

(11) Número de Publicação: **PT 1948690 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 9/64 (2014.01) **C12N 15/57** (2014.01)

A61K 38/48 (2014.01) **A61P 7/04** (2014.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2006.11.15	(73) Titular(es): THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA 34TH STREET & CIVIC CENTER BOULEVARD PHILADELPHIA, PA 19104 US
(30) Prioridade(s): 2005.11.15 US 736680 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.07.30	
(45) Data e BPI da concessão: 2014.06.11 171/2014	(72) Inventor(es): RODNEY M. CAMIRE US
	(74) Mandatário: JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES RUA CASTILHO, 167 - 2.º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MODULAR HEMÓSTASE**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO DESCREVE VARIANTES DE FATOR XA E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DAS MESMAS.

RESUMO

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MODULAR HEMÓSTASE

A presente invenção descreve variantes de Fator Xa e métodos de utilização das mesmas.

DESCRIÇÃO

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MODULAR HEMÓSTASE

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos campos de medicina e hematologia. Mais especificamente, a invenção proporciona novos agentes de Fator de X/Xa de coagulação e métodos de utilização dos mesmos para modular a cascata de coagulação em pacientes em necessidade dos mesmos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Várias publicações e documentos de patente são citados ao longo da memória descritiva para descrever o estado da técnica ao qual esta invenção pertence.

As enzimas de coagulação são enzimas semelhantes à tripsina que pertencem à família de proteases S1 peptidase que carregam um dobramento semelhante à quimiotripsina. As proteases de coagulação contêm domínios catalíticos que são altamente homólogos uns aos outros e às serinas proteases ancestrais de digestão. A homologia/identidade estrutural é tão grande (> 70 %) que os resíduos nos domínios catalíticos das enzimas de coagulação são numerados de acordo com os resíduos correspondentes em quimiotripsinogénio.

As enzimas de coagulação circulam no sangue como precursores inativos, zimogénios, que requerem clivagem proteolítica para ativação. Os zimogénios possuem ~10.000 vezes ou menos atividade proteolítica quando comparados às serinas proteases produzidas seguindo ativação. Iniciação da coagulação no local do dano vascular leva a uma série de

reações em que um zimogénio é convertido numa protease através de clivagem proteolítica específica e forma a enzima para a reação sucessiva. Isto culmina na ativação das células sanguíneas e na conversão do fibrinogénio solúvel em fibrina insolúvel e consequentemente a formação do coágulo. Proteases em excesso são removidas através de reação com inibidores de protease circulantes que atuam como substratos "suicidas" ou aqueles que reconhecem as enzimas ativas. Desse modo, ativação proteolítica dos zimogénios de coagulação é uma característica reguladora fundamental da cascata de coagulação.

Camire R., (J. Biol. Chem., vol 277, N° 40, 2002) revela a substituição de Tyr²²⁵ em Fator Xa com Pro com a finalidade de diminuir a sensibilidade à ligação a Na⁺. O Fator Xa resultante exibiu uma ponte salina parcialmente desestabilizada (Ile16-Asp194), foi mais semelhante a zimogénio, e tinha uma capacidade diminuída de ligar-se a Fator Va.

Embora alguns dos zimogénios de coagulação sejam clivados em dois ou mais locais em suas respectivas reações de ativação, a formação da protease requer clivagem num local só. Clivagem neste local e suas consequências estruturais são consideradas no modo mais fácil usando o sistema de numeração homólogo com base em quimiotripsinogénio e o trabalho estrutural extensivo feito com tripsinogénio e tripsina. A conversão do zimogénio para serina protease requer clivagem seguindo Arg¹⁵ (tipicamente a ligação entre Arg¹⁵ e Ile¹⁶) que tipicamente remove um péptido de ativação e expõe um novo término N no domínio catalítico começando com Ile¹⁶. Um exemplo é a conversão do fator X para Fator Xa (veja-se figuras 1 e 2). Em tripsina e Fator Xa, a sequência N-terminal nova começa com Ile¹⁶-Val¹⁷-Gly¹⁸-Gly¹⁹. Para outras enzimas de coagulação, a

sequência N-terminal nova é uma variação no mesmo tema. A sequência N-terminal depois dobra-se de volta no domínio catalítico e insere-se na ligação N-terminal clivada de uma maneira sequência-específica que é referida como "sexualidade molecular". Veja-se Figura 2. Consequentemente, variantes com sequências N-terminais alternadas não são prováveis de sofrer sexualidade molecular de um modo comparável. Inserção N-terminal leva à formação de uma ponte de sal entre o grupo de α -NH₂ de Ile¹⁶ e Asp¹⁹⁴ no interior do domínio catalítico. Formação da ponte de sal está associada a numerosas alterações na estrutura do domínio catalítico incluindo: rearranjo dos assim chamados domínios de ativação, mostrados na Figura 3; formação do orifício de oxianião requerido para catálise e a formação de um local de ligação de substrato. Estas alterações levam à maturação da serina protease ativa. A contribuição fundamental das interações sequência-específicas do novo término N através de sexualidade molecular e formação da ponte de sal para a maturação da protease ativa é evidente dos fatos a seguir: proteases bacterianas que não requerem clivagem para ativação utilizam outra cadeia lateral dentro do domínio catalítico para a ponte de sal com Asp¹⁹⁴; tripsinogénio pode ser ativado para uma conformação semelhante à proteinase sem clivagem, mas com concentrações extremamente altas de um dipéptido de Val-Ile que se insere na fenda, embora muito ineficientemente; o dipéptido de Val-Ile e outras variantes são bem menos eficazes; adicionalmente, há dois exemplos de proteínas bacterianas que ativam zimogénios de coagulação na ausência de clivagem subvertendo o mecanismo de ativação por meio de provisão de seu próprio término N que se insere na fenda da ligação N-terminal.

As alterações estruturais esboçadas acima proporcionam uma explanação molecular para a conversão de um zimogénio

de precursor para uma serina protease ativa. Porém, diferente de tripsina que é completamente ativa seguindo clivagem em Arg¹⁵, muitas das enzimas de coagulação atuam muito fracamente em seus substratos de proteína. Embora elas em geral possuam locais ativos completamente funcionais e possam clivar substratos de peptídilo pequenos, clivagem eficiente do substrato biológico frequentemente requer uma proteína de co-fator (Figura 2). Nestes casos, as proteínas de co-fator aumentam a taxa de clivagem do substrato de proteína através de vários mil dobramentos. Embora o mecanismo pelo qual as proteínas de co-fator funcionam permaneça a ser solucionado, elas são improváveis de funcionar tornando a protease mais semelhante à enzima e portanto mais eficiente. Um ponto chave é que, com uma exceção, os co-fatores seletivamente ligam-se à protease e não ao zimogénio correspondente. Por exemplo, Fator Xa liga com afinidade alta a FVa ligado à membrana, enquanto que o zimogénio de fator X não liga a FVa.

Dependendo do estado do paciente pode ser desejável desenvolver proteínas de cascata de coagulação alteradas que possuem função de coagulação intensificada ou reduzida. É um objetivo da invenção prover tais proteínas para a utilização como terapêuticas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, composições e métodos são proporcionados para influenciar locais reguladores na via de transição de zimogénio de ZX → protéase, assim dirigindo a produção de uma espécie de FXa mais "semelhante a zimogénio". As composições e métodos da invenção são eficazes para modular hemóstase em pacientes em necessidade dos mesmos.

Numa forma de realização, uma variante Fator Xa que modula a hemóstase é proporcionada, a qual compreende os aminoácidos 41 a 179 e os aminoácidos 235 a 488 da sequência de aminoácidos proporcionada na Figura 5, e que compreende pelo menos uma mutação de substituição, em que a dita pelo menos uma mutação de substituição inclui a substituição de Ile na posição 235 com um aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em Leu, Phe, Asp ou Gly.

A variante de Fator Xa de acordo com a invenção pode compreender ainda uma mutação de substituição na Val na posição 236 ou a Asp na posição 418 da sequência de aminoácidos proporcionada na Figura 5; preferentemente em que a Val na posição 236 é Leu, Ala, ou Gly; ou em que a Asp na posição 418 é Asn ou Glu.

Ácidos nucleicos que codificam a variante zimogénio/proteases da invenção são também revelados como são métodos de utilização dos mesmos. Tais nucleótidos podem opcionalmente codificar um local intracelular de clivagem de PACE/furina.

Em ainda outra forma de realização, um ácido nucleico que tem a sequência de SEQ ID NO: 2, em que os nucleótidos nas posições 1684-1695 codificam os aminoácidos selecionados a partir do grupo que consiste em Leu-Val-Gly, Gly-Val-Gly, Ile-Ala-Gly, Phe-Val-Gly e Ile-Gly-Gly, o dito ácido nucleico compreende opcionalmente nucleótidos na posição 2233-2235 que codificam um aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em Asn ou Glu.

Uma composição farmacêutica que compreende a variante de Fator Xa da invenção num veículo biologicamente compatível é também proporcionada. Outro aspeto preferido

da invenção inclui métodos para o tratamento de um distúrbio relacionado com a hemóstase num paciente em necessidade dos mesmos que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da variante de zimogénio/protease de Fator X/Xa contendo as composições farmacêuticas descritas no presente documento. Tais métodos deveriam ter eficácia no tratamento de distúrbios onde um pró-coagulante é necessário e inclui, sem limitação, hemofilia A e B, hemofilia A e B associada a anticorpos inibidores, deficiência de fator de coagulação, deficiência de vitamina K-epóxido redutase C1, deficiência de gama-carboxilase, hemorragia associada a traumatismo, lesão; trombose, trombocitopenia, acidente vascular cerebral, coagulopatia, coagulação intravascular disseminada (DIC); distúrbios de tratamento de sobre-coagulação, síndrome de Bernard Soulier, tromblastemia de Glanzman, e deficiência de fundo geral de armazenamento.

Certas variantes de zimogénio/protease podem ser úteis no tratamento de distúrbios onde a anti-coagulação é desejada. Tais distúrbios incluem, sem limitação, trombose, trombocitopenia, acidente vascular cerebral, e coagulopatia.

Outro aspeto da invenção inclui células hospedeiras que expressam a variante de zimogénio/proteases da invenção para produzir quantidades grandes da mesma. Métodos para isolar e purificar as variantes de zimogénio protease são também revelados.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. Processamento de Fator X. O Fator X é sintetizado com uma sequência sinal e pró-péptido que são removidos antes de sua secreção. O Fator X é um

zimogénio e não tem nenhuma atividade enzimática. O FX é convertido em Fator Xa seguindo clivagem na ligação de Arg15-Ile16 que liberta um péptido de ativação (AP).

Figura 2. Zimogénio para conversão de protease. O zimogénio para transição de protease para Fator X e ajuntamento do Fator Xa em protrombinase (FXa, FVa, fosfolípido e iões de cálcio). Esta enzima converte protrombina (II) para trombina (Ma).

Figura 3. A estrutura de Raio X de FXa. O domínio catalítico de FXa na orientação padrão. Regiões estruturais são observadas juntamente com resíduos importantes. Tirado de Brandstetter *et al.* (1996) J. Biol. Chem. 271:29988-29992.

Figura 4. Análise de SDS-PAGE de variantes de FX/Xa. 4-12 % de géis de SDS-PAGE foram operados sob condições não-redutoras ou redutoras e depois tingidos com Coomassie Blue.

Figura 5. Sequências de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) e ácido nucleico (SEQ ID NO: 2) de Fator Xa. Os locais e posições dos aminoácidos para modificações desejadas na SEQ ID NO: 1 são mostrados em negrito.

Figura 6. Atividade de Fator Xa em plasma de hemofilia B. FXa do tipo selvagem ou FXa116L (2 nM) foram adicionados ao plasma de hemofilia B e em intervalos de tempo selecionados as amostras foram diluídas (0,1 nM) e ensaiadas num ensaio de coagulação de aPTT.

Figura 7. Correção do aPTT. O Fator Xa-I16L (200 µg/kg; n = 7 ratinhos) ou PBS (n = 4 ratinhos) foi

injetado em ratinhos com hemofilia B (C57BL/6) por meio da veia da cauda. Em 5 e 30 min pós-injeção, o sangue foi colhido e um ensaio de aPTT foi executado. A linha pontilhada vermelha representa o valor de aPTT dos animais de C57Bl/6 normais.

Figura 8. Avaliação hemostática seguindo ensaio de grampo na cauda em ratinhos com hemofilia B. A perda de sangue é medida pelo teor de hemoglobina da solução salina através de A525 pós-lesão. O número de ratinhos (Balb c) é: do tipo selvagem (n = 7); HB-PBS (n = 6); e HB-FXall16L (n = 7).

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Proteólise é um aspeto essencial de coagulação do sangue e dá suporte a muitos dos mecanismos que regulam hemóstase normal. Pró-cofatores e zimogénios não podem participar em qualquer grau significativo em seus respetivos complexos enzimáticos macromoleculares. Isto indica que a ativação proteolítica tem que resultar em alterações estruturais apropriadas que levam à expressão dos locais que dão capacidades de ligação da enzima, substrato e co-fator. Embora ativação de pró-cofator e de zimogénio tenha sido intensivamente estudada, a relação entre proteólise e a expressão de locais de ligação que transmitem a função é incompletamente entendida. A presente invenção proporciona composições e sistemas modelos que elucidam os mecanismos moleculares que estão por detrás da expressão das interações de ligações macromoleculares que acompanham as transições do estado de zimogénio.

