



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 010**

51 Int. Cl.:
C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02801919 .8**

86 Fecha de presentación : **18.10.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1436389**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2004**

54 Título: **Proteínas quiméricas clivables por trombina.**

30 Prioridad: **19.10.2001 FR 01 13492**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Le Bonniec, Bernard;
Marque, Pierre-Emmanuel;
Louvain, Virginie;
Calmel, Claire;
Bianchini, Elsa y
Aiach, Martine**

74 Agente: **Esteban Pérez-Serrano, María Isabel**

ES 2 279 010 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas quiméricas clivables por trombina.

5 La presente invención se refiere a las proteínas quiméricas clivables por trombina, particularmente a las proteínas derivadas a partir de la proteína C humana y a partir del factor X humano, y a las utilidades terapéuticas de las mismas.

10 La proteína C (en adelante, en esta memoria, referida como PC) es un factor esencial de un mecanismo principal para la regulación de coagulación, llamado "ruta anticoagulante". La forma activa de la PC (proteína C activada, en adelante referida en este documento como PCa) es una serina proteasa que, cuando se asocia con otro cofactor (proteína S), degrada dos factores de la cascada de coagulación esenciales para la generación masiva de trombina: factores Va y VIIIa. La destrucción de estos factores regula a la baja la cantidad de trombina formada, resultando en un efecto anticoagulante. El factor X (en adelante referido en la presente memoria como FX) es un factor esencial de la cascada de coagulación. La forma activada de FX (factor X activado, en adelante referido en esta memoria como FXa) es la única serina proteasa que, asociada con su cofactor (factor de coagulación Va), es capaz de activar la protrombina a trombina.

20 La PC es una glicoproteína de 62.000 Da sintetizada en el hígado. Antes de ser secretada en el plasma, su cadena de polipéptidos experimenta varias maduraciones postranslacionales con el fin de convertirse en una proenzima funcional. Estas maduraciones comprenden el clivaje del prepéptido y del propéptido, la γ -carboxilación de los primeros nueve glutamatos de la región amino-terminal, la β -hidroxilación del aspartato en la posición 71, la glicosilación de 4 residuos distribuidos a lo largo de la secuencia y la escisión del doblete Lys¹⁵⁶-Arg¹⁵⁷, separando la cadena ligera (amino-terminal) y la cadena pesada (carboxi-terminal), y resultando en la forma madura de la PC. Debido a una escisión incompleta del doblete Lys¹⁵⁶-Arg¹⁵⁷ durante la maduración mediante las células hepáticas, entre el 10% y el 20% de PC plasmático se mantiene en forma de cadena simple. Sin embargo, la forma principal del plasma comprende dos cadenas de polipéptidos que se encuentran conectadas mediante un puente de disulfuro. La cadena ligera de 21.000 Da está compuesta de 155 aminoácidos, comprendiendo un pequeño dominio que alberga los ácidos γ -carboxiglutámicos, seguido por dos dominios de tipo Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). La cadena pesada de 41.000 Da está compuesta de 262 aminoácidos y representa el futuro dominio catalítico, clasificado en la clase SA de la familia de serina proteasas (Shen y Dahlback, Handbook of proteolytic enzymes: Protein C. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner J. F., eds. Academic Press, Orlando, FL. 1998).

35 El FX es una glicoproteína de 59.000 Da sintetizada en el hígado. Antes de ser secretada en el plasma, su cadena de polipéptidos experimenta varias maduraciones postranslacionales con el fin de convertirla en una proenzima funcional. Estas maduraciones comprenden el clivaje del prepéptido y del propéptido, la γ -carboxilación de los primeros once glutamatos de la región amino-terminal, la β -hidroxilación del aspartato en la posición 103, la glicosilación de por lo menos 5 residuos (incluyendo 4 en el péptido de activación) y la escisión del tripéptido Arg¹⁸⁰-Lys¹⁸¹-Arg¹⁸². A diferencia de la PC, virtualmente todo el FX maduro que circula en el plasma se encuentra en forma de cadena doble, con las cadenas conectadas mediante un puente disulfuro. La cadena ligera de 16.900 Da está compuesta de 139 aminoácidos, comprendiendo un pequeño dominio que alberga los ácidos γ -carboxiglutámicos, seguido por dos dominios EGF. La cadena pesada de 42.100 Da está compuesta de 306 aminoácidos y representa el futuro dominio catalítico, clasificado en la clase SA de la familia de serina proteasas (Stenflo, Handbook of proteolytic enzymes: Factor X. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner J. F., eds. Academic Press, Orlando, FL. 1998).

45 Como la mayoría de los precursores de las serina proteasas, la PC y el FX son zimógenos que carecen de actividad catalítica. La activación de la misma es el resultado del clivaje proteolítico en sus cadenas pesadas. En la PC, este clivaje tiene lugar en el extremo N-terminal de la cadena pesada, liberando un péptido de "activación" de 12 aminoácidos. En el FX, este clivaje tiene lugar entre los residuos Arg₂₃₄ y Ile₂₃₅, también liberando un péptido de "activación" de 52 aminoácidos.

55 La secuencia polipeptídica de la cadena pesada y de la cadena ligera de la forma madura de la PC está representada en la Figura 1, y en el listado de secuencias adjunto bajo el número SEQ ID NO:1. Las principales regiones de la PC están indicadas en la secuencia de la Figura 1. La cadena pesada está subrayada. El doblete Lys¹⁵⁶-Arg¹⁵⁷ está representado en caracteres en negrita. El péptido de activación está recuadrado.

60 La secuencia polipeptídica de la cadena pesada y de la cadena ligera de la forma madura del FX está representada en la Figura 2, y en el listado de secuencias adjunto bajo el número SEQ ID NO:23. Las principales regiones del FX están indicadas en la secuencia de la Figura 2. La cadena pesada está subrayada. El triplete Arg¹⁸⁰-Lys¹⁸¹-Arg¹⁸² está representado en caracteres en negrita. El péptido de activación está recuadrado.

Para localizar los residuos de aminoácidos en relación a la secuencia de la PC, pueden utilizarse diversos sistemas de numeración, y particularmente:

65 - un sistema de numeración con referencia a la secuencia deducida a partir del ADNc de la PC (Beckman *et al.*, Nucleic Acid Res., 13, 5233-5247, 1995); esta numeración está representada en la Figura 1, bajo la secuencia peptídica;

ES 2 279 010 T3

- un sistema de numeración de residuos de la cadena pesada de la PC con referencia a la numeración de los residuos del dominio catalítico de la quimotripsina (Mathers *et al.*, Embo J., 15, 6822-6831, 1996). Esta numeración, generalmente utilizada para las serina proteasas, está basada en las similitudes topológicas que existen entre estas enzimas, que facilita enormemente la comparación de las mismas. Esta numeración está representada en caracteres en itálica en la Figura 1 bajo la numeración con referencia a la secuencia de ADNc.

Para localizar los residuos de aminoácidos en relación a la secuencia del FX, también pueden utilizarse estos diversos sistemas de numeración, y particularmente:

- el sistema de numeración con referencia a la secuencia deducida a partir del ADNc del FX (Messier *et al.*, Gene, 99, 291-294, 1991); esta numeración está representada en la Figura 2, bajo la secuencia peptídica;

- el sistema de numeración de los residuos de la cadena pesada del FX con referencia a la numeración de los residuos del dominio catalítico de la quimotripsina (Padmanabhan *et al.*, J. Mol. Biol., 232, 1-20, 1993); esta numeración está representada en caracteres en itálica en la Figura 2, bajo la numeración con referencia a la secuencia de ADNc.

Por ejemplo, si la numeración se realiza con referencia a la forma madura de la PC, los residuos Arg y Leu que bordean el sitio de clivaje proteolítico que da lugar a la PCa son identificados mediante las posiciones Arg¹⁶⁹ y Leu¹⁷⁰; si la numeración se realiza con referencia al dominio catalítico de la quimotripsina, estos mismos residuos son identificados mediante las posiciones Arg¹⁵ y Leu¹⁶. De manera similar, si la numeración se realiza con referencia a la forma madura del FX, los residuos de Arg e Ile que bordean el sitio de clivaje proteolítico que da lugar a FXa son identificados mediante las posiciones Arg²³⁴ e Ile²³⁵; si la numeración se realiza con referencia al dominio catalítico de la quimotripsina, estos mismos residuos son identificados mediante las posiciones Arg¹⁵ e Ile¹⁶.

Otro sistema de numeración universal también utilizado se refiere al sitio de clivaje proteolítico. Las posiciones de los aminoácidos se proporcionan en orden ascendente a partir de este sitio de clivaje. Las posiciones a continuación del sitio se identifican mediante P, y las posiciones anteriores al sitio se identifican mediante P'. De esta manera, en el caso de la PC, P₁₂ representa el aminoácido N-terminal del péptido de activación (el más alejado del sitio de clivaje), y P₁ representa el aminoácido C-terminal del péptido de activación; P₁' representa el aminoácido N-terminal de la PCa.

La activación de la PC es el resultado de su clivaje por trombina que forma un complejo con un cofactor unido a membrana, trombomodulina, presente en la superficie del endotelio vascular. En ausencia de trombomodulina, la activación de la PC por trombina es aproximadamente 1.000 veces más lenta y genera sólo una cantidad despreciable de PCa.

Para una sección determinada del vaso, la cantidad de moléculas de trombomodulina por volumen irrigadas es mucho mayor en la microcirculación que en los vasos de gran calibre. Como resultado, en presencia de trombina, la generación de PCa es rápida en la microcirculación pero es lenta en los vasos de gran calibre. El papel fisiológico de la ruta anticoagulante se limita, por lo tanto, a la microcirculación.

La importancia de la ruta de anticoagulante se pone de manifiesto en la seriedad de las deficiencias genéticas o deficiencias adquiridas en las proteínas que participan en este sistema; una deficiencia en la PC o en la proteína S o en la resistencia del factor Va a la inactivación mediante la PCa puede ser identificada en más de un 30% de los accidentes trombóticos (AIACH *et al.*, Seminars in Haematology, 34, 205-217, 1997). Ratones transgénicos en los que se ha inactivado el gen PC (Jalbert *et al.*, J. Clin. Invest. 102 (8), 1481-1488, 1998) o en los que el gen trombomodulina no es funcional (Weiler-Guettler *et al.*, J. Clin. Invest., 101, 1983-1991, 1998) presentan anomalías en la coagulación, materializadas particularmente por la aparición de depósitos de fibrina en diversos órganos.

Diversos estudios han demostrado que la PC presenta actividad biológica pleiotrópica: no sólo actividad antitrombótica (Taylor *et al.*, J. Clin. Invest., 79, 918-925, 1987; Gruber *et al.*, Blood, 73, 639-642, 1989; Circulation, 82, 578-585, 1990; Chesebro *et al.*, Circulation, 86, III100-110, 1992; Hanson *et al.*, J. Clin. Invest., 92, 2003-2012, 1993; Arnljots *et al.*, Thromb. Haemost., 72, 415-420, 1994; Sakamoto *et al.*, Circulation, 90, 427-432, 1994; Jang *et al.*, Circulation, 92, 3041-3050, 1995; Kurz *et al.*, Blood, 89, 534-540, 1997; Gresele *et al.*, J. Clin. Invest., 101, 667-676, 1998; Mizutani *et al.*, Blood, 95, 3781-3787, 2000; Bernard *et al.*, N. Engl. J. Med., 344, 699-709, 2001), sino también actividad antiinflamatoria (Esmon, Biochim. Biophys. Acta., 1477, 349-360, 2000), actividad antiapoptótica (Joyce *et al.*, J. Biol. Chem., 276, 11199-11203, 2001) y actividad profibrinolítica (Comp & Esmon, J. Clin. Invest., 68, 1221-1228, 1981; Rezaie, J. Biol. Chem., 276, 15567-15570, 2001). Este espectro farmacológico hace de ella una candidata excelente para el tratamiento de la enfermedad trombótica en general, ya que en esta fisiopatología a menudo hay una reacción inflamatoria y a veces muerte celular asociados con este proceso trombótico.

Además, el mecanismo inducible de la activación de la PC la convierte en un antitrombótico autorregulado, cuya acción se dirige al trombo, limitando de esta manera el riesgo hemorrágico inherente a los antitrombóticos convencionales.

La administración de concentrados de PC ha demostrado ser beneficiosa en el tratamiento de deficiencias genéticas homocigóticas de PC y también deficiencias adquiridas tales como las infecciones meningococales asociadas con la *purpura fulminans* (Gerson *et al.*, Pediatrics, 91, 418-422, 1993; Okajima *et al.*, Am. J. Hematol., 33, 277-278, 1990; Dreyfus *et al.*, N. Engl. J. Med., 325, 1565-1568, 1991; Manco-Johnson & Nuss, Am. J. Hematol., 40, 69-70, 1992;

ES 2 279 010 T3

Rintala *et al.*, Lancet, 347, 1767, 1996; Smith *et al.*, Lancet, 350, 1590-1593, 1997; White *et al.*, Blood, 96, 3719-3724, 2000). Esta terapia sustitutiva hace posible corregir desordenes asociados con estas deficiencias reconstituyendo un depósito de PC circulante.

5 Sin embargo, no resulta posible prever la utilización de concentrados de PC como un tratamiento antitrombótico en el caso de vasos grandes, trombosis arterial o trombosis venosa. Tal como se ha indicado anteriormente, la cantidad de trombomodulina disponible constituye un factor de limitación, incluso con concentraciones de saturación de PC, la activación de la misma se mantiene demasiado baja para obtener un efecto terapéutico adecuado.

10 Con el fin de extender la actividad biológica de la ruta anticoagulante de la PC al territorio vascular completo, se ha propuesto la utilización directa de la PCa. Esta solución ha demostrado ser eficaz (Bernard *et al.*, N. Engl. J. Med., 344, 699-709, 2001) pero su utilización está limitada por la vida media muy corta (aproximadamente de 30 minutos) de la PCa en la circulación. De hecho, como sucede con la mayoría de las serina proteasas activadas, la PCa es rápidamente neutralizada por los inhibidores (serpinas) presentes en el plasma. Por lo tanto, el efecto terapéutico
15 puede obtenerse sólo mediante una infusión continua.

Una de las soluciones ideadas con el fin de resolver esta limitación consiste en realizar modificaciones a la PCa de manera que se incrementa su resistencia a los inhibidores del plasma. Sin embargo, surge otro problema debido al hecho de que la utilización de la PCa no permite beneficiarse de una ventaja principal de la PC, particularmente
20 la activación inducida mediante la presencia de la trombina. Una PCa resistente a los inhibidores y cuya formación no puede ser regulada presenta las desventajas de los antitrombóticos convencionales, particularmente una acción anticoagulante no limitada al área trombotica y el potencial riesgo hemorrágico resultante.

Otro enfoque que ha sido propuesto consiste en intentar modificar la PC con el fin de hacerla directamente activable por trombina en ausencia de trombomodulina, con el fin de permitir la formación de PCa a través del trombo y no sólo
25 en la vecindad inmediata del endotelio vascular.

Richardson *et al.*, (Protein Sci., 3, 711-712, 1994) da a conocer derivados de la proteína C en los que el residuo Asp en la posición P₃' en relación al sitio de clivaje proteolítico es sustituido por Asn, Gly, Ala o Lys. Los derivados
30 sustituidos por Asn, Gly, Ala son activados por trombina en ausencia de trombomodulina con una velocidad entre 4 y 9 veces superior, y el derivado sustituido por Lys es activado con una velocidad 30 veces superior que la PC nativa.

La patente US 5453373 describe diversos derivados de la PC:

35 - el derivado denominado F167 es el resultado de sustituir el residuo Asp en la posición 167 de la forma madura de la PC (posición P₃ del péptido de activación) por un residuo Phe; este derivado es activado por trombina en ausencia de trombomodulina a una velocidad 12 veces superior que la PC nativa;

40 - el derivado denominado LIN es el resultado de sustituir el residuo Asp en la posición 172 de la forma madura de la PC (posición P₃' en relación al sitio de clivaje proteolítico) por un residuo Asn; este derivado es activado por trombina en ausencia de trombomodulina a una velocidad 4 veces superior que la PC nativa;

45 - el derivado denominado FLIN es el resultado de sustituir el residuo Asp en la posición 167 de la forma madura de la PC por un residuo Phe, y de sustituir el residuo Asp en la posición 172 de la forma madura de la PC por un residuo Asn; este derivado es activado por trombina en ausencia de trombomodulina a una velocidad 30 veces superior que la PC nativa;

50 - los derivados denominados Q313 y Q329 son el resultado, respectivamente, de sustituir el residuo Asn en la posición 313 o el residuo Asn en la posición 329 de la forma madura de la PC por un residuo Gln; estas modificaciones se llevaron a cabo con el fin de eliminar los sitios de glicosilación en estos residuos Asn, con el fin de incrementar la actividad anticoagulante de la PCa. El derivado Q313 es activado por trombina a una velocidad 2 veces superior que la PC nativa; su actividad anticoagulante es 1,8 veces superior que la de la PCa; el derivado Q329 es activado por trombina menos rápidamente que la PC nativa;

55 - el derivado denominado Q3Q9 es el resultado de sustituir el residuo Asn en la posición 313 y el residuo Asn en la posición 329 de la forma madura de la PC por residuos Gln; este derivado es activado por trombina en ausencia de trombomodulina a una velocidad 3,3 veces superior que la PC nativa.

60 Los derivados denominados FLIN-Q313 y FLIN-Q3Q9 combinan estas diversas modificaciones; se activan, respectivamente, mediante sólo trombina, a una velocidad 61 veces superior que la PC nativa y 84 veces superior que la PC nativa. Estas velocidades de activación se mantienen, sin embargo, muy inferiores a la PC nativa en presencia de trombomodulina.

65 Los presentes inventores han investigado otras modificaciones de la PC que harían posible incrementar más significativamente la velocidad de activación de la misma por trombina, independientemente de la trombomodulina.

