot, que en las células deficientes en furina no se lleva a cabo el procesamiento del precursor de factor Xr y solamente existe un precursor de factor X de una sola cadena (Figura 6); por el contrario, el factor Xr de células "normales", con una expresión modesta, todavía se procesa por completo, sin embargo en caso de una mayor expresión, de forma muy limitada a pesar de la furina endógena. Debido al reducido grado de expresión del FXr del clón celular utilizado, no se puede ver en la transferencia la cadena ligera del factor Xr.

## Ejemplo 6

Producción de análogos de factor XΔ (actualmente según la opinión del solicitante la mejor forma para realizar la invención)

### 6.1 Construcción de plásmidos de expresión para la producción de mutantes de delección de FX

Los mutantes de delección de factor X se diferencian de la secuencia del tipo salvaje del factor X por la delección de los péptidos de activación con un tamaño de aproximadamente 4,5 kDa entre los aminoácidos 180 a 234. Además, se incorporaron por mutagénesis diferentes sitios de disociación en el C-terminal de la cadena ligera y/o en el N-terminal de la cadena pesada, sitios de disociación que sirven para la activación de la molécula del factor X de una sola cadena así obtenida en un polipéptido activado. Los plásmidos de expresión para estos mutantes de delección de factor X se derivan todos de pHAct-Fx (descritos en el Ejemplo 1).

Para simplificar la clonación de los mutantes de delección del factor X se insertó el fragmento de ADN HindIII-NaeI del FX del plásmido pHAc, que comprende la región que codifica el factor X de la posición +1 a +1116, en los puntos de intersección de restricción HindIII/SmaI del plásmido pUC19. El plásmido resultante se denominó pUC/FX. Para la delección del péptido de activación e inserción de nuevos sitios de disociación, por ejemplo sitios de disociación de furina, FXIa, FXIIa, FXa, FIIa, se sustituyó el fragmento de ADN del FX Bsp120I/BstXI del vector pUC/FX por oligonucleótidos sintéticos. Para la inserción de un sitio de disociación de trombina o FXIa, se lisó el exceso BstXI-3' por medio de nucleasa de haba de Mung, de forma que también se pudo cambiar el aminoácido Ile en la posición 235. A continuación se clonaron los fragmentos de ADN del factor X sometidos a delección en el factor X de plásmido pAct a través de HindIII-AgeI.

Para obtener el sitio de disociación de FXIa Asp-Phe-Thr-Arg/Val se utilizó el oligonucleótido sens #0009 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG GAC TTC ACC AGG GTG-3') (SEQ ID NO 3) y el oligonucleótido antisens #0010 (5'-CAC CCT GGT GAA GTC CTG TTT CCC ACA GGG CTA G-3') (SEQ ID NO 4) y se insertaron en el sitio Bsp120I y en el sitio BstXI tratado con nucleasa de haba de Mung. Así se mutaron los aminoácidos desde la posición 176 a 235 en Asp-Phe-Thr y Val (Fig. 2A).

Para la obtención del sitio de disociación del FIIa Arg/Thr se utilizó el oligonucleótido sens #0011 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC CTG GAA CGG ACC-3') (SEQ ID NO 5) y el antisens #0012 (5'-GGT CCG TTC CAG GGT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 6) y se insertaron en el sitio Bsp120I y el sitio BstXI tratado con nucleasa de haba de Mung. Así se mutó el aminoácido Ile en la posición 235 a Thr (Figura 2B).

Para la obtención del sitio de disociación de FXIIa Ile-Lys-Pro-Arg/Ile se utilizó el oligonucleótido sens #0013 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ATC AAG CCC AGG ATC-3') (SEQ ID NO 7) y el antisens #0014 (5'-CT GGG CTT GAT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 8) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos de la posición 176 a 178 en Ile-Lys-Pro (Fig. 2C).

## ES 2 273 405 T3

Para la obtención del sitio de disociación de calicreína Ser-Met-Thr-Arg/Ile se utilizó el oligonucleótido sens #0015 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGC ATG ACC AGG ATC-3') (SEQ ID NO 9) y el oligonucleótido #0016 (5'-CT GGT CAT GCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 10) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos de la posición 176 a 178 en Ser-Met-Thr (Figura 2D).

5 Para la obtención del sitio de disociación de FXa Met-Lys-Thr-Arg/Ile se utilizó el oligonucleótido sens #0033 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ATG AAA ACG AGG ATC-3') (SEQ ID NO 11) y el antisens #0034 (5'-CT CGT TTT CAT CTG TTT CCC ACA GGG CTA G-3') (SEQ ID NO 12) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos de la posición 176 a 178 de Thr-Leu-Glu a Met-Lys-Thr (Figura 2E).

10 Para la obtención de un sitio de disociación de FXa Ile-Glu-Gly-Arg/Ile se utilizó el oligonucleótido sens #0035 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ATC GAG GGA AGG ATC-3') (SEQ ID NO 13) y el antisens #0036 (5'-CT TCC CTC GAT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 14) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos en posición 176 a 178 de Thr-Leu-Glu a Ile-Glu-Gly (Figura 2F).

15 Para la obtención de un sitio de disociación de furina Arg-Arg-Lys-Arg/Ile se utilizó el oligonucleótido sens #0017 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG AGG AAG AGG ATC-3') (SEQ ID NO 15) y el antisens #0018 (5'-CT CTT CCT CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 16) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos de la posición 176 a 178 en Arg-Arg-Lys (Fig. 2G).

20 Para la obtención de un sitio de disociación de furina Arg-Val-Arg-Arg/Ile se utilizaron el oligonucleótido sens #0019 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG GTG AGG AGG ATC-3') (SEQ ID NO 17) y el antisens #0020 (5'-CT CCT CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 18) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos de la posición 176 a 178 en Arg-Val-Arg (Fig. 2G).

25 Para la obtención de un sitio de disociación de furina Arg-Arg-Arg-Arg/Ile se utilizaron el oligonucleótido sens #0021 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG AGG AGG AGG ATC-3') (SEQ ID NO 19) y el antisens #0022 (5'-CT CCT CCT CTG TTT CCC ACA GGG CTA G-3') (SEQ ID NO 20) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos de posición 176 a 178 en Arg-Arg-Arg (Fig. 2G).

30 Para la obtención de un sitio de disociación de furina Arg-Pro-Lys-Arg/Ile se utilizaron el oligonucleótido sens #0023 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG CCC AAG AGG ATC-3') (SEQ ID NO 21) y el antisens #0024 (5'-CT CTT GGG CCT CTG TTT CCC ACA GGG CTA G-3') (SEQ ID NO 22) y se insertaron en Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos de posición 176 a 178 en Arg-Pro-Lys (Fig. 2G).

35 Para la obtención de un sitio de disociación de furina Ile-Arg-Lys-Arg/Ile se utilizaron el oligonucleótido sens #0025 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ATC AGG AAG AGG ATC-3') (SEQ ID NO 23) y el antisens #0026 (5'-CT CTT CCT GAT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 24) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos de posición 176 a 178 en Ile-Arg-Lys (Fig. 2G).

40 Para la obtención de un sitio de disociación de furina Arg-Ser-Lys-Arg/Ile se utilizaron el oligonucleótido sens #0027 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG AGC AAG AGG ATC-3') (SEQ ID NO 25) y el antisens #0028 (5'-CT CTT GCT CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 26) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos de posición 176 a 178 en Arg-Ser-Lys (Fig. 2G).

45 Para la obtención de un sitio de disociación de furina Arg-Val-Thr-Arg/Ile se utilizaron el oligonucleótido sens #0029 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG GTC ACG AGG ATC-3') (SEQ ID NO 27) y el antisens #0030 (5'-CT CGT GAC CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 28) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos de la posición 176 a 178 en Arg-Val-Thr (Fig. 2G).

50 Para la obtención de un sitio de disociación de furina Arg-Leu-Lys-Arg/Ile se utilizaron el oligonucleótido sens #0031 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG AGG CTG AAA AGG ATC-3') (SEQ ID NO 29) y el antisens #0032 (5'-CT TTT CAG CCT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 30) y se insertaron en el sitio Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos de la posición 176 y 178 en Arg y Lys (Fig. 2G).

55 Para la obtención de un sitio de disociación de FXa Pro-Gln-Gly-Arg/Ile se utilizaron el oligonucleótido sens #0037 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG CCC CAA GGA AGG ATC-3') (SEQ ID NO 31) y el antisens #0038 (5'-CT TCC TTG GGG CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 32) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI. Así se mutaron los aminoácidos en posición 176 a 178 de Thr-Leu-Glu a Pro-Gln-Gly (Fig. 2H).

60 Para la obtención del sitio de disociación de FXIIa Thr-Ser-Thr-Arg/Ile se utilizaron el oligonucleótido sens #0039 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACG AGC ACG AGG ATC-3') (SEQ ID NO 33) y el antisens #0040 (5'-CT CGT GCT CGT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 34) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI. Así se modificaron los aminoácidos de posición 176 y 178 en Ser-Thr (Fig. 2I).

65 Para la obtención de un sitio de disociación de tripsina Arg/Ile se utilizaron el oligonucleótido #0041 (5'-GG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC CTG GAA CGG ATC-3') (SEQ ID NO 35) y el antisens #0042 (5'-CG TTC

# ES 2 273 405 T3

CAG GGT CTG TTT CCC ACA GGG GTA G-3') (SEQ ID NO 36) y se insertaron en los sitios Bsp120I y BstXI (Fig. 2J).

Los plásmidos de expresión resultantes (véase Fig. 3) comprenden el promotor humano de beta-actina, de 78bp del 5'UTR, el intrón de beta-actina, la secuencia modificada de factor X así como 39pb de 3'UTR y el sitio de poliadenilación SV40.

## 6.2 Construcción de plásmidos de expresión para la obtención de análogos de FX $\beta$

Esta estructura se derivó de las estructuras del análogo de factor X $\Delta$ , incorporando un codón de parada TGA en la posición 470. Para este fin se eliminaron los aminoácidos de la posición 457 hasta el codón de parada por SpeI y digestión parcial de BstEII y se sustituyeron por el par de oligonucleótidos #0003 (5'-GTC ACC GCC TTC CTC AAG TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AGG TGA A-3') (SEQ ID NO 37) y #004 (5'-CTA GTT CAC CTG GTT TTC ATG GAC CTG TCG ATC CAC TTG AGG AAG GCG-3') (SEQ ID NO 38). En la Figura 7 se muestra una representación esquemática de las estructuras del análogo de factor X $\Delta\beta$ . Para simplificar la representación se muestran todos los análogos de factor X $\Delta\beta$  como una estructura general en la que se han indicado los aminoácidos variables en la región de los sitios de disociación como "X" sombreada.