Fator X (FX)¹ é uma glicoproteína de duas cadeias dependentes de vitamina k que desempenha um papel central na coagulação do sangue (Figura 1). Este zimogénio de

serina protease é um substrato para os complexos de enzima de tenase extrínsecos (fator de tecido/FVIIa) e intrínsecos (FVIIIa/FIXa) que cliva a ligação de Arg¹⁵-Ile¹⁶ fendível em FX resgatando um péptido de ativação de 52 aminoácidos gerando FXa. O Fator Xa é a protease responsável pela conversão de protrombina em trombina (Figura 2). Embora o Fator Xa seja uma protease completamente competente e possua a maquinaria catalítica para a clivagem de protrombina, é um catalisador profundamente fraco para esta reação. Sua interação de ligação firme com o co-fator, fator Va, numa superfície de membrana profundamente aumenta a taxa de formação de trombina sem substancialmente afetar as outras reações catalisadas por Fator Xa. Alterações para a sequência N-terminal (Ile-Val-Gly) seguindo o local de clivagem de Arg15 que leva à sexualidade molecular subótima são esperadas render um derivado "semelhante a zimogénio" de Xa que tem atividade proteolítica prejudicada, ou até mesmo nada. Estes derivados não são esperados ser suscetíveis à inibição através de inibidores de protease do plasma tais como Antitrombina III e não são esperados interferir com a iniciação de coagulação seguindo dano vascular porque eles não são esperados ligar a TFPI muito bem. O Fator Xa liga-se ao fator Va firmemente enquanto o fator de zimogénio X não. Desse modo, formas de Fator Xa semelhantes a zimogénio são esperadas ligar a Va mais fracamente, mas serem completamente resgatadas em concentrações de co-fator suficientemente altas e eficientemente catalisam a formação de trombina. Formas semelhantes a zimogénio de Fator Xa com estas propriedades são esperadas atuar como proteases duradouras na circulação que estão do contrário mortas mas retêm a habilidade para catalisar a formação de trombina ao ligar ao fator Va. Elas têm o potencial para servir como pró-coagulantes terapêuticos que evita as deficiências em outros fatores de coagulação na cascata, sem os efeitos deletérios associados

à infusão do FXa do tipo selvagem completamente funcional.

I. Definições:

Vários termos relativos às moléculas biológicas da presente invenção são usados mais acima e também ao longo da memória descritiva e reivindicações.

A frase "variante de zimogénio/protease" refere-se a um zimogénio de FX ou protease de FXa modificados que foram alterados geneticamente de modo que sua atividade de protease quando convertida em FXa é reduzida ou "semelhante a zimogénio" na ausência de co-fatores específicos (por exemplo, a afinidade de ligação ao local ativo é inferior que à observada na molécula do tipo selvagem. Notavelmente, esta afinidade/atividade é restabelecida na presença dos co-fatores apropriados que incluem, sem limitação, fator Va. Locais preferidos para alterações de aminoácido na molécula FX de origem incluem substituição da isoleucina na posição 16, substituição da valina na posição 17 e substituição do ácido aspártico na posição 194, com a condição que o aminoácido na posição 16 não seja valina ou alanina.

A frase "distúrbio relacionado com a hemóstase" refere-se aos distúrbios de hemorragia tais como hemofilia A e B, pacientes com hemofilia A e B com anticorpos inibidores, deficiências em Fatores de coagulação, VIl, IX e X, XI, V, XII, II, fator de von Willebrand, deficiência de FV/FVIII combinados, deficiência de vitamina K-epóxido redutase C1, deficiência de gama-carboxilase; hemorragia associada a traumatismo, lesão, trombose, trombocitopenia, acidente vascular cerebral, coagulopatia, coagulação intravascular disseminada (DIC); sobre-anticoagulação associada à heparina, heparina de peso molecular baixo,

pentassacárido, warfarina, antitrombóticos de molécula pequena (isto é, inibidores de FXa); e distúrbios de plaquetas tais como, síndrome de Bernard Soulier, tromblastemia de Glanzman, e deficiência de fundo geral de armazenamento.

Um distúrbio relacionado com a hemóstase pode também incluir hemorragia relacionada com distúrbios trombóticos tais como trombose venosa profunda, trombose associada a estados ou malignidades de doença cardiovascular, trombose resultante de permanência interna ou outros procedimentos cirúrgicos invasivos e trombose associada a doenças autoimunes tais como lúpus. As variantes de zimogénio/protease poderiam também proporcionar hemóstase necessária para pacientes com coagulação intravascular disseminada ou coagulopatias consuntivas surgindo de uma variedade de estados de doença.

Com referência aos ácidos nucleicos da invenção, o termo "ácido nucleico isolado" às vezes é usado. Este termo, quando aplicado a ADN, refere-se a uma molécula de ADN que está separada das sequências com as quais é imediatamente contígua (nas direções 5' e 3') no genoma de ocorrência natural do organismo do qual origina. Por exemplo, "ácido nucleico isolado" pode compreender uma molécula de ADN ou ADNc inserida num vetor, tal como um vetor de plasmídeo ou de vírus, ou integrada no ADN de um procariota ou eucariota.

Com respeito às moléculas de ARN da invenção, o termo "ácido nucleico isolado" primariamente refere-se a uma molécula de ARN codificada por uma molécula de ADN isolada como definida acima. Alternativamente, o termo pode referir-se a uma molécula de ARN que foi suficientemente separada das moléculas de ARN com as quais estaria

associada em seu estado natural (isto é, em células ou tecidos), de modo que ela existe numa forma "substancialmente pura" (o termo "substancialmente puro" é definido a seguir).

Com respeito à proteína, o termo "proteína isolada" ou "proteína isolada e purificada" às vezes é no presente documento usado. Este termo refere-se primariamente a uma proteína produzida por expressão de uma molécula de ácido nucleico isolada da invenção. Alternativamente, este termo pode referir a uma proteína que foi suficientemente separada das outras proteínas com as quais seria naturalmente associada, para existir na forma "substancialmente pura".

O termo "região de promotor" refere-se às regiões reguladoras transcrpcionais de um gene que pode ser encontrado no lado de 5' ou 3' da região de codificação, ou dentro da região de codificação, ou dentro dos intrões.

O termo "vetor" refere-se a uma molécula de ADN veículo pequena ao qual uma sequência de ADN pode ser inserida para introdução numa célula hospedeira onde será replicada. Um "vetor de expressão" é um vetor especializado que contém um gene ou sequência de ácido nucleico com as regiões reguladoras necessárias requeridas para expressão numa célula hospedeira.

O termo "operativamente ligado" significa que as sequências reguladoras necessárias para expressão de uma sequência de codificação são colocadas na molécula de ADN nas posições apropriadas com relação à sequência de codificação para realizar expressão da sequência de codificação. Esta mesma definição às vezes é aplicada ao arranjo de sequências de codificação e aos elementos de

controle de transcrição (por exemplo promotores, intensificadores, e elementos de terminação) num vetor de expressão. Esta definição é também às vezes aplicada ao arranjo de sequências de ácido nucleico de uma primeira e uma segunda molécula de ácido nucleico em que uma molécula de ácido nucleico híbrida é gerada.

O termo "substancialmente puro" refere-se a uma preparação que compreende pelo menos 50-60 % em peso do composto de interesse (por exemplo, ácido nucleico, oligonucleótido, proteína, etc.). Mais preferivelmente, a preparação compreende pelo menos 75 % em peso, e mais preferivelmente 90-99 % em peso, do composto de interesse. Pureza é medida através de métodos apropriados para o composto de interesse (por exemplo métodos cromatográficos, agarose ou eletroforese em gel de poliacrilamida, análise de HPLC, e similares).

A frase "consistindo essencialmente" ao referir-se a uma sequência de nucleótido ou sequência de aminoácido particular significa uma sequência que tem as propriedades de uma SEQ ID NO: dada. Por exemplo, quando usado em referência a uma sequência de aminoácido, a frase inclui a sequência per se e as modificações moleculares que não afetariam as características básicas e novas da sequência.

O termo "oligonucleótido", como no presente documento usado, refere-se aos iniciadores e sondas da presente invenção; e é definido como uma molécula de ácido nucleico compreendida de dois ou mais ribo- ou desoxirribonucleótidos, preferivelmente mais que três. O tamanho exato do oligonucleótido dependerá de vários fatores e da aplicação particular para a qual o oligonucleótido é usado.

O termo "sonda" como no presente documento usado refere-se a um oligonucleótido, polinucleótido ou ácido nucleico, ARN ou ADN, quer de ocorrência natural como numa digestão da enzima de restrição purificada quer produzido sinteticamente, que é capaz de anelar ou especificamente hibridar com um ácido nucleico com as sequências complementares à sonda. Uma sonda pode ser de cadeia simples ou de cadeia dupla. O comprimento exato da sonda dependerá de muitos fatores, incluindo temperatura, fonte da sonda e método de utilização. Por exemplo, para aplicações de diagnóstico, dependendo da complexidade da sequência alvo, a sonda de oligonucleótido tipicamente contém 15-25 nucleótidos ou mais, embora possa conter menos nucleótidos.

As sondas no presente documento são selecionadas para ser "substancialmente" complementares a diferentes filamentos de uma sequência de ácido nucleico alvo particular. Isto significa que as sondas devem ser suficientemente complementares para serem capazes de "hibridar-se especificamente" ou anelar-se com seus respectivos filamentos alvos sob um conjunto de condições predeterminadas. Portanto, a sequência de sonda não necessita refletir a sequência complementar exata do alvo. Por exemplo, um fragmento de nucleótido não-complementar pode ser ligado à terminação 5' ou 3' da sonda, com o restante da sequência da sonda sendo complementar ao filamento alvo. Alternativamente, bases não-complementares ou sequências mais longas podem ser entremeadas na sonda, contanto que a sequência de sonda tenha complementaridade suficiente com a sequência do ácido nucleico alvo para especificamente anelarem-se entre si.

O termo "híbrida especificamente" refere-se à associação entre duas moléculas de ácido nucleico de cadeia

simples de sequência suficientemente complementar para permitir tal hibridação sob condições predeterminadas em geral usadas na técnica (às vezes denominadas "substancialmente complementares"). Em particular, o termo refere-se a hibridação de um oligonucleótido com uma sequência substancialmente complementar contida dentro de uma molécula ADN ou ARN de cadeia simples da invenção, para a exclusão substancial da hibridação do oligonucleótido com ácidos nucleicos de cadeia simples de sequência não-complementar.

O termo "iniciador" como usado no presente documento refere-se a um oligonucleótido, ARN ou ADN, de cadeia simples ou de cadeia dupla, quer derivado de um sistema biológico, gerado por digestão da enzima de restrição, quer produzido sinteticamente que, quando colocado no ambiente apropriado, é capaz de atuar funcionalmente como um iniciador da síntese de ácido nucleico dependente do modelo. Quando presentes com um modelo de ácido nucleico apropriado, precursores de trifosfato de nucleótido adequados de ácidos nucleicos, uma enzima de polimerase, co-fatores adequados e condições tais como uma temperatura e pH adequados, o iniciador pode ser estendido em seu término 3' pela adição de nucleótidos mediante ação de uma polimerase ou atividade similar para render um produto de extensão de iniciador.

O iniciador pode variar em comprimento dependendo das condições particulares e requerimentos da aplicação. Por exemplo, em aplicações de diagnóstico, o iniciador de oligonucleótido é tipicamente 15-25 ou mais nucleótidos em comprimento. O iniciador deve ser de complementaridade suficiente para o modelo desejado preparar a síntese do produto de extensão desejado, isto é, para ser capaz de anelar com o filamento de modelo desejado de uma maneira

suficiente para proporcionar a metade de hidroxilo de 3' do iniciador em justaposição apropriada para o utilização na iniciação da síntese por uma polimerase ou enzima similar. Não é requerido que a sequência de iniciador represente um complemento exato do modelo desejado. Por exemplo, uma sequência de nucleótido não-complementar pode ser ligada à terminação 5' de um iniciador do contrário complementar. Alternativamente, bases não-complementares podem ser entremeadas dentro da sequência de iniciador de oligonucleótido, contanto que a sequência de iniciador tenha complementaridade suficiente com a sequência do filamento de modelo desejado para funcionalmente proporcionar um complexo de modelo-iniciador para a síntese do produto de extensão.

O termo "por cento idêntica" é no presente documento usado com referência às comparações entre sequências de ácido nucleico ou de aminoácido. Sequências de ácido nucleico e de aminoácido são frequentemente comparadas usando programas de computação que alinham as sequências de ácidos nucleicos ou aminoácidos desse modo definindo as diferenças entre as duas. Para propósitos desta invenção, comparações de sequências de ácido nucleico são executadas usando o Pacote de GCG Wisconsin versão 9.1, disponível do Genetics Computer Group em Madison, Wisconsin. Por conveniência, os parâmetros predefinidos (penalidade de criação de intervalo = 12, penalidade de extensão de intervalo = 4) especificados por aquele programa são intencionados para a utilização no presente documento para comparar identidade de sequência. Alternadamente, o programa de Blastn 2.0 proporcionado pelo National Center for Biotechnology Information (encontrado na rede mundial em ncbi.nlm.nih.gov/blast/; Altschul et al., 1990, J Mol Biol 215:403-410) usando um alinhamento intervalado com parâmetros predefinidos, pode ser usado para determinar o

nível de identidade e similaridade entre sequências de ácido nucleico e sequências de aminoácidos.