De esta manera, los presentes inventores han demostrado dos tipos de modificaciones que estimulan una aceleración de la activación de PC por trombina (bajo condiciones fisiológicas y en ausencia de trombomodulina). Además,

ES 2 279 010 T3

la combinación de esas modificaciones hace posible la obtención de PC modificadas, cuya activación en ausencia de trombomodulina es hasta 500 veces más rápida que la PC nativa bajo las mismas condiciones y produce PCa modificadas, cuya vida media en plasma es superior que la de la PCa nativa.

5 Un primera categoría de modificaciones concierne al péptido de activación: los presentes inventores observaron que reemplazando este péptido por los aminoácidos P₁₀ a P₁ del fibrinopéptido A (FpA) del fibrinogen (numerado con referencia al sitio de clivaje proteolítico) hizo posible obtener una velocidad de activación 40 veces superior que la de la PC normal expresada y caracterizada bajo las mismas condiciones (en comparación, el derivado F167 descrito en la patente US 5453373, que alberga una sustitución Asp→Phe en la posición p₃ del péptido de activación, es activada
10 por trombina 12 veces más rápidamente que la PC nativa).

La coagulación sanguínea es el resultado de una cascada de reacciones enzimáticas, cuya última etapa es la generación de trombina, que induce la formación de un coágulo capaz de sellar la abertura vascular. La mayoría de estas reacciones implican la activación proteolítica de un cimógeno inactivo para activar la serina proteasa. Esta cascada de
15 reacciones se divide convencionalmente en dos rutas denominadas: "ruta intrínseca" y "ruta factor tisular", o "ruta extrínseca", en función de si la activación del FX es el resultado de su clivaje por el factor IXa o por el factor VIIa. Por lo tanto, estas rutas convergen hacia la activación del FX a FXa. El FXa es una de las enzimas de coagulación clave ya que el enlace de la misma a su cofactor, factor Va, forma el complejo protrombinasa, que activa la protrombina a trombina.

20 Una deficiencia cualitativa o cuantitativa en una de las proteínas implicadas en la coagulación lleva a manifestaciones trombóticas o hemorrágicas graves frecuentes, posiblemente amenazando la prognosis vital. En este contexto, se hará mención particular de la hemofilia A y B, que son el resultado, respectivamente, de una deficiencia en el factor VIII o en el factor IX.

25 Los tratamientos para la hemofilia propuestos en la actualidad son tratamientos de tipo sustitutivo o tratamientos basados en la utilización de una o más moléculas que puentean la etapa deficiente (Hedner, *Thromb. Haemost.*, 82, 531-539, 1999).

La principal desventaja del tratamiento sustitutivo estriba en la antigenicidad potencial de la molécula inyectada,
30 que puede ser vista como extraña por el sistema inmunológico del receptor. El desarrollo de aloanticuerpos neutralizantes dirigidos contra el factor utilizado representa una complicación seria del tratamiento sustitutivo que, poco a poco, la convierte en ineficaz. La principal desventaja de los tratamientos "de puenteo" disponibles o en ensayo en la actualidad es la ausencia de autorregulación (particularmente, la ausencia de localización y/o autoamplificación de la producción de trombina). Pueden llevar a efectos secundarios extraños pero graves: shocks anafilácticos y accidentes
35 trombóticos (infarto de miocardio, coagulación intravascular diseminada).

Por lo tanto, parece deseable disponer de un tratamiento que no presentara estas desventajas. Con este objetivo, los presentes inventores han investigado derivados de FX activables por trombina que harían posible no sólo puentear las etapas deficientes de la cascada de coagulación, sino también reestablecer la autoamplificación de la generación de
40 trombina. La forma activada de este derivado de FX (FXa*) sería, de hecho, capaz (en combinación con el factor Va) de formar un complejo protrombinasa funcional y por lo tanto, sería capaz de activar la protrombina a trombina. A su vez, la trombina activaría moléculas derivadas de FX adicionales.

De esta manera, los presentes inventores han realizado en el FX modificaciones del mismo tipo que las indicadas
45 anteriormente para la PC. Observaron que la sustitución del péptido de activación del FX por los aminoácidos P₁₀ a P₁ del fibrinopéptido A permite obtener un FX modificado que es activable por trombina, a diferencia del FX normal.

Por lo tanto, parece que la sustitución del péptido de activación nativo de un cimógeno activable por trombina por un FpA, o por un péptido que comprende por lo menos los aminoácidos P₁₀ a P₁ del mismo, hace posible incrementar
50 la velocidad de activación de este cimógeno. Además, parece posible construir proteínas clivables por trombina a partir de cimógenos activables mediante otra serina proteasa, o incluso a partir de cualquier polipéptido, colocando en su extremo N-terminal por lo menos los aminoácidos P₁' , P₂' y P₃' de un sitio de clivaje para trombina, precedidos por un péptido que comprende por lo menos los aminoácidos P₁₀ a P₁ del fibrinopéptido A. Los aminoácidos que pueden ser utilizados en las posiciones P₁' , P₂' y P₃' para constituir un sitio para el clivaje por trombina son conocidos en sí;
55 son descritas, por ejemplo, por Dawson *et al.*, (*J. Biol. Chem.*, 269, 15989-15992, 1994) en la patente US 5688664 o por Le Bonniec *et al.*, (*Biochemistry*, 35, 7114-7122, 1996).

Por otra parte, aunque se ha considerado en la técnica anterior que la presencia de un residuo de prolina en la posición P₂ del sitio de clivaje era necesaria para un clivaje óptimo por trombina (cf. particularmente Dawson *et al.*, y
60 la patente US 5688664, citados anteriormente), la presente invención proporciona proteínas clivables por trombina en las que el residuo en la posición P₂ es una valina. Se supone que este residuo, y también la fenilalanina en la posición P₉ y el glutamato en la posición P₆ de FpA, permitirían la utilización de un sitio de enlace adicional en la trombina, no utilizado para un clivaje de la PC normal.

65 El objetivo de la presente invención es una proteína quimérica clivable por trombina que comprende en su extremo N-terminal un péptido de activación seguido de los aminoácidos P₁'-P₂'-P₃' de un sitio de clivaje por trombina, caracterizado en que dicho péptido de activación es un fibrinopéptido A, o una porción del mismo, que comprende por lo menos los aminoácidos P₁₀ a P₁ de dicho fibrinopéptido A.

ES 2 279 010 T3

Dicha proteína quimérica es derivada a partir de la PC o del FX reemplazando el péptido de activación de dicho cimógeno por fibrinopéptido A, o una porción del mismo, que comprende por lo menos los aminoácidos P₁₀ a P₁ de dicho fibrinopéptido A.

5 Por lo tanto, dicha proteína quimérica comprende una secuencia clivable por trombina, P₁₀P₉P₈P₇P₆P₅P₄P₃P₂P₁P₁' P₂'P₃', que comprende los aminoácidos P₁₀ a P₁ del fibrinopéptido A y una secuencia P₁'-P₂'-P₃' que puede ser la secuencia Leu-Ile-Asp, que corresponde a la secuencia nativa P₁'-P₂'-P₃' de la PC, o la secuencia Ile-Val-Gly, que corresponde a la secuencia nativa P₁'-P₂'-P₃' del FX.

10 Para obtener una proteína quimérica de la presente invención, resulta posible prever la utilización del FpA (o por lo menos los aminoácidos P₁₀-P₁ del mismo) de cualquier especie animal, siendo la secuencia del FpA muy conservada de una especie a otra, particularmente, respecto a la fenilalanina en la posición P₉, el glutamato en la posición P₆ y la valina en la posición P₂. Sin embargo, para la producción de derivados de la PC o del FX, destinados a ser utilizados en la medicina humana, preferentemente se utilizará FpA humano, o la secuencia de péptidos DFLAEGGVR (SEQ ID NO:2), correspondiente a los aminoácidos P₁₀ a P₁ del FpA humano. De hecho, estos péptidos presentan la ventaja
15 de ser potencialmente relativamente no inmunogénicos ya que se encuentran expuestos, de manera natural, en el fibrinogen circulante.

De manera ventajosa, resulta también posible utilizar una secuencia P₁'-P₂'-P₃' en la que uno o más de los residuos
20 P₁', P₂' o P₃' son modificados con el fin de mejorar adicionalmente la velocidad de activación por trombina. Diversas modificaciones que influyen la activación por trombina son descritas, por ejemplo, en la publicación de Le Bonniec *et al.*, (1996), citada anteriormente.

Los residuos P₁' a P₃' (16 a 18 en la numeración de la quimotripsina) constituyen, en las serina proteasas, el
25 extremo amino terminal del dominio catalítico de la enzima activa resultante del clivaje.

Están bien conservadas en las serina proteasas: la secuencia de consenso es Ile¹⁶-Val¹⁷-Gly¹⁸. Particularmente, las
posiciones P₁' y P₂' están ocupadas casi sistemáticamente por los residuos hidrofóbicos con cadenas laterales alifáti-
cas, que desarrollan interacciones hidrofóbicas que juegan un importante papel en la formación y la estabilización del
30 sitio catalítico de la serina proteasa activada.

En el caso de la PCa, el residuo 16 (P₁') es una leucina, el residuo 17 (P₂') es una isoleucina y el residuo 18 (P₃')
es un aspartato. En el caso del FX, el residuo 16 (P₁') es una isoleucina, el residuo 17 (P₂') es una valina y el residuo
35 18 (P₃') es una glicina.

Sin embargo, la secuencia óptima para el clivaje por trombina en estos residuos es Ser-Phe-Arg (en la posición
P₁', P₂' y P₃', respectivamente), es decir, una secuencia muy distante tanto de la secuencia de consenso de las serina
proteasas como de la secuencia particular de la PC o del FX, particularmente debido a la presencia de un residuo
40 hidrofílico (serina) en la posición P₁'.

Bajo estas condiciones, parece probable que, particularmente en el caso de la PC y del FX, se podría obtener una
ganancia en afinidad para la trombina, que incrementa la velocidad de activación, en detrimento de la estabilidad del
dominio catalítico, y por lo tanto de la actividad de la PC y del FX.

45 Sin embargo, los presentes inventores construyeron derivados de la PC y el FX que, además de albergar la secuencia
FpA a continuación del sitio de clivaje activador, se modificaron con el fin de introducir una alanina o una serina en
la posición P₁' del sitio de clivaje como una sustitución para la leucina de la PC o para la isoleucina del FX, y/o una
fenilalanina en la posición P₂' como una sustitución para la isoleucina de la PC o para la valina del FX, y/o una glicina
en la posición P₃' como una sustitución para el aspartato de la PC.

50 Los presentes inventores observaron que estas mutaciones estimulan el clivaje activador de la PC y del FX por
trombina y que, además, los derivados de la PCa resultantes conservan una actividad catalítica que, aunque reducida,
es compatible con la función fisiológica normal; además, esta reducción en la actividad catalítica es compensada por
un incremento en la vida media (hasta de 10 veces) comparada con la de los homólogos no mutados de la PCa. Este
55 incremento en la vida media es el resultado de una mayor resistencia a los inhibidores de la serina proteasa en el
plasma, conferida por estas mutaciones.

Según una forma de realización preferente de un derivado de la PC o del FX, según la invención, la secuencia P₁'-
P₂'-P₃' nativa de dicho cimógeno es también modificada mediante la sustitución del aminoácido en la posición P₁'
60 por una alanina o una serina.

Entre otras modificaciones ventajosas de la secuencia P₁'-P₂'-P₃' nativa se incluyen, por ejemplo:

- la sustitución del aminoácido en la posición P₂' por una fenilalanina.
- la sustitución del aminoácido en la posición P₃' por una glicina.

ES 2 279 010 T3

Los derivados particularmente preferentes son aquellos en los que el aminoácido en la posición P₁' es sustituido por una alanina.

5 El objetivo de la presente invención es también cualquier derivado de PCa, que puede obtenerse por clivaje por trombina de un derivado de la PC según la invención en el que uno o más residuos P₁' o P₂' del sitio de clivaje han sido modificados tal como se ha indicado anteriormente.

10 Los derivados de la PCa según la invención presentan la ventaja de ser más resistentes a las serpinas del plasma que la serina proteasa nativa correspondiente, y por lo tanto, de presentar una vida media más larga.

De esta manera, la implementación de la presente invención hace posible:

15 - obtener un clivaje para trombina de proteínas que no constituyen sustratos naturales para esta enzima, o acelerar el clivaje de proteínas que son naturalmente de clivaje lento por trombina; de esta manera resulta posible particularmente obtener, de manera fácil y relativamente barata, proteínas activas a partir de cimógenos, mediante un simple clivaje con trombina, que es una enzima barata y fácil de obtener;

20 - obtener, además, cuando se realiza la modificación indicada anteriormente, de uno o más de los residuos P₁', P₂' o P₃' del sitio de clivaje, los derivados de la serina proteasa que son resistentes a los inhibidores y por lo tanto presentan un vida media en plasma más larga.

25 De esta manera, a modo de ejemplo, en el caso de la PC, la implementación de la presente invención hace posible obtener derivados de la PC cuya velocidad de activación por trombina en ausencia de trombomodulina es muy superior que la de los derivados de la PC de la técnica anterior. Además, hace posible la preparación de PC activada a partir de estos derivados, utilizando trombina, mientras que normalmente se utiliza un activador extraído de veneno de serpiente, que es muy caro, para preparar PCa a partir de PC nativa. Respecto a los derivados de PCa que pueden ser obtenidos según la invención, su relativamente baja actividad es compensada, primero, por la velocidad de activación y, segundo, por su considerable resistencia a las serpinas del plasma. El resultado de esto es un efecto terapéutico mejor dirigido y que es más fácilmente controlado que el de la PCa o el de los derivados de la PC de la técnica anterior.

30 También, a modo de ejemplo, la implementación de la presente invención hace posible obtener derivados de FX activables por trombina. Además, hace posible la preparación de FXa a partir de estos derivados, utilizando trombina, mientras que convencionalmente se utiliza un activador extraído de veneno de serpiente, que es muy caro, para preparar FXa a partir de FX.

35 Opcionalmente, resulta posible combinar las modificaciones específicas de los derivados de la invención con otras modificaciones que conciernen diferentes dominios de la proteína elegida y que pueden hacer posible la mejora de algunas de sus propiedades. De esta manera, en el caso de los derivados de la PC o de la PCa de la presente invención, resulta posible, por ejemplo, si se desea obtener un derivado de la PCa con una actividad anticoagulante ligeramente superior, sustituir los residuos Asn en las posiciones 313 y 329 (con referencia a la forma madura de la PC), tal como se describe en la patente US 5453373. En el caso de los derivados de FX de la presente invención, si se desea obtener un mejor rendimiento de la proteína γ -carboxilada madura, resulta posible sustituir el propéptido del FX nativo por el de la protrombina, tal como es descrito por Camire *et al.* (Biochemistry, 39, 14322-14329, 40 2000).

Un objetivo de la presente invención son también las moléculas de ácido nucleico que codifican los derivados de PC o FX según la invención.

50 Estas moléculas de ácido nucleico pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales, bien conocidos por los expertos en la materia, particularmente mediante mutagénesis sitio dirigida del gen que codifica la proteína nativa para la que se desea permitir o acelerar el clivaje por trombina.

55 La presente invención también abarca pares de cebadores nucleótidos que pueden ser utilizados para obtener, mediante mutagénesis sitio dirigida, moléculas de ácido nucleico que codifican derivados de PC según la invención, y particularmente los siguientes pares de cebadores:

- un par de oligonucleótidos definido por las secuencias SEQ ID NO: 5 y 6,
- 60 - un par de oligonucleótidos definido por las secuencias SEQ ID NO: 7 y 8,
- un par de oligonucleótidos definido por las secuencias SEQ ID NO: 9 y 10,
- un par de oligonucleótidos definido por las secuencias SEQ ID NO: 11 y 12,
- 65 - un par de oligonucleótidos definido por las secuencias SEQ ID NO: 13 y 14.

ES 2 279 010 T3

La presente invención también abarca pares de cebadores nucleótidos que pueden ser utilizados para obtener, mediante mutagénesis sitio dirigida, moléculas de ácido nucleico que codifican derivados de FX según la invención, y particularmente los siguientes pares de cebadores:

- 5 - un par de oligonucleótidos definido por las secuencias SEQ ID NO: 15 y 16,
- un par de oligonucleótidos definido por las secuencias SEQ ID NO: 17 y 18,
- un par de oligonucleótidos definido por las secuencias SEQ ID NO: 19 y 20,
- 10 - un par de oligonucleótidos definido por las secuencias SEQ ID NO: 21 y 22,

15 La presente invención también abarca los casetes de expresión en los que una molécula de ácido nucleico de la invención está asociada con elementos adecuados para controlar la transcripción (particularmente un promotor y, opcionalmente, un terminador) y, opcionalmente la translación, y también los vectores recombinantes en los que se introduce una molécula de ácido nucleico según la invención. Estos vectores recombinantes pueden, por ejemplo, ser vectores de clonación, o vectores de expresión. La invención también incluye sistemas de suministro de genes que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención, que puede ser utilizada en terapia génica *in vivo* o *ex vivo*. Esto incluye, por ejemplo, vectores de transferencia vírica tales como los derivados a partir de retrovirus, adenovirus, virus adeno asociados, lentivirus, que se utilizan convencionalmente en terapia génica. También incluye sistemas de suministro de genes que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención y un vehículo de suministro génico no vírico. Entre los ejemplos de vehículos de suministro génico no víricos se incluyen liposomas y polímeros tales como polietilimininas, ciclodextrinas, polímeros histidina/lisina (HK), etcétera.

25 Un objetivo de la presente invención son también las células huésped procariotas o eucariotas genéticamente transformadas con por lo menos una molécula de ácido nucleico según la invención. Preferentemente, para la expresión y la producción de derivados de la PC o del FX según la invención, se elegirán células eucariotas, particularmente células de mamífero.