## 6.3 Construcción de plásmidos de expresión para la obtención de análogos FX $\Delta\alpha$

Con la activación del factor X por disociación del péptido de activación de 4,5 kDa en el extremo de N-terminal de la cadena pesada se produce la forma del Factor X $\Delta\alpha$ . Esta forma se transforma, a continuación, por actividad autoproteolítica y disociación del C-terminal de la cadena pesada entre Arg 469 y Gly 470 en la forma FX $\alpha\beta$ . Para la producción de plásmidos de expresión del factor X que conducen a la producción de análogos del factor X $\Delta$ , los cuales después de la activación existen exclusivamente como forma FX $\Delta\alpha$  con el péptido  $\beta$  intacto, se mutó el aminoácido Arg469 en Lys de manera que ya no podía tener lugar ningún procesamiento en la zona C-terminal de la cadena pesada.

Para ello, se eliminó la secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos C-terminal C del factor X desde la posición 1363 hasta la señal de parada por digestión parcial con BstEII-SpeI y se sustituyó por dos pares de oligonucleótidos ligados entre sí. Se ligaron los oligonucleótidos #0005 (5'-GTC ACC GCC TTC CTC AAG TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AAG GGC TTG CCC AAG-3') (SEQ ID NO 39) y #0006 (5'-TTG GCC TTG GGC AAG CCC TTG GTT TTC ATG GAC CTG TCG ATC CAC TTG AGG AAG GCG-3') (SEQ ID NO 40) con los oligonucleótidos #0007 (5'-GCC AAG AGC CAT GCC CCG GAG GTC ATA ACG TCC TCT CCA TTA AAG TGA GAT CCC A-3') (SEQ ID NO 41) y #0008 (5'-CTA GTG GGA TCT CAC TTT AAT GGA GAG GAC GTT ATG ACC TCC GGG GCA TGG CTC-3') (SEQ ID NO 42). La mutación del aminoácido Arg469 se introduce por el par de oligonucleótidos #0005-#0006. Una representación esquemática del análogo FX $\Delta$  se muestra en la Figura 7.

## Ejemplo 7

### 40 Determinación de los N-terminales del factor X y productos de procesamiento con y sin furina-r

El factor X recombinante se expresó, según se describe en el Ejemplo 1, en células CHO con furina endógena o bien, según se describe en el Ejemplo 5, en células deficientes en furina. El factor Xr se aisló tanto del sobrenadante de cultivo celular de clones de CHO-FXr de alta expresión a) no pretratado, b) incubado durante 12 horas a 37°C y c) pretratado durante 12 horas a 37°C, con sobrenadante de CHO-furina-r como también de sobrenadante de cultivo celular de clones CHO-FD11-FXr d) no pretratado y e) pretratado durante 12 horas a 37°C, con sobrenadante de CHO-furina-r. Los aminoácidos terminados N-terminal N del factor X y los productos de procesamiento de las distintas fórmulas de reacción a) a e) se determinaron mediante análisis Edman. La Figura 8 muestra una representación esquemática de los resultados.

El factor Xr de células CHO de alta expresión se presenta en forma de cadenas maduras pesadas y ligeras, así como de cadenas únicas, en parte todavía con contenido en propéptido. Después de una incubación de este sobrenadante de cultivo celular durante 12 horas a 37°C (b) se presentan, además, según ya lo ha descrito en Wolf y col., (1991, J. Bio. Chem. 266:13726-13730), N-terminales defectuosos en la cadena ligera de FXr con 3 aminoácidos adicionales Val38-Thr39-Arg40. Estos terminales crípticos también se encuentran durante la secuenciación de material FXr de células CHO-FD11 (d) sin pretratar. Esta observación muestra que se puede evitar la aparición de estos N-terminales defectuosos aplicando condiciones de cultivo celular, almacenamiento y procedimientos de purificación adecuados para minimizar la proteólisis de FXr por proteasas CHO.

Al contrario del material purificado de células CHO (a y b), el FXr de células deficientes en furina, no amplificadas (d), solamente existe en forma de precursores de una sola cadena no procesados. Tampoco se pueden encontrar secuencias N-terminal que corresponden a la parte del propéptido. Así se demostró que ya no se produce el procesamiento de precursores de FXr de una sola cadena a cadena ligera/pesada en células CHO deficientes en furina (d), lo que hace suponer una función central de la endoproteasa furina en este paso de procesamiento *in vivo*. Además, se demostró que el procesamiento de moléculas de FXr con contenido en propéptidos también tiene lugar en células CHO deficientes en furina y que, por tanto, la furina *in vivo* no tiene ningún papel esencial en este paso de procesamiento. Por la incubación de FXr en células CHO (c) y CHO-FD11 (e) en presencia de furina se encuentran exclusivamente cadenas ligeras y pesadas con N-terminales correctos. Así se ha demostrado que tanto los precursores de FX de una

# ES 2 273 405 T3

sola cadena como también las moléculas de FXr con contenido en propéptido pueden transformarse en el factor X homogéneo maduro por procesamiento *in vitro*. Así, el factor X procesado en presencia de furina muestra una integridad estructural extraordinaria.

## 5 Ejemplo 8

*Expresión y caracterización del mutante de delección de FX recombinante con el sitio de disociación Arg-Val-Thr-Arg/Ile (FXΔ<sup>RCTR/I</sup>)*

- 10 El plásmido de expresión que codifica el mutante de delección de FX con el sitio de disociación Arg-Val-Thr-Arg/Ile (FXΔ<sup>RCTR/I</sup>) se cotransfectó, como ya se ha descrito en el Ejemplo 1, con el marcador de selección pSV/dhfr en células de CHO deficientes en dhfr. La proteína recombinante FXΔ<sup>RCTR/I</sup> de clones CHO permanentes se caracterizó por medio de análisis Western Blot. Como se puede ver en la Figura 9, banda 4, la proteína recombinante se presenta en forma de banda doble de aproximadamente 56 y 50 kD. En el sobrenadante de cultivo celular de células CHO no transfectadas  
15 no se puede detectar ningún material reactivo de FX (banda 2). Estos resultados excluyen que estas bandas de proteína se presenten en el medio de cultivo celular debido a impurezas de los sobrenadantes analizados del tipo salvaje de FX en restos de suero bovino. Por esta razón, es probable, que la banda doble se deba a diferentes modificaciones postraducción, por ejemplo la presencia del propéptido o glucosilación diferente de la molécula de rFXΔ<sup>RCTR/I</sup>.
- 20 El sitio de disociación Arg-Val-Thr-Arg/Ile incorporado en esta estructura es idéntico al sitio de disociación de propéptido de la molécula FX de tipo salvaje, la cual es reconocida y disociada con eficacia por una endoproteasa CHO *in vivo* (véase Ejemplo 7). El análisis Western Blot no muestra ninguna molécula adicional de FX pesado de 35 kD o de 31 kD, que corresponderían a las formas  $\alpha$  y  $\beta$  activadas de las cadenas pesadas de rFXΔ<sup>RCTR/I</sup>. Estos resultados demuestran que bien la cantidad de endoproteasa no es suficiente como para la activación de la proteína  
25 y/o que no se ha reconocido y disociado *in vivo* o solamente se ha reconocido y disociado de forma no eficaz el sitio de disociación Arg-Val-Thr-Arg/Ile en el entorno de secuencia dado. La rFXΔ<sup>RCTR/I</sup> existe, por tanto prácticamente de manera exclusiva, en forma de una sola cadena.

## Ejemplo 9

30 *Activación de la proteína rFXΔ<sup>RCTR/I</sup> recombinante por medio de derivados de furina recombinantes *in vitro**

- Aunque el sitio de disociación Arg-Val-Thr-Arg en el propéptido de FXr es reconocido *in vivo* por otra proteasa diferente de furina, se demostró en el Ejemplo 2 que esta secuencia se disocia *in vitro* de forma muy eficaz y correcta  
35 por un derivado de furina-r.

Para examinar la capacidad de activación de la proteína rFXΔ<sup>RCTR/I</sup> por furina-r *in vitro* se realizaron experimentos mixtos. Para ello se mezcló el sobrenadante de cultivo celular de células de CHO-FXΔ<sup>RCTR/I</sup> con el derivado de furina-r purificado, r-furinΔCys-Spacer-10xHis (véase la solicitud de patente EP 0 775 750 A2) en presencia de 20 mM Hepes, pH 7,0, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl<sub>2</sub> y 0,1 de BSA en una relación 1:1. En el experimento de control se mezcló el sobrenadante de CHO-rFXΔ<sup>RCTR/I</sup> en la misma proporción solamente con la sustancia tampón con contenido en BSA. La adición de BSA estabiliza la actividad enzimática del derivado de furina-r así como los productos resultantes activados de rFXΔ<sup>RCTR/I</sup>. Se examinaron por análisis Western Blot alícuotas de las fórmulas de reacción antes y después de un tiempo de incubación de 6, 24, 48 y 72 horas ( $t = 0$ ,  $t = 6$ ,  $t = 24$ ,  $t = 48$ ,  $t = 72$ ) a 37°C en cuanto al procesamiento de rFXΔ<sup>RCTR/I</sup> (Figura 10). En el experimento de la mezcla sin adición de furina-r (Figura 10B) no se puede observar ninguna modificación de la banda durante el tiempo de incubación (bandas 4 a 9). Debido a la presencia de BSA en las fórmulas de reacción solamente son bien visibles las moléculas de rFXΔ<sup>RCTR/I</sup> más ligeras (50 kD), puesto que las moléculas pesadas de 56 kD no quedan cubiertas por la banda de BSA.