II. Preparação de Moléculas de Ácido Nucleico e Polipéptidos que codificam Variante de Zimogénio-Protease

A. Moléculas de Ácido Nucleico

Moléculas de ácido nucleico que codificam a variante de zimogénio/proteases da invenção podem ser preparadas usando métodos de tecnologia de ADN recombinante. A disponibilidade de informação da sequência de nucleótido permite a preparação de moléculas de ácido nucleico isoladas da invenção por uma variedade de meios. Por exemplo, as sequências de ácido nucleico que codificam um polipéptido de zimogénio/protease podem ser isoladas de fontes biológicas apropriadas usando protocolos padrões bem conhecidos na técnica.

Ácidos nucleicos da presente invenção podem ser mantidos como ADN em qualquer vetor de clonagem conveniente. Numa forma de realização preferida, os clones são mantidos num vetor de clonagem/expressão de plasmídeo, tal como pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA) que é propagado numa célula hospedeira de *E. coli* adequada. Alternativamente, os ácidos nucleicos podem ser mantidos em vetor adequado para expressão em células de mamíferos. Em casos onde modificação pós-translacional afeta a função de zimogénio/protease (por exemplo, Fator Xa), é preferível expressar a molécula em células de mamíferos.

Numa forma de realização, os ácidos nucleicos que codificam as variantes de zimogénio de fator X podem ser também modificados por meio de inserção de um local de clivagem proteolítico intracelular. Para expressar

variantes de FXa semelhantes a zimogénio "ativadas" em células de mamíferos, um local de clivagem proteolítico intracelular pode ser inserido entre as posições Arg15 e 16 na variante de zimogénio de FX. Tais locais de clivagem incluem: Arg-Lys-Arg ou Arg-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg. Estes locais de clivagem são reconhecidos eficientemente através de proteases (enzimas semelhantes a PACE/furina) dentro da célula e são removidos. Isto resulta numa variante de FX(a) processada em que a cadeia pesada na molécula começa agora na posição 16. Introdução deste local de clivagem na dita posição permitirá a conversão intracelular de FX em FXa.

Em outra forma de realização, o péptido de ativação de 52 aminoácidos inteiro pode ser removido e o local de clivagem de protease intracelular pode ser introduzido em seu lugar que resultará na variante de FXa.

Por fim estes tipos de modificações permitem secreção da forma processada "ativa" de variante de FX de uma célula que expressa a variante de FX modificada. Secreção do fator clivado obvia uma necessidade por clivagem proteolítica durante o coágulo sanguíneo ou seguindo o isolamento da proteína.

Moléculas de ácido nucleico de codificação de variante de zimogénio/protease da invenção incluem ADNc, ADN, ARN genómico, e fragmentos dos mesmos, que podem ser uni ou de cadeia dupla. Desse modo, esta invenção proporciona oligonucleótidos (filamentos senses e antissenses de ADN ou ARN) tendo sequências capazes de hibridar com pelo menos uma sequência de uma molécula de ácido nucleico da presente invenção. Tais oligonucleótidos são úteis como sondas para detectar expressão de zimogénio/protease.

B. Proteínas

Um polipéptido de zimogénio/protease de comprimento total ou variante da presente invenção pode ser preparado numa variedade de modos, de acordo com os métodos conhecidos. A proteína pode ser purificada de fontes apropriadas, por exemplo, células ou tecidos cultivados bacterianos ou animais transformados que expressam zimogénio/protease, através de purificação de imunoafinidade. Porém, este não é um método preferido devido a baixa quantidade de proteína, provável estar presente num tipo de célula dado a qualquer momento.

A disponibilidade das moléculas de ácido nucleico que codificam um polipéptido de variante de zimogénio/protease permite a produção de zimogénio/protease usando métodos de expressão *in vitro* conhecidos na técnica. Por exemplo, um ADNc ou gene pode ser clonado num vetor de transcrição *in vitro* apropriado, tal como pSP64 ou pSP65 para transcrição *in vitro*, seguido por translação livre de célula num sistema de translação livre de célula adequado, tal como lisados de reticulócito de germe de trigo ou de coelho. Sistemas de transcrição e de translação *in vitro* estão comercialmente disponíveis, por exemplo, de Promega Biotech, Madison, Wisconsin ou BRL, Rockville, Maryland.

Alternativamente, de acordo com uma forma de realização preferida, quantidades maiores de zimogénio/protease podem ser produzidas através de expressão num sistema de expressão procariótico ou eucariótico adequado. Por exemplo, parte ou toda de uma molécula de ADN que codifica variante de Fator Xa por exemplo, pode ser inserida num vetor de plasmídeo adaptado para expressão numa célula bacteriana, tal como *E. coli* ou uma célula mamífera tal como células CHO ou Hela.

Alternativamente, numa forma de realização preferida, proteínas de fusão marcadas que compreende zimogénio/protease podem ser geradas. Tais proteínas de fusão marcadas com zimogénio/protease são codificadas por parte ou toda de uma molécula de ADN, ligada na estrutura de leitura de codão correta numa sequência de nucleótidoa que codifica uma porção ou todo um marcador de polipéptido desejado que é inserido num vetor de plasmídeo adaptado para expressão numa célula bacteriana, tal como *E. coli* ou uma célula eucariótica, tal como, mas não limitada a, células de levedura e mamíferas. Vetores tais como aqueles descritos acima compreendem os elementos reguladores necessários para expressão do ADN na célula hospedeira posicionada numa tal maneira a permitir expressão do ADN na célula hospedeira. Tais elementos reguladores requeridos para expressão incluem, mas não são limitados a, sequências de promotor, sequências de iniciação de transcrição, e sequências de intensificador.

Proteínas de variante de zimogénio/proteases, produzidas através de expressão de gene num sistema procariótico ou eucariótico recombinante, podem ser purificadas de acordo com os métodos conhecidos na técnica. Numa forma de realização preferida, um sistema de expressão/secreção comercialmente disponível pode ser usado, por meio do qual a proteína recombinante é expressada e depois disso segregada da célula hospedeira, para ser facilmente purificada do meio circunvizinho. Se os vetores de expressão/secreção não forem usados, um método alternativo envolve purificar a proteína recombinante através de separação de afinidade, tal como por interação imunológica com anticorpos que especificamente ligam à proteína recombinante ou colunas de níquel para isolamento das proteínas recombinantes marcadas com 6-8 resíduos de histidina em seu término N ou término C. Marcadores

alternativos podem compreender o epítopo FLAG, GST ou o epítopo de hemaglutinina. Tais métodos são comumente usados por médicos hábeis.

As proteínas de zimogénio/protease, preparadas pelos métodos acima mencionados, podem ser analisadas de acordo com os procedimentos padrões. Por exemplo, tais proteínas podem ser submetidas à análise de sequência de aminoácido, de acordo com os métodos conhecidos.

Como debatido acima, um modo conveniente de produzir um polipéptido de acordo com a presente invenção é expressar ácido nucleico que o codifica, mediante utilização do ácido nucleico num sistema de expressão. Uma variedade de sistemas de expressão de utilidade para os métodos da presente invenção é bem conhecida aos peritos na especialidade.

Consequentemente, também se descreve um método de preparação de um polipéptido (como revelado), o método inclui a expressão de ácido nucleico que codifica o polipéptido (em geral, ácido nucleico). Isto pode ser convenientemente alcançado cultivando uma célula hospedeira, contendo um tal vetor, sob condições apropriadas que causam ou permitem produção do polipéptido. Polipéptidos podem também ser produzidos em sistemas *in vitro*, tais como em lisados de reticulócitos.

III. Utilizações de Proteínas de Zimogénio/Protease e Ácidos Nucleicos que Codificam Zimogénio/Protease

Ácidos nucleicos de variante de zimogénio/proteases que codificam polipéptidos que têm atividades de protease alteradas podem ser usados, por exemplo, como agentes terapêuticos e/ou profiláticos (proteína ou ácido nucleico)

que modulam a cascata de coagulação sanguínea. Os inventores presentes descobriram que moléculas de zimogénio/protease de fator X/Xa podem aumentar a coagulação e proporcionar hemóstase eficaz.

A. Polipéptidos de Variantes de Zimogénio/Protease

Os polipéptidos de variante de zimogénio/proteases podem ser administrados a um paciente por meio de infusão num veículo biologicamente compatível, preferivelmente por meio de injeção intravenosa. A variante de zimogénio/proteases da invenção pode opcionalmente ser encapsulada em lipossomas ou misturada com outros fosfolípidos ou micelas para aumentar a estabilidade da molécula. Zimogénio/protease pode ser administrado sozinho ou em combinação com outros agentes conhecidos modular hemóstase (por exemplo, Fator V, Fator Va ou derivados dos mesmos). Uma composição apropriada para resgatar os polipéptidos de zimogénio/protease pode ser determinada por um médico em consideração de uma variedade de variáveis fisiológicas, incluindo, mas não limitadas a, a condição e estado hemodinâmico do paciente. Uma variedade de composições bem adaptadas para diferentes aplicações e vias de administração é bem conhecida na técnica e é descrita mais a seguir.

A preparação contendo o análogo de fator X/Xa purificado contém uma matriz fisiologicamente aceitável e é preferivelmente formulada como uma preparação farmacêutica. A preparação pode ser formulada usando métodos da técnica anterior substancialmente conhecidos, misturada com um tampão contendo sais, tais como NaCl, CaCl₂, e aminoácidos, tais como glicina e/ou lisina, e numa faixa de pH de 6 a 8. Até necessário, a preparação purificada contendo o análogo de fator X/Xa pode ser armazenada na forma de uma solução

acabada ou na forma liofilizada ou extremamente congelada. Preferivelmente a preparação é armazenada na forma liofilizada e é dissolvida numa solução visualmente clara usando uma solução de reconstituição apropriada.

Alternativamente, a preparação de acordo com a presente invenção pode também ser disponibilizada como uma preparação líquida ou como um líquido que é extramente congelado.

A preparação de acordo com a presente invenção é especialmente estável, isto é, pode ser deixada repousar em forma dissolvida um tempo prolongado antes da aplicação.

A preparação que contém um análogo de fator X em combinação com fator XIa ou um derivado do mesmo é capaz de ativar o análogo de fator X em Fator Xa ou o análogo de Fator Xa pode "ser disponibilizado na forma de uma preparação de combinação que compreende um recipiente que retém o fator XIa que é imobilizado numa matriz, potencialmente na forma de uma coluna miniatura ou uma seringa enchida com uma protease, e um recipiente contendo a preparação farmacêutica com o análogo de fator X. Para ativar o análogo de fator X, a solução contendo o análogo de fator X, por exemplo, pode ser pressionada na protease imobilizada. Durante o armazenamento da preparação, a solução contendo o análogo de fator X é preferivelmente de forma espacial separada da protease. A preparação pode ser armazenada no mesmo recipiente que a protease, mas os componentes são espacialmente separados por uma partição impermeável que pode ser facilmente removida antes da administração da preparação. As soluções podem também ser armazenadas em recipientes separados e ser colocadas em contato entre si apenas brevemente antes da administração.

O análogo de fator X pode ser ativado no Fator Xa logo antes da utilização imediato, isto é, antes da administração ao paciente. A ativação pode ser realizada colocando um análogo de fator X em contato com uma protease imobilizada ou misturando as soluções que contêm uma protease, por um lado, e o análogo de fator X, por outro lado. Desse modo, é possível manter os dois componentes separadamente em solução e os misturar por meio de um dispositivo de infusão adequado em que os componentes entram em contato entre si à medida que eles atravessam o dispositivo e assim causam uma ativação no Fator Xa ou no análogo de Fator Xa. O paciente desse modo recebe uma mistura de Fator Xa e, além disso, uma serina protease que é responsável pela ativação. Neste contexto, é especialmente importante para prestar muita atenção na dosagem uma vez que a administração adicional de uma serina protease também ativa fator X endógeno que pode encurtar o tempo de coagulação.

A preparação pode ser disponibilizada como uma preparação farmacêutica com atividade de Fator Xa na forma de uma preparação de um componente só ou em combinação com outros fatores na forma de uma preparação de multicomponentes.

Antes de processar a proteína purificada numa preparação farmacêutica, a proteína purificada é submetida aos controles de qualidade convencionais e formada numa forma de apresentação terapêutica. Em particular, durante a fabricação recombinante, a preparação purificada é testada quanto à ausência de ácidos nucleicos celulares como também ácidos nucleicos que são derivados do vetor de expressão, preferivelmente usando um método, tal como é descrito no documento EP 0 714 987.

Também se descreve no presente documento uma preparação que contém um análogo de Fator X com uma estabilidade alta e integridade estrutural e que, em particular, é livre de intermediários de análogo de fator X/Xa inativos e produtos de degradação autoproteolíticos e que podem ser produzidos ativando um análogo de fator X do tipo descrito acima e formulando-o numa preparação apropriada.

A preparação farmacêutica pode conter dosagens de entre 10- 1000 µg/kg, mais preferivelmente entre cerca de 10-250 µg/kg e o mais preferivelmente entre 10 e 75 µg/kg, com 40 µg/kg do polipéptido de variante de fator X sendo particularmente preferido. Os pacientes podem ser tratados imediatamente sob apresentação na clínica com uma hemorragia. Alternativamente, os pacientes podem receber uma infusão de bolo uma a cada três horas, ou se melhoria suficiente for observada, uma infusão uma vez ao dia do variante de Fator Xa descrita no presente documento.