30 La presente invención también abarca animales no humanos transgénicos, particularmente mamíferos no humanos transgénicos que presentan por lo menos un trasgen que comprende un casete de expresión de la invención. Dichos animales transgénicos pueden ser utilizados para producir las proteínas quiméricas de la invención, tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, por Brink *et al.*, (Theriologeny, 53, 139-148, 2000).

La construcción de los vectores de expresión según la invención, la transformación de las células huésped, y la producción de los animales transgénicos pueden realizarse utilizando técnicas convencionales de la biología molecular.

40 Los derivados de la PC o del FX de la invención, pueden, por ejemplo, ser obtenidos mediante un cultivo de células genéticamente transformadas según la invención y recuperando el derivado expresado por dicha célula, del cultivo. A continuación, si resulta necesario, pueden ser purificadas mediante procedimientos convencionales, conocidos en sí por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante precipitación fraccionada, particularmente precipitación con sulfato de amonio, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etcétera.

45 Particularmente, pueden utilizarse procedimientos convencionales para preparar y purificar las proteínas recombinantes para producir las proteínas según la invención. Por ejemplo, para producir los derivados de PC según la invención, pueden utilizarse los procedimientos tales como los descritos en las patentes US 4992373 y US 4981952.

50 También es un objetivo de la presente invención la utilización de derivados de PC, PCa o FX según la invención, o de las moléculas de ácido nucleico que codifican estos derivados, para la producción de productos medicinales.

Dichos productos medicinales son también parte de la invención. Se incluyen, por ejemplo:

55 - composiciones farmacéuticas que comprenden por lo menos una proteína quimérica, o el producto del clivaje por trombina de la misma, según la invención, y particularmente por lo menos un derivado de PC, PCa o FX según la invención, combinado con un excipiente adecuado.

60 - composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención asociada con un vehículo de suministro génico vírico o no vírico. Estas composiciones farmacéuticas pueden ser utilizadas, de manera ventajosa, en terapia génica *in vivo* o *ex vivo*. Los vectores utilizados convencionalmente en terapia génica, tales como vectores víricos (por ejemplo, un vector de tipo adenovirus o retrovirus), liposomas, etcétera, pueden ser utilizados para la producción de productos medicinales según la invención.

65 Por ejemplo, los productos medicinales obtenidos a partir de derivados de PC o PCa según la invención puede ser utilizados en todas las aplicaciones típicas de PC o PCa, y particularmente como antitrombóticos, antiinflamatorios y agentes antiapoptóticos, y profibrinolíticos, en el contexto de la prevención o tratamiento de patologías que implican hipercoagulación. A modo de ejemplo, se hará mención de la trombosis venosa o arterial, particularmente de la

trombosis que afecta a los vasos de gran calibre, infarto de miocardio, enfermedad trombótica, embolismo pulmonar, la prevención de reoclusiones coronarias después de una angioplastia o una trombólisis, y también el tratamiento o la prevención de anomalías de coagulación en pacientes que padecen anomalías genéticas que afectan al gen PC o al de la trombomodulina.

5 Los productos obtenidos a partir de derivados de FX según la invención pueden ser utilizados como procoagulantes. A modo de ejemplo, se hará mención de la prevención o el tratamiento de patologías de coagulación de tipo hemorrágico, particularmente como resultado de una deficiencia de factor VIII, IX o XI. Estas pueden ser particularmente hemofilias A o B, que pueden complicarse o no con la presencia de inhibidores (neutralizando los aloanticuerpos dirigidos contra el factor VIII o IX utilizados convencionalmente para el tratamiento); también pueden ser hemofilias adquiridas como resultado de la aparición de autoanticuerpos asociados con otra patología (enfermedad autoinmune, cáncer, síndrome linfoproliferativo, desorden idiopático, etcétera).

15 La presente invención se apreciará con mayor claridad a partir de las descripciones adicionales siguientes, que se refieren a ejemplos no limitativos de preparación y caracterización de derivados de PC y FX según la invención.

Ejemplo 1

Construcción de los vectores para expresión de variantes de PC

20 Los vectores destinados para la expresión de las variantes de PC se construyeron utilizando, como materia prima, el vector pCI-neo-PC, que expresa la proteína C humana normal después de la transfección a células de mamífero.

25 El ADNc de la PC se aisló a partir de células de hígado humano mediante una reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (PCR); los procedimientos utilizados para clonar el ADNc al vector pCI-Neo (Promega, Madison, USA) concuerdan con los descritos en la técnica (Sambrook *et al.*, "Molecular cloning, A laboratory manual" (Segunda edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; White, PCR protocols, Methods in Molecular Biology, Walter J. H. editores, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993).

Mutagénesis sitio dirigida del vector pCI-neo-PC

30 La mutagénesis sitio dirigida del vector pCI-neo-PC, para preparar los vectores destinados para la expresión de los análogos de la PC, se llevó a cabo utilizando un procedimiento derivado a partir del procedimiento de Jones *et al.* (Nature, 344, 793-794, 1990). La modificación del ADNc de la PC que hace posible la introducción de la secuencia FpA en sustitución del péptido de activación, se obtuvo en una única etapa de PCR, con el vector pCI-neo-PC como matriz y los pares de oligonucleótidos mostrados en la Tabla I como cebadores.

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

Tabla I

Secuencia del péptido de activación	Secuencia P ₁ ' - P ₃ '	Secuencia del cebador proteína C
DFLAEGGGVR	LID	Sentido 5'-GACTTTCTAGCTgAAAggAggAggCgTgCggCTCATTgATgggAAgATgACC-3' (SEQ ID NO: 3) Antisentido 5'-CACgCTCCTCCTTCAgCTAgAAAgtCTCgTTTCAggTgACTgCgCTTCTT-3' (SEQ ID NO: 4)
DFLAEGGGVR	LFG	Sentido 5'-GAAAggAggAggCgTgCgCTCTTTCggCgggAAgATgACCAggCg-3' (SEQ ID NO: 5) Antisentido 5'-CgCCTggTCATCTTCCCgCCgAAgAgCCgCACgCCTCCTTC-3' (SEQ ID NO: 6)
DFLAEGGGVR	SIG	Sentido 5'-gAAAggAggAggCgTgCggTCCATTggCgggAAgATgACCAggCg-3' (SEQ ID NO: 7) Antisentido 5'-CgCCTggTCATCTTCCCgCCAATggACCgCACgCCTCCTCCTTC-3' (SEQ ID NO: 8)
DFLAEGGGVR	AIG	Sentido 5'-gAAAggAggAggCgTgCgggCCATTggCgggAAgATgACCAggCg-3' (SEQ ID NO: 9) Antisentido 5'-CgCCTggTCATCTTCCCgCCAATggCCCgCACgCCTCCTCCTTC-3' (SEQ ID NO: 10)
DFLAEGGGVR	LIG	Sentido 5'-GAAAggAggAggCgTgCggCTCATTggCgggAAgATgACCAggCg-3' (SEQ ID NO: 11) Antisentido 5'-CgCCTggTCATCTTCCCgCGAATgAgCCgCACgCTCCTCCTTC-3' (SEQ ID NO: 12)
ADTEDQED	LID	Sentido 5'-AgCgCAGTCACCTgAAACgACAAgTAGATCCgCggCTCAT-3' (SEQ ID NO: 13) Antisentido 5'-ATgAgCCgCggATCTACTgTCgTTTCAggTgACTgCgCT-3' (SEQ ID NO: 14)

ES 2 279 010 T3

En esta tabla, la primera columna indica la modificación introducida en el péptido de activación: DFLAEGGGVR se refiere a que, en el derivado preparado, el péptido de activación se sustituyó por la secuencia del fibrinopéptido A; Δ_{DTEDEQED} se refiere a que, en el derivado preparado, los primeros 7 residuos del péptido de activación normal fueron eliminados. Para cada mutagénesis, la secuencia del par de oligonucleótidos utilizada (sentido y antisentido) se muestra en la columna de la derecha. La columna central de la tabla indica la secuencia de aminoácidos P_1' , P_2' y P_3' del sitio de activación.

La PCR se lleva a cabo en un volumen de 50 μl que comprende 2,5 unidades de Pfu ADN polimerasa (Stratagene; Amsterdam Zuidoost, Holanda), en el tampón recomendado por el fabricante, una mezcla equimolar de cada dNTP (0,5 mM), 125 ng de cada cebador (sentido y antisentido, véase Tabla I) y 50 ng de matriz. Las PCR se llevan a cabo utilizando un dispositivo termociclador de ADN tipo 480 (Perkin Elmer, Roissy, Francia). Cada reacción comprende una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguida de 15 ciclos idénticos, cada uno de los cuales comprende 3 etapas sucesivas (desnaturalización, hibridación y elongación) de, respectivamente, 30 segundos a 95°C, 60 segundos a 55°C o 60°C, y 20 minutos a 68°C.

Para preparar el mutante DFLAEGGGVR con LID para los residuos P_1' - P_3' (es decir, los residuos naturales), la temperatura de hibridación del cebador es de 60°C.

El ADNc que codifica este mutante es utilizado para preparar las otras variantes en las que la secuencia P_1' - P_3' difiere de LID; siendo la temperatura de hibridación de 55°C.

Al final de estos 15 ciclos, el vector que fue utilizado como matriz es degradado a 37°C durante 60 minutos, con 10 unidades de endonucleasa de restricción DpnI (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, Francia).

La preparación de la variante de Δ_{DTEDEQED} se lleva a cabo de la misma manera, con el vector pCI-neo-PC que contiene la secuencia que codifica la PC normal, como matriz de la PCR. La temperatura de hibridación es de 55°C.

Las variantes en P_1' - P_3' del sitio de activación del derivado de PC que presenta FpA en sustitución del péptido de activación se obtuvieron de la misma manera, con el vector pCI-neo-PC-FpA (con la secuencia FpA) como matriz y el correspondiente par de cebadores, tal como se indica en la Tabla I.

Preparación de los vectores derivados a partir de pCI-neo-PC

Las bacterias de la cepa DH5 α (Dam⁺) se hacen competentes lavándolas a 4°C en CaCl_2 100 mM y almacenándolas a -80°C en una solución de CaCl_2 100 mM que contiene 15% de glicerol. Una alícuota de bacterias competentes (aproximadamente 10^6 en 100 μl) es transformada con entre 5 μl y 10 μl del producto de PCR digerido con DpnI. La mezcla es incubada durante 30 minutos a 4°C y a continuación es sometida a un choque de calor durante 2 minutos a 42°C seguido por una incubación adicional a 4°C durante 2 minutos. A continuación, las bacterias son incubadas a 37°C durante 60 minutos en un medio LB (caldo Luthia Bertoni, Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia) con agitación vigorosa. El medio LB es decantando después de una centrifugación a 2.000 rpm durante 5 minutos, y las bacterias se colocan en agar (1,5% de Agar-Select en medio LB que contiene 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina). Los platos Petri son incubados en un incubador a 37°C durante 36 horas. Se aíslan entre 6 y 12 colonias y se amplifican durante la noche con agitación vigorosa, a 37°C, en 5 ml de medio LB que contiene 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina. El vector responsable de la resistencia a la ampicilina es purificado mediante un procedimiento de "lisis de ebullición" (Sambrook *et al.*, citado anteriormente). De manera alternativa, para preparar grandes cantidades de plásmido, se utilizó el kit "Plasmid Midy Kit" (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) según las instrucciones del fabricante.

Secuenciación de los ADNc de las variantes de la PC

La secuencia de ADNc realizada mediante los derivados de pCI-neo-PC se controló utilizando un procedimiento derivado del procedimiento de Sanger *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, 1977), utilizando un dispositivo secuenciador "Abi Prism 377" (Perkin Elmer). Se utilizó el kit "Abi Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit", según las instrucciones del fabricante. Todos los ADNc de los derivados de PC se secuenciaron utilizando 6 cebadores distribuidos a lo largo de la secuencia ADNc de la PC.

Ejemplo 2

Transfección y selección de células de mamífero que expresan una variante de la PC

Transfección de células HEK293

La línea celular transfectada es una línea celular epitelial de hígado humano, HEK293 (CRL-1573), de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Estas células fueron transfectadas con los vectores derivados a partir de pCI-neo-PC mediante el procedimiento de coprecipitación con fosfato de calcio (Sambrook *et al.*, citado anteriormente).

La células HEK293 se cultivan en platos Petri (80 mm de diámetro) a 37°C en una atmósfera enriquecida con CO_2 al 5%, en medio completo: "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal

ES 2 279 010 T3

bovino, glutamato 2 mM, 5 U/ml de penicilina y 5 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina (todos proporcionados por Invitrogen). Cuando las células alcanzan una confluencia del 80%, de 5 μg a 40 μg del vector a transfectar se diluyen en 220 μl de H_2O y se añaden a 250 μl de tampón Hepes 50 mM, pH 7,05, que contiene NaCl 280 mM, KCl 10 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM y dextrosa 12 mM (HBS, Hepes Buffered Saline). La coprecipitación del ADN se obtiene añadiendo, gota a gota y con una agitación lenta, 31 μl de CaCl_2 2,5 M, seguida de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se aclaran dos veces en tampón de fosfato (PBS, Invitrogen), y a continuación, se devuelven al medio completo fresco. A continuación, el precipitado de ADN es añadido y puesto en contacto con las células HEK293 durante 4 horas a 37°C. Al final de esta incubación, las células se lavan con PBS y se devuelven al cultivo en medio completo fresco durante 24 horas. A continuación, las células se separan del plato Petri mediante incubación durante 5 minutos a 37°C en presencia de 1,5 ml de una solución de Tripsina-EDTA (Invitrogen). A continuación, las células son distribuidas en tres platos Petri y son seleccionadas en medio completo que contiene 1 mg/ml de geneticina (Invitrogen). El medio de cultivo es renovado cada 2 días durante 2 a 3 semanas, hasta que se obtienen colonias. Se aíslan y se transfieren aproximadamente 20 colonias en los tubos (2 cm^2) de un plato de cultivo de 24 tubos, y se devuelven al cultivo hasta la confluencia, en medio completo que contiene el agente de selección. A continuación, cada sobrenadante se somete a ensayo mediante Elisa (véase más adelante) con el fin de detectar la presencia de derivados de PC. Los clones que muestran la mejor expresión del derivado de la PC son amplificados y se aseguran congelándolos en nitrógeno líquido (conteniendo, cada vial aproximadamente 10^6 células en 1 ml de suero bovino mezclado con 10% (v/v) de DMSO).

20 *Identificación de clones que expresan una variante de la PC*

La identificación de los clones que expresan un derivado de la PC y la estimación de la cantidad secretada se realizaron mediante Elisa. Se utiliza un anticuerpo monoclonal, P7058, descrito por Miletich y Broze (J. Biol. Chem., 265, 11397-11404, 1990) y comercializado por Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, Francia). Este anticuerpo es diluido en tampón Na_2HCO_3 50 mM, pH 9,6 y absorbido durante la noche a 4°C (1 μg en 100 μl por cada tubo) a una placa de titración "Maxisorp" (Nunc, Polylabo, Strasbourg, Francia). Los tubos son lavados 3 veces en TTBS (Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 150 mM y 0,5% (v/v) de Tween 20) y a continuación son saturados durante 1 hora a temperatura ambiente con albúmina de suero bovino en TTBS (5% (p/v); 100 μl por tubo). Una alícuota de cada sobrenadante a ensayar (100 μl diluidos a 1/5 en medio DMEM que contiene EDTA 5mM) es añadida a uno de los tubos de la placa de microtitración saturada y se deja incubar durante una hora a temperatura ambiente. Los tubos son lavados 3 veces en TTBS, y un anticuerpo dirigido contra PC, es preparado en conejo y es acoplado a la peroxidasa (Dako, Clostrup, Dinamarca), es añadido después de la dilución de 1/1.000 en TTBS (100 μl por tubo). Después de la incubación durante una hora a temperatura ambiente, los tubos son lavados de nuevo 3 veces en tampón TTBS. La presencia de PC enlazada al primer anticuerpo es revelada mediante la actividad peroxidasa mostrada por el segundo anticuerpo añadiendo 100 μl de una solución de OPD (ácido cítrico 0,1 M, Na_2HPO_4 0,1 M, pH 5,0 que contiene 0,5% de H_2O_2 (v/v) y 1 mg/ml de ortofenilendiamina). Después de entre 5 y 15 minutos, la reacción es detenida añadiendo 100 μl de H_2SO_4 0,15 M y el producto de la reacción catalizada por peroxidasa es cuantificado mediante la medición de la absorbencia a 490 nm.

40 Ejemplo 3

Expresión y purificación de las variante de la PC

Las células HEK293 transfectadas son cultivadas en monocapa, en un incubador a 37°C bajo una atmósfera controlada que contiene 5% CO_2 , en medio completo. Los clones derivados a partir de las células HEK293 transfectadas y que secretan una variante de la PC son amplificadas mediante pasos sucesivos en matraces de área superficial creciente (hasta 300 cm^2). A continuación, cada matraz de 300 cm^2 es utilizado para inocular dos botellas Roller con un área superficial de 850 cm^2 . Los sobrenadantes, recogidos después de entre 2 a 6 días (dependiendo de la densidad celular) son centrifugados durante 10 minutos a 5.000 rpm para eliminar los restos celulares. Las proteasas posiblemente presentes en el medio de cultivo son inhibidas mediante la adición de EDTA 5 mM y benzamidina 10 mM, y el medio es almacenado a -20°C antes de purificar la proteína recombinante.