- 50 En presencia del derivado de furina-r (Figura 10A) se presenta, incluso después de una incubación de 6 horas (banda 5), una banda de proteína de un tamaño de 35 kD, que corresponde a la forma  $\alpha$  de la cadena pesada de FX (comparación con banda 9). Esta proteína se acumula en el transcurso de la incubación y se transforma, a continuación, también en la forma  $\beta$  proteolítica, como es conocido en el FX plasmático, forma  $\beta$  que se produce por la transformación proteolítica de la forma  $\alpha$  (bandas 7 y 8). Paralelamente a la detección de las formas activas de las  
55 cadenas pesadas se pueden ver cadenas ligeras de 22 kD y 20 kD, que se identificaron en el Ejemplo 1 b. como LC2 carboxilado, libre de propéptidos (que corresponde a la forma funcional propia) o bien como forma LC4 carboxilado, libre de propéptidos, de la cadena ligera. La presencia de la forma LC4 deficiente en carboxilación confirma que en los clones de CHO analizados los mecanismos de modificación postraducción son limitados. Aunque la banda de 50 kD parece no estar modificada, mientras que aparentemente la forma de 56 kD se desintegra directamente en cadenas  
60 ligera/pesadas, de hecho la molécula de 56 kD se transforma de momento en la forma 50 kD y solamente a continuación se disocia en una cadena ligera y una cadena pesada. Esto es debido a la presencia del propéptido en la molécula de 50 kD, que se elimina de momento formando la forma de 50 kD.

Así se demostró que la estructura rFXΔ<sup>RCTR/I</sup> puede activarse *in vitro* por derivados de furina-r a través del sitio de disociación incorporado Arg-Val-Thr-Arg/Ile y que los productos de procesamiento resultantes de las estructuras rFXΔ<sup>RCTR/I</sup> corresponden en tamaño a los del FXa del plasma. La presencia de FXΔ $\beta$  que se produce por el procesamiento autoproteolítico de FXΔ $\alpha$  muestra la funcionalidad de la molécula de rFXΔ<sup>RCTR/I</sup>.

**REIVINDICACIONES**

- 5        1. Análogo de factor X $\Delta$ , **caracterizado** porque tiene una delección de los aminoácidos Arg180 a Arg234 de la secuencia de aminoácidos del factor X $\Delta$  y una modificación en la zona de la secuencia de aminoácidos entre Gly173 y Arg179, donde la modificación representa un sitio de procesamiento de una proteasa que no disocia naturalmente en este sitio de la secuencia del factor X.
- 10      2. Análogo de factor X $\Delta$  según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la modificación es como mínimo un intercambio de aminoácidos en la zona de la secuencia de aminoácidos entre Gly173 y Arg179 con referencia a la numeración de los aminoácidos según la Figura 1.
- 15      3. Análogo de factor X $\Delta$  según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque contiene una secuencia de factor X con Gly173-R6-R5-R4-R3-R2-Arg179/R1 (235) donde:
- 20      a) R1 es un aminoácido seleccionado del grupo Val, Ser, Thr, Ile ó Ala.  
b) R2 es un aminoácido seleccionado del grupo Glu, Thr, Pro, Gly, Lys ó Arg.  
c) R3 es un aminoácido seleccionado del grupo Leu, Phe, Lys, Met, Gln, Glu, Ser, Val, Arg ó Pro.  
d) R4 es un aminoácido seleccionado del grupo Thr, Asp, Asn, Ile, Ser, Met, Pro, Arg ó Lys.  
e) R5 es un aminoácido seleccionado del grupo Asn, Lys, Ser, Glu, Gln, Ala, His ó Arg, y  
f) R6 es un aminoácido seleccionado del grupo Asp, Phe, Thr, Arg, Leu ó Ser.
- 25      4. Análogo de factor X $\Delta$  según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la modificación representa un sitio de procesamiento para una proteasa seleccionada de entre el grupo de endoproteasas, por ejemplo Kexin/Kex2, Furina/PA $\beta$ CE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, de serinaproteasas, por ejemplo los factores IIa, VIIa, IXa, XIIa, XIa, Xa o de calicreína o un derivado de estas proteasas.
- 30      5. Análogo de factor X $\Delta$  según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque existe como molécula de una sola cadena en forma enzimática inactiva.
- 35      6. Análogo de factor X $\Delta$  según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la modificación permite una activación del polipéptido inactivo de una sola cadena del análogo de factor X $\Delta$  para obtener la forma activa de doble cadena del análogo de factor Xa.
- 40      7. Análogo de factor X $\Delta$  según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque tiene otra modificación en la zona de la secuencia de aminoácidos C-terminal del factor X.
- 45      8. Análogo de factor X $\Delta$  según la reivindicación 7, **caracterizado** porque tiene una modificación en la zona C-terminal del sitio de disociación del péptido  $\beta$ .
- 50      9. Análogo de factor X $\Delta$  según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la modificación es una mutación, delección o inserción en la zona de la secuencia de aminoácidos del factor X entre la posición de los aminoácidos Arg469 y Ser476.
- 55      10. Análogo de factor X $\Delta$  según una de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado** porque la modificación impide la disociación del péptido  $\beta$ .
- 60      11. Análogo de factor X $\Delta$  según la reivindicación 7, **caracterizado** porque tiene una delección del péptido  $\beta$  del factor X.
- 65      12. Análogo de factor X $\Delta$  según la reivindicación 11, **caracterizado** porque tiene una señal de parada de traducción en la zona C-terminal de la secuencia del factor X.
- 70      13. Análogo de factor X $\Delta$  según la reivindicación 12, **caracterizado** porque tiene una señal de parada de traducción en la posición del aminoácido Lys470 de la secuencia del factor X.
- 75      14. Análogo de factor X $\Delta$  según una de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque la modificación permite, en la zona de la secuencia de aminoácidos entre Gly173 y Arg179, una activación del análogo inactivo del factor X para obtener el análogo activo del factor X $\Delta$  *in vitro*.
- 80      15. Análogo de factor X $\Delta$  según la reivindicación 14, **caracterizado** porque la modificación permite una activación por una proteasa seleccionada de entre el grupo de endoproteasas, por ejemplo Kexin/Kex2, Furina/PACE, PC1/PC3,

# ES 2 273 405 T3

PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, de serinoproteasas, por ejemplo los factores IIa, VIIa, IXa, XIIa, XIa, Xa o de calicreína o un derivado de estas proteasas.

16. Análogo de factor X $\Delta$  según una de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque tiene un péptido  $\beta$  intacto y existe como factor X $\Delta\alpha$ .
17. Análogo de factor X $\Delta$  según una de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque tiene una delección del péptido  $\beta$ .
18. ADN recombinante que codifica un análogo de factor X $\Delta$  según una de las reivindicaciones 1 a 17, contenido en un vector para la expresión recombinante de la proteína codificada.
19. Células transformadas, **caracterizadas** porque contienen un ADN recombinante según la reivindicación 18.
20. Preparadocontenido un análogo purificado de factor X $\Delta$  que tiene una delección de los aminoácidos Arg180 a Arg234 de la secuencia de aminoácidos del factor X y una modificación en la zona de la secuencia de aminoácidos entre Gly173 y Arg179, donde la modificación representa un sitio de procesamiento de una proteasa que no disocia naturalmente en este sitio de la secuencia del factor X.
21. Preparado según la reivindicación 20, **caracterizado** porque contiene un análogo de una sola cadena de factor X $\Delta$  en forma enzimática inactiva con una pureza mínima del 80%, preferentemente del 90%, en especial del 95%, y no tiene productos proteolíticos inactivos de análogo de factor X/Xa.
22. Preparado según una de las reivindicaciones 20 ó 21, **caracterizado** porque contiene el análogo de factor X $\Delta$  como factor X $\Delta\alpha$ .
23. Preparado según una de las reivindicaciones 20 ó 21, **caracterizado** porque contiene el análogo de factor X $\Delta$  como FX $\Delta\beta$ .
24. Preparado según una de las reivindicaciones 20 a 23, **caracterizado** porque contiene el análogo de factor X $\Delta$  como molécula de una sola cadena en forma aislada.
25. Preparado según una de las reivindicaciones 20 a 24, **caracterizado** porque contiene un análogo de factor X $\Delta$  con una gran estabilidad e integridad estructural de la molécula.
26. Preparado según una de las reivindicaciones 20 a 25, **caracterizado** porque contiene un análogo de factor X $\Delta$  que tiene una modificación que permite una activación *in vitro* del análogo de factor X $\Delta$  para obtener un análogo de factor Xa.
27. Preparado según una de las reivindicaciones 20 a 26, **caracterizado** porque está formulado como preparado farmacéutico.
28. Preparado según la reivindicación 27, **caracterizado** porque se presenta en un dispositivo adecuado, preferentemente en un dispositivo de aplicación, en combinación con una proteasa seleccionada de entre el grupo de endoproteasas, por ejemplo Kexin/Kex2, Furina/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, de serinoproteasas, por ejemplo los factores IIa, VIIa, IXa, XIIa, XIa, Xa o calicreína o un derivado de estas proteasas.
29. Preparado según la reivindicación 28, **caracterizado** porque los componentes están dispuestos en espacios separados.
30. Preparado que contiene un análogo purificado de factor Xa con una gran estabilidad e integridad estructural, en particular, que está libre de productos intermedios inactivos de análogo de factor X $\Delta$ /Xa y de productos de desintegración autoproteolíticos, que se obtiene por la activación de un análogo de factor X $\Delta$  según una de las reivindicaciones 1 a 17.
31. Preparado según la reivindicación 30, **caracterizado** porque contiene un análogo activo de factor Xa como molécula de doble cadena en forma aislada.
32. Preparado según una de las reivindicaciones 30 ó 31, **caracterizado** porque contiene el análogo de factor Xa con una pureza de como mínimo un 80%, preferentemente de un 90%, en especial de un 95% y no tiene productos intermedios proteolíticos inactivos de análogo de factor X/Xa.
33. Preparado según una de las reivindicaciones 30 a 32, **caracterizado** porque contiene un portador fisiológicamente aceptable y se presenta en forma estable para su almacenamiento.
34. Preparado según una de las reivindicaciones 20 a 33, **caracterizado** porque contiene, eventualmente, como otro componente un factor sanguíneo o una forma activa de un factor sanguíneo.

# ES 2 273 405 T3

35. Preparado según la reivindicación 34, **caracterizado** porque contiene como otro ingrediente, como mínimo un componente con actividad bypass de factor VIII.

5 36. Preparado según una de las reivindicaciones 20 a 35, **caracterizado** porque está formulado como una composición farmacéutica.

37. Utilización de un preparado según una de las reivindicaciones 20 a 36 para la producción de un medicamento.

10 38. Utilización de un preparado según una de las reivindicaciones 20 a 36 para la producción de un medicamento para el tratamiento de pacientes con trastornos de coagulación sanguínea, por ejemplo pacientes con hemofilia o pacientes hemofílicos que han desarrollado anticuerpos inhibidores.

15 39. Procedimiento para la producción de un preparado que contiene un análogo purificado recombinante de factor X $\Delta$ , **caracterizado** porque un análogo de factor X $\Delta$  obtenido por producción recombinante se aísla como molécula de una sola cadena y se purifica mediante un procedimiento cromatográfico.