B. Ácidos Nucleicos que Codificam Zimogénio/Protease

Ácidos nucleicos que codificam zimogénio/protease podem ser usados para uma variedade de propósitos. Por exemplo, um veículo de libertação de ácido nucleico (isto é, um vetor de expressão) para modular coagulação sanguínea é proporcionado em que o vetor de expressão compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica para um polipéptido de variante de zimogénio/protease, ou um fragmento funcional do mesmo como descrito no presente documento. Administração de vetores de expressão codificando zimogénio/protease a um paciente resulta na expressão do polipéptido de zimogénio/protease que serve para alterar a cascata de coagulação. De acordo com a presente invenção, uma sequência de ácido nucleico de codificação de zimogénio/protease pode codificar um polipéptido de zimogénio/protease como descrito no presente documento cuja expressão aumenta a hemóstase. Numa forma de realização preferida, uma sequência de ácido nucleico de zimogénio/protease codifica uma variante de polipéptido de Fator Xa humana.

Os vetores de expressão que compreendem sequências de ácido nucleico de variantes de zimogénio/protease de X/Xa

podem ser administrados sozinhos, ou em combinação com outras moléculas úteis para modular hemóstase. De acordo com a presente invenção, os vetores de expressão ou combinação de agentes terapêuticos podem ser administrados sozinhos ao paciente ou numa composição farmacologicamente aceitáveis ou biologicamente compatíveis.

Numa forma de realização preferida da invenção, o vetor de expressão que compreende sequências de ácido nucleico que codificam as variantes de variante de zimogénio/proteases é um vetor viral. Vetores virais que podem ser usados na presente invenção incluem, mas não são limitados a, vetores adenovirais (com ou sem promotores/intensificadores tecido-específicos), vetores adenovírus- associados (A- AV) de sorotipos múltiplos (por exemplo, AAV-2, AAV-5, AAV-7, e AAV-8) e vetores de AAV híbrido, vetores de lentivírus e vetores de lentivírus de pseudo-tipo [por exemplo, vírus de Ebola, vírus de estomatite vesicular (VSV), e vírus de imunodeficiência felina (FIV)], vetores de vírus do herpes simples, vetores de vírus de vacínia, e vetores retrovirais.

Descrevem-se no presente documento métodos para a administração de um vetor viral que compreende as sequências de ácido nucleico que codificam uma variante de zimogénio/protease, ou um fragmento funcional das mesmas, são proporcionados. Vetores adenovirais de utilidade nos métodos preferivelmente incluem pelo menos as partes essenciais do ADN do vetor adenoviral. Como descrito no presente documento, expressão de um polipéptido de variante de zimogénio/protease seguindo administração de tal um vetor adenoviral serve para modular hemóstase. No contexto da variante de Fator Xa descrito no presente documento, tal administração intensifica a atividade de pró-coagulação da protease.

Vetores adenovirais recombinantes encontraram utilidade vasta para uma variedade de aplicações de terapêutica de gene. Sua utilidade para tais aplicações é em grande parte devido à eficiência alta de transferência de gene *in vivo* alcançada numa variedade de contextos de órgão.

Partículas adenovirais podem ser usadas para tirar vantagem como veículos para libertação de gene adequada. Tais viriões possuem várias características desejáveis para tais aplicações, incluindo: características estruturais relacionadas em ser um vírus não-envelopado de ADN de cadeia dupla e características biológicas tais como um tropismo para o sistema respiratório humano e trato gastrointestinal. Além disso, adenovírus são conhecidos por infectar uma ampla variedade de tipos de célula *in vivo* e *in vitro* através de endocitose mediada por receptor. Atestando à segurança geral dos vetores adenovirais, infecção com adenovírus leva a um estado de doença mínimo em humanos que compreende sintomas moderados semelhantes à influenza.

Devido a seu tamanho grande (~36 quilobases), genomas adenovirais são bem adaptados para a utilização como veículos de terapêutica de gene porque eles podem acomodar a inserção de ADN estranho seguindo a remoção de genes adenovirais essenciais para regiões de replicação e não-essenciais. Tais substituições tornam o vetor viral prejudicado com respeito às funções replicativas e de infecciosidade. De nota, os adenovírus foram usados como vetores para terapêutica de gene e para expressão de genes heterólogos.

Para um debate mais pormenorizado da utilização de vetores de adenovírus utilizado para terapêutica de gene, veja-se Berkner, 1988, *Biotechniques* 6:616- 629 e Trapnell,

1993, Advanced Drug Delivery Reviews 12:185-199.

É desejável introduzir um vetor que possa proporcionar, por exemplo, cópias múltiplas de um gene desejado e consequentemente maiores quantidades do produto daquele gene. Vetores adenovirais melhorados e métodos para produzir estes vetores foram descritos em pormenores em várias referências, patentes, e pedidos de patente, incluindo: Mitani e Kubo (2002, Curr Gene Ther. 2(2): 135-44); Olmsted-Davis *et al.* (2002, Hum Gene Ther. 13(11): 1337-47); Reynolds *et al.* (2001, Nat Biotechnol. 19(9):838-42); patentes US N° 5.998.205 (em que são proporcionados vetores replicativos específicos a tumor que compreendem cópias de ADN múltiplas); documento US 6.228.646 (em que são descritos vetores de adenovírus livres de auxiliares, totalmente defeituosos); documento US 6.093.699 (em que são proporcionados vetores e métodos para terapêutica de gene); documento US 6.100.242 (em que um vetor de adenovírus defeituoso de replicação inserido em transgene foi eficazmente usado em terapêutica de gene *in vivo* de doença vascular periférica e doença cardíaca); e Pedidos de Patente Internacionais N° WO 94/17810 e WO 94/23744.

Para algumas aplicações, uma construção de expressão pode também compreender elementos reguladores que servem para dirigir a expressão num tipo de célula ou de tecido particular. Tais elementos reguladores são conhecidos aos peritos na especialidade e debatidos a fundo em Sambrook *et al.* (1989) e Ausubel *et al.* (1992). A incorporação de elementos reguladores tecido-específicos nas construções de expressão da presente invenção proporciona pelo menos tropismo de tecido parcial à expressão da variante de zimogénio/proteases ou fragmentos funcionais da mesma. Por exemplo, um vetor adenoviral do tipo 5 deletado em E1 que compreende as sequências de ácido nucleico que codificam a

variante de zimogénio/protease sob o controlo de um promotor de citomegalovírus (CMV) pode ser usado para tirar vantagem dos métodos descritos no presente documento.

Métodos Exemplares para Produzir Vetores Adenovirais

Vetores adenovirais para expressão de gene recombinante foram produzidos na linha celular de rim embrionário humano 293 (Graham *et al.*, 1977, J. Gen. Virol. 36:59-72), esta linha celular é permissiva para crescimento de mutantes de adenovírus 2 (Ad2) e adenovírus 5 defeituosos nas funções de E1 porque compreende a terminação esquerda do genoma de adenovírus 5 e, portanto, expressa proteínas de E1. Genes de E1 integrados no genoma celular das células 293 são expressos em níveis que facilitam a utilização destas células como um sistema de expressão em que para amplificar os vetores virais destas, os genes foram deletados. As células 293 foram extensivamente usadas para o isolamento e propagação de mutantes de E1, para clonagem independente de ajudante, e para expressão dos vetores de adenovírus. Sistemas de expressão tais como a linha de células 293, portanto, fornecem funções virais essenciais *in trans* e assim permitem propagação dos vetores virais nas quais as sequências de ácido nucleico exógenas foram substituídas por genes de E1. Veja-se Young *et al.* em *The Adenovirus*, Ginsberg, ed., Plenum Press, Nova Iorque e Londres (1984), págs. 125-172.

Outros sistemas de expressão bem adaptados à propagação de vetores adenovirais são conhecidos aos peritos na especialidade (por exemplo, células HeLa) e foram revisados em outro lugar.

Também se descreve no presente documento um método

para modular hemóstase que compreende proporcionar células de um indivíduo com um veículo de libertação de ácido nucleico codificando um polipéptido de variante de zimogénio/protease e permitindo as células crescerem sob condições em que o polipéptido de zimogénio/protease é expressado.

Do debate anterior, pode ser visto que os polipéptidos de zimogénio/protease, e o polipéptido de zimogénio/protease que expressa vetores de ácido nucleico podem ser usados no tratamento de distúrbios associados à coagulação sanguínea aberrante.

C. Composições Farmacêuticas

Os vetores de expressão da presente invenção podem ser incorporados nas composições farmacêuticas que podem ser libertadas a um indivíduo, para permitir a produção de uma proteína biologicamente ativa (por exemplo, um polipéptido de variante de zimogénio/protease ou fragmento funcional ou derivado do mesmo). Numa forma de realização particular da presente invenção, as composições farmacêuticas que compreendem material genético suficiente para permitir um recipiente produzir uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido de variante de zimogénio/protease podem influenciar hemóstase no indivíduo. Alternativamente, como debatido acima, uma quantidade eficaz do polipéptido de variante de Fator X pode ser infundida diretamente num paciente em necessidade do mesmo. As composições podem ser administradas sozinhas ou em combinação com pelo menos um outro agente, tal como um composto de estabilização que pode ser administrado em qualquer veículo farmacêutico estéril, biocompatível incluindo, mas não limitado a, solução salina, solução salina tamponada, dextrose, e água. As composições podem ser administradas sozinhas a um

paciente, ou em combinação com outros agentes (por exemplo, co-fatores) que influenciem hemóstase.

As composições farmacêuticas podem também conter um excipiente farmacêuticamente aceitável. Tais excipientes incluem qualquer agente farmacêutico que não leve a induzir uma resposta imune prejudicial ao indivíduo que recebe a composição, e que possam ser administrados sem toxicidade imprópria. Excipientes farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, líquidos tais como água, solução salina, glicerol, açúcares e etanol. Sais farmacêuticamente aceitáveis podem também ser inclusos neles, por exemplo, sais de ácido minerais tais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos e similares; e os sais de ácidos orgânicos tais como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos e similares. Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como agentes intumescentes ou emulsificantes, substâncias de tamponação de pH, e outros, podem estar presentes em tais veículos. Um debate completo de excipientes farmacêuticamente aceitáveis está disponível em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack. Pub. Co., 18ª Edição, Easton, Pa. [1990]).

As formulações farmacêuticas adequadas para administração parentérica podem ser formuladas em soluções aquosas, preferivelmente em tampões fisiologicamente compatíveis tais como solução de Hanks, solução de Ringer, ou solução salina fisiologicamente tamponada. Suspensões de injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, tais como carboximetil celulose de sódio, sorbitol, ou dextrano. Adicionalmente, as suspensões dos compostos ativos podem ser preparadas como suspensões de injeção oleosas apropriadas. Solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos gordos tais como óleo de gergelim, ou ésteres de ácido gordo sintético,

tais como oleato de etilo ou triglicéridos, ou lipossomas. Opcionalmente, a suspensão pode também conter estabilizantes adequados ou agentes que aumentem a solubilidade dos compostos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

A composição farmacêutica pode ser proporcionada como um sal e pode ser formada com muitos ácidos, incluindo mas não limitado a, clorídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Os sais tendem a ser mais solúveis em solventes protônicos aquosos ou outros que as formas de base livres correspondentes. Em outros casos, a preparação preferida pode ser um pó liofilizado que pode conter qualquer um ou todos dos seguintes: 1 - 50 mM de histidina, 0,1 %-2 % de sacarose, e 2-7 % de manitol, numa faixa de pH de 4,5 a 5,5, que aquele é combinado com tampão antes da utilização.

Após as composições farmacêuticas serem preparadas, elas podem ser colocadas num recipiente apropriado e marcadas para tratamento. Para administração de vetores ou polipéptidos contendo zimogénio/protease, tal marcação incluiria quantidade, frequência, e método de administração.

As composições farmacêuticas adequadas para a utilização nos métodos descritos no presente documento incluem composições em que os componentes ativos são contidos numa quantidade eficaz para alcançar o propósito terapêutico intencionado. Determinar uma dose terapeuticamente eficaz está bem dentro da capacidade de um médico hábil usando as técnicas e orientação proporcionadas no presente documento. Doses terapêuticas dependerão, entre outros fatores, da idade e condição geral do indivíduo, da severidade do fenótipo de coagulação sanguínea aberrante, e

da resistência das sequências de controlo que regulam os níveis de expressão do polipéptido de variante de zimogénio/protease. Desse modo, uma quantidade terapêuticamente eficaz em seres humanos cairá numa faixa relativamente vasta que pode ser determinada por um médico com base na resposta de um paciente individual para tratamento de zimogénio/protease com base em vetor.

D. Administração

Os polipéptidos de variante de Fator X, sozinhos ou em combinação com outros agentes, podem ser infundidos diretamente num paciente num veículo biológico apropriado como mais acima descrito. Vetores de expressão da presente invenção que compreendem as sequências de ácido nucleico que codificam a variante de zimogénio/protease, ou fragmentos funcionais das mesmas, podem ser administrados a um paciente por uma variedade de meios (veja-se a seguir) para alcançar e manter um nível profilático e/ou terapêuticamente eficaz do polipéptido de zimogénio/protease. Alguém versado na técnica poderia facilmente determinar os protocolos específicos para usar os vetores de expressão de codificação de zimogénio/protease da presente invenção para o tratamento terapêutico de um paciente particular. Protocolos para a geração de vetores adenovirais e administração em pacientes foram descritos nas patentes US N° 5.998.205; 6.228.646; 6.093.699; 6.100.242; e Pedidos de Patente Internacionais N° WO 94/17810 e WO 94/23744.