Las variantes de la PC son purificadas a partir de los sobrenadantes de los cultivos mediante tres etapas de cromatografía. Dos litros de sobrenadante de cultivo son primeramente concentrados mediante absorción en una resina de intercambio de aniones. Estos 2 litros de sobrenadante de cultivo son diluidos con antelación en 4 litros de tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene EDTA 5 mM y benzamidina 10 mM, con el fin de reducir la fuerza iónica; a continuación, se añaden 4,5 g de Sephadex QAE A50 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Suiza) y la mezcla es agitada lentamente durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la sedimentación de las perlas de Sephadex en una columna de cromatografía, las proteínas retenidas (incluyendo la PC) son eluidas con NaCl 0,5 mM en tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene EDTA 5 mM y benzamidina 10 mM. A continuación, la PC es purificada mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando resinas en las que se han injertado anticuerpos monoclonales (mab2) o HPC4 (Roche Diagnosis, Meylan, Francia) que reconocen la secuencia EDQVDPRLIDGK del péptido de activación. Estos anticuerpos monoclonales fueron acoplados a la Sepharose 4B activada por CNBr (aproximadamente 1 mg de anticuerpo por ml de gel), según las recomendaciones del proveedor (Amersham Pharmacia Biotech). La PC recombinante normal y su análogo, en el que el péptido de activación está truncado, se purificaron utilizando la resina acoplada al anticuerpo HPC4.

ES 2 279 010 T3

La columna de afinidad se cargó con el eluato de la resina QAE después de haber llevado la concentración de Ca²⁺ hasta 5 mM. A continuación, la columna fue lavada en tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 0,5 M y Ca²⁺ 5 mM. La PC recombinante es eluída con un tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 0,15 M y EDTA 5 mM.

5 Los análogos de PC en los que la secuencia P₃-P₃' ya no es DPRLID fueron purificados utilizando la resina acoplada al anticuerpo mab2. En este caso, después de cargar la columna de afinidad con el eluato a partir de la resina QAE, y lavado en tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 0,5 M y EDTA 5 mM, la PC recombinante es eluída mediante acidificación en tampón de glicina 0,1 M, pH 2,7. El pH de la fracción eluída es inmediatamente corregido a 7,5 añadiendo Tris 2 M, pH 10. La etapa de purificación final es una cromatografía de intercambio de 10 iones adicional, cuyo objetivo es reconcentrar y dializar el eluato a partir de la cromatografía de afinidad. Este eluato es diluido a 1/3 en un tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 50 mM, y a continuación es absorbido en un gel FAST Q (Amersham Pharmacia Biotech). Después de lavar en tampón de dilución (10 veces el volumen de la columna) para eliminar toda traza de glicina y EDTA, la PC es eluída con NaCl 0,5 M en tampón Tris 50 mM, pH 7,5. La concentración de PC es estimada a partir de su absorbencia a 280 nm, utilizando un coeficiente de absorción molar (E^{0,1%}) de 1,45. La pureza de cada análogo de PC es evaluada en un gel de poliacrilamida (al 12%, que contiene SDS al 1%) después de una desnaturalización y reducción de puentes disulfuro mediante incubación en presencia de 5% de β-mercaptoetanol. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 3.

Leyenda de la Figura 3:

20 Carril 1: marcadores de masa molecular. Carriles 2 a 7: 2 μg de variante Fpa-LID, Δ_{DTEDQED}, Fpa-LFG, Fpa-SIG, Fpa-AIG y Fpa-LIG, respectivamente. El peso molecular aparente (en kDa) se indica a la izquierda del gel. La posición de la forma de cadena simple de la PC normal, y también los de las cadenas ligeras y pesadas de la PC normal se indican a la derecha del gel.

25 Todas las preparaciones de PC obtenidas aparentan ser puras mediante gel SDS, pero dos formas están presentes. Una forma de cadena doble es el principal componente (entre 70% y 90%) con masas moleculares aparentes compatibles con las esperadas para las cadenas ligeras y pesadas (41.000 Da y 21.000 Da, respectivamente). El 10%-30% restante se obtiene en forma de cadena simple con una masa molecular aparente de 62.000 Da. El porcentaje de 30 la forma de cadena simple no parece depender del análogo considerado, sino que parece depender de la colección de sobrenadante de cultivo a partir de la que se deriva la preparación, independientemente de la naturaleza de la mutación.

Sin embargo, debería observarse que al final de este protocolo de purificación, parte de la preparación de la PC se obtiene en forma activada (hasta un 50%). Debido a que la forma activada no puede distinguirse del cimógeno mediante 35 análisis en gel de poliacrilamida SDS, este porcentaje se evalúa mediante la actividad amidolítica de la preparación (véase más adelante). El porcentaje de la forma activada parece depender tanto del análogo de PC considerado como del lote de preparación considerado. Resulta particularmente alto para los análogos de PC que presentan una serina o una alanina en sustitución de la leucina normal en la posición P₁' del sitio de activación.

40 *Neutralización de las formas activas presentes en las preparaciones de variantes de PC*

Con el fin de medir con exactitud la velocidad de activación por trombina de cada variante de PC, resulta esencial neutralizar, previamente, todas las trazas de PCa que puedan estar presentes en la preparación. Esta neutralización se lleva a cabo mediante la inhibición irreversible del sitio activo de la PCa. El inhibidor covalente utilizado es D-Phe-Pro-Arg-CH₃Cl (PPACK, Calbiochem, StCloud, Francia), que enlaza a His⁵⁷ del sistema de estabilización de carga. 45 En la práctica, se añade PPACK 5 mM a la preparación PC y la mezcla es incubada durante una hora a temperatura ambiente. Esta incubación se repite dos veces, añadiendo la misma cantidad de PPACK (fresco). El PPACK que no ha reaccionado es, a continuación, eliminado mediante cromatografía de intercambio de iones. La PC y la PCa inhibida (pero no el PPACK libre) son absorbidos a una columna Ressource Q (Amersham Pharmacia Biotech) después de la 50 dilución (1/10, v/v) en tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 50 mM. Antes de la elución con NaCl 1 M en tampón Tris 50 mM, pH 7,5, la columna es lavada, con 20 veces su volumen del tampón de dilución. Después del tratamiento, el porcentaje de la forma activa es inferior al 0,1% para la mayoría de las preparaciones PC, y no excede el 0,4% para el análogo de PC en el que el residuo en la posición P₁' es una serina. La presencia de PCa neutralizada no interfiere con la activación de la trombina de la fracción cimógeno.

55 Ejemplo 4

Caracterización de las variantes de PC

60 *Determinación de la velocidad de activación*

Las constantes de velocidad para la activación por trombina de las variantes de PC se determinaron bajo condiciones de pseudo primer orden. En la práctica, la PC (1 μM) fue incubada en presencia de trombina (de 10 nM a 50 nM, en función de la variante de PC) en tampón cinético (Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 0,15 M, 0,2% de PEG 8000 (p/v), 0,5 mg/ml de albúmina de suero bovino y CaCl₂ 5 mM). Después de tiempos de incubación variables, se 65 añadieron hirudina (200 unidades/ml) a 5 μl de alícuotas de la mezcla de reacción (con el fin de detener la reacción y neutralizar la trombina).

ES 2 279 010 T3

A continuación, la cantidad de PCa generada es estimada mediante la medición de la velocidad inicial de hidrólisis de piroGlu-Pro-Arg-pNA 200 μ M (S2366, Biogenics, Lattes, Francia). Se graba la variación en absorbencia a 405 nm como una función del tiempo utilizando un lector de microplaca MR5000 (Dynex, Guyancourt, Francia), y la concentración de PCa es deducida mediante la referencia a una curva estándar.

A continuación, la constante de velocidad para la reacción es estimada mediante una regresión no lineal de la variación de la concentración de PCa como una función del tiempo utilizando una ecuación que representa un incremento exponencial de primer orden:

$$PCa_{(t)} = PC(1 - \exp^{-kt}) + Cte;$$

en la que $PCa_{(t)}$ representa la concentración de PCa en el tiempo t; PC representa la concentración total de PC (activable), y k representa la constante de velocidad de primer orden; Cte es una constante que se añade para tener en cuenta una posible (pequeña) actividad amidolítica presente al inicio, antes de la adición del activador (ruido de fondo). Los valores de k_{on} (constante de especificidad) se calculan formando la relación de k respecto a la concentración del activador (trombina). Los valores obtenidos (en $M^{-1}s^{-1}$) se resumen en la Tabla II.

TABLA II

	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)
PC	$3,0 \cdot 10^2$
PC (+ TM)	$5,0 \cdot 10^5$
QVDPRLID	$6,0 \cdot 10^2$
Fpa-LID	$1,1 \cdot 10^4$
Fpa-LIG	$1,6 \cdot 10^4$
Fpa-LFG	$2,9 \cdot 10^4$
Fpa-AIG	$3,0 \cdot 10^4$
Fpa-SIG	$1,6 \cdot 10^5$

La sustitución del péptido de activación de la PC por fibrinopéptido A (variante Fpa-LID) incrementa el valor de k_{on} 40 veces. La sustitución adicional en esta variante del aspartato P_3 ' por una glicina (Fpa-LIG) sólo incrementa levemente k_{on} , pero si la isoleucina en P_2 ' es, además, sustituida por una fenilalanina (Fpa-LFG), el valor de k_{on} se hace 96 veces superior que el valor de la PC normal. Finalmente, cuando la leucina en P_1 ' es sustituida por una alanina (Fpa-AIG) o por una serina (Fpa-SIG), el valor de k_{on} se hace, respectivamente, 100 y 500 veces superior que el de la PC normal, un valor que no es tan lejano al de la activación de la PC normal en presencia de trombomodulina (PC+TM).

Activación preparativa de las variantes de PC

Para los estudios funcionales, la PC y sus derivados fueron activados en cantidades preparativas con un activador aislado a partir de veneno de serpiente de *Agkistrodon contortrix contortrix* (Protac, Kordia Leiden, Holanda). 9 unidades de Protac se acoplan a 1 ml de Sapharose-NHS activada (Hi-Trap, Amersham Pharmacia Biotech), respetando las recomendaciones del fabricante.

Una alícuota de 1 ml de PC (1 μ M) en tampón de activación (Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 50 mM, EDTA 5 mM y 0,2% (p/v) PEG) es inyectado en la columna injertada con Protac y equilibrada en el mismo tampón. La columna se cierra por ambos extremos y la incubación se mantiene durante 8 horas a temperatura ambiente. La PC activada es eluída de la columna inyectando 2 volúmenes de tampón de activación.

De manera alternativa, particularmente para los derivados de PC que pueden ser rápidamente activados por trombina, la activación se lleva a cabo en una columna de Sepharose injertada con trombina humana purificada (1 mg/ml de gel). El gel es preparado y utilizado bajo las mismas condiciones que las descritas anteriormente para la columna injertada con Protac. A continuación, las PCa son reconcentradas mediante una cromatografía de intercambio de iones en una columna Mono Q (Amersham Pharmacia Biotech). El eluato de la columna Hitrap es diluido (1/10; v/v) en Tris 50 mM, pH 7,5, y es cargado en la columna Mono Q, y la PCa es eluída con NaCl 0,5 M en Tris 50 mM, pH 7,5.

ES 2 279 010 T3

Titrición de las variantes de PCa

La concentracón de sitio activo de los derivados de la PCa activados se determina mediante titracón con PPACK, que forma un complejo equimolar covalente con la PCa.

5

Diferentes concentraciones de PPACK, de entre 1 nM y 25 μ M, son incubadas con una cantidad fija de la PCa a titrar en tampón cinético. La mezcla es incubada a temperatura ambiente hasta completar la reaccón. El tiempo de incubacón requerido depende del derivado de PCa considerado y resulta necesario asegurarse de que la prolongacón de la incubacón no conlleva la inhibicón de moléculas PCa adicionales: tres horas de incubacón resultan suficientes para una PCa normal, pero 18 horas resultan preferentes para los derivados de PCa que presentan una serina o una alanina en la posicón 16 y también para el derivado que presenta una fenilalanina en la posicón 17.

10

Al final de esta incubacón, la concentracón residual de la PCa es estimada mediante la medición de la velocidad inicial de la hidrólisis de S2366 200 μ M. Se graba la variacón en absorbencia a 405 nm como una funcón del tiempo (v_s) utilizando un lector de microplaca MR5000. A continuacón, la concentracón eficaz de PCa inicialmente presente (E_t) es estimada mediante una regresión no lineal de la dependencia de v_s como una funcón de la concentracón de PPACK añadida, utilizando la ecuacón "inhibicón de unón fuerte" (CHA, Biochem. Pharmacol., 24, 2177-2185, 1975; Williams y Morrison, Methods Enzymol., 63, 437-467, 1979):

15

20

$$v_s = (v_0/2[E_t])[(K_i + [PPACK] - [E_t])^2 + 4K_i[E_t]]^{1/2} - (K_i + [PPACK] - E_t)$$

donde v_0 es la velocidad inicial de hidrólisis de S2366 en ausencia del inhibidor, y K_i es una constante de inhibicón aparente para el complejo inhibidor de la enzima.

25

Actividad amidolítica de las variantes de PCa

Con el fin de caracterizar el sitio activo de las variantes de PCa, las constantes k_{cat} y K_M fueron determinadas para la hidrólisis de dos sustratos cromogénicos: S2366 y D-Phe-Pip-Arg-pNA (S2238, Biogenic). Las hidrólisis se llevan a cabo en tampón cinético que contienen $CaCl_2$ 5 mM o EDTA 5 mM, a temperatura ambiente. Diferentes concentraciones de sustrato, de entre 50 μ M y 3.000 μ M, son incubadas con una cantidad fija de PCa (de 10 nM a 50 nM en funcón de la variante). Se graba la variacón en absorbencia a 405 nm como una funcón del tiempo utilizando un lector de microplaca MR5000, y la velocidad inicial de hidrólisis es estimada mediante una regresión lineal de las absorbencias correspondientes, como mucho, al 10% de hidrólisis. A continuacón, las constantes k_{cat} y K_M son estimadas mediante una regresión no lineal de la variacón de esta velocidad inicial como una funcón de la concentracón de sustrato, utilizando la ecuacón Michaelis-Menten.

30

35

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla III.

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 279 010 T3

TABLA III

		S2238Ca ²⁺	
	K _{cat} s ⁻¹	K _M μM	K _{cat} /K _M (μM ⁻¹ .s ⁻¹)
5	PCa	28	63
10	Fpa-LIG (activada)	20	66
	Fpa-LFG (activada)	ND	ND
	Fpa-AIG (activada)	10,8	14,5
15	Fpa-SIG (activada)	4,6	2,3
		S2238 EDTA	
	PCa	20	37
20	Fpa-LIG (activada)	19	35
	Fpa-LFG (activada)	ND	ND
	Fpa-AIG (activada)	ND	ND
25	Fpa-SIG (activada)	0,49	1,8
		S2366Ca ²⁺	
	K _{cat} s ⁻¹	K _M μM	K _{cat} /K _M (μM ⁻¹ .s ⁻¹)
30	PCa	42	108
35	Fpa-LIG (activada)	46	80
	Fpa-LFG (activada)	25	> 3.000
	Fpa-AIG (activada)	53	20
40	Fpa-SIG (activada)	13	> 3.000
		S2366 EDTA	
	K _{cat} s ⁻¹	K _M μM	K _{cat} /K _M (μM ⁻¹ .s ⁻¹)
45	PCa	37	92
	Fpa-LIG (activada)	36	73
50	Fpa-LFG (activada)	21	> 3.000
	Fpa-AIG (activada)	20	12
	Fpa-SIG (activada)	2,2	1,1

55 Las formas activas de los derivados de PC en las que el residuo en P₁' es una alanina (Fpa-AIG) o una serina (Fpa-SIG), y también el derivado que presenta una fenilalanina en P₂' (Fpa-LFG), muestran una reducción de su actividad amidolítica. ND: no determinado. Para el sustrato S2366, en presencia de Ca²⁺, la mutación de la isoleucina a fenilalanina en la posición P₂' causa un incremento superior a 8 veces en el K_M y una reducción de 1,7 veces en la k_{cat}. La sustitución de la leucina en la posición P₁' por una alanina o una serina genera un incremento de 7 veces y 8 veces en el valor de K_M, respectivamente. El valor de k_{cat} es reducido 3 veces con la variante que alberga una serina en P₁', mientras que, para la variante con una alanina, el valor de k_{cat} es comparable al determinado con la PCa. La dependencia de Ca²⁺ de la PCa con respecto a la hidrólisis de estos 2 sustratos es conservada con las diferentes variantes de PC: en presencia de EDTA, el valor k_{cat}/K_M se reduce ligeramente.

65 La forma activada de la variante Fpa-SIG es aquella para la que la constante de especificidad para hidrólisis de los sustratos S2238 y S2366 es la más reducida.

ES 2 279 010 T3

Determinación de la vida media en plasma de las variantes de PCa

La vida media de las variantes de PCa fue comparada con la de la PCa normal (PCa recombinante preparada bajo las mismas condiciones o PCa purificada a partir de plasma humano).

5

Para estimar esta vida media, la actividad residual de diversas PCa es medida después de la incubación para un periodo variado de tiempo en plasma normal, convertido en no coagulable mediante la adición de hirudina. La mezcla de reacción está compuesta, al 80% (v/v), de una colección de plasmas normales citrados y de PCa (de 50 nM a 200 nM en función de la variante) en tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 150 mM, 0,5 mg/ml de albúmina de suero bovino y 80 U/ml de hirudina. Después de la incubación, una alícuota de la mezcla plasma/PCa/hirudina (40 μ l) es añadida a 160 μ l de S2366 250 μ M, y la velocidad inicial de hidrólisis del sustrato es medida mediante la grabación del incremento en absorbencia a 405 nm en un lector de microplaca MR5000.

10

A continuación, la vida media de cada variante es estimada mediante una regresión no lineal de la variación en actividad residual como una función del tiempo utilizando una ecuación que representa una reducción exponencial de primer orden:

15

$$A_{(t)} = A_0 \exp(-kt) + Cte;$$

20

en la que $A_{(t)}$ representa la actividad residual de la PCa en el tiempo t, A_0 representa su actividad inicial, y k representa la constante de velocidad de primer orden. La constante Cte se añade para tener en cuenta una posible actividad independiente de la actividad de la variante de PCa (ruido de fondo).

25

A continuación, la vida media en plasma se calcula dividiendo $\ln(2)$ por k.