40. Procedimiento según la reivindicación 39, **caracterizado** porque comprende los siguientes pasos:

20 - poner a disposición un ácido nucleico que codifica un análogo de factor X $\Delta$  según una de las reivindicaciones 1 a 17

- transfectar una célula adecuada

- expresar el análogo de factor X $\Delta$

25 - aislar los análogos de una sola cadena de factor X $\Delta$ , y

- purificar el polipéptido.

30 41. Procedimiento para la producción de un preparado que contiene análogos activos de factor X $\Delta$  **caracterizado** porque un preparado obtenido según una de las reivindicaciones 39 ó 40 se somete a un paso de activación.

35 42. Procedimiento según la reivindicación 41, **caracterizado** porque el preparado que contiene un análogo de una sola cadena de factor X $\Delta$  se pone en contacto con una proteasa seleccionada de entre el grupo de endoproteasas, por ejemplo Kexin/Kex2, Furina/PACE, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE 4, LPC/PC7, de serinaproteasas, por ejemplo los factores IIa, VIIa, IXa, XIIa, XIa, Xa o de calicreína o un derivado de estas proteasas, bajo condiciones que permiten que el análogo de una sola cadena de factor X $\Delta$  se disocie formando el análogo de doble cadena de factor Xa.

40 43. Procedimiento según la reivindicación 42, **caracterizado** porque la proteasa está inmovilizada.

45 44. Procedimiento según una de las reivindicaciones 40 a 43, **caracterizado** porque se obtiene un análogo purificado de factor Xa con una gran estabilidad e integridad estructural, en particular que está libre de productos intermedios inactivos de análogo de factor X $\Delta$ /Xa.

50

55

60

65

# ES 2 273 405 T3

(-40)

1

Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly Leu Leu Leu  
 ATG GGG CGG CCA CTG CAC CTC GTC CTC AGT GCC TCC CTG GCT GGC CTC CTG CTG  
 9 18 27 36 45 54

(-4)

(-1)

40

Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg  
 CTC GGG GAA AGT CTG TTC ATC CGC AGG GAG CAG AAC AAC ATC CTG GCG AGG GTC ACG AGG  
 66 75 84 93 102 111 120

(+1)

41

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr  
 GCC AAT TCC TTT CTT GAA GAG ATG AAG AAA GGA CAC CTC GAA AGA GAG TGC ATG GAA GAG ACC  
 129 138 147 156 165 174 183

Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn  
 TGC TCA TAC GAA GAG GGC CGC GAG GTC TTT GAG GAC ACC GAC AAG ACG AAT GAA TTC TGG AAT  
 192 201 210 219 228 237 246

Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Glu Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp  
 AAA TAC AAA GAT GGC GAC CAG TGT GAG ACC AGT CCT TGC CAG AAC CAG GGC AAA TGT AAA GAC  
 255 264 273 282 291 300 309

Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe  
 GGC CTC GGG GAA TAC ACC TGC ACC TGT TTA GAA GGA TTC GAA GGC AAA AAC TGT GAA TTA TTC  
 318 327 336 345 354 363 372

Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn  
 ACA CGG AAG CTC TGC AGC CTG GAC AAC GGG GAC TGT GAC CAG TTC TGC CAC GAG GAA CAG AAC  
 381 390 399 408 417 426 435

Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro  
 TCT GTG GTG TGC TCC GCC CGC GGG TAC ACC CTG GCT GAC AAC GGC AAG GGC TGC ATT CCC  
 444 453 462 471 480 489 498

R6 R5 R4 R3 R2

173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183

Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala  
 ACA GGG CGC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC CTG GAA GGC AGG AAG AGG TCA GTG GCC CAG GGC  
 507 516 525 534 543 552 561

Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu  
 ACC AGC AGC AGC GGG GAG GGC CCT GAC AGC ATC ACA TGG AAG CCA TAT GAT GCA GCC GAC CTG  
 570 579 588 597 606 615 624

Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp  
 GAC CCC ACC GAG AAC CCC TTC GAC CTG CTT GAC TTC AAC CAG ACG CAG CCT GAG AGG GGC GAC  
 633 642 651 660 669 678 687

R1

234 235

Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala  
 AAC AAC CTC ACC AGG ATC GTG GGA CCC CAG GAA TGC AAG GAC GCG GAG TGT CCC TGG CAG GCC  
 696 705 714 723 732 741 750

Fig. 1-1

# ES 2 273 405 T3

Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile  
 CTG CTC ATC AAT GAG GAA AAC GAG GGT TTC TGT GGT GGA ACT ATT CTG AGC GAG TTC TAC ATC  
 759        768        777        786        795        804        813

Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn  
 CTA ACG GCA GCC CAC TGT CTC TAC CAA GCC AAG AGA TTC AAG GTG AGG GTA GGG GAC CGG AAC  
 822        831        840        849        858        867        876

Thr Glu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg  
 ACG GAG CAG GAG GAG GGC GGT GAG GCG GTG CAC GAG GTG GAG GTG GTC ATC AAG CAC AAC CGG  
 885        894        903        912        921        930        939

Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe  
 TTC ACA AAG GAG ACC TAT GAC TTC GAC ATC GCC GTG CTC CGG CTC AAG ACC CCC ATC ACC TTC  
 948        957        966        975        984        993        1002

Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr  
 CGC ATG AAC GTG GCG CCT GCC TGC CTC CGC GAG CGT GAC TGG GCC GAG TCC ACG CTG ATG ACG  
 1011        1020        1029        1038        1047        1056        1065

Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg  
 CAG AAG ACG GGG ATT GTG AGC GGC TTC GGG CGC ACC CAC GAG AAG GGC CGG CAG TCC ACC AGG  
 1074        1083        1092        1101        1110        1119        1128

Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile  
 CTC AAG ATG CTG GAG GTG CCC TAC GTG GAC CGC AAC AGC TGC AAG CTG TCC AGC AGC TTC ATC  
 1137        1146        1155        1164        1173        1182        1191

Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp  
 ATC ACC CAG AAC ATG TTC TGT GCC GGC TAC GAC ACC AAG CAG GAG GAT GCC TGC CAG GGG GAC  
 1200        1209        1218        1227        1236        1245        1254

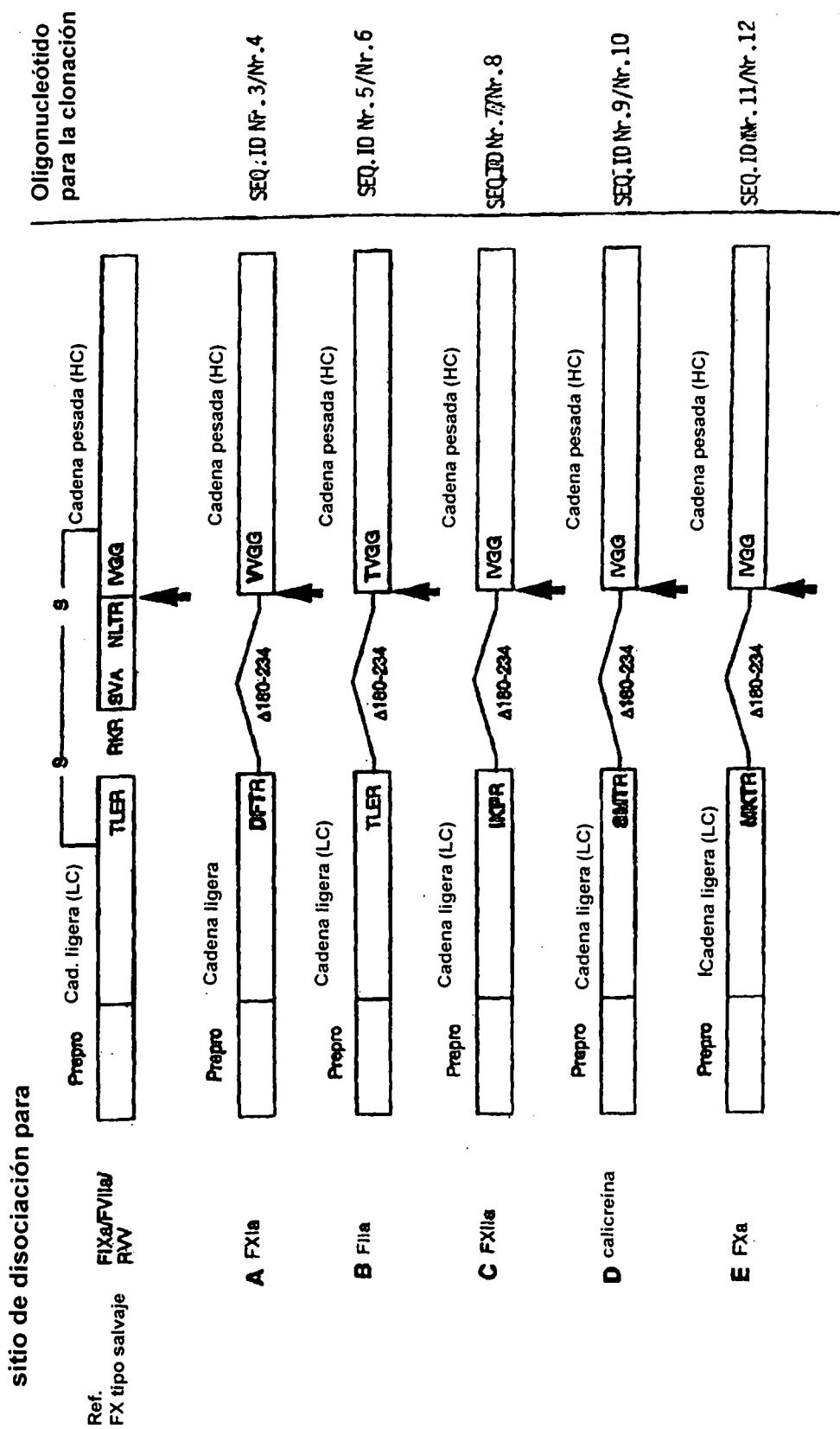
Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp  
 AGC GGG GGC CCG CAC GTC ACC CGC TTC AAG GAC ACC TAC TTC GTG ACA GGC ATC CTC AGC TGG  
 1263        1272        1281        1290        1299        1308        1317

Gly Glu Ser Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys  
 GGA GAG ACC CGT AAG GGG AAG TAC GGG ATC TAC ACC AAG GTC ACC GCC TTC CTC AAG  
 1326        1335        1344        1353        1362        1371        1380