Vetores adenovirais de codificação da variante de zimogénio/protease podem ser administrados a um paciente por quaisquer meios conhecidos. A libertação direta das composições farmacêuticas *in vivo* pode, em geral, ser realizada por meio de injeção usando uma seringa

convencional, embora outros métodos de libertação tais como libertação de transmissão intensificada sejam visados (Veja-se por exemplo, Patente US N° 5.720.720). Nesta consideração, as composições podem ser libertadas subcutânea, epidérmica, intradérmica, intratecal, intra-orbital, intramucosal, intraperitoneal, intravenosa, intra-arterial, oral, intra-hepática ou intramuscularmente. Outros modos de administração incluem administração oral e pulmonar, supositórios, e aplicações transdérmicas. Um clínico especializado no tratamento de pacientes com distúrbios de coagulação sanguínea pode determinar a via ótima para administração dos vetores adenovirais que compreende sequências de ácido nucleico de zimogénio/protease com base em vários critérios, incluindo, mas não limitados a: a condição do paciente e o propósito do tratamento (por exemplo, coagulação sanguínea intensificada ou reduzida).

Também se descrevem no presente documento vetores de AAV que compreendem uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipéptido de variante de zimogénio/protease.

Também se descrevem lentivírus ou vetores de lentivírus de pseudo-tipo que compreendem uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipéptido de variante de zimogénio/protease.

Também se descrevem plasmídeo desprotegidos ou vetores de expressão que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipéptido de variante de zimogénio/protease.

EXEMPLO 1**VARIANTE DE ZIMOGENIO/PROTEASE DE FATOR XA**

Processamento proteolítico das proteínas de plasma de precursor para afetar ativação é uma conspicuidade de coagulação sanguínea. O paradigma para este tipo de mecanismo de ativação é a transição de zimogénio para protease na família de serina protease semelhante à quimiotripsina. Clivagem de ligação num local altamente conservado (Arg15-Ile16; sistema de numeração de quimiotripsina) desmascara um novo término N que atua como um ligando intramolecular para Asp194 (Figura 2). Esta ponte de sal nova resulta ou está associada a uma alteração conformacional e ordenamento do assim chamado "domínio de ativação", alças de superfície que consistem em cavidade de especificidade de S1, orifício de oxianião, alça de autólise, e local de ligação de sódio (Figura 3). Está bem documentado no sistema de tripsina que formação de ponte de sal interna de Ile16-Asp194 é alostericamente ligada ao local de especificidade de S1; ou seja alterações num local influencia o outro local e vice-versa.

Os princípios básicos da transição de zimogénio para enzima ativa para serina proteases no nível estrutural estão bem documentados, particularmente para quimiotripsina e tripsina e estes exemplos servem como o paradigma para a família de serina protease. Aspectos gerais podem ser resumidos como segue (veja-se Figura 2): 1) a estrutura (-80-85 %) do zimogénio é relativamente similar a protease; 2) a transição é iniciada seguindo libertação de um término N altamente conservado (por exemplo, Ile16-Val-Gly-Gly19); 3) o novo grupo α -amino (Ile 6) é enterrado num ambiente hidrofóbico e seu nitrogénio de α -amino forma uma ponte de sal interna com Asp194; 4) a posição de Asp194

significativamente altera sob rotação de ativação de zimogénio a $\sim 170^\circ$; e 5) esta ponte de sal interna resulta ou está associada a uma alteração conformacional no assim-chamado "domínio de ativação", alças expostas de superfície que consistem em resíduos 16-19, 142-153, 184-194, e 216-223; e parcialmente que compreende o local de especificidade de S1 (nomenclatura de Schechter e Berger (1967) *Bochem. Biophys. Res. Comm.* 43:694-702) e orifício de oxianião. Vários estudos indicam que o zimogénio e a enzima madura existem num equilíbrio, com $K_{eq} = \sim 10^8$ a favor do zimogénio. Bode e colaboradores demonstraram elegantemente que tripsinogénio pode adotar uma estrutura ativa semelhante à tripsina sob ligação de ligando forte à cavidade de especificidade de S1 ou ligantes adequados com afinidade alta pela fenda de Ile16. Exemplos adicionais desta indução sem clivagem da ligação de Arg/Lys15-Ile16 incluem a ligação de estreptocinase a plasminogénio, estafilocoagulase a protrombina, e um auto-anticorpo recentemente descrito a protrombina (Madoiwa *et al.* (2001) *Blood* 97:3783-3789). Coletivamente estes estudos indicam que serinas proteases, até mesmo em sua forma de zimogénio, pode adotar funções semelhantes à protease dependendo de várias condições ambientais, isto é, ligação de ligante forte ao zimogénio.

É bem conhecido que a ativação de FX resulta em alterações conformacionais principais no domínio de serina protease que é acompanhado pela habilidade da protease ligar com maior afinidade às sondas S1- direcionadas e FVa ligado à membrana (1-6). O(s) mecanismo(s) moleculares) geral(is) que governa(m) a transição das serina proteases é/são em geral assumido(s) seguir ao do sistema de tripsina. Porém, isto pode não ser uniformemente o caso. TPA de cadeia simples emprega uma estratégia molecular diferente para manter seu estado semelhante a zimogénio (8-

11). Análise de pares de zimogénio/protease envolvidos em coagulação sanguínea, particularmente FVII/FVIIa, indica que várias diferenças existem nesta transição em comparação com o sistema de tripsina (12). Embora vários determinantes estruturais em FXa sejam parte do assim chamado domínio de ativação, está correntemente incerto se a formação destes locais está ligada diretamente ao zimogénio para transição de protease. Um modelo recentemente descrito do Fx de zimogénio sugere porém que vários destes elementos podem ser desordenados no zimogénio (13). Comparação do modelo de zimogénio com a enzima ativa revela que resíduos que compõem as alças de Ca^{2+} (Asp70-Glu80), Na^+ (Ala183-Asp194; Gly219-Gly226) e de autólise (Thr144-Arg150) sofrem alterações principais em suas posições da cadeia principal na transição de zimogénio para protease. Uma vez que já está bem documentado, pelo menos para tripsinogénio/tripsina, que o local de especificidade de S1 e a formação de Ile16-Asp194 são alostericamente ligados, é razoável levantar a hipótese que outros elementos do domínio de ativação estão também ligados à transição de zimogénio para protease. No exemplo presente, projetou-se experiências para testar a hipótese que desestabilização da ponte de sal interna de Ile16-Asp194 fazendo alterações na posição 16, 17, ou 194 altera o local ativo clivado fazendo a variante resultante "semelhante a zimogénio". Também foi levantada a hipótese que estas alterações alostericamente modularão o FVa ligante.

Materiais e Métodos

Expressão de Fator Xa

Embora haja vários relatórios na literatura na expressão de rFX, a maioria tem contado com versões truncadas ou não tem proporcionado caracterização adequada

(15-20). Tentativas iniciais para expressar rFX em células de HEK 293 resultaram em níveis de expressão na faixa de 1-2 mg de rFX/L de meios condicionados; porém, apenas foram encontrados 10-40 % do material produzido serem completamente γ -carboxilados (21). O material restante não mostrou nenhuma γ -carboxilação. Tirou-se proveito das afinidades de ligação diferentes dos pró-péptidos dependentes de vitamina K para a carboxilase e foi levantada a hipótese que uma vez que o pró-péptido de protrombina exibe a afinidade mais baixa para a carboxilase, trocando o pró-péptido de FX (afinidade mais alta) com que o da protrombina pode intensificar a γ -carboxilação permitindo maior giro de substrato (22, 23). Usando este vetor novo, os transfetantes estáveis de células HEK 293 foram selecionados, expandidos, e rFX foi purificado através de cromatografia de imunoafinidade. Eluição de fosfato de hidroxapatita foi usada para separar o material carboxilado do material não-carboxilado. Os resultados, obtidos agora de mais de 30 linhagens celulares estáveis indicam que em ~80-90 % em média do rFX são completamente γ -carboxilados comparados a 10-40 % usando o pró-péptido de FX nativo. Estes resultados foram publicados recentemente e esta estratégia tem subsequentemente sido empregada por pelo menos um outro laboratório (24,25). Desse modo, usando este sistema de expressão novo, são agora produzidas quantidades em miligramas (15- 25 mg de rFX completamente γ -carboxilado de ~10 L de meios condicionados) de proteína para estudos pormenorizados de estrutura/função.

Ensaio de Enzima

Concentrações de enzima serão determinadas através de titulação de local ativo com p-guanidinobenzoato de p-nitrofenilo (IIa) ou mono-p-guanidinobenzoato de

fluoresceína (FXa) (26, 27). Atividade de substrato cromogénico de FXa, na presença ou ausência de vários inibidores, será medida das taxas iniciais de hidrólise de Spectrozyme FXa, S-2222, ou S-2765 como previamente descrito (14). Parâmetros cinéticos serão determinados por ajuste de quadrados mínimos dos dados de taxa iniciais às equações apropriadas.

Geração de Variantes de FXa

Os mutantes de FX foram gerados usando o kit de mutagénese dirigida ao local de alteração-rápida (Stratagene) e o ADNc de FX inteiro foi sequenciado para verificar a identidade do produto. Os vários plasmídeos foram transientemente transfectados em células HEK 293 usando Lipofectamina-2000. 48 h pós-transfecção, meios foram colhidos e os níveis de antigénio de FX foram determinados usando um ELISA FX-específico e atividade de FXa foi avaliada através de ensaio cromogénico antes da ativação por RVV-X ou através de fator de tecido-FVIIa.

RESULTADOS

Geração de espécies de FXa distribuídas ao longo da via de transição de zimogénio-protease é esboçada no Quadro 1. Resultados da transfecção transiente indicam que geram-se uma série de variantes de FXa com quantidades variáveis de atividade, variando de ~25 % a < 1 %. Levantou-se a hipótese que estas diferenças na atividade provavelmente reflitam variantes de FX que são deslocadas em graus variados ao longo do zimogénio para transição de protease. Declarado diferentemente, a ponte de sal interna de Ile16-Asp194 é estabilizada em graus variados dependendo do aminoácido nas posições 16, 17 ou 194. Foram selecionadas três destas variantes (rFXa116L, FXa116G e FXaV17A) para

caracterização adicional.

Quadro 1: Ativação de Várias Variantes de rFX com RVV-X e

Construções	^a [FX] (nM)	% wt- Antigénio	TF-FVIIa			
			Ativação de FX com RW- X:		Ativação de FX com TF- FVIIa:	
			^b Atividade de FXa (nM)	^c % wt	^b Atividade de FXa (nM)	^c % wt
rwt-FX	54,07	100,00	10,95	100,00	18,905	100,00
Ile16-Leu	24,88	46,03	0,25	5,00	0,572	6,57
Ile16-Phe	49,48	91,51	0,01	0,08	0,004	0,02
Ile16-Asp	12,04	22,27	0,01	0,22	0,000	0,00
Ile16-Gly	27,88	51,56	0,00	0,05	0,037	0,38
Val17-Leu	28,18	52,12	1,22	21,33	3,003	30,48
Val17-Ala	55,88	103,36	0,34	3,02	1,029	5,27
Val17-Gly	47,76	88,34	0,02	0,21	0,036	0,22
Asp194-Asn	17,32	32,04	0,03	0,79	0,000	0,00
Asp194-Glu	30,97	57,29	0,02	0,27	0,000	0,00

^a Níveis de antigénio são calculados de um ELISA FX-específico e expressos como nM de FX

^b Níveis de atividade de FXa são com base na taxa de hidrólise de substrato de peptidilo seguindo ativação por RVV-X ou TF-FVIIa de uma variante de FX dada e taxas iniciais de hidrólise são em comparação com a curva padrão de FXa

^c valores de % em peso são com base na comparação aos níveis de atividade FXa do tipo selvagem. Os valores foram ajustados para os níveis de antigénio.

As linhas celulares estáveis em células HEK293 foram estabelecidas e cada um dos zimogénios foram purificados de 10 L de meios condicionados (14, 24). As variantes foram ativadas com RVV-X e subsequentemente purificadas através de cromatografia de filtração em gel (14,24). SDS-PAGE das variantes antes e seguindo ativação (reduzindo e não reduzindo) é mostrada na Figura 4.