Los valores obtenidos (en min^{-1}) se resumen en la Tabla IV.

TABLA IV

30

	Vida media (min^{-1})
PCa	26
Fpa-LIG (activada)	56
Fpa-LFG (activada)	184
Fpa-AIG (activada)	147
Fpa-SIG (activada)	270

35

40

Las vidas medias fueron determinadas en plasma citrado mediante la medición de la reducción en actividad PCa como una función del tiempo. La vida media es 10 veces más larga para la variante de PCa en la que el residuo en P_1 ' es una serina y el residuo en P_3 ' una glicina (Fpa-SIG).

45

La vida media en plasma de la forma activada de la variante Fpa-SIG es incrementada 10 veces comparada con la PCa normal.

50

Ensayos de coagulación

Las actividades anticoagulantes de la PCa y de sus derivados fueron determinadas mediante la medición de la prolongación del tiempo de cefalina con activador de una colección de plasma normal citrado recalcificado, en presencia de concentraciones variables de PCa o de uno de sus derivados (Richarson *et al.*, Nature, 360, 261-264, 1992).

55

Estos ensayos se realizan por duplicado en una máquina ST4 (Diagnostica Stago, Asnières, Francia). Las formas activadas de las PCa se diluyen en un tampón Tris 50 mM, pH 7,5 que contiene NaCl 0,15 M y 0,5 mg/ml de albúmina de suero bovino. Para cada ensayo, 50 μ l de una dilución de PCa, 50 μ l del reactivo "APTT" (Organon Technika, Fresnes, Francia) y 50 μ l de la colección de plasma citrado se mezclan e incuban durante 3 minutos a 37°C. La coagulación se inicia mediante la adición de 50 μ l de tampón de dilución que contiene CaCl_2 25 mM.

60

La Tabla V representa la actividad anticoagulante de los derivados de PCa, expresada como porcentaje de la actividad anticoagulante de la PCa normal 1 nM.

65

ES 2 279 010 T3

TABLA V

	Actividad anticoagulante (%)
PCa	100
Fpa-LIG (activada)	50
Fpa-LFG (activada)	8
Fpa-AIG (activada)	20
Fpa-SIG (activada)	6

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

El porcentaje de la actividad anticoagulante está expresado en relación a la PCa normal, que sirve como referencia (100% corresponde a la actividad anticoagulante de la PCa 1 nM). Para cada variante, la concentración requerida para obtener una actividad anticoagulante equivalente a 1nM de PCa es estimada. La actividad anticoagulante de la variante Fpa-AIG es, por ejemplo, 20% de la actividad de la PCa normal (se requieren 5 nM de la variante para obtener la misma actividad que 1 nM de PCa normal).

La actividad anticoagulante de la variante Fpa-SIG representa el 6% de la actividad de la PCa normal.

Análisis de la formación de complejos de Las variantes activas Fpa-AIG y Fpa-SIG con α 1-antitripsina

La capacidad de las formas activas de las variantes Fpa-AIG y Fpa-SIG para formar un complejo estable con α 1-antitripsina (Calbiochem) se demostró mediante la incubación de variantes de PC activadas (5 μ M) con α 1-antitripsina 40 μ M, en tampón cinético, durante 5 horas a 37°C.

El producto de reacción fue analizado en gel de poliacrilamida al 10% bajo condiciones de desnaturalización. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Leyenda de la Figura 4:

Carril 1: Fpa-AIG incubada durante 5 horas a 37°C en presencia de α 1-antitripsina, carril 2: Fpa-AIG sola (2 μ g). Carril 3: Fpa-SIG incubada en presencia de α 1-antitripsina, carril 4: Fpa-SIG sola. Carril 5: PCa normal incubada en presencia de α 1-antitripsina, carril 6: PCa normal sola. Carril 7: α 1-antitripsina sola. Todas las variantes de PCa forman un complejo covalente con α 1-antitripsina.

La formación de un complejo estable entre PCa y α 1-antitripsina da lugar a la formación de una banda de peso molecular elevado. Este gel revela que las variantes de PCa en las que el dominio catalítico presenta una alanina o una serina en la posición 16 son capaces de formar un complejo estable con α 1-antitripsina en la concentración fisiológica normal de la serpina.

Conclusión

Efectos de la modificación del péptido de activación de la PC

En el caso del derivado de PC en el que 7 de los 12 residuos del péptido de activación (desde P₁₂ hasta P₆, es decir, la secuencia DTEDQED) han sido eliminados, la velocidad de activación (bajo condiciones fisiológicas y en ausencia de trombomodulina) es doblada en comparación a la de la PC normal expresada y caracterizada bajo las mismas condiciones. Por lo tanto, esto muestra que el péptido de activación limita la capacidad de la trombina de clivar la PC; se cree que constituye una de las barreras que limitan su activación en ausencia de trombomodulina.

En el caso del derivado de PC en el que los 12 residuos del péptido de activación (desde P₁₂ hasta P₁, es decir, la secuencia DTEDQEDQVDPR) han sido eliminados y sustituidos por la secuencia FpA humana (desde P₁₀ a P₁, es decir, la secuencia DFLAGGGVR), la velocidad de activación (bajo condiciones fisiológicas y en ausencia de trombomodulina) es 40 veces superior que la de la PC normal expresada y caracterizada bajo las mismas condiciones. En conjunto, la modificación del péptido de activación de la PC hizo posible conseguir una constante de velocidad de activación de 2 x 10⁴ M⁻¹s⁻¹.

Optimización de los residuos P₁' , P₂' y P₃' del sitio de activación de la PC

Los presentes inventores han expresado y caracterizado variantes de PC que, además de presentar la secuencia FpA a continuación del sitio de clivaje activador, se modificaron en las posiciones 16, 17 y/o 18. En la posición 16, la leucina fue sustituida por una serina o una alanina; en la posición 17, la isoleucina fue sustituida por una fenilalanina, y en la posición 18, el aspartato fue sustituido por una glicina. Todas estas mutaciones desplazan, en mayor o menor grado, el sitio de activación de la PC más cerca de la secuencia de clivaje óptima de la trombina, y todas ellas incrementan

ES 2 279 010 T3

eficazmente la susceptibilidad de cada variante al activador. La diferencia resulta particularmente espectacular con la variante que presenta una serina en la posición 16 y una glicina en la posición 18, ya que el valor de la constante de activación obtenido ($1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) es del mismo orden de magnitud que el obtenido para la PC normal en presencia de trombomodulina ($5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Tabla II).

5

La ganancia en relación al derivado de PC que presenta sólo FpA a continuación del sitio de clivaje es, con este mutante, superior a 10 veces. Esta ganancia se debe especialmente a la mutación L16S, ya que la contribución de la mutación D18G es sólo de 1,6 veces (Tabla II).

10 Cuando el residuo 16 es una alanina, la ganancia es de aproximadamente 2 veces (en relación al mutante que presenta FpA y mutado en D18G); siendo esta ganancia similar a la obtenida cuando se sustituye la isoleucina en 17 por una fenilalanina.

15 Sin embargo, excepto para la mutación D18G, estas modificaciones presentan (en grados variables) una consecuencia perjudicial sobre la actividad catalítica de la PCa. Cuando el residuo 16 es una serina, la actividad anticoagulante es 20 veces inferior que la PCa normal, cuando el residuo 16 es una alanina, la actividad anticoagulante es 5 veces inferior, y la actividad catalítica es 13 veces inferior cuando el residuo 17 es una fenilalanina.

20 Esta pérdida (relativa) de actividad probablemente refleja un desparejamiento de la propia maquinaria catalítica ya que el valor de la constante de especificidad (k_{cat}/K_M) para un sustrato cromogénico tal como S2366 o S2238 es reducido, en proporciones similares (27 veces cuando una serina está en la posición 16, 5 veces cuando es una alanina y 12 veces cuando el residuo 17 es una fenilalanina). Es concebible que la serina, y en un grado inferior la alanina, no hacen posible la formación de todos los contactos necesarios para la activación máxima de la maquinaria catalítica; siendo la hidrofobicidad de la alanina inferior a la de los otros residuos alifáticos, valina, leucina o isoleucina, mientras el residuo serina es de naturaleza hidrofílica. La hidrofobicidad probablemente no es, por otra parte, la causa de la pérdida de actividad resultante de la mutación en la posición 17, ya que la hidrofobicidad de una fenilalanina es comparable a la de una leucina. El efecto desestabilizador puede ser el resultado de un bloqueo estérico, presentando la cadena lateral de la fenilalanina un mayor volumen (190 \AA^3) que la leucina (124 \AA^3); de manera alternativa, puede producirse una repulsión entre la carga de Asp¹⁸⁹ y la carga parcial del anillo aromático de la fenilalanina.

30

La deficiencia catalítica de los mutantes activados obviamente genera la pregunta acerca de la ganancia efectiva total como consecuencia de la mutación. A primera vista, esta ganancia no es favorable, ya que el incremento en la velocidad de activación parece perderse completamente debido a la deficiencia en actividad: la relación de la ganancia en velocidad de activación a la pérdida de actividad catalítica es inferior a uno (10/20 y 2/5 para la serina y la alanina en la posición 16, 2/13 para una fenilalanina en la posición 17).

35

Sin embargo, esta deficiencia en la actividad está acompañada por una resistencia relativa a los inhibidores de plasma y, por lo tanto, prolonga su acción. Por lo tanto, comparada con la PCa normal, la vida media en plasma del mutante que presenta una serina en la posición 16 es incrementada 10 veces, la del mutante que presenta una alanina es incrementada entre 5 y 6 veces, y la del mutante que presenta una fenilalanina en la posición 17 es incrementada 7 veces. Bajo estas condiciones, mientras la ganancia efectiva se mantiene inferior a 1 para el mutante con la fenilalanina en la posición 17, y permanece cercana a cero para la mutación L16S, se hace muy favorable para el mutante que presenta una alanina en la posición 16. En conjunto, a pesar de una reducción en la actividad catalítica, la velocidad de activación y el incremento en la vida media en plasma confieren al mutante L16A una ventaja considerable sobre los otros derivados de PC descritos hasta la fecha.

45

Ejemplo 5

Construcción de vectores para expresión de variantes de FX

50

Los vectores destinados para la expresión de las variantes de FX se construyeron utilizando, como materia prima, el vector pNUT-FX, que expresa el FX humano normal después de la transfección a células de mamífero (Bianchini *et al.*, J. Biol. Chem. 277, 20527-20534, 2002).

55

Mutagénesis sitio dirigida del vector pNUT-FX

La mutagénesis sitio dirigida del vector pNUT con el fin de preparar los vectores destinados a la expresión de los análogos de FX se llevó a cabo mediante un procedimiento derivado del de Jones *et al.*, (citado anteriormente). La modificación del ADN de FX para la introducción de la secuencia FpA en sustitución del péptido de activación se obtuvo en una única etapa de PCR, con el vector pNUT-FX como matriz y los pares de oligonucleótidos mostrados en la Tabla VI como cebadores.

60

En el FX nativo, la secuencia de los residuos P₃-P₂-P₁-P₁'-P₂'-P₃' que bordean el sitio de clivaje (el clivaje teniendo lugar entre P₁ y P₁') es LTR-IVG. Los cuatro análogos de FX preparados: FpA-IVG, FpA-IFG, FpA-AVG y FpA-AFG, tienen por secuencia P₃-P₂-P₁-P₁'-P₂'-P₃': GVR-IVG, GVR-IFG, GVR-AVG y GVR-AFG respectivamente.

65

Los vectores que expresan estos análogos de FX fueron preparados mediante mutagénesis sitio dirigida. La secuencia de los cebadores utilizados para esta mutagénesis del vector pNUT-FX es mostrada en la Tabla VI.

Tabla VI

Secuencia del péptido de activación	Secuencia P ₁ '- P ₃ '	Secuencia del cebador del Factor X
DFLAEGGGVR	IVG	Sentido 5'-gACTTTCTAGCTgAAggAggAggCgTgAggATCgTgggAggCCAggAATgC-3' (SEQ ID NO: 15) Antisentido 5'-CACgCCTCCTCCCTTCAGCTAGAAAgtCCCTCTTCCCTgCgTCCAgggTCTg-3' (SEQ ID NO: 16)
DFLAEGGGVR	IFG	Sentido 5'-gACTTTCTAGCTgAAggAggAggCgTgAggATCTTCgggAggCCAggAATgCCAAgg-3' (SEQ ID NO: 17) Antisentido 5'-gAAgATCCTCACgCCTCCTCCTTCAGCTAGAAAgtCCCTCTTCCCTgCgTCCAgggTCTg-3' (SEQ ID NO: 18)
DFLAEGGGVR	AVG	Sentido 5'-ggAggAggCgTgAgggCCgTggAggCCAggAATg-3' (SEQ ID NO: 19) Antisentido 5'-CATTCCTggCCTCCACgGCCCTCACgCCTCCTCC-3' (SEQ ID NO: 20)
DFLAEGGGVR	AFG	Sentido 5'-ggAggAggCgTgAgggCCTTCggAggCCAggAATgCAAg-3' (SEQ ID NO: 21) Antisentido 5'-CTTgCATTCCTggCCTCCgAAggCCCTCACgCCTCCTCC-3' (SEQ ID NO: 22)

ES 2 279 010 T3

En esta tabla, la primera columna indica la modificación introducida en el péptido de activación: DFLAEGGGVR se refiere a que en el derivado preparado el péptido de activación de FX entero ha sido sustituido por la secuencia del fibrinopéptido A. Para cada mutagénesis, la secuencia del par de oligonucleótidos utilizados (sentido y antisentido) es mostrada en la columna de la derecha. La columna central de la tabla indica la secuencia P₁' , P₂' y P₃' de aminoácidos del sitio de activación.

La PCR se lleva a cabo en un volumen de 50 μ l que contiene 2,5 unidades de Pfu ADN polimerasa (Stratagene; Amsterdam Zuidoost, Holanda) en el tampón recomendado por el fabricante, una mezcla equimolar de cada dNTP (0,5 mM), 125 ng de cada cebador (sentido y antisentido, ver Tabla VI) y 50 ng de matriz. La matriz utilizada para preparar los derivados DFLAEGGGVR-IVG y DFLAEGGGVR-IFG es pNUT-FX; la temperatura de hibridación es de 55°C. La matriz utilizada para preparar los derivados DFLAEGGGVR-AVG y DFLAEGGGVR-AFG es pNUT-FX, derivándose DFLAEGGGVR-IVG previamente; la temperatura de hibridación es de 50°C. Las PCR se llevaron a cabo utilizando un termociclador de ADN tipo 480 (Perkin Elmer). Cada reacción comprende una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguida de 16 ciclos idénticos, cada uno de los cuales comprende tres etapas (desnaturalización, hibridación y elongación) de, respectivamente, 45 segundos a 95°C, 60 segundos a 55°C (o 50°C) y 26 minutos a 68°C. Al final de estos 16 ciclos, el vector que ha servido como matriz es degradado a 37°C durante 1 hora con 10 unidades de DpnI (Ozyme).

Preparación de vectores derivados de pNUT-FX

Las bacterias, cepa DH5 α (Dam+) se hacen competentes lavándolas a 4°C en CaCl₂ 100 mM y se almacenan a -80°C en una solución de CaCl₂ 100 mM que contiene glicerol al 15%. Una alícuota de bacterias competentes (aproximadamente 10⁶ en 100 μ l) es transformada con 5 μ l-10 μ l del producto de la PCR digerido con DpnI. La mezcla es incubada durante 30 minutos a 4°C y a continuación, es sometida a un choque de calor durante 2 minutos a 42°C seguido de una incubación adicional a 4°C durante 2 minutos. A continuación, las bacterias son incubadas a 37°C durante 60 minutos en un medio LB (caldo Luthia Bertoni, Invitrogen) con agitación vigorosa. El medio LB es decantado después de una centrifugación a 2.000 rpm durante 5 minutos, y las bacterias se colocan en agar (1,5% de Agar-Select en medio LB que contiene 100 μ g/ml de ampicilina). Los platos Petri son incubados en un incubador a 37°C durante 36 horas. Entre 6 y 12 colonias son aisladas y amplificadas durante la noche con agitación vigorosa, a 37°C, en 5 ml de medio LB que contiene 100 μ g/ml de ampicilina. El vector responsable de la resistencia a la ampicilina es purificado mediante el procedimiento de "lisis por ebullición" (Sambrook *et al.*, citado anteriormente). De manera alternativa, para preparar grandes cantidades de plásmido, el kit "Plasmid Midy Kit" (Qiagen) fue utilizado según las instrucciones del fabricante.

Secuenciación de los ADNc de las variantes de FX

La secuencia del ADNc presente en los derivados de pNUT-FX se controló mediante un procedimiento derivado del procedimiento en Sanger *et al.*, (citado anteriormente), utilizando un secuenciador "Abi Prism 377" (Perkin Elmer). Se utilizó el kit "Abi Prism dRhodamine Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" según las instrucciones del fabricante. La secuenciación del ADNc del FX completo contenida en los derivados de pNUT-FX se llevó a cabo utilizando un mínimo de 6 cebadores distribuidos a lo largo de la secuencia del ADNc del FX.

Ejemplo 6

Transfección y selección de células de mamífero que expresan una variante de FX

Transfección de células BHK-21

Las proteínas recombinantes fueron expresadas en células de riñón de hamster recién nacido (BHK-21) proporcionadas por la Colección Europea de Cultivos Tipo (Sofia-antipolis, Francia). Estas células fueron transfectadas con los vectores derivados a partir de pNUT-FX, mediante el procedimiento de coprecipitación con fosfato de calcio (Sambrook *et al.*, citado anteriormente).