469 470                  475 476                  480  
 Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val  
 TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AGG GGC TTG CCC AAG GCC AAG AGC CAT GCC CGG GAG GTC  
 1389        1398        1407        1416        1425        1434        1443

488  
 Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys TER  
 ATA ACG TCC TCT CCA TTA AAG TGA  
 1452        1461        1467

Fig. 1-2

**Fig. 2.1.**

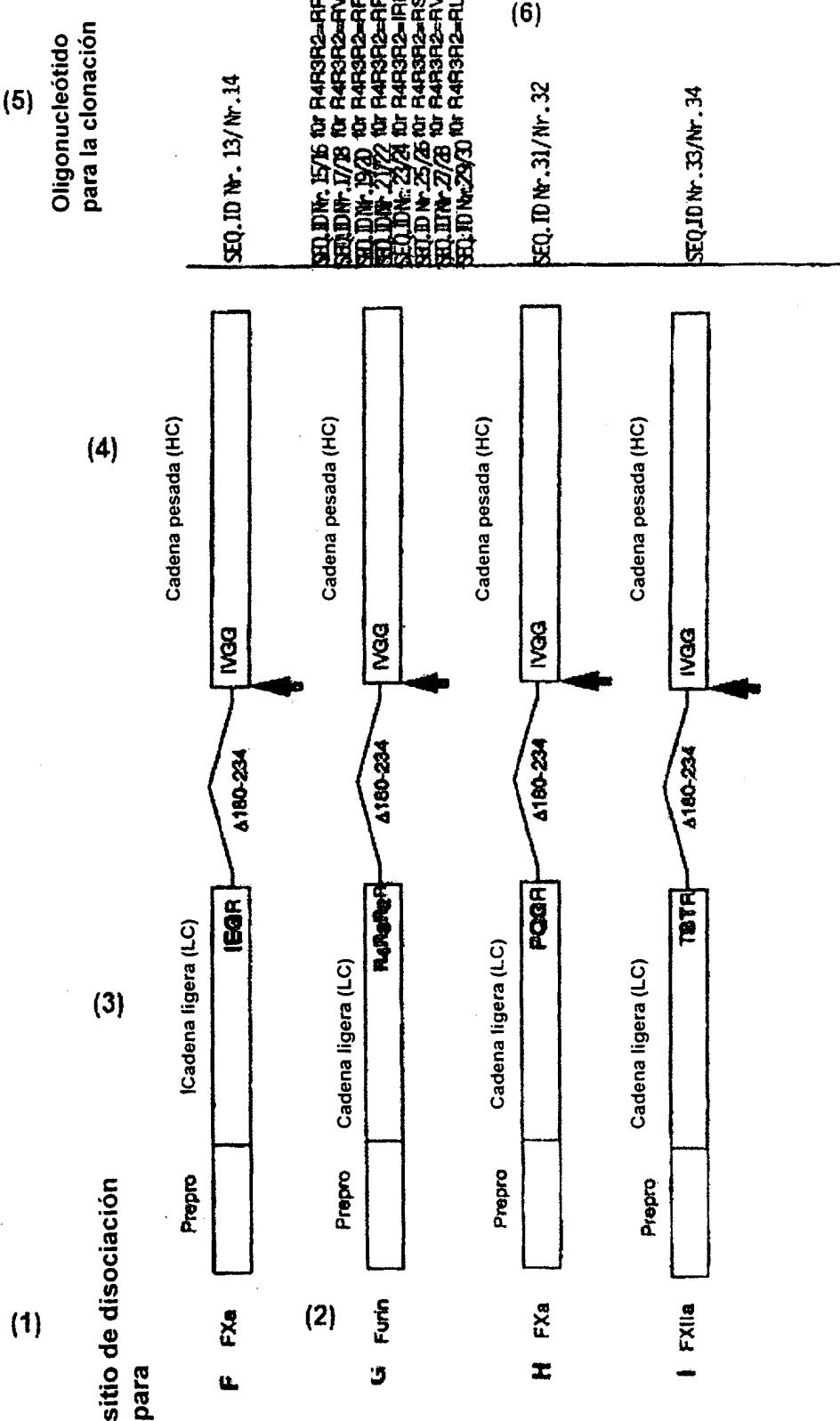


Fig. 2.2

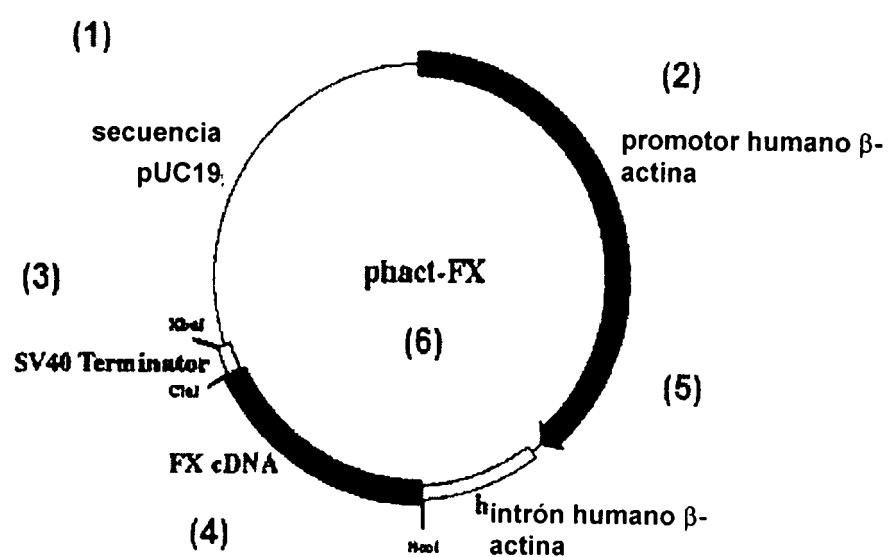


Fig. 3

ES 2 273 405 T3

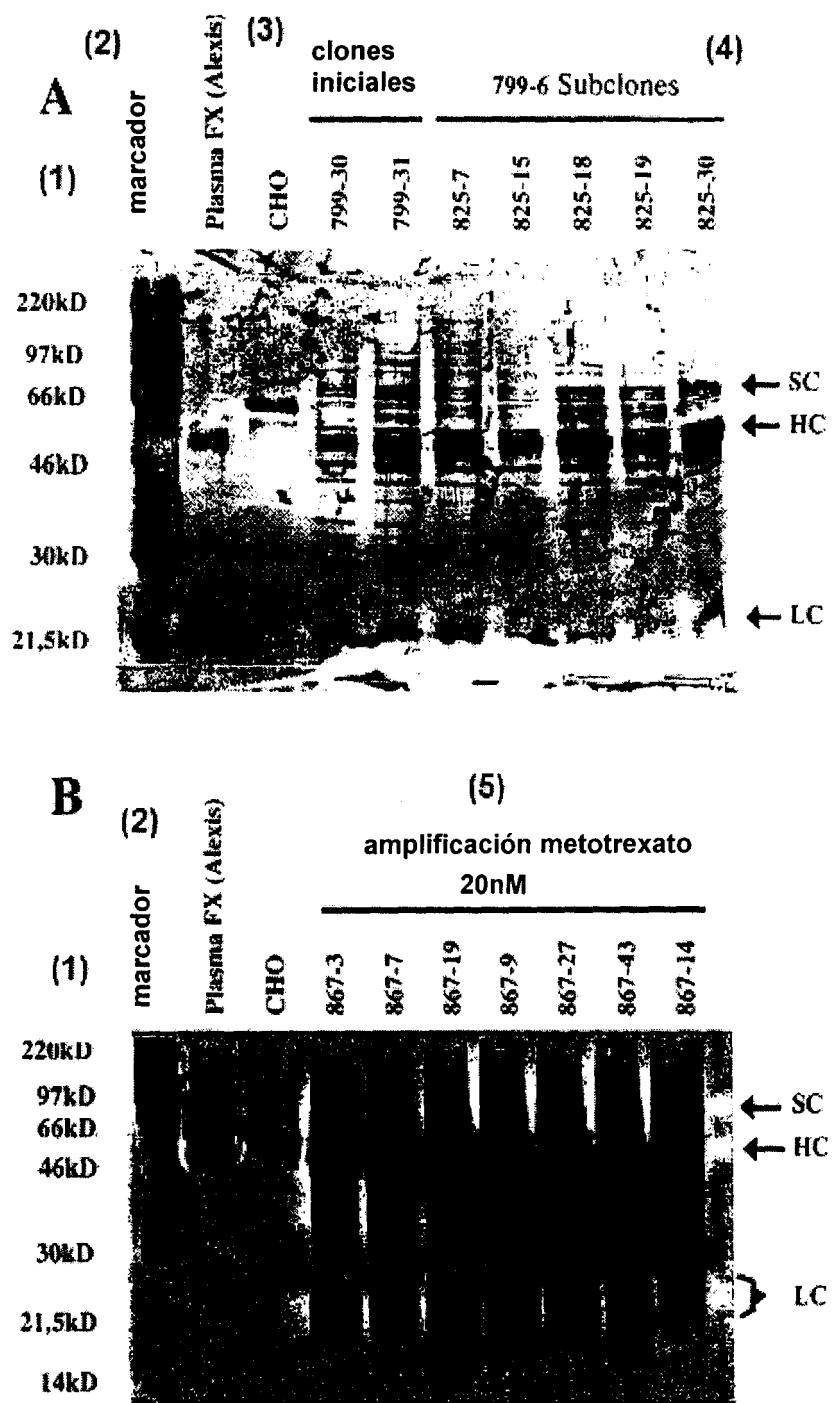
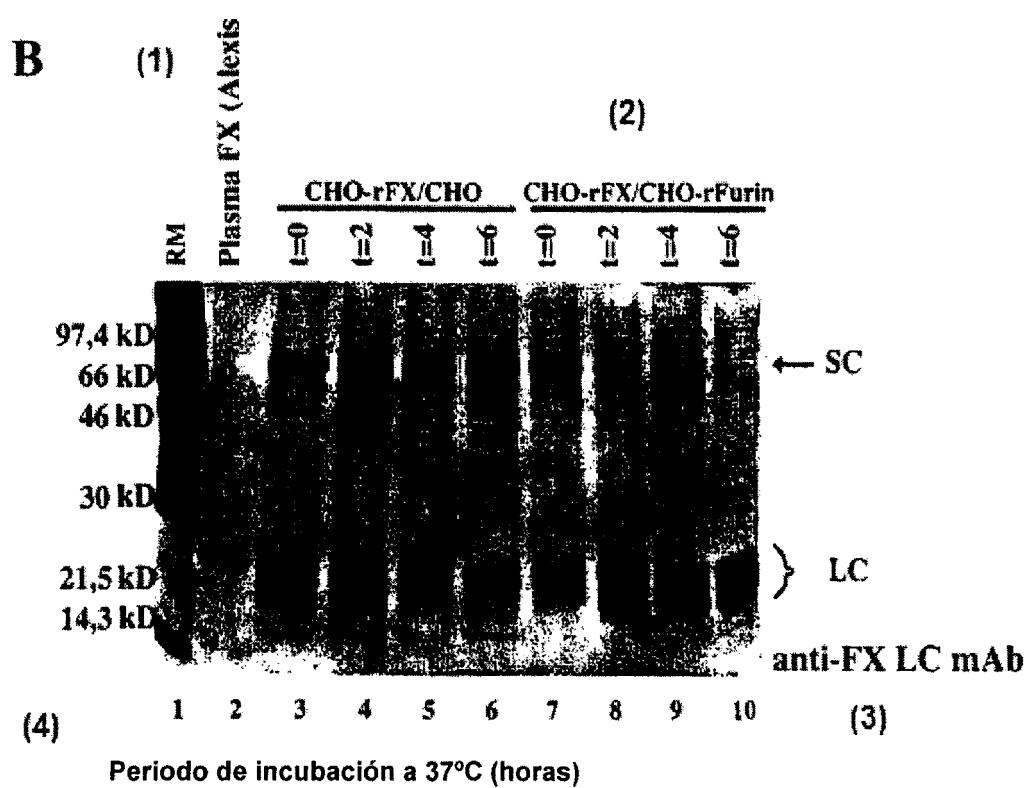
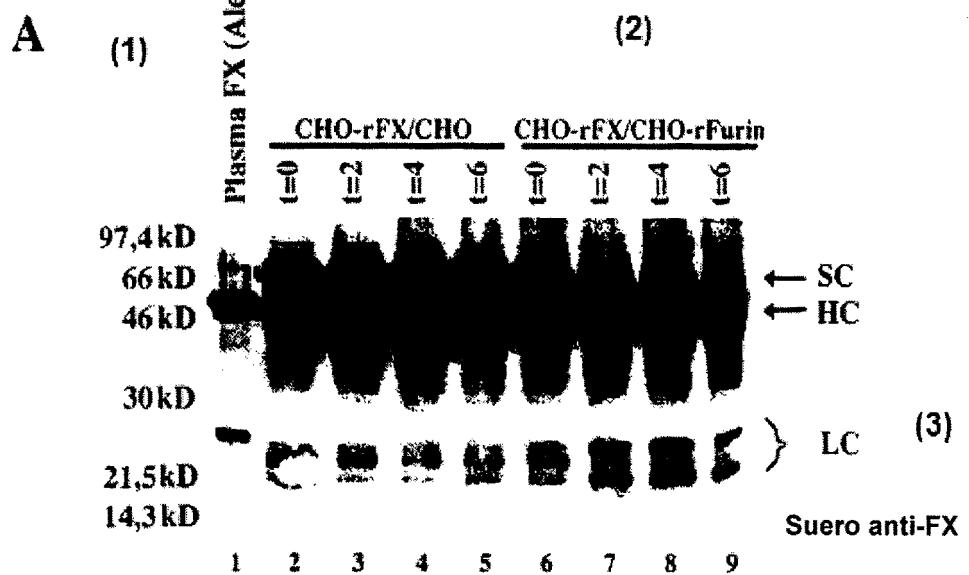