Focalizou-se primeiro em avaliar alterações no ambiente do local ativo de cada uma das variantes usando sondas específicas que alvejam esta região de FXa. Estudos cinéticos usando substratos de peptidilo e sondas direcionadas por local ativo revelaram que FXa116L e FXaV17A têm uma habilidade prejudicada para ligar-se a estas sondas (aumento de 15 a 25 vezes na Km ou Ki), enquanto a taxa de catálise (kcat) foi reduzida em 3 vezes,

comparada ao FXa do tipo selvagem (derivado de plasma e recombinante) (Quadros 2 e 3). O Fator Xa116G não foi inibido por nenhuma das sondas examinadas e sua atividade cromogénica foi prejudicada severamente (500 a 1000 vezes) impedindo o cálculo dos parâmetros cinéticos. Estes dados são consistentes com a ideia que desestabilização de formação da ponte de sal interna (Ile16-Asp194), influencia ligar no local de especificidade de S1. Em contraste com estes resultados, o conjunto de FXa116L e FXaV17A em protrombinase completamente restabeleceu a K_m quase para substratos de peptidilo enquanto a k_{cat} ainda era 3 vezes reduzida, indicando que ligação de FVa pode resgatar ligação no local ativo (Quadros 2 e 3). Surpreendentemente até mesmo o valor de K_m para I16G quase foi restabelecido completamente (aumento de 3 vezes comparado a FXa do tipo selvagem) quando agrupado em protrombinase; porém uma redução de 60 vezes na k_{cat} foi observada.

Quadro 2: Constantes de cinética para clivagem de substrato cromogénico

Espécies de enzima	K_m (μM) $\pm$ DP	K_{cat} (sec^{-1}) $\pm$ DP
Fator Xa		
rwtFXa	88,8 $\pm$ 11,4	215 $\pm$ 13,5
rFXa ^{v17A}	1377 $\pm$ 332	71,6 $\pm$ 13,5
rFXa ^{116L}	15X 1149 $\pm$ 244	3X 57,3 $\pm$ 3,1
rFXa ^{116G}	1608 $\pm$ 423	0,28 $\pm$ 0,05
Protombinase		
rwtFXa	130 $\pm$ 11	141 $\pm$ 3,7
rFXa ^{v17A}	362 $\pm$ 42	3X 68,2 $\pm$ 9,7
rFXa ^{116L}	3X 296 $\pm$ 54	32,5 $\pm$ 3,1
rFXa ^{116G}	433 $\pm$ 31	60X 1,92 $\pm$ 0,05

Para experiências em que o fator Xa livre foi usado, 2,0 nM de fator Xa do tipo selvagem ou 6,0 nM de mutante foram incubados com concentrações crescentes de Spectrozyme FXa e para experiências em que protrombinase

<i>Espécies</i>	<i>de</i>	<i>K_m (μM) ± DP</i>	<i>Kcat (sec⁻¹) ± DP</i>
foi utilizada 5,0 nM de fator Xa do tipo selvagem ou mutante foram incubados com 30 nM de fator Va, 50 μM de PCPS e concentrações crescentes de substrato (10 a 500 μM). Atividade cromogénica foi avaliada monitorando o aumento na absorvância em 405 nm com o tempo. Os erros nas constantes ajustadas representam limites de confiança de 95 %.			

Consistentes com estes dados, estudos cinéticos usando protrombina revelaram que os valores de K_m obtidos para cada uma destas variantes agrupadas na protrombinase foram essencialmente equivalentes à enzima do tipo selvagem, enquanto os valores de k_{cat} onde reduzidos a uma extensão similar como para os substratos cromogénicos (Quadro 4). Considerados juntos, os resultados indicam que a transição de zimogénio para protease para FX não só influencia a formação do local de S1, mas também contribui de um modo substancial para a formação de um local de ligação de FVa. Uma vez que ligação direta destas variantes de FXa para FVa resgata ligação no local de S1, ligação alostérica provavelmente existe entre estes locais. Coletivamente estes estudos ilustraram um único modo para modificar a via de transição de zimogénio para protease e revelaram um possível modo para desenvolver formas semelhantes a zimogénio das enzimas que são "ativadas" seguindo ligação de ligante forte tal como proteínas de co-fator.

Quadro 3: Constantes de cinética para inibição de FXa e protrombinase

Protrombinase			
Espécies de enzima	K_i (μM) $\pm$ DP		k_2 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) $\pm$ SD $\times 10^3$
Fator Xa	Pefabloc tPA/Xa	Para-amino benzamidina III	Antitrombina III
rwFXa	0,070 $\pm$ 0,002	78,1 $\pm$ 1,5	1,37 $\pm$ 0,02
rFXa ^{V17A}	25X 1,695 $\pm$ 0,072	11X 996 $\pm$ 37	19X 0,09 $\pm$ 0,003
rFXa ^{I16L}	1,701 $\pm$ 0,065	726 $\pm$ 40	0,06 $\pm$ 0,001
Protrombinase			
rwFXa	0,050 $\pm$ 0,002	48,6 $\pm$ 0,6	0,28 $\pm$ 0,01
rFXa ^{V17A}	5X 0,295 $\pm$ 0,013	3X 191 $\pm$ 6,4	4X 0,05 $\pm$ 0,001
rFXa ^{I16L}	0,209 $\pm$ 0,005	143 $\pm$ 9,0	0,09 $\pm$ 0,003

Quadro 4: Constantes de cinética para clivagem de protrombina

Espécies de enzima	K_m $\pm$ DP (μM)	$V_{\max}/E_t$ $\pm$ DP (nM Ila/min/nM E)	$V_{\max}/E_t \cdot K_m$ ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
pdFXa	0,42 $\pm$ 0,02	2424 $\pm$ 54	96
rFXa	0,35 $\pm$ 0,01	1937 $\pm$ 26	92
FXa ^{V17A}	0,47 $\pm$ 0,03	887 $\pm$ 26	3X 31
FXa ^{I16L}	0,31 $\pm$ 0,02	619 $\pm$ 14	33

Os resultados obtidos com o substrato cromogénico e os inibidores direcionados ao local ativo indicam que as variantes de FXa semelhantes a zimogénio ligam às sondas de local ativas com afinidade reduzida. Porém, o conjunto destas variantes em protrombinase melhora significativamente a afinidade para as sondas de local ativo, sugerindo que ligante de FVa pode resgatar ligação no local ativo. A seguir investigou-se se o contrário é também verdadeiro, ou seja, ocupação do local ativo semelhante a zimogénio influencia ligação a FVa. Para avaliar esta hipótese mediu-se as constantes de ligação entre FVa e FXaI16L e FXaV17A. Para realizar isto incubou-

se FVa com um derivado fluorescente de FXa do tipo selvagem inativo na presença de vesículas de fosfolípido sintéticas e iões de Ca^{2+} . A formação dos complexos resulta no aumento do sinal fluorescente com relação a FXa fluorescente sozinho. Depois adicionou-se concentrações crescentes de um FXa não-fluorescente que, se puder ligar a FVa, deslocará o FXa fluorescente, que resulta numa diminuição do sinal fluorescente. Como um controlo foi adicionado FXa de S195A como um competidor. Este mutante é inativo porque está faltando o Ser da tríade catalítica, mas tem uma afinidade alta para o FVa (Quadro 5). Em contraste, quando adicionou-se FXaI16L ou FXaV17A a afinidade destas variantes semelhantes a zimogénio para FXa foi significativamente reduzida comparada a FXaS195A (Quadro 5). A seguir examinou-se se a ocupação covalente do local ativo de FXaI16L poderia restabelecer ligação a FVa. Para fazer isto foram modificamos o local ativo de FXa do tipo selvagem e FXaI16L com um inibidor irreversível (EGR-clorometil cetona) e depois repetiu-se a experiência. Os dados mostram que o local ativo bloqueou as membranas de FVa ligadas a FXaI16L com a mesma afinidade que o local ativo do tipo selvagem bloqueou FXa. Isto indica que ocupação do local ativo de FXa semelhante a zimogénio tem uma influência direta na ligação a FVa.

Quadro 5: Constantes de ligação de equilíbrio para o conjunto de protrombinase

<i>Espécies de enzima</i>	<i>$K_d \pm DP (nM)$</i>
rFXa^{S195A}	1,34 $\pm$ 0,17
rFXa^{V17A}	7,25 $\pm$ 0,65
rFXa^{I16L}	13,81 $\pm$ 1,07
EGR-FXa	1,80 $\pm$ 0,42
EGR-FXa^{I16L}	1,92 $\pm$ 0,20

Com base na observação que os derivados de FXa

semelhantes a zimogénio têm reatividade fraca com sondas local ativo-direcionadas e inibidores na ausência de FVa, mas aparentemente atividade quase normal quando as variantes são agrupadas em protrombinase, a seguir avalia-se a atividade de FXaM6L num ambiente de plasma. Plasma hemofílico A (dados não mostrados) ou B teve picos com FXa do tipo selvagem para corrigir o tempo de coagulação (aPTT) destes plasmas; 0,1 nM de FXa do tipo selvagem deram um tempo de coagulação de ~32 seg. A adição da mesma concentração de FXa16L deu um tempo de coágulo de ~42 seg, que é ~50 - 70 % da atividade relativa a FXa do tipo selvagem, sugerindo que esta variante semelhante a zimogénio tem atividade de coagulação quase normal no plasma. A seguir foi monitorada a semivida de FXa do tipo selvagem e FXa16L em plasma de hemofilia B. As proteínas foram adicionadas ao plasma de HB e em pontos de tempo diferentes, uma alíquota da mistura foi retirada e ensaiada num ensaio baseado em aPTT. Os resultados com plasma de HB mostram que a atividade residual relativa de FXa do tipo selvagem foi inibida muito rapidamente (< 2-min) (Figura 6). Em contraste, a atividade de FXa16L persistiu por muito mais tempo com uma semivida estimada de >2 horas. Foram encontrados resultados similares com plasma de hemofilia A. Estes resultados sugerem que é possível modular as características de uma enzima de forma que ela tenha uma semivida longa no plasma e pode corrigir o tempo de coagulação de um plasma hemofílico.

A seguir foi avaliada a habilidade de FXa16L semelhante a zimogénio modular hemóstase num modelo murino de hemofilia (Schlachterman *et al.*, 2005, *J. Thromb. Haemost.*, 3, 2730-2737). O valor de aPTT de ratinhos com hemofilia B (C57BL/6) é aproximadamente 50-55 seg. O Fator Xa16L (200 µg/kg; n = 7) ou PBS (n = 4) foi injetado por meio da veia de cauda de ratinhos com hemofilia B. Em

pontos de tempo selecionados (5 e 30 min) sangue foi colhido e um aPTT foi executado em todas as amostras. Como mostrado na Figura 7, infusão de FXall6L resultou em correção completa do aPTT para níveis vistos em animais normais. Este efeito foi contínuo por pelo menos 30 min indicando que a molécula tem uma meia-vida relativamente longa *in vivo*. Infusão de PBS teve apenas um efeito marginal. Estes dados são consistentes com as experiências *in vitro* em plasma acima e indicam que de fato FXall6L e possivelmente outras variantes de FXa semelhantes a zimogénio podem modular hemóstase eficazmente *in vivo*.

Para também testar a eficácia de FXall6L *in vivo*, foi examinado se esta molécula poderia corrigir o tempo de hemorragia de ratinhos com hemofilia B seguindo lesão na cauda (Schlachterman, et al., 2005, J. Thromb. Haemost., 3, 2730-2737). Perda de sangue foi medida durante um período de 10 min seccionando a parte distal da cauda. Neste tipo de ensaio, a perda de sangue é mínima em ratinhos Balb-c normais do tipo selvagem (n = 7) e bastante substancial em ratinhos injetados com PBS (n = 6) com hemofilia B (Balb c) seguindo a lesão da cauda (Figura 8). Em contraste, injeção de 450 µg/kg de FXall6L significativamente reduziu a quantidade total de perda de sangue seguindo a lesão da cauda (n = 7). Considerados juntos, estes dados fornecem evidência que FXall6L tem a habilidade para melhorar hemóstase em pacientes com hemofilia A ou B.

REFERÊNCIAS

1. Furie, B. e Furie, B. C. (1976) Spectral changes in bovine factor X associated with activation by the venom coagulant protein *Vipera russelli*. J. Biol. Chem. 251, 6807-6814.
2. Robison, D., Furie, B., Furie, B. C., e Bing, D. H.

(1980) Active site of bovine factor X. Characterization using substituted benzamidines as competitive inhibitors and affinity-labeling reagents. J. Biol. Chem. 255, 2014-2021.

3. Keyt, B., Furie, B. C., e Furie, B. (1982) Structural transitions in bovine factor X associated with metal binding and zymogen activation. Studies using conformational-specific antibodies. J. Biol. Chem. 257, 8687-8695.

4. Persson, E., Valcarce, C., e Stenflo, J. (1991) The γ -carboxyglutamic acid and epidermal growth factor-like domains of factor X. Effect of isolated domains on prothrombin activation and endothelial cell binding of factor X. J Biol Chem 266, 2458.

5. Persson, E., Hogg, P. J., e Stenflo, J. (1993) Effects of Ca^{2+} binding on the protease module of factor Xa and its interaction with factor Va: evidence for two Glu-independent Ca^{2+} binding sites in factor Xa. J Biol Chem 268, 22531-22539.

6. Dahlbäck, B. e Stenflo, J. (1978) Binding of bovine coagulation factor Xa to platelets. Biochemistry 17, 4938-4945.

7. Miletich, J. P., Jackson, C. M., e Majerus, P. W. (1978) Properties of the factor Xa binding site on human platelets. J. Biol. Chem. 253, 6908-6916.

8. Madison, E., Kobe, A., Gething, M., Sambrook, J. F., e Goldsmith, E. (1993) Converting tissue plasminogen activator to a zymogen: A regulatory triad of Asp-His-Ser. Science 262, 419-421.

9. Tachias, K. e Madison, E. (1996) Converting tissue-type plasminogen activator into a zymogen. J. Biol. Chem. 271, 28749-28752.