Las células BHK-21 son cultivadas en platos Petri (80 mm de diámetro) en un incubador a 37°C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%, en un medio completo de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle 15 Medium; Invitrogen): suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen), L-glutamina 2 mM (Invitrogen), 100 unidades/ml de penicilina (Invitrogen) y 100 μ g/ml de estreptomycin (Invitrogen). Cuando alcanzan una confluencia de aproximadamente el 80%, las células son secadas dos veces en tampón PBS (Invitrogen) y a continuación son incubadas a 37°C durante 1 hora en 4 ml de Opti-Mem (Invitrogen).

La transfección es llevada a cabo añadiendo 40 nM del vector pNUT-FX o uno de sus derivados (40 μ g en un volumen de 220 μ l ajustada con agua destilada) a 250 μ l de una solución, a un pH de exactamente 7,05, compuesta de Hepes 50 mM, Na₂HPO₄ 1,5 M, NaCl 280 mM, KCl 10 mM y dextrosa 12 mM. La coprecipitación del ADN es obtenida añadiendo 31 μ l de CaCl₂ 2,5 M, gota a gota y con agitación constante. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, el precipitado es añadido al medio cubriendo las células y se deja sedimentar durante 3 horas a 37°C. Las células son lavadas con PBS (con el fin de eliminar la mayor parte del precipitado) y devueltas al cultivo en medio DMEM completo durante 24 horas a 37°C. Las células se separan de la placa Petri con 2 ml de una solución EDTA a 54 mM, pH 8,0, que contiene 0,5 mg/ml de tripsina, son resuspendidas en el medio de selección (DMEM

ES 2 279 010 T3

completo que contiene 50 mg/l de metotrexato (Teva, Courbevoie, Francia), y son sembradas en dos nuevas placas Petri. El medio de cultivo es renovado cada dos días durante un intervalo entre dos y tres semanas, hasta que se obtienen las colonias, que son aisladas y transferidas a los tubos (2 cm²) de una placa de cultivo, donde son multiplicadas hasta la confluencia en el medio de selección.

5

Identificación de clones que producen un derivado de FX

Los clones que expresan de manera estable un derivado de FX son detectados mediante inmunotransferencia. Una alícuota (30 µl) del sobrenadante de un cultivo de células BHK-21, que permaneció en contacto con las células transfectadas por lo menos durante 48 horas, es añadida a 10 µl de Tris 100 mM, pH 6,8, que contiene 40% (v/v) de glicerol, 8% (p/v) de SDS, 0,04% (p/v) de azul de bromofenol y 20% (v/v) de β-mercaptoetanol. Las proteínas en la muestra son desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos, y son separadas en 12% de gel de poliacrilamida (entrecruzamiento 29/1) en un tampón Tris 25 mM, pH 7,5, que contiene glicina 0,1 M y 0,1% (p/v) SDS.

15 La electroforesis es seguida por una transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot, Bio-Rad, Ivry sur Seine, Francia) en tampón Tris 25 mM, glicina 0,1 M, pH 7,5, que contiene 20% de metanol. La membrana es saturada mediante incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de leche desnatada (5% p/v) en tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl de 150 mM y 0,1% de Tween 20 (TTBS), y a continuación lavada 3 veces durante 10 minutos en el mismo tampón. A continuación, la membrana es incubada durante un intervalo entre 1 hora
20 y 12 horas en presencia de 50 ng/ml del anticuerpo monoclonal 9E10 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) en TTBS.

Después de tres lavados (como se ha descrito anteriormente), la membrana es incubada durante una hora a temperatura ambiente en presencia de un anticuerpo policlonal IgC de cabra anti ratón marcado con fosfatasa alcalina (Bio-Rad), diluida a 1/3.000 en TTBS. La presencia de FX recombinante es revelada incubando la membrana en presencia de un sustrato cromogénico (mezcla en cantidades iguales de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, sal de toluidina (BCIPT) y cloruro de nitrotetrazolio (NTC), diluido en tampón 0,1 M, pH 9,5, que contiene MgCl₂ 0,5 M.

Ejemplo 7

30 *Expresión y purificación de variantes de FX*

Cultivo de células y producción

Las células que expresan el derivado de FX son multiplicadas mediante pasos sucesivos en matraces de 150 cm² que son utilizados para inocular botellas de 850 cm². La producción se lleva a cabo a 37°C bajo una atmosfera controlada que contiene 5% de CO₂, en medio de selección que contiene ZnCl₂ 50 µM (para inducir el promotor de metalotioneína) y 5 µg/ml de vitamina K (Roche, Neuilly sur Seine, Francia) para permitir la γ-carboxilación posttranslacional. Los sobrenadantes del cultivo son recogidos en intervalos de 2 a 6 días (en función de la densidad celular), son clarificados mediante centrifugación durante 10 minutos a 5.000 g y son almacenados a -20°C después de añadir EDTA 5 mM y benzamidina 10 mM.

Los derivados de FX son purificados en tres etapas. La primera es la absorción en resina de intercambio de aniones con el fin de concentrar las proteínas contenidas en el sobrenadante del cultivo. Los sobrenadantes son diluidos a 1/3 en Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene benzamidina 10 mM y EDTA 5 mM. Típicamente, se diluyen dos litros de sobrenadante en cuatro litros de tampón, se añaden 4,5 gramos de QAE Sephadex A50 (Amersham Pharmacia Biotech) y la mezcla es agitada lentamente durante 30 minutos a temperatura ambiente (utilizando un agitador de paleta rotatoria). Se dejan sedimentar las perlas de Sephadex y el sobrenadante se elimina. La resina cargada es transferida a una columna y las proteínas absorbidas son eluidas con tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 0,5 M. La segunda etapa es una cromatografía de afinidad para separar el derivado de FX de las otras proteínas contenidas en el eluato de QAE-Sephadex. El eluato es cargado en gel Affi-Prep-HZ (Bio-Rad) injertado (3 mg/ml de gel) con el anticuerpo monoclonal 9E10 (Clontech). Después del lavado en tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 0,5 M, el derivado de FX es eluido en tampón glicina-HCl 0,1M pH 2,7. El pH del eluato es ajustado a 7,5 añadiendo 30 µl/ml de Tris 2 M, y la columna es reequilibrada en el tampón de lavado. La etapa final de la purificación es una cromatografía de intercambio de aniones adicional para eliminar la glicina y concentrar el derivado eluido de la columna de afinidad. Diversos eluatos, que hacen un total de entre 1 mg y 10 mg de derivado de FX, son recogidos, diluidos a 1/4 en tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene EDTA 5 mM, y son cargados en una columna Q-Sepharose Fast Flow (0,8 cm x 10 cm)(Amersham Pharmacia Biotech). Después del lavado en tampón de dilución, la columna es eluida con tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 0,5 M.

60 Se prepara un mínimo de 1 mg de cada derivado de FX; la pureza de cada preparación es controlada, después de la desnaturalización y la reducción de una muestra, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (12%, entrecruzamiento 29/1) y tintado con azul Coomassie. Todas las preparaciones obtenidas parecen ser puras en gel de poliacrilamida SDS, pero dos formas se encuentran sistemáticamente presentes: una forma principal de cadena doble (80% a 90%), con masas moleculares aparentes compatibles con las esperadas para las cadenas ligeras y pesadas de los derivados de FX, y una forma de cadena simple secundaria (10% a 20% en función de las preparaciones), con una masa molecular de 46 kDa. El porcentaje de la forma de cadena simple parece depender de la colección de sobrenadantes a partir de la que se deriva la preparación en vez de depender de la mutación introducida: para una mutación determinada, el porcentaje de la forma de cadena simple varía de una purificación a otra. Los derivados purificados

ES 2 279 010 T3

se alicuotan y se almacenan a -80°C hasta su utilización. La concentración de las alícuotas es estimada a partir de su absorbencia a 280 nm, tomando como coeficiente de absorción el valor $1,25 \text{ g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (e%280).

Ejemplo 8

5

Caracterización de las variantes de FX

Determinación de la velocidad de activación por trombina

10

Las constantes de velocidad para la activación por trombina de las variantes de FX fueron determinadas bajo condiciones de pseudoprimer orden. En la práctica, el derivado de FX ($1 \mu\text{M}$ o $2 \mu\text{M}$) es incubado en presencia de trombina (100 nM) en tampón cinético (Tris 50 mM , pH 7,8, que contiene NaCl $0,15 \text{ M}$, $0,2\%$ de PEG 8000 (p/v) y CaCl_2 5 mM), a 37°C . Después de diferentes tiempos de inoculación, se añaden (100 unidades/ml) de hirudina a $5 \mu\text{l}$ de alícuota de la mezcla de reacción (con el fin de detener la reacción neutralizando la trombina).

15

A continuación, la proporción de FXa generada es estimada midiendo la velocidad inicial de hidrólisis de N- α -Z-Arg-Gly-Arg-pNA $100 \mu\text{M}$ (S2765, Biogenic). La variación en absorbencia a 405 nm es grabada como una función del tiempo utilizando un lector de microplaca MR5000. La reacción se mantiene hasta que se alcanza una meseta de activación (cuando la velocidad de la hidrólisis de S2765 ya no incrementa incluso con incubación más larga del derivado de FX con trombina).

20

A continuación, la constante de velocidad para la reacción es estimada mediante una regresión no lineal de la variación en velocidad de hidrólisis de S2765 como una función del tiempo de incubación del derivado de FX con trombina, utilizando una ecuación que representa un incremento exponencial de primer orden:

25

$$v_{(t)} = V_{\max}(1 - \exp^{-kt}) + V_0;$$

30

en la que $v_{(t)}$ representa la velocidad de hidrólisis de S2765 en el tiempo t ; V_{\max} representa la velocidad máxima de hidrólisis (en la meseta) y k representa la constante de velocidad de primer orden; V_0 es una constante que es añadida para tener en cuenta una posible (pequeña) actividad amidolítica presente al inicio, antes de la adición del activador (ruido de fondo). Los valores de k_{on} (constante de especificidad) son calculados formando la relación de k a la concentración del activador (trombina). Los valores obtenidos (en $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) se resumen en la Tabla VII.

35

TABLA VII

40

	$k_{\text{on}} \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$
FX	ND
FpA-IVG	$4,0 \cdot 10^2$
FpA-IFG	$3,0 \cdot 10^3$
FpA-AVG	$2,2 \cdot 10^3$
FpA-AFG	$2,4 \cdot 10^3$

45

50

La sustitución del péptido de activación del FX por fibrinopéptido A (variante FpA-IVG) por lo tanto hace posible transformar FX (cuya activación por trombina no puede detectarse: ND) en un cimógeno sensible a trombina ($k_{\text{on}} 4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). La sustitución adicional en esta variante de la valina en la posición P_2' por una fenilalanina (FpA-IFG) incrementa esta velocidad 7,5 veces. Si la isoleucina en P_1' es sustituida por una alanina (FpA-AVG), esta velocidad incrementa 5,5 veces. Finalmente, cuando la isoleucina en P_1' es sustituida por una alanina y la valina en P_2' es sustituida por una fenilalanina (FpA-AFG), el valor de k_{on} se hace 625 veces superior que la del derivado FpA-IVG de FX. La actividad catalítica de los derivados activados obtenidos a partir de FpA-AIG, FpA-IFG y especialmente a partir de FpA-AFG es enormemente reducida en relación al derivado activado obtenido a partir de FpA-IVG. El derivado FpA-IVG debería generar, tras la activación, una FXa idéntica en todos los aspectos a la FXa normal, ya que el péptido de activación es liberado durante la activación. Los otros derivados generan FXa en las que el residuo P_1' y/o el residuo P_2' son modificados, lo que altera la actividad catalítica en mayor o menor grado.

65

Activación preparativa de las variantes de FX

Para los estudios funcionales, el FX y sus derivados fueron activados en cantidades preparativas. El FX (no activable por trombina) fue activado pasándolo a una columna de Sepharose-NHS (Hitrap, Amersham Pharmacia, Biotech)

ES 2 279 010 T3

injetada, en 5 mg/ml de gel, con el activador FX aislado a partir de veneno de víbora Russel (RVV-X, Kordia, Leiden, Holanda) y preparado respetando las recomendaciones del fabricante. Los derivados de FX activables por trombina fueron activados a derivados de FXa pasándolos a una columna de Sepharose-NHS injertada, en 1 mg/ml de gel, con trombina, también preparada respetando las recomendaciones del fabricante.

Cuatro miligramos de derivado de FX en tampón cinético son introducidos en la columna de activación. La columna es cerrada en ambos extremos y la incubación se mantiene durante 16 horas a temperatura ambiente. El derivado activado es eluído con Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 0,5 M y CaCl₂ 5 mM. El eluato contiene la forma activada pero, debido a que la activación no es siempre completa, posiblemente permanezca alguna forma no activada. Para separar la forma activada de la no activada, el eluato es diluido a 1/3 en Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene CaCl₂ 5 mM (para reducir la fuerza iónica), se carga en una columna de Heparina-Sepharose Hitrap (Amersham Pharmacia Biotech) y es eluído con tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 0,5 M y CaCl₂ 5 mM.

Titrición de la forma activada de las variantes de FX

La concentración del sitio activo de los derivados de FX activados es determinada mediante titrición con D-Phe-Phe-Arg-CH₃Cl (FFRCK; comercializado por Calbiochem), que forma un complejo covalente equimolar con la FXa.

Diferentes concentraciones de FFRCK, de entre 20 nM y 12 μM, son incubadas con una cantidad fija (de entre 0,5 μM y 1 μM) de derivado de FXa a titrar, en tampón cinético. La mezcla es incubada a temperatura ambiente hasta completar la reacción. El tiempo de incubación requerido depende del derivado de FXa considerado, y resulta necesario asegurarse de que la prolongación de la incubación no causa la inhibición de moléculas de FXa adicionales: tres horas de incubación resultan suficientes para la FXa normal y para la forma activada del derivado de FpA-IVG, pero 18 horas no resultan suficientes para los derivados de FXa que presentan una alanina en la posición 16 y/o una fenilalanina en la posición 17, y que resultan difíciles de titrar mediante este procedimiento.

Al final de esta incubación, la concentración residual de derivado de FXa es estimada midiendo la velocidad inicial de hidrólisis de S2765 100 μM. La variación en absorbencia a 405 nm como una función del tiempo (v_s) es grabada utilizando un lector de microplaca MR5000. La concentración efectiva del derivado de FXa inicialmente presente (E_t) es a continuación estimada mediante una regresión no lineal de la dependencia de v_s como una función de la concentración de FFRCK añadida, utilizando la ecuación "inhibición de unión fuerte" (Cha; Williams y Morrison, citado anteriormente):

$$v_s = (v_0/2[E_t])\{[(K_i + [FFRCK] - [E_t])^2 + 4K_i[E_t]]^{1/2} - (K_i + [FFRCK] - E_t)\}$$

en la que v_0 es la velocidad inicial de hidrólisis de S2765 en ausencia de inhibidor, y K_i es una constante de inhibición aparente para el complejo inhibidor de enzima.

Actividad amidolítica de la forma activada de la variante FpA_IVG

Con el fin de comparar el sitio activo de la forma activada de la variante FpA-IVG con el de la FXa normal, las constantes k_{cat} y K_M para la hidrólisis de dos sustratos cromogénicos fueron determinadas: S2756 y bencil-CO-Ile-Glu-(y-OR)-Gly-Arg-pNa (S2222), comercializados por Biogenic. Las hidrólisis se llevan a cabo en tampón cinético, a temperatura ambiente. Diferentes concentraciones de sustrato, de entre 6 μM y 800 μM, son incubadas con una cantidad fija del derivado activado de FX (10 nM). La variación en absorbencia a 405 nm como una función del tiempo es grabada utilizando un lector de microplaca MR5000, y la velocidad inicial de hidrólisis es estimada mediante una regresión lineal de las absorbencias correspondientes, como mucho al 10% de hidrólisis. Las constantes k_{cat} y K_M son a continuación estimada mediante una regresión no lineal de la variación de esta velocidad inicial como una función de la concentración de sustrato, utilizando la ecuación Michaelis-Menten.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla VIII.

ES 2 279 010 T3

TABLA VIII

		S2222	
	$K_{cat} S^{-1}$	$K_M \mu M$	K_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} S^{-1}$)
5	FXa	79	0,3
10	Fpa-IVG	56	0,3
		S2765	
15		$K_{cat} S^{-1}$	$K_M \mu M$
			K_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} S^{-1}$)
	FXa	182	2,0
20	Fpa-IVG	125	2,5

Los valores de k_{cat} y K_M , y también la relación entre los mismos, para S2222 y S2765 son similares incluso cuando no son idénticos. Este resultado sugiere que la FXa generada por la activación por trombina del derivado FpA-IVG es de hecho la misma que la generada mediante la activación RVV-X de FX.

Inhibición por antitrombina de las formas activadas de las variantes de FX

La antitrombina es el principal inhibidor fisiológico de FXa. Por lo tanto, resultaba esencial determinar la capacidad de la antitrombina para interactuar con las formas activadas de los derivados de FX, ya que cualquier alteración de la vida media en plasma modificaría la acción procoagulante del derivado de FX.

Los presentes inventores compararon la capacidad de FXa de formar un complejo covalente estable con la antitrombina, con la capacidad de las formas activadas de los derivados FpA-IVG y Fpa-AVG de FX. La demostración de estos complejos entre la forma activada de los derivados de FX ($1 \mu M$) y la antitrombina ($2 \mu M$; purificada a partir de plasma humano según la técnica descrita por McKay (Thromb. Res., 21, 375-25 382, 1981)) es llevada a cabo en presencia de 2 unidades/ml de heparina (Kordia). La incubación se mantiene durante una hora a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción es analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (10%, entrecruzamiento 29/1), después de la desnaturalización y la reducción de la muestra. La presencia de complejos covalentes entre los derivados de FX activados y la antitrombina resulta en una reducción de la intensidad de la banda correspondiente a la antitrombina (60 kDa), una reducción en la intensidad de la banda correspondiente a la forma activada del derivado de FX (31 kDa), y la aparición de una nueva banda, con un peso molecular superior (aproximadamente 100 kDa), correspondiente al complejo covalente.

Los resultados se muestran en la Figura 5.