Fig. 4

Fig. 5



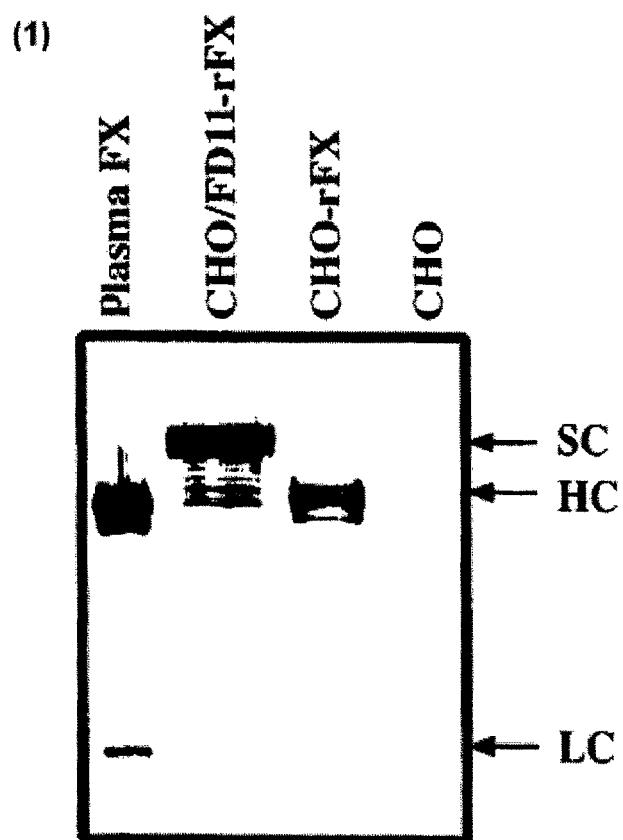


Fig. 6

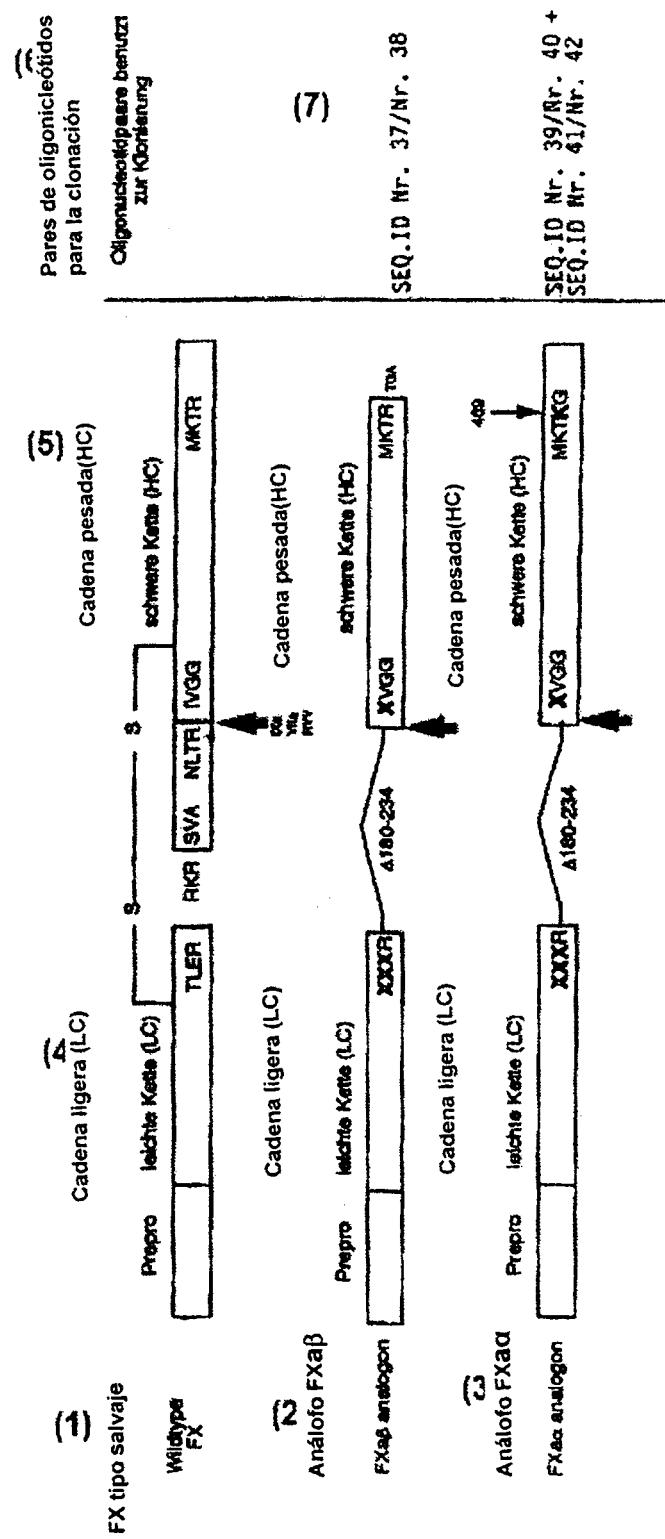


Fig. 7

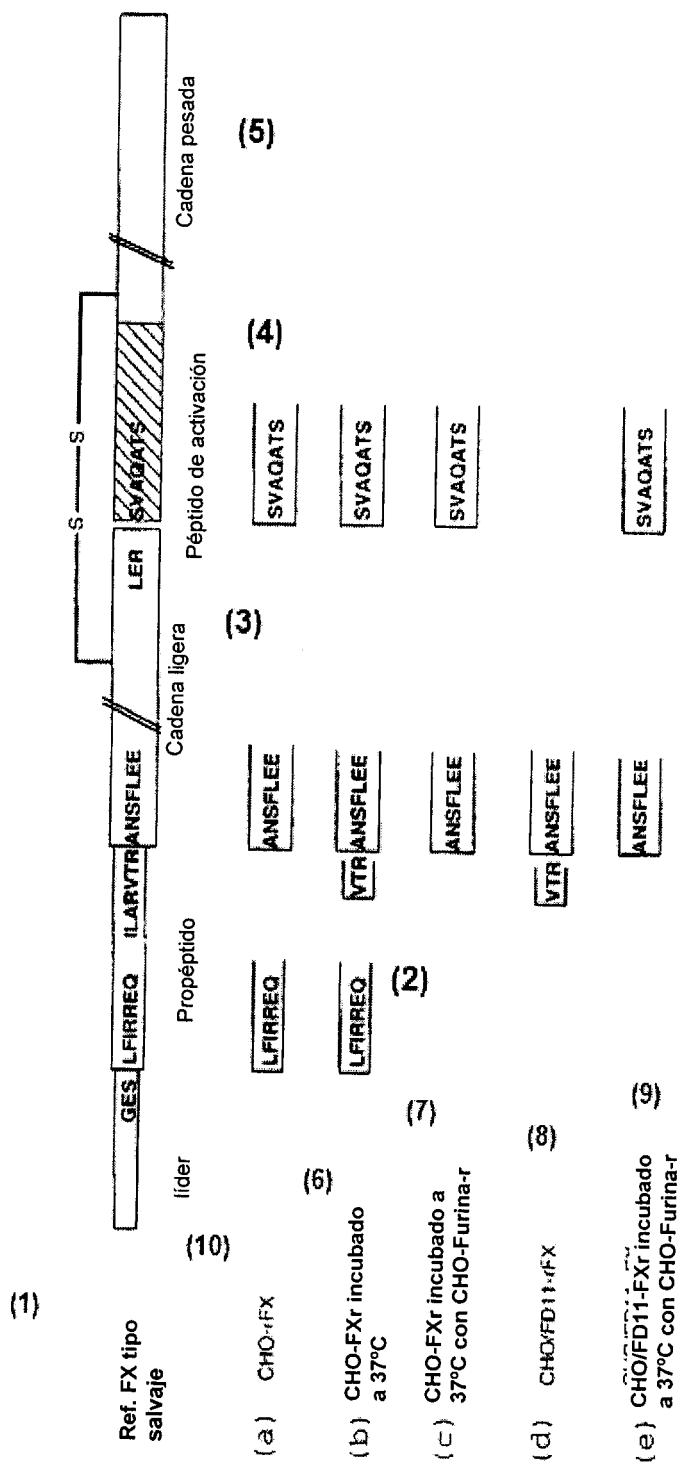


Fig. 8

ES 2 273 405 T3

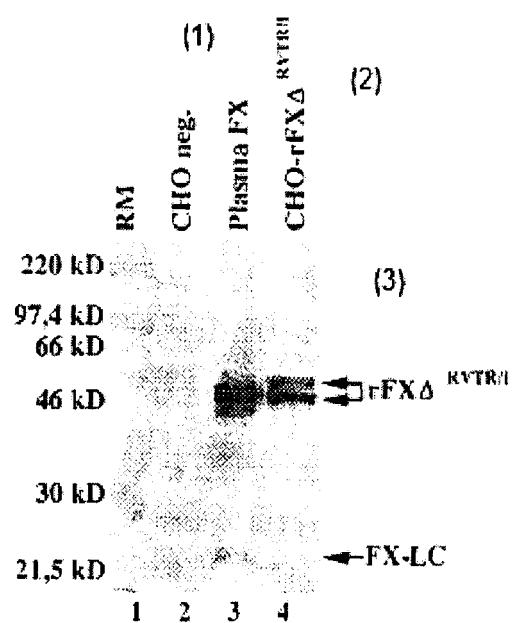


Fig. 9

ES 2 273 405 T3

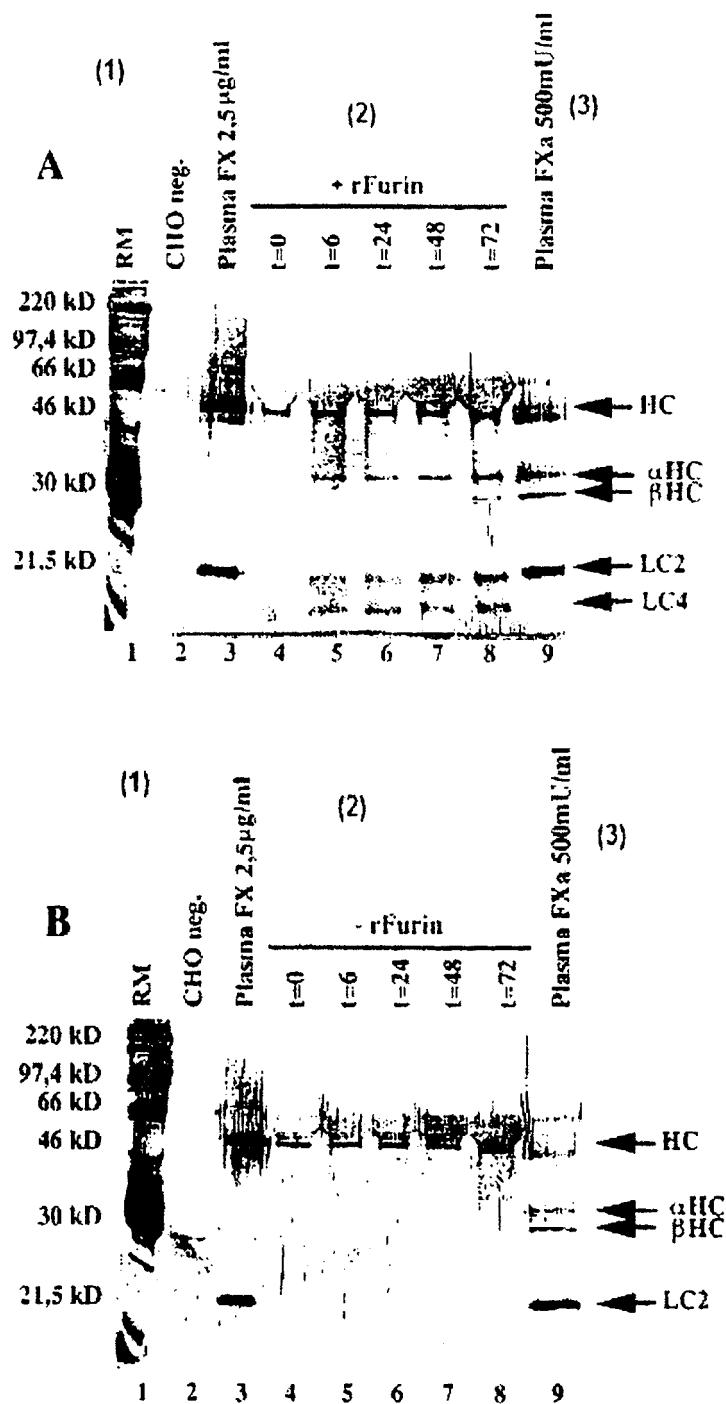


Fig. 10

**LISTA DE SECUENCIAS**

(1) DATOS GENERALES:

- 5                   (i) SOLICITANTE
- (A) NOMBRE: immuno ag  
(B) CALLE: Industriestrasse 67  
10                 (C) LUGAR: Viena  
                   (D) PAÍS FEDERAL: Austria  
                   (E) PAÍS: Austria  
                   (F) CÓDIGO POSTAL: 1220  
15                 (A) NOMBRE: Friedrich Dorner  
                   (B) CALLE: Peterlinigasse 17  
                   (C) LUGAR: Viena  
20                 (D) PAÍS FEDERAL: Austria  
                   (E) PAÍS: Austria  
                   (F) CÓDIGO POSTAL: 1238  
25                 (A) NOMBRE: Falko-Guenther Falkner  
                   (B) CALLE: Mannsdorf 116  
                   (C) LUGAR: Mannsdorf  
30                 (D) PAÍS FEDERAL: Austria  
                   (E) PAÍS: Austria  
                   (F) CÓDIGO POSTAL: 2304  
35                 (A) NOMBRE: Michele Himmelspach  
                   (B) CALLE: Breitstetten 19  
                   (C) LUGAR: Leopoldsdorf  
40                 (D) PAÍS FEDERAL: Austria  
                   (E) PAÍS: Austria  
                   (F) CÓDIGO POSTAL: 22285  
45                 (A) NOMBRE: Michael Fleiderer  
                   (B) CALLE: Johann Nestroygasse 12/16  
                   (C) LUGAR: Groos-Enzersdorf  
50                 (D) PAÍS FEDERAL: Austria  
                   (E) PAÍS: Austria  
                   (F) CÓDIGO POSTAL: 2301  
55                 (A) NOMBRE: Uwe Schlokat  
                   (B) CALLE: Hauptstrasse 51  
                   (C) LUGAR: Orth/Donau  
60                 (D) PAÍS FEDERAL: Austria  
                   (E) PAÍS: Austria  
                   (F) CÓDIGO POSTAL: 2304  
65                 (A) NOMBRE: Johann Eibl  
                   (B) CALLE: Gustav Tschermakgasse 2

ES 2 273 405 T3

- (C) LUGAR: Viena
  - (D) PAÍS FEDERAL: Austria
  - (E) PAÍS: Austria
  - (F) CÓDIGO POSTAL: 1180