10. Tachias, K. e Madison, E. (1997) Converting tissue type plasminogen activator into a zymogen. Important role of Lys156 J. Biol. Chem. 272, 28-31.

11. Renatus, M., Engh, R. A., Stubbs, M. T., Huber, R., Fischer, S., Kohnert, U., e Bode, W. (1997) Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. EMBO J 16, 4797-4805.
12. Eigenbrot, C., Kirchhofer, D., Dennis, M. S., Santell, L., Lazarus, R. A., Stamos, J., e Ultsch MH (2001) The factor VII zymogen structure reveals reregistration of beta strands during activation. Structure 9, 627-636.
13. Venkateswarlu, D., Perera, L., Darden, T., e Pedersen, L. G. (2002) Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X. Biophys.J 82, 1190-1206.
14. Camire, R. M. Prothrombinase assembly and S1 site occupation restore the catalytic activity of FXa impaired by mutation at the sodium-binding site. (2002) J. Biol. Chem. 277, 37863-37870.
15. Rezaie, A. R., Neuenschwander, P. F., Morrissey, J. H., e Esmon, C. T. (1993) Analysis of the functions of the first epidermal growth factor-like domain of factor X. J Biol Chem 268, 8176-8180.
16. Rezaie, A. R. e Esmon, C. T. (1994) Asp-70 to Lys mutant of factor X lacks high affinity Ca²⁺ binding site yet retains function. J. Biol. Chem. 269, 21495-21499.
17. Rezaie, A. R. e Esmon, C. T. (1995) Contribution of residue 192 in factor Xa to enzyme specificity and function. J. Biol. Chem. 270, 16176-16181.
18. Rezaie, A. R. (1996) Role of residue 99 at the S2 subsite of factor Xa and activated protein C in enzyme specificity. J. Biol. Chem. 271, 23807-23814.
19. Rezaie, A. R. (2000) Identification of basic residues in the heparin-binding exosite of factor Xa critical for heparin and factor Va binding. J. Biol. Chem. 275, 3320-3327.

20. Rezaie, A. R. e He, X. (2000) Sodium binding site of factor Xa: Role of sodium in the prothrombinase complex. *Biochemistry* 39, 1817-1825.
21. Larson, P. J., Camire, R. M., Wong, D., Fasano, N. C., Monroe, D. M., Tracy, P. B., e High, K. A. (1998) Structure/function analyses of recombinant variants of human factor Xa: Factor Xa incorporation into prothrombinase on the activated platelet surface is not mimicked by synthetic phospholipid vesicles. *Biochemistry* 37, 5029-5038.
22. Stanley, T. B., Jin, D. Y., Lin, P., e Stafford, D. W. (1999) The propeptides of the vitamin K-dependent proteins possess different affinities for the vitamin K-dependent carboxylase. *J. Biol. Chem.* 274, 16940-16944.
23. Stanley, T. B., Humphries, J., High, K. A., e Stafford, D. W. (1999) Amino acids responsible for the reduced affinities of vitamin K-dependent propeptides for the carboxylase. *Biochemistry* 38, 15681-15687.
24. Camire, R. M., Larson, P. J., Stafford, D. W., e High, K. A. (2000) Enhanced γ -carboxylation of recombinant factor X using a chimeric construct containing the prothrombin propeptide. *Biochemistry* 39, 14322-14329.
25. Zhong, D., Bajaj, M. S., Schmidt, A. E., e Bajaj, S. P. (2001) The N-terminal EGF-like domain in factor IX and factor X represents an important recognition motif for binding to tissue factor. *J. Biol. Chem.* 277, 3622-3631.
26. Chase, T. e Shaw, E. (1969) Comparison of the esterase activities of trypsin, plasmin, and thrombin on guanidinobenzoate esters. Titration of the enzymes. *Biochemistry*. 8, 2212-2224.
27. Bock, P. E., Craig, P. A., Olson, S. T., e Singh, P. (1989) Isolation of human blood coagulation α -factor Xa by soybean-trypsin inhibitor-Sepharose chromatography and its active-site titration with fluorescein mono- γ -guanid-

inobenzoate. Arch. Bioch. Biophys. 273, 375-388.

Embora certas das formas de realização preferidas da presente invenção tenham sido descritas e especificamente exemplificadas acima, a invenção não é intencionada a ser limitada por tais formas de realização.

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pelo requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- EP 0714987 A [0060]
- US 5998205 A [0071] [0083]
- US 6228646 B [0071]
- US 6093699 A [0071] [0083]
- US 6100242 A [0071] [0083]
- WO 9417810 A [0071] [0083]
- WO 9423744 A [0071] [0083]
- US 6228646 A [0083]
- US 5720720 A [0084]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- CAMIRE R. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277 (40 [0005]
- BRANDSTETTER et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 29988-29992 [0017]
- ALTSCHUL et al. *J Mol Biol*, 1990, vol. 215, 403-410, world wide web at ncbi.nlm.nih.gov/blast [0038]
- BERKNER. *Biotechniques*, 1988, vol. 6, 616-fi29 [0070]
- TRAPNELL. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1993, vol. 12, 185-199 [0070]
- MITANI ; KUBO. *Curr Gene Ther.*, 2002, vol. 2 (2), 135-44 [0071]

- **OLMSTED-DAVIS et al.** *Hum Gene Ther.*, 2002, vol. 13 (11), 1337-47 [0071]
- **REYNOLDS et al.** *Nat Biotechnol.*, 2001, vol. 19 (9), 838-42 [0071]
- **GRAHAM et al.** *J. Gen. Virol.*, 1977, vol. 36, 59-72 [0073]
- **YOUNG et al.** *The Adenoviruses*. Plenum Press, 1984, 125-172 [0073]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Pub. Co, 1990 [0078]
- **SCHECHTER ; BERGER.** *Bochem. Biophys. Res. Comm.*, 1967, vol. 43, 694-702 [0089]
- **MADOIWA et al.** *Blood*, 2001, vol. 97, 3783-3789 [0089]
- **SCHLACHTERMAN.** *J. Thromb. Haemost.*, 2005, vol. 3, 2730-2737 [0100]
- **SCHLACHTERMAN.** *J. Thromb. Haemost.*, 2005, vol. 3, 2730-2737 [0101]
- **FURIE, B. ; FURIE, B. C.** Spectral changes in bovine factor X associated with activation by the venom coagulant protein *Vipera russelli*. *J. Biol. Chem*, 1976, vol. 251, 6807-6814 [0102]
- **ROBISON, D. ; FURIE, B. ; FURIE, B. C. ; BING, D. H.** Active site of bovine factor X. Characterization using substituted benzamidines as competitive inhibitors and affinity-labeling reagents. *J.Biol.Chem.*, 1980, vol. 255, 2014-2021 [0102]
- **KEYT, B. ; FURIE, B. C. ; FURIE, B.** Structural transitions in bovine factor X associated with metal binding and zymogen activation. Studies using conformational-specific antibodies. *J.Biol.Chem.*, 1982, vol. 257, 8687-8695 [0102]
- **PERSSON, E. ; VALCARCE, C. ; STENFLO, J.** The γ -carboxyglutamic acid and epidermal growth factor-like domains of factor X. Effect of isolated domains on prothrombin activation and endothelial cell binding of

factor X. *J Biol Chem*, 1991 [0102]

- **PERSSON, E. ; HOGG, P. J. ; STENFLO, J.** Effects of Ca²⁺ binding on the protease module of factor Xa and its interaction with factor Va: evidence for two Gla-independent Ca²⁺ binding sites in factor Xa. *J Biol Chem*, 1993, vol. 268, 22531-22539 [0102]
- **DAHLBÄCK, B. ; STENFLO, J.** Binding of bovine coagulation factor Xa to platelets. *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4938-4945 [0102]
- **MILETICH, J. P. ; JACKSON, C. M. ; MAJERUS, P. W.** Properties of the factor Xa binding site on human platelets. *J.Biol. Chem.*, 1978, vol. 253, 6908-6916 [0102]
- **MADISON, E. ; KOBE, A. ; GETHING, M. ; SAMBROOK, J. F. ; GOLDSMITH, E.** Converting tissue plasminogen activator to a zymogen: A regulatory triad of Asp-His-Ser. *Science*, 1993, vol. 262, 419-421 [0102]
- **TACHIAS, K. ; MADISON, E.** Converting tissue-type plasminogen activator into a zymogen. *J.Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 28749-28752 [0102]
- **TACHIAS, K. ; MADISON, E.** Converting tissue type plasminogen activator into a zymogen. Important role of Lys156. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 28-31 [0102]
- **RENATUS, M. ; ENGH, R. A. ; STUBBS, M. T. ; HUBER, R. ; FISCHER, S. ; KOHNERT, U. ; BODE, W.** Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *EMBO J*, 1997, vol. 16, 4797-4805 [0102]
- **EIGENBROT, C. ; KIRCHHOFFER, D. ; DENNIS, M. S. ; SANTELL, L. ; LAZARUS, R. A. ; STAMOS, J. ; ULTSCH MH.** The factor VII zymogen structure reveals reregistration of beta strands during activation. *Structure*, 2001, vol. 9, 627-636 [0102]
- **VENKATESWARLU, D. ; PERERA, L. ; DARDEN, T. ;**

- PEDERSEN, L. G.** Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X. *Biophys. J.*, 2002, vol. 82, 1190-1206 [0102]
- **CAMIRE, R. M.** Prothrombinase assembly and S1 site occupation restore the catalytic activity of FXa impaired by mutation at the sodium-binding site. *J.Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 37863-37870 [0102]
 - **REZAIE, A. R. ; NEUENSCHWANDER, P. F. ; MORRISSEY, J. H. ; ESMON, C. T.** Analysis of the functions of the first epidermal growth factor-like domain of factor X. *J Biol Chem*, 1993, vol. 268, 8176-8180 [0102]
 - **REZAIE, A. R. ; ESMON, C. T.** Asp-70 to Lys mutant of factor X lacks high affinity Ca²⁺ binding site yet retains function. *J.Biol.Chem.*, 1994, vol. 269, 21495-21499 [0102]
 - **REZAIE, A. R. ; ESMON, C. T.** Contribution of residue 192 in factor Xa to enzyme specificity and function. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 16176-16181 [0102]
 - **REZAIE, A. R.** Role of residue 99 at the S2 subsite of factor Xa and activated protein C in enzyme specificity. *J.Biol.Chem.*, 1996, vol. 271, 23807-23814 [0102]
 - **REZAIE, A. R.** Identification of basic residues in the heparin-binding exosite of factor Xa critical for heparin and factor Va binding. *J.Biol.Chem.*, 2000, vol. 275, 3320-3327 [0102]
 - **REZAIE, A. R. ; HE, X.** Sodium binding site of factor Xa: Role of sodium in the prothrombinase complex. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, 1817-1825 [0102]
 - **LARSON, P. J. ; CAMIRE, R. M. ; WONG, D. ; FASANO, N. C. ; MONROE, D. M. ; TRACY, P. B. ; HIGH, K. A.** Structure/function analyses of recombinant variants of human factor Xa: Factor Xa incorporation into prothrombinase on the activated platelet surface is not mimicked by synthetic phospholipid vesicles.

- Biochemistry*, 1998, vol. 37, 5029-5038 [0102]
- **STANLEY, T. B. ; JIN, D. Y. ; LIN, P. ; STAFFORD, D. W.** The propeptides of the vitamin K-dependent proteins possess different affinities for the vitamin K-dependent carboxylase. *J.Biol.Chem.*, 1999, vol. 274, 16940-16944 [0102]
 - **STANLEY, T. B. ; HUMPHRIES, J. ; HIGH, K. A. ; STAFFORD, D. W.** Amino acids responsible for the reduced affinities of vitamin K-dependent propeptides for the carboxylase. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, 15681-15687 [0102]
 - **CAMIRE, R. M. ; LARSON, P. J. ; STAFFORD, D. W. ; HIGH, K. A.** Enhanced γ -carboxylation of recombinant factor X using a chimeric construct containing the prothrombin propeptide. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, 14322-14329 [0102]
 - **ZHONG, D. ; BAJAJ, M. S ; SCHMIDT, A. E. ; BAJAJ, S. P.** The N-terminal EGF-like domain in factor IX and factor X represents an important recognition motif for binding to tissue factor. *J.Biol. Chem.*, 2001, vol. 277, 3622-3631 [0102]
 - **CHASE, T. ; SHAW, E.** Comparison of the esterase activities of trypsin, plasmin, and thrombin on guanidinobenzoate esters. Titration of the enzymes. *Biochemistry*, 1969, vol. 8, 2212-2224 [0102]
 - **BOCK, P. E ; CRAIG, P. A. ; OLSON, S. T. ; SINGH, P.** Isolation of human blood coagulation α -factor Xa by soybean-trypsin inhibitor-Sepharose chromatography and its active-site titration with fluorescein mono- γ -guanidinobenzoate. *Arch. Bioch. Biophys*, 1989, vol. 273, 375-388 [0102]

Lisboa, 27 de Agosto de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Uma variante de Fator Xa que modula a hemóstase que compreende aminoácidos 41 a 179 e aminoácidos 235 a 488 da sequência de aminoácidos proporcionada na Figura 5, e que compreende pelo menos uma mutação de substituição, em que a dita pelo menos uma mutação de substituição inclui a substituição de Ile na posição 235 com um aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em Leu, Phe, Asp ou Gly.
2. A variante de Fator Xa de acordo com a reivindicação 1, em que a Ile na posição 235 é substituída com Leu.
3. A variante de Fator Xa como reivindicado na reivindicação 1, que compreende ainda uma mutação de substituição na Val na posição 236 ou a Asp na posição 418.
4. A variante de Fator Xa de acordo com a reivindicação 3, em que
 - a) a Val na posição 236 é Leu, Ala, ou Gly; ou
 - b) a Asp na posição 418 é Asn ou Glu.
5. A variante de Fator Xa de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência nas posições 235 a 237 é Leu-Val-Gly.
6. A variante de Fator Xa de acordo com a reivindicação 1, em que a dita pelo menos uma mutação de substituição consiste na substituição da Ile na posição 235 com um aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em Leu, Phe, Asp e Gly.
7. A variante de Fator Xa de acordo com a reivindicação 1, em que a variante de Fator Xa tem uma semivida mais longa no plasma que Fator Xa do tipo selvagem, em que o

dito Fator Xa do tipo selvagem consiste em aminoácidos 41 a 179 e 235 a 488 da sequência de aminoácidos proporcionada na Figura 5.