Carril 1: antitrombina sola; carriles 2 y 3: derivado de FX (normal) sin y con antitrombina; carriles 4 y 5: derivado FpA-IVG activado sin y con antitrombina. La formación de un complejo resulta en la aparición de una banda de peso molecular alto (carriles 3, 5), que está ausente cuando la antitrombina es utilizada sola o cuando una de las formas activadas del derivado de FX es utilizada sola (carriles 2, 4). Tras la electroforesis, las proteínas son tintadas con azul Coomassie.

Determinación de la vida media en plasma de la forma activada de la variante FpA-IVG del FX

La vida media de la forma activada de la variante FpA-IVG fue comparada con la de la FXa normal.

Para estimar esta vida media, la actividad residual de la variante es medida después de la incubación durante diferentes tiempos en plasma normal, convertido en no coagulable mediante la adición de hirudina. La mezcla de reacción comprende 80% (v/v) de plasmas normales citrados y de 20% de tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 40 mM, 0,5 mg/ml de albúmina de suero bovino, 400 U/ml de hirudina y FXa 50 nm (normal o preparada a partir de la variante FpA-IVG). Tras la incubación, una alícuota de la mezcla plasma/FXa/hirudina ($40 \mu l$) es añadida a $160 \mu l$ de S2765 $100 \mu M$, y la velocidad inicial de hidrólisis del sustrato es medida mediante la grabación del incremento en la absorbencia a 405 nm en un lector de microplaca MR5000.

La vida media de cada variante es estimada mediante una regresión no lineal de la variación en la actividad residual como una función del tiempo, utilizando una ecuación que representa una reducción exponencial de primer orden:

$$A_{(t)} = A_0 \exp(-kt) + Cte;$$

ES 2 279 010 T3

en la que $A_{(t)}$ representa la actividad residual de FXa en el tiempo t, A_0 representa su actividad inicial y k representa la constante de velocidad de primer orden. La constante Cte es añadida para tener en cuenta una posible actividad independiente de la de la FXa (ruido de fondo). La vida media en plasma es a continuación calculada dividiendo $\ln(2)$ por k.

Los valores de vida media obtenidos (en segundos) se resumen en la Tabla IX.

TABLA IX

	Vida media (segundos)
FXa (normal)	77
Fpa-IVG (activada)	44

La vida media en plasma de la forma activada de la variante Fpa-IVG es, por lo tanto, comparable a la de la FXa normal, lo que quiere una vez más que estas dos moléculas son similares, o incluso idénticas.

Actividad antihemofílica del derivado FpA-IVG del FX

La actividad antihemofílica del derivado FpA-IVG de FX se ensayó midiendo la cantidad de trombina producida en el tiempo: un ensayo normalmente denominado “tiempo de generación de trombina”. Esta medición es realizada en plasma normal reconstituido (Diagnostica Stago, Asnières, Francia) o en plasma sin FVIII (también Diagnostica Stago) para simular hemofilia A grave. La cascada de coagulación es iniciada mediante recalcificación y adición de factor tisular. Con el fin de poder eliminar una alícuota en diferentes momentos, la formación de coágulos de fibrina es inhibida mediante la adición del péptido Gly-Pro-Arg-Pro 2,5 mM (GPRP; Sigma Aldrich) tal como se describe en Laudao *et al.* (Biochemistry 19, 1013-1019, 1980). La cantidad de trombina presente en un momento determinado después del inicio de la cascada de coagulación es medido utilizando un sustrato cromogénico (S2238).

En la práctica, 150 μ l de plasma reconstituido se mezclan con 150 μ l de tampón cinético que contiene el péptido GPRP 2,5 mM, y opcionalmente, derivado FpA-IVG de FX 50 nM o 1 U/ml de factor recombinante VIII (Hemofil M, Baxter Maurepas, Francia, correspondiente al tratamiento convencional para la hemofilia). Esta mezcla es preincubada durante 3 minutos a 37°C. La cascada de coagulación es a continuación iniciada mediante la adición de 300 μ l de una solución de Neoplastine (Diagnostica Stago) diluida a 1/100 en tampón cinético. Alícuotas de 20 μ l son tomadas en diferentes momentos y son inmediatamente diluidas a 1/5 en una solución de parada (tampón cinético que contiene benzamidina 100 mM y EDTA 10mM). La cantidad de trombina es estimada mediante la adición de 20 μ l de cada alícuota diluida a 180 μ l de S2238 200 μ M. La variación en absorbencia a 405 nm como una función de tiempo es grabada utilizando un lector de microplaca MR5000 y la correspondiente cantidad de trombina es deducida con referencia a una curva estándar. La concentración de trombina se incrementa rápidamente durante los dos primeros minutos tras la adición del factor tisular, alcanza un máximo, y a continuación decrece lentamente después de su inhibición irreversible por la antitrombina. El máximo alcanzado, el tiempo requerido para alcanzar este máximo y el área bajo la curva son representativos del “tiempo de generación de trombina”.

Los “tiempos de generación de trombina” obtenidos con el plasma normal reconstituido, plasma sin factor VIII, plasma sin factor VIII suplementado con factor VIII a 1 U/ml y plasma sin factor VIII suplementado con derivado FpA-IVG de FX 50 nM se muestran en la Figura 6.

La adición de derivado FpA-IVG de FX 50 nM hace posible restablecer una curva de generación de trombina similar a la observada con un plasma normal, mientras que la adición de 1 U/ml de factor VIII (la dosis terapéutica normal) sólo restablece parcialmente esta “generación de trombina”.

Conclusión

Efectos de la modificación del péptido de activación de FX

Cuando, en FX, el péptido de activación completo (52 residuos) es sustituido por FpA humano (desde P₁₀ a P₁, es decir, la secuencia DFLAEGGGVR), el derivado se convierte en activable por trombina, a diferencia de su homólogo normal, todo ello bajo condiciones fisiológicas.

Cuando este derivado es activado por trombina, el producto obtenido es muy similar, o incluso idéntico (no parte de la reivindicación 6), a la FXa normal (su estructura de aminoácidos covalente es idéntica). La actividad catalítica, la vida media en plasma, y su inhibición por antitrombina son comparables. En conjunto, la modificación del péptido de activación de FX hizo posible obtener un derivado activable por trombina capaz de corregir el tiempo de generación de trombina en un plasma sin factor VIII.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Derivado quimérico clivable por trombina de un cimógeno serina proteasa seleccionado de entre la proteína C o el factor X, **caracterizado** porque el péptido de activación nativo de dicho cimógeno es sustituido por el fibrinopéptido A, o por una parte del mismo, dicha sustitución generando una secuencia clivable por trombina $P_{10}P_9P_8P_7P_6P_5P_4P_3P_2P_1P_1'P_2'P_3'$, donde $P_{10}P_9P_8P_7P_6P_5P_4P_3P_2P_1$ representa los aminoácidos P_{10} a P_1 del fibrinopéptido A y $P_1'P_2'P_3'$ representa Leu-Ile-Asp o Ile-Val-Gly.
- 10 2. Derivado quimérico de proteína C **caracterizado** porque es obtenido a partir de un derivado de proteína C según la reivindicación 1 sustituyendo el aspartato en la posición P_3' por una glicina.
- 15 3. Derivado quimérico de proteína C o factor X **caracterizado** porque puede obtenerse a partir de un derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 sustituyendo la leucina o la isoleucina en la posición P_1' por una alanina o una serina.
- 20 4. Derivado quimérico de proteína C o factor X **caracterizado** porque puede obtenerse a partir de un derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 sustituyendo la isoleucina o la valina en la posición P_2' por una fenilalanina.
- 25 5. Procedimiento para la producción de una proteína C activada (PCa) o un factor X activado (FXa) o un derivado de los mismos en el que dicho procedimiento comprende el clivaje de un derivado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con trombina.
6. Derivado de PCa obtenido mediante clivaje por trombina de un derivado quimérico de proteína C según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4.
7. Molécula de ácido nucleico que codifica un derivado quimérico de proteína C o factor X según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un derivado de PCa según la reivindicación 6.
- 30 8. Par de cebadores de amplificación para obtener una molécula de ácido nucleico que codifica un derivado quimérico de proteína C o factor X según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos cebadores se seleccionan de entre:
- 35 - el par de oligonucleótidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 3 y 4,
 - el par de oligonucleótidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 5 y 6,
 - el par de oligonucleótidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 7 y 8,
 40 - el par de oligonucleótidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 9 y 10,
 - el par de oligonucleótidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 11 y 12,
 45 - el par de oligonucleótidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 13 y 14,
 - el par de oligonucleótidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 15 y 16,
 - el par de oligonucleótidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 17 y 18,
 50 - el par de oligonucleótidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 19 y 20,
 - el par de oligonucleótidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 21 y 22.
- 55 9. Vector recombinante, **caracterizado** porque comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7.
10. Sistema de suministro génico **caracterizado** porque comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7.
- 60 11. Célula huésped transformada genéticamente con una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7.
12. Utilización de una proteína quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o de una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7 para producir un producto medicinal.
- 65 13. Utilización de un derivado de PCa según la reivindicación 6 para la producción de un producto medicinal.

ES 2 279 010 T3

14. Utilización según la reivindicación 12, **caracterizada** porque se utiliza una PC quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una molécula de ácido nucleico que codifica dicha PC quimérica para la producción de un producto medicinal antitrombótico.

5 15. Utilización según la reivindicación 12 **caracterizada** porque se utiliza un FX quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4 o una molécula de ácido nucleico que codifica dicho FX quimérico para la producción de un producto medicinal procoagulante.

10 16. Utilización según la reivindicación 13 **caracterizada** porque dicho derivado de PCa es utilizado para la producción de un producto medicinal antitrombótico.

17. Composición farmacéutica que comprende por lo menos una proteína quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un derivado de PCa según la reivindicación 6 combinada con un excipiente adecuado.

15 18. Composición farmacéutica que comprende un sistema de suministro génico según la reivindicación 10.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 279 010 T3

Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	His	Ser	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu
1				5					10					15	
Cys	Ile	Glu	Glu	Ile	Cys	Asp	Phe	Glu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ile	Phe	Gln
			20					25					30		
Asn	Val	Asp	Asp	Thr	Leu	Ala	Phe	Trp	Ser	Lys	His	Val	Asp	Gly	Asp
		35					40					45			
Gln	Cys	Leu	Val	Leu	Pro	Leu	Glu	His	Pro	Cys	Ala	Ser	Leu	Cys	Cys
	50					55					60				
Gly	His	Gly	Thr	Cys	Ile	Asp	Gly	Ile	Gly	Ser	Phe	Ser	Cys	Asp	Cys
65					70					75					80
Arg	Ser	Gly	Trp	Glu	Gly	Arg	Phe	Cys	Gln	Arg	Glu	Val	Ser	Phe	Leu
				85					90					95	
Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Asn	Gly	Gly	Cys	Thr	His	Tyr	Cys	Leu	Glu	Glu
			100					105					110		
Val	Gly	Trp	Arg	Arg	Cys	Ser	Cys	Ala	Pro	Gly	Tyr	Lys	Leu	Gly	Asp
		115					120					125			
Asp	Leu	Leu	Gln	Cys	His	Pro	Ala	Val	Lys	Phe	Pro	Cys	Gly	Arg	Pro
	130					135					140				
Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Lys	Lys	Arg	Ser	His	Leu	Lys	Arg	<u>Asp</u>	<u>Thr</u>	<u>Glu</u>
145					150					155					160
<u>Asp</u>	<u>Gln</u>	<u>Glu</u>	<u>Asp</u>	<u>Gln</u>	<u>Val</u>	<u>Asp</u>	<u>Pro</u>	<u>Arg</u>	<u>Leu</u>	<u>Ile</u>	<u>Asp</u>	<u>Gly</u>	<u>Lys</u>	<u>Met</u>	<u>Thr</u>
				165					170					175	
									16					21	
ARG	ARG	GLY	ASP	SER	PRO	TRP	GLN	VAL	VAL	LEU	LEU	ASP	SER	LYS	LYS
			180					185					190		
			26					31					36		
LYS	LEU	ALA	CYS	GLY	ALA	VAL	LEU	ILE	HIS	PRO	SER	TRP	VAL	LEU	THR
		195					200					205			
		41					46					51			
ALA	ALA	HIS	CYS	MET	ASP	GLU	SER	LYS	LYS	LEU	LEU	VAL	ARG	LEU	GLY
	210					215					220				
	56					60, 61					65				
GLU	TYR	ASP	LEU	ARG	ARG	TRP	GLU	LYS	TRP	GLU	LEU	ASP	LEU	ASP	ILE
225					230					235					240
70					75					80					85

FIG. 1

ES 2 279 010 T3

LYS	GLU	VAL	PHE	VAL	HIS	PRO	ASN	TYR	SER	LYS	SER	THR	THR	ASP	ASN
				245					250					255	
				90					95					100	
ASP	ILE	ALA	LEU	LEU	HIS	LEU	ALA	GLN	PRO	ALA	THR	LEU	SER	GLN	THR
			260					265					270		
			105					110					115		
ILE	VAL	PRO	ILE	CYS	LEU	PRO	ASP	SER	GLY	LEU	ALA	GLU	ARG	GLU	LEU
		275					280					285			
		120					125					128,	128,	128,	129 129,
ASN	GLN	ALA	GLY	GLN	GLU	THR	LEU	VAL	THR	GLY	TRP	GLY	TYR	HIS	SER
	290					295					300				
130						136					141				
SER	ARG	GLU	LYS	GLU	ALA	LYS	ARG	ASN	ARG	THR	PHE	VAL	LEU	ASN	PHE
305					310					315					320
146			149	149,	149,	149,	149,	150		152					157
ILE	LYS	ILE	PRO	VAL	VAL	PRO	HIS	ASN	GLU	CYS	SER	GLU	VAL	MET	SER
				325					330					335	
				162					167					172	
ASN	MET	VAL	SER	GLU	ASN	MET	LEU	CYS	ALA	GLY	ILE	LEU	GLY	ASP	ARG
			340					345					350		
			177					182		184	184,	185	186	186,	187
GLN	ASP	ALA	CYS	GLU	GLY	ASP	SER	GLY	GLY	PRO	MET	VAL	ALA	SER	PHE
		355					360						365		
		190					195						200		
HIS	GLY	THR	TRP	PHE	LEU	VAL	GLY	LEU	VAL	SER	TRP	GLY	GLU	GLY	CYS
	370					375					380				
	205					210					215	216	217	219	220
GLY	LEU	LEU	HIS	ASN	TYR	GLY	VAL	TYR	THR	LYS	VAL	SER	ARG	TYR	LEU
385					390					395					400
221	221,				225					230					235
ASP	TRP	ILE	HIS	GLY	HIS	ILE	ARG	ASP	LYS	GLU	ALA	PRO	GLN	LYS	SER
				405					410					415	
				240					245					250	
<u>Trp Ala Pro</u>															
254															

FIG. 1 (FINAL)

Met-Gly-Arg-Pro-Leu-His-Leu-Val-Leu-Leu-Ser-Ala-Ser-Leu-Ala-Gly
 1 5 10 15
 Leu-Leu-Leu-Leu-Gly-Glu-Ser-Leu-Phe-Ile-Arg-Arg-Glu-Gln-Ala-Asn
 20 25 30
 Asn-Ile-Leu-Ala-Arg-Val-Thr-Arg-Ala-Asn-Ser-Phe-Leu-Glu-Glu-Met
 35 40 45
 Lys-Lys-Gly-His-Leu-Glu-Arg-Glu-Cys-Met-Glu-Glu-Thr-Cys-Ser-Tyr
 50 55 60
 Glu-Glu-Ala-Arg-Glu-Val-Phe-Glu Asp-Ser-Asp-Lys-Thr-Asn-Glu-Phe
 65 70 75 80
 Trp-Asn-Lys-Tyr-Lys-Asp-Gly-Asp-Gln-Cys-Glu-Thr-Ser-Pro-Cys-Gln
 85 90 95
 Asn-Gln-Gly-Lys-Cys-Lys-Asp-Gly-Leu-Gly-Glu-Tyr-Thr-Cys-Thr-Cys
 100 105 110
 Leu-Glu-Gly-Phe-Glu-Gly-Lys-Asn-Cys-Glu-Leu-Phe-Thr-Arg-Lys-Leu
 115 120 125
 Cys-Ser-Leu-Asp-Asn-Gly-Asp-Cys-Asp-Gln-Phe-Cys-His-Glu-Glu-Gln
 130 135 140
 Asn-Ser-Val-Val-Cys-Ser-Cys-Ala-Arg-Gly-Tyr-Thr-Leu-Ala-Asp-Asn
 145 150 155 160
 Gly-Lys-Ala-Cys-Ile-Pro-Thr-Gly-Pro-Tyr-Pro-Cys-Gly-Lys-Gln-Thr
 165 170 175
 Leu-Glu-Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Val-Ala-Gln-Ala-Thr-Ser-Ser-Ser-Gly
 180-181-182 185 190
 Glu-Ala-Pro-Asp-Ser-Ile-Thr-Trp-Lys-Pro-Tyr-Asp-Ala-Ala-Asp-Leu
 195 200 205
 Asp-Pro-Thr-Glu-Asn-Pro-Phe-Asp-Leu-Leu-Asp-Phe-Asn-Gln-Thr-Gln
 210 215 220
 Pro-Glu-Arg-Gly-Asp-Asn Asn-Leu-Thr-Arg-Ile-Val-Gly-Gly-Gln-Glu
 225 230 235 240
 16 17 18 20
 Cys-Lys-Asp-Gly-Glu-Cys-Pro-Trp-Gln-Ala-Leu-Leu-Ile-Asn-Glu-Glu
 245 250 255
 25 30 35
 Asn-Glu-Gly-Phe-Cys-Gly-Gly-Thr-Ile-Leu-Ser-Glu-Phe-Tyr-Ile-Leu
 260 265 270
 40 45 50
 Thr-Ala-Ala-His-Cys-Leu-Tyr-Gln-Ala-Lys-Arg-Phe-Lys-Val-Arg-Val
 275 280 285
 55 57* 60 61a 65
 Gly-Asp-Arg-Asn-Thr-Glu-Gln-Glu-Glu-Gly-Gly-Glu-Ala-Val-His-Glu
 290 295 300
 70 75 80
 Val-Glu-Val-Val-Ile-Lys-His-Asn-Arg-Phe-Thr-Lys-Glu-Thr-Tyr-Asp
 305 310 315 320
 85 90 95 100
 Phe-Asp-Ile-Ala-Val-Leu-Arg-Leu-Lys-Thr-Pro-Ile-Thr-Phe-Arg-Met
 325 330 335