(ii) DENOMINACIÓN DE LA INVENCIÓN: Mutantes de delección del factor X y análogos de los mismos.

(iv) VERSIÓN LEGIBLE DE COMPUTADORA:

- (A) SOPORTE DE DATOS: Floppy disk
  - (B) COMPUTADORA: IBM PC compatible
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0. Versión #1.30 (E)

(2) DATOS SOBRE SEO ID NO 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 pares de bases
  - (B) TIPO: nucleótido
  - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 1:

ATTACTCGAG AAGCTTACCA TGGGGCGCCC ACTG

34

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 2:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
  - (B) TIPO: nucleótido
  - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 2:

ATTACAATTG CTGCAGGGAT CCAC

24

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
  - (B) TIPO: nucleótido
  - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN de genoma

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 3:

GGCCCTACCC CTGTGGAAA CAGGACTTCA CCAGGGTG

38

### (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 4:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

# ES 2 273 405 T3

- (A) LONGITUD: 34 pares de bases  
(B) TIPO: nucleótido  
(C) FORMA DE CADENA: cadena simple  
5 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma  
10 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 4:

CACCCTGGTG AAGTCCTGTT TCCCACAGGG GTAG

34

(2) DATOS SOBRE SSEQ ID NO 5:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases  
(B) TIPO: nucleótido  
20 (C) FORMA DE CADENA: cadena simple  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 5:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGACCCTGG AACGGACC

38

30 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 pares de bases  
35 (B) TIPO: nucleótido  
(C) FORMA DE CADENA: cadena simple  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 6:

GGTCCGTTCC AGGGTCTGTT TCCCACAGGG GTAG

34

45 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases  
50 (B) TIPO: nucleótido  
(C) FORMA DE CADENA: cadena simple  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 7:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGATCAAGC CCAGGATC

38

60 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 65 (A) LONGITUD: 30 pares de bases  
(B) TIPO: nucleótido

# ES 2 273 405 T3

	(C) FORMA DE CADENA: cadena simple	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
5	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 8:	
	CTGGGCTTGA TCTGTTCCC ACAGGGTAG	30
10	(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 9:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 38 pares de bases	
15	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) FORMA DE CADENA: cadena simple	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
20	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 9:	
25	GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGAGCATGC CCAGGATC	38
	(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 10:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:	
30	(A) LONGITUD: 30 pares de bases	
	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) FORMA DE CADENA: cadena simple	
35	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 10:	
40	CTGGTCATGC TCTGTTCCC ACAGGGTAG	30
	(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 11:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:	
45	(A) LONGITUD: 38 pares de bases	
	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) FORMA DE CADENA: cadena simple	
50	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 11:	
55	GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGATGAAAA CGAGGATC	38
	(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 12:	
60	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 30 pares de bases	
	(B) TIPO: nucleótido	
65	(C) FORMA DE CADENA: cadena simple	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	

# ES 2 273 405 T3

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 12:

5 CTCGTTTCA TCTGTTCCC ACAGGGTAG 30

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 13:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 38 pares de bases
  - (B) TIPO: nucleótido
  - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 13:

20 GGCCCTACCC CTGTGGAAA CAGATCGAGG GAAAGGATC 38

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 14:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 30 pares de bases
  - (B) TIPO: nucleótido
  - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 14:

CTTCCCTCGA TCTGTTCCC ACAGGGTAG 30

40 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 15:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 38 pares de bases
  - (B) TIPO: nucleótido
  - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 15:

GGCCCTACCC CTGTGGAAA CAGAGGAGGA AGAGGATC 38

55 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 16:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 30 pares de bases
  - (B) TIPO: nucleótido
  - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 16:

ES 2 273 405 T3

CTCTTCCTCC TCTGTTCC ACAGGGGTAG

30

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 17:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 17:

GGCCCTACCC CTGTGGAAA CAGAGGGTGA GGAGGATC

38

20 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 18:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 18:

CTCCTCACCC TCTGTTCCC ACAGGGTAG

30

35 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 19:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 19:

GGCCCTACCC CTGTGGAAA CAGAGGAGGA GGAGGATC

38

50 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 20:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 20:

CTCCTCCTCC TCTGTTCCC ACAGGGTAG

30

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 21:

# ES 2 273 405 T3

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 21:

GGCCCTACCC CTGTGGAA CAGAGGCCA AGAGGATC

38

15 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 22:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 22:

CTCTGGGCC TCTGTTCCC ACAGGGTAG

30

30 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 23:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 23:

45 GGCCCTACCC CTGTGGAAA CAGATCAGGA AGAGGATCT

38

45 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 24:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 24:

60 CTCTCGTGA TCTGTTCCC ACAGGGTAG

30

60 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 25:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases

# ES 2 273 405 T3

- (B) TIPO: nucleótido  
(C) FORMA DE CADENA: cadena simple  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 25:
- 10 GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGAGGAGCA AGAGGATC 38
- (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 26:
- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 30 pares de bases  
(B) TIPO: nucleótido  
(C) FORMA DE CADENA: cadena simple  
20 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma  
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 26:
- 25 CTCTTGCTCC TCTTGTTCAC ACAGGGTAG 30
- (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 27:
- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 38 pares de bases  
(B) TIPO: nucleótido  
35 (C) FORMA DE CADENA: cadena simple  
(D) TOPOLOGÍA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma  
40 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 27:
- 55 GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGAGGGTCA CGAGGATC 38
- (2) DATOS SEQ ID NO 28:
- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 30 pares de bases  
(B) TIPO: nucleótido  
50 (C) FORMA DE CADENA: cadena simple  
(D) TOPOLOGÍA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma  
55 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 28:
- 60 CTCGTGACCC TCTGTTCCC ACAGGGTAG 30
- (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 29:
- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 38 pares de bases  
(B) TIPO: nucleótido  
(C) FORMA DE CADENA: cadena simple

# ES 2 273 405 T3

	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
5	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 29:	
	GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGAGGCTGA AAAGGATC	38
10	(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 30:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 30 pares de bases	
15	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) FORMA DE CADENA: cadena simple	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
20	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 30:	
	CTTTCACGG TCTGTTCCC ACAGGGTAG	30
25	(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 31:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 38 pares de bases	
30	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) FORMA DE CADENA: cadena simple	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
35	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 31:	
40	GGCCATACC CTGTGGGAAA CAGCCCCAAG GAAGGATC	38
	(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 32:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:	
45	(A) LONGITUD: 30 pares de bases	
	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) FORMA DE CADENA: cadena simple	
50	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 32:	
55	CTTCCTTGGG GCTGTTCCC ACAGGGTAG	30
	(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 33:	
60	(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 38 pares de bases	
	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) FORMA DE CADENA: cadena simple	
65	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma	

ES 2 273 405 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 33:

GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGACGAGCA CGAGGATC

38

5 (2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 34:

20 CTCGTGCTGC TCTGTTCCC ACAGGGTAG

30

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 35:

35 GGCCCTACCC CTGTGGGAAA CAGACCTGG AACGGATC

38

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 36:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 36:

CGTTCCAGG TCTGTTCCC ACAGGGTAG

30

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 37:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 49 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 37:

GRCACCGCCT TCCTCAAGTC GATCGACAGG TCCATGAAAA CCAGGTGAA

49

# ES 2 273 405 T3

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 38:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 48 pares de bases
  - (B) TIPO: nucleótido
  - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 38:

15 CTCGTTCACC TGGTTTCAT GGACCTGTCG ATCCACTTGA GGAAGGCG

48

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 39:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 57 pares de bases
  - (B) TIPO: nucleótido
  - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 39:

30 GTCACCGCCT TCCTCAAGTG GATCGACAGG TCCATGAAAA CCAAGGGCTT GCCCAAG

57

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 40:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 57 pares de bases
  - (B) TIPO: nucleótido
  - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 40:

65 TTGGCCTTGG GCAAGCCCTT GGTTTCATG GACCTGTCGA TCCACTTGAG GAAGGCG

57

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 41:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 55 pares de bases
  - (B) TIPO: nucleótido
  - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 41:

70 GCCAAGAGCC ATGCCCGGA GGTCTAACG TCCTCTCCAT TAAAGTGAGA TCCCA

55

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 42:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

# ES 2 273 405 T3

- (A) LONGITUD: 54 pares de bases  
 (B) TIPO: nucleótido  
 (C) FORMA DE CADENA: cadena simple  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 42:

CTAGTGGAT CTCACTTAA TGGAGAGGAC GTTATGACCT CCGGGGCATG GCTC 54

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 43:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 1467 pares de bases  
 (B) TIPO: nucleótido  
 (C) FORMA DE CADENA: cadena simple  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN de genoma

(IX) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS  
 (B) POSICIÓN: 1 .. 1467

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 43:

ATG GGG CGC CCA CTG CAC CTC GTC CTG CTC AGT GCC TCC CTG GCT GGC Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly	48
1                   5                   10                   15	
CTC CTG CTG CTC GGG GAA AGT CTG TTC ATC CGC AGG GAG CAG GCC AAC Leu Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn	96
20                 25                 30	
AAC ATC CTG GCG AGG GTC ACG AGG GCC AAT TCC TTT CTT GAA GAG ATG Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met	144
35                 40                 45	
AAG AAA GGA CAC CTC GAA AGA GAG TGC ATG GAA GAG ACC TGC TCA TAC Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr	192
50                 55                 60	
GAA GAG GCC CGC GAG GTC TTT GAG GAC AGC GAC AAG ACG AAT GAA TTC Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe	240
65                 70                 75                 80	
TGG AAT AAA TAC AAA GAT GGC GAC CAG TGT GAG ACC AGT CCT TGC CAG Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln	288
85                 90                 95	
AAC CAG GGC AAA TGT AAA GAC GGC CTC GGG GAA TAC ACC TGC ACC TGT Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys	336
100               105               110	
TTA GAA GGA TTC GAA GGC AAA AAC TGT GAA TTA TTC ACA CGG AAG CTC Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu	384
115               120               125	
TGC AGC CTG GAC AAC GGG GAC TGT GAC CAG TTC TGC CAC GAG GAA CAG Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln	432
130               135               140	

# ES 2 273 405 T3

	AAC TCT GTG GTG TGC TCC TGC GCC CGC GGG TAC ACC CTG GCT GAC AAC Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn 145 150 155 160	480
5	GGC AAG GCC TGC ATT CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr 165 170 175	528
10	CTG GAA CGC AGG AAG AGG TCA GTG GCC CAG GCC ACC AGC AGC AGC GGG Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly 180 185 190	576
15	GAG GCC CCT GAC AGC ATC ACA TGG AAG CCA TAT GAT GCA GCC GAC CTG Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu 195 200 205	624
20	GAC CCC ACC GAG AAC CCC TTC GAC CTG CTT GAC TTC AAC CAG ACG CAG Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln 210 215 220	672
25	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 Gln Glu 225 230 235 240	720
30	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
35	AAC GAG GGT TTC TGT GGT GGA ACT 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
40	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
45	GGG GAC CGG AAC ACG GAG CAG GAG GAG GGC 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
50	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
55	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
60	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
65	CTG ATG ACG CAG AAG ACG GGG ATT GTG AGC GGC 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
	CAG AAG GGC CCG 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

# ES 2 273 405 T3

	GTG GAC CGC AAC AGC TGC AAG CTG TCC AGC AGC TTC ATC ATC ACC CAG	1200	
	Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln		
385	390	395	
		400	
5	AAC ATG TTC TGT GCC GGC TAC GAC ACC AAG CAG GAG GAT GCC TGC CAG	1248	
	Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln		
	405	410	415
10	GGG GAC AGC GGG GGC CCG CAC GTC ACC CGC TTC AAG GAC ACC TAC TTC	1296	
	Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe		
	420	425	430
15	GTG ACA GGC ATC GTC AGC TGG GGA GAG AGC TGT GCC CGT AAG GGG AAG	1344	
	Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Ser Cys Ala Arg Lys Gly Lys		
	435	440	445
20	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
25	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		
30			

(2) DATOS SOBRE SEQ ID NO 44:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 489 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO 44:

45	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			
50	20	25	30	
	Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met			
	35	40	45	
55	Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr			
	50	55	60	
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	

# ES 2 273 405 T3

	Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys			
	100	105	110	
5	Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu			
	115	120	125	
10	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
15	Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr			
	165	170	175	
20	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	
25	Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln			
	210	215	220	
30	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	
35	Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu			
	260	265	270	
40	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 Glu Ala Val His Glu			
	290	295	300	
45	Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp			
	305	310	315	320
50	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	
55	Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His			
	355	360	365	
60	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
65	Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln			
	405	410	415	

ES 2 273 405 T3

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

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

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

15 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

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65