FIG. 2

Asn-Val-Ala-Pro-Ala-Cys-Leu-Pro-Glu-Arg-Asp-Trp-Ala-Glu-Ser-Thr
 340 345 350
 120 124a 130
Leu-Met-Thr-Gln-Lys-Thr-Gly-Ile-Val-Ser-Gly-Phe-Gly-Arg-Thr-His
 355 360 365
 131a131b 135 140 145
Glu-Lys-Gly-Arg-Gln-Ser-Thr-Arg-Leu-Lys-Met-Leu-Glu-Val-Pro-Tyr
 370 375 380
 150 155 160
Val-Asp-Arg-Asn-Ser-Cys-Lys-Leu-Ser-Ser-Ser-Phe-Ile-Ile-Thr-Gln
 385 390 395 400
 165 170 175
Asn-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Asp-Thr-Lys-Gln-Glu-Asp-Ala-Cys-Gln
 405 410 415
 180 185 185a185b 190
Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-His-Val-Thr-Arg-Phe-Lys-Asp-Thr-Tyr-Phe
 420 425 430
 195* 200 205
Val-Thr-Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Glu-Gly-Cys-Ala-Arg-Lys-Gly-Lys
 435 440 445
 210 215 218 220 223 223a
Tyr-Gly-Ile-Tyr-Thr-Lys-Val-Thr-Ala-Phe-Leu-Lys-Trp-Ile-Asp-Arg
 450 455 460
 225 230 235 240
Ser-Met-Lys-Thr-Arg-Gly-Leu-Pro-Lys-Ala-Lys-Ser-His-Ala-Pro-Glu
 465 470 475 480
 245 250
Val-Ile-Thr-Ser-Ser-Pro-Leu-Lys
 485

FIG. 2 (FINAL)

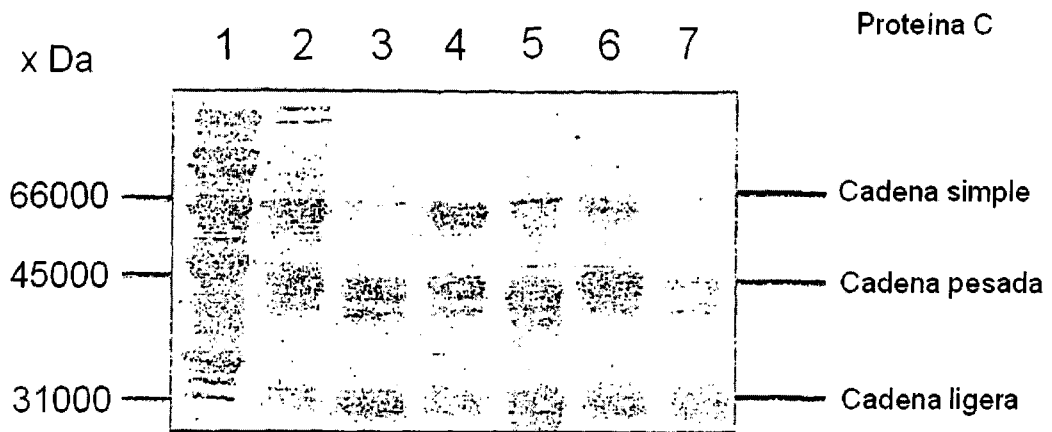


FIG. 3

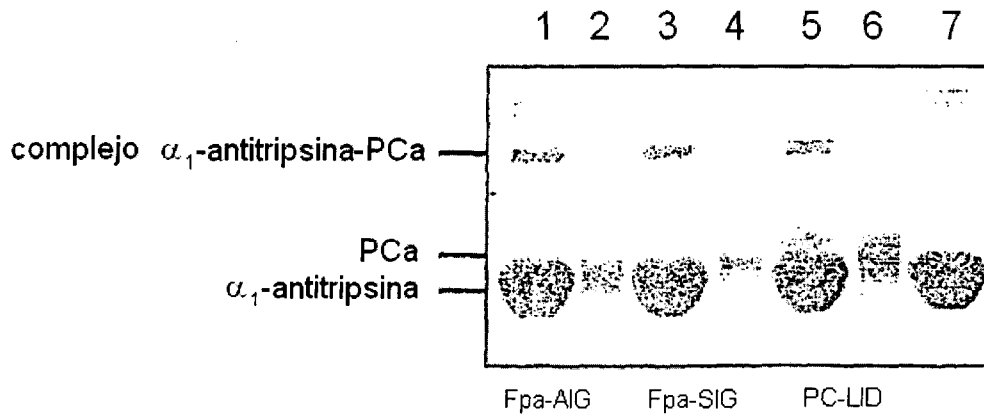


FIG. 4

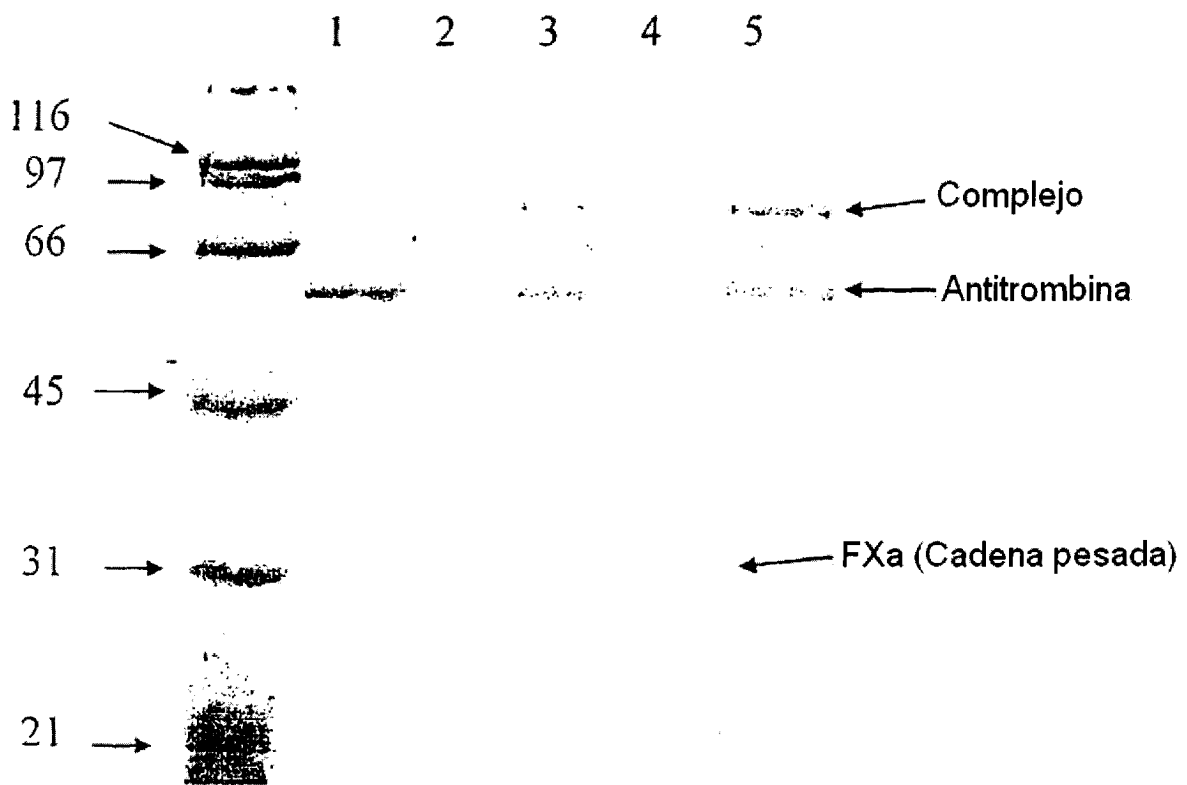


FIG. 5

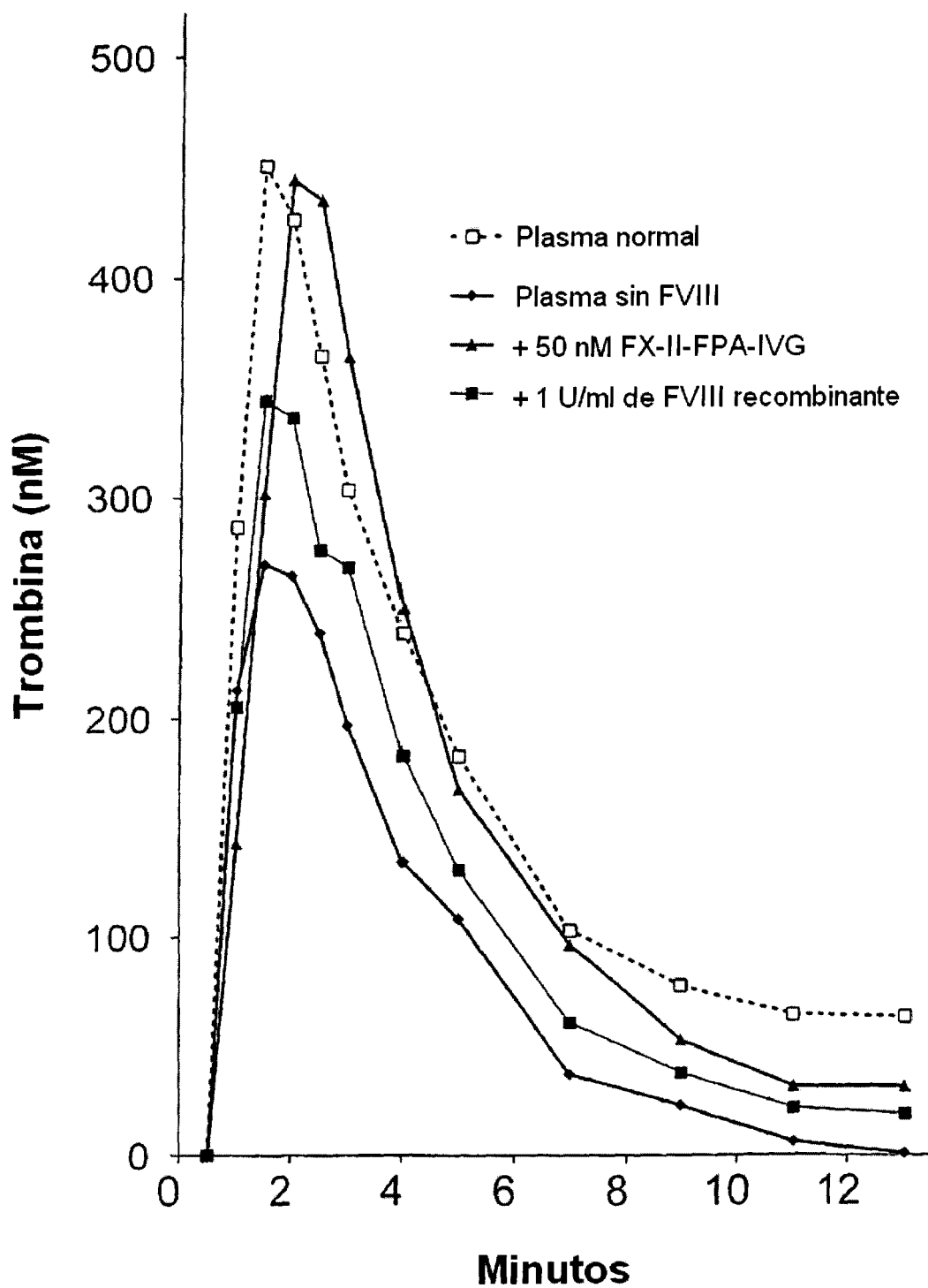


FIG. 6

ES 2 279 010 T3

LISTA DE SECUENCIAS

INSERM

5 LE BONNIEC, Bernard
 MARQUE, Pierre-Emmanuel
 LOUVAIN, Virginie
 CALMEL, Claire
 BIANCHINI, Elsa
 AIACH, Martine

10 <120> Proteínas quiméricas clivables por trombina
 <130> MJPbv598/58PCT
 <160> 23
 15 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 419
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*

 <400> 1

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

65

ES 2 279 010 T3

```

    Arg Arg Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu Asp Ile Lys Glu Val Phe Val His Pro
    210                235                240                245
5    Asn Tyr Ser Lys Ser Thr Thr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu His Leu Ala Gln Pro
    250                255                260
    Ala Thr Leu Ser Gln Thr Ile Val Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ser Gly Leu Ala Glu
    270                275                280                285
10   Arg Glu Leu Asn Gln Ala Gly Gln Glu Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser
    290                295                300
    Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu Asn Phe Ile Lys Ile
    305                310                315                320
15   Pro Val Val Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val Met Ser Asn Met Val Ser Glu Asn
    325                330                335                340
    Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly Asp Arg Gln Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly
    345                350                355                360
20   Gly Pro Met Val Ala Ser Phe His Gly Thr Trp Phe Leu Val Gly Leu Val Ser Trp
    365                370                375                380
25   Gly Glu Gly Cys Gly Leu Leu His Asn Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr
    385                390                395
    Leu Asp Trp Ile His Gly His Ile Arg Asp Lys Glu Ala Pro Gln Lys Ser Trp Ala
    400                405                410                415
30   Pro

```

<210> 2

35 <211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 2

```

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

```

45 <210> 3

<211> 51

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador PCR

55 <400> 3

gactttctag ctgaaggagg aggcgtgcgg ctcatgatg ggaagatgac c

51

60 <210> 4

<211> 50

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador PCR

ES 2 279 010 T3

<400> 4		
	cacgtcctc cttcagctag aaagtctcgt ttcaggtgac tgcgcttct	50
5	<210> 5	
	<211> 43	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
15	<400> 5	
	gaaggaggag gcgtgcgctc ttcggcggga agatgaccag gcg	43
20	<210> 6	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador PCR	
30	<400> 6	
	cgctgtgca tcttcccgcc gaagagccgc acgctctct c	41
35	<210> 7	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador PCR	
	<400> 7	
45	gaaggaggag gcgtgcggtc cattggcggg aagatgacca ggcg	44
	<210> 8	
50	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador PCR	
	<400> 8	
60	cgctgtgca tcttcccgcc aatggaccgc acgctctctc cttc	44
	<210> 9	
	<211> 44	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 279 010 T3

<220>
<223> Cebador PCR

5 <400> 9
gaaggaggag gcgtgcgggc cattggcggg aagatgacca ggcg 44

10 <210> 10
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador PCR

<400> 10

20 gcctgtgca tcttccgcc aatggccgc acgctcctc ettc 44

<210> 11
25 <211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador PCR

<400> 11

35 gaaggaggag gcgtgcggct cattggcggg aagatgacca ggcg 44

<210> 12
40 <211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador PCR

<400> 12

50 gcctgtgca tcttccgcc aatgagccgc acgctcctc ttc 43

<210> 13
<211> 40
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador PCR

60 <400> 13
agcgagtca cctgaaacga caagtagatc cgcggctcat 40

65 <210> 14
<211> 40

ES 2 279 010 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador PCR	
	<400> 14	
10	atgagccgcg gatctacttg tcgttcagg tgactgcgct	40
	<210> 15	
	<211> 51	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador PCR	
	<400> 15	
25	gactttctag ctgaaggagg aggcgtgagg atcgtgggag gccaggaatg c	51
	<210> 16	
	<211> 51	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
35	<400> 16	
40	cagcctcct cttcagcta gaaagtcct cttcctgcgt tccagggtct g	51
	<210> 17	
	<211> 55	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
50	<400> 17	
55	gactttctag ctgaaggagg aggcgtgagg atcttcggag gccaggaatg caagg	55
	<210> 18	
	<211> 60	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
65	<400> 18	
	gaagatcctc acgctcctc cttcagctag aaagtcctc ttctgcggt ccagggtctg	60

ES 2 279 010 T3

	<210> 19	
	<211> 35	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
10	<400> 19	
	ggaggaggcg tgaggccgt gggaggccag gaatg	35
15	<210> 20	
	<211> 35	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
25	<400> 20	
	cattctggc ctcccacggc cctcacgcct cctcc	35
30	<210> 21	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador PCR	
40	<400> 21	
	ggaggaggcg tgaggcctt cggaggccag gaatgcaag	39
45	<210> 22	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador PCR	
55	<400> 22	
	cttgattcc tggcctccga aggcctcac gcctcctcc	39
60	<210> 23	
	<211> 488	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65		

ES 2 279 010 T3

<400> 23

5 Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn Asn Ile Leu Ala Arg Val
20 25 30 35
10 Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys
40 45 50 55
Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys
15 60 65 70 75
Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys
80 85 90 95
20 Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu
100 105 110
Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn
115 120 125 130
25 Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
135 140 145 150
Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro
155 160 165 170
30 Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser
175 180 185 190

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 279 010 T3

Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp
 195 200 205
 5 Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly
 210 215 220 225
 10 Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro
 230 235 240 245
 Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu
 250 255 260 265
 15 Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys
 270 275 280 285
 Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu
 290 295 300
 20 Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile
 305 310 315 320
 25 Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys
 325 330 335 340
 Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile Val
 345 350 355 360
 30 Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu
 365 370 375 380
 35 Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr
 385 390 395
 Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp
 400 405 410 415
 40 Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val
 420 425 430 435
 Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr
 440 445 450 455
 45 Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys
 460 465 470 475
 50 Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
 480 485

55

60

65