8. Uma variante de Fator Xa que modula a hemóstase que consiste em aminoácidos 41-179 e aminoácidos 235-488 da sequência de aminoácidos proporcionada na Figura 5 e que compreende pelo menos uma mutação de substituição, em que a dita pelo menos uma mutação de substituição inclui a substituição da Ile na posição 235 com um aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em Leu, Phe, Asp e Gly.

9. Uma variante de Fator Xa que consiste em aminoácidos 41-179 e aminoácidos 235-488 da sequência de aminoácidos proporcionada na Figura 5, em que a Ile na posição 235 da sequência de aminoácidos proporcionada na Figura 5 (posição 16 em numeração de quimotripsina) é alterada a Leu.

10. Uma composição farmacêutica que compreende a variante de Fator Xa de qualquer uma das reivindicações 1 a 9 num portador biologicamente compatível.

11. Uma variante de Fator Xa de qualquer uma das reivindicações 1 a 9 em que a ligação de substrato pelo local ativo de a dita variante de Fator Xa é mais baixa em comparação com o Fator Xa do tipo selvagem e aumenta quando a dita variante de Fator Xa é ligada pelo Fator Va no complexo de protrombinase, em que o dito Fator Xa do tipo selvagem consiste em aminoácidos 41 a 179 e 235 a 488 da sequência de aminoácidos proporcionada na Figura 5.

12. A variante de Fator Xa de qualquer uma das reivindicações 1-9 para utilização no tratamento de um distúrbio relacionado com a hemóstase.

13. A variante de Fator Xa para utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o dito distúrbio é selecionado a partir do grupo que consiste em hemofilia A, hemofilia B, deficiência de fator de coagulação, sangramento associado com lesão, traumatismo, trombose, trombocitopenia, acidente vascular cerebral, coagulopatia, e coagulação intravascular disseminada (CID).

14. Uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica a variante de Fator Xa de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a dita sequência de ácido nucleico também codifica um local de clivagem proteolítico intracelular, em que o dito local de clivagem proteolítico intracelular está entre as posições 234 e 235 da sequência de aminoácidos proporcionada na Figura 5, ou substitui o péptido de ativação.

15. Uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipéptido de Fator X (FX) humano, em que o dito polipéptido de FX compreende pelo menos uma mutação de substituição em aminoácidos 41 a 179 e 235 a 488 da sequência de aminoácidos proporcionada na Figura 5, a dita pelo menos uma mutação de substituição incluindo substituição de Ile na posição 235 com um aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em Leu, Phe, Asp, e Gly, e em que a dita sequência de ácido nucleico codifica um local de clivagem proteolítico intracelular, em que o dito local de clivagem proteolítico intracelular está entre as posições 234 e 235 da sequência de aminoácidos proporcionada na Figura 5, ou substitui o péptido de ativação.

16. A molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 15, em que a Ile na posição 235 é substituída

com Leu.

17. A molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 15, em que o dito polipéptido de FX compreende ainda pelo menos uma mutação de substituição na Val na posição 236 ou a Asp na posição 418 da sequência de aminoácidos proporcionada na Figura 5

18. A molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 17, em que o polipéptido de Fator X compreende ainda pelo menos uma modificação selecionada a partir do grupo que consiste em:

- a) a Val na posição 236 é Leu, Ala ou Gly; e
- b) a Asp na posição 418 é Asn ou Glu.

19. A molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 15, em que o dito polipéptido de FX compreende uma sequência de pró-péptido.

20. A molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 14 ou 15, em que o dito local de clivagem proteolítico intracelular é um local de clivagem de PACE/furina.

21. Um vetor de expressão que compreende a molécula de ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 14 a 20 operativamente ligada a uma sequência reguladora.

22. O vetor de expressão de acordo com a reivindicação 21, selecionado a partir do grupo que consiste num vetor adenoviral, um vetor associado a adenovírus, um vetor retroviral, um plasmídeo, e um vetor lentiviral.

23. Uma célula hospedeira que compreende a molécula de ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 14 a 20

operativamente ligada a uma sequência reguladora.

24. A célula hospedeira de acordo com a reivindicação 23, em que as ditas células hospedeiras são células CHO.

25. Um método de produção de Fator X ativado (FXa) que compreende incubar a célula hospedeira de acordo com a reivindicação 23 ou 24 e purificar o FXa produzido deste modo.

26. O FXa produzido de acordo com o método de acordo com a reivindicação 25.

27. Um Fator X ativado (FXa) obtido pela clivagem proteolítica do polipéptido de Fator X codificado pela sequência de ácido nucleico da molécula de ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 14 a 20.

Lisboa, 27 de Agosto de 2014

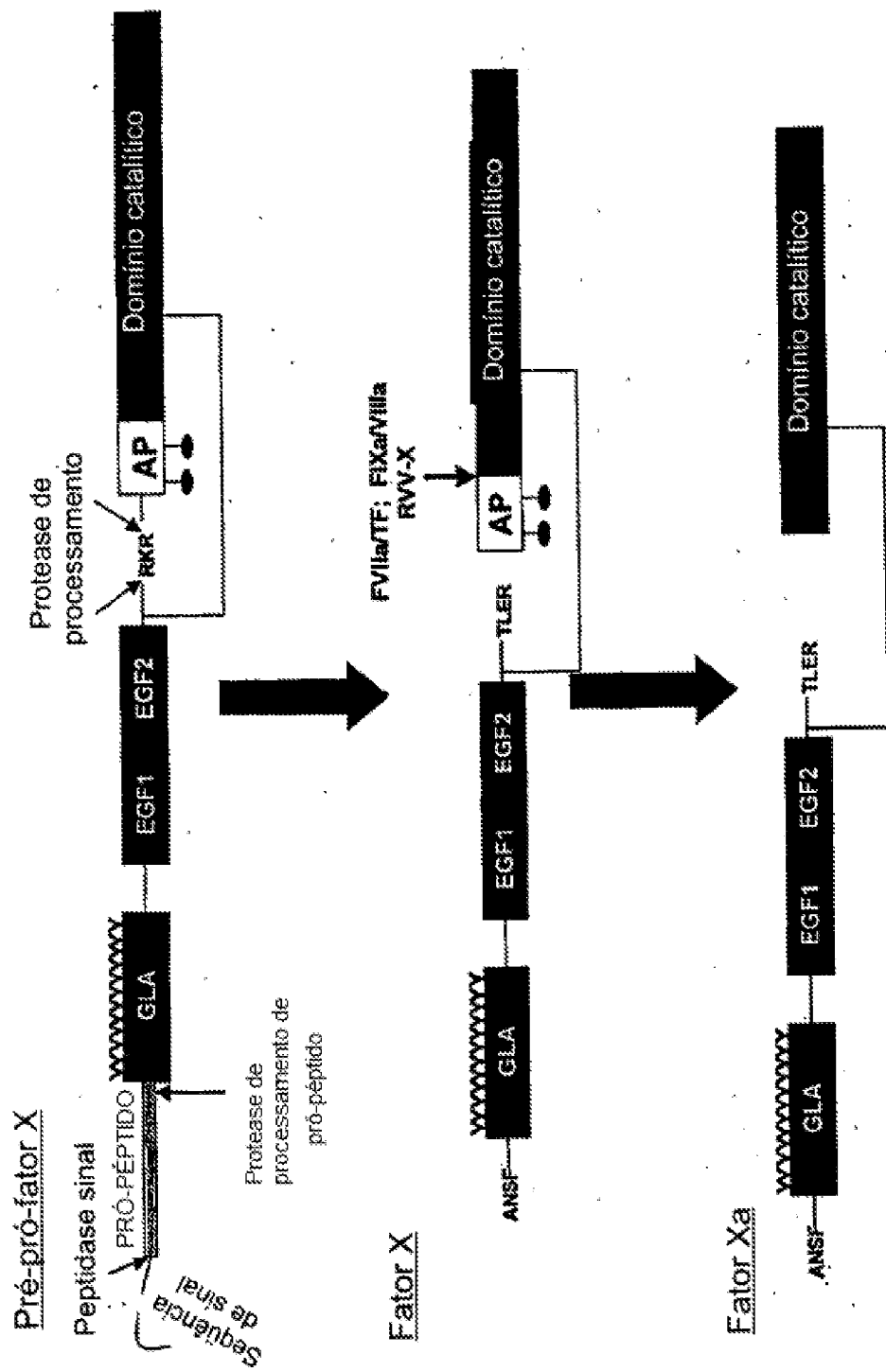


Figura 1

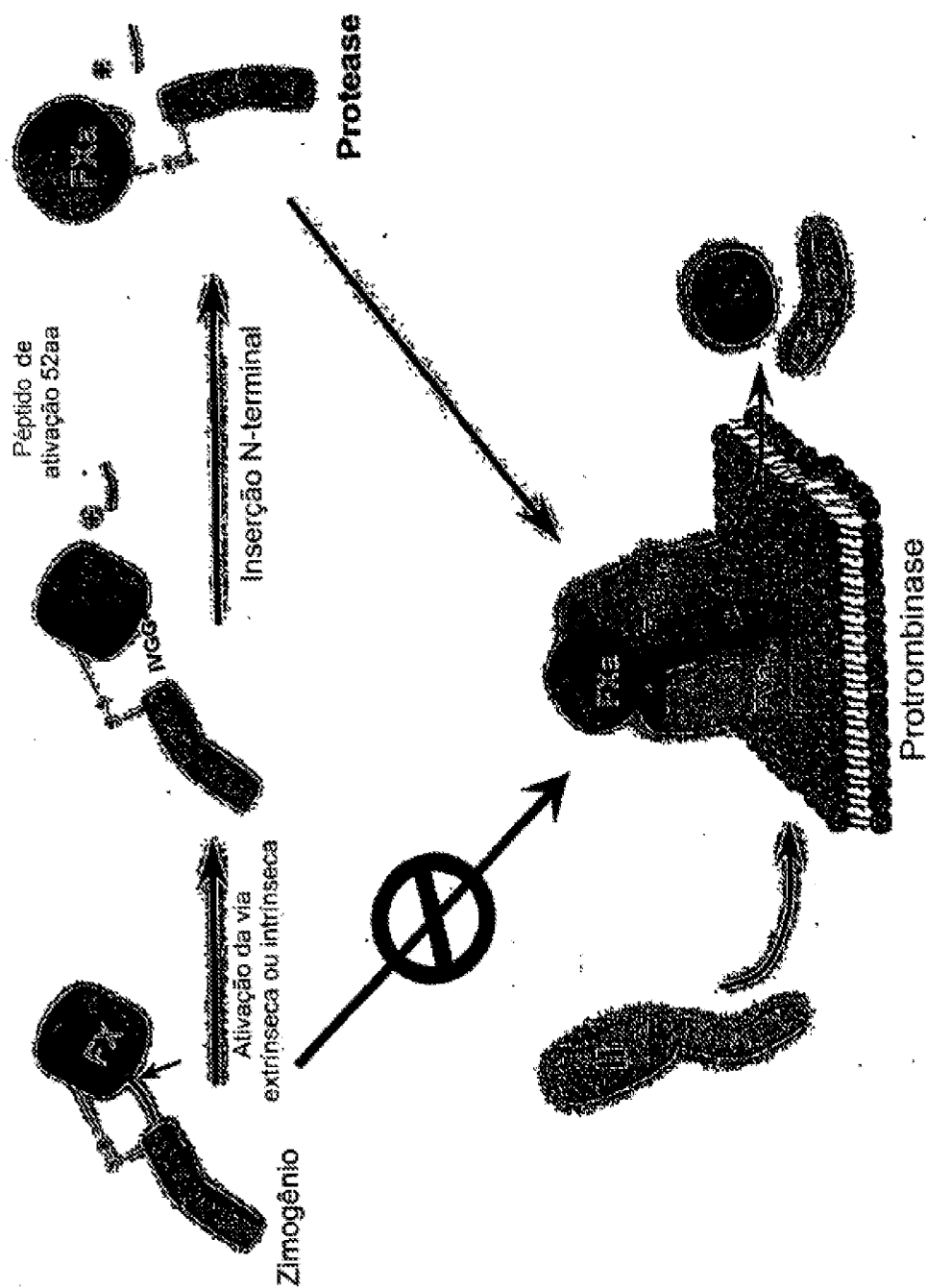


Figura 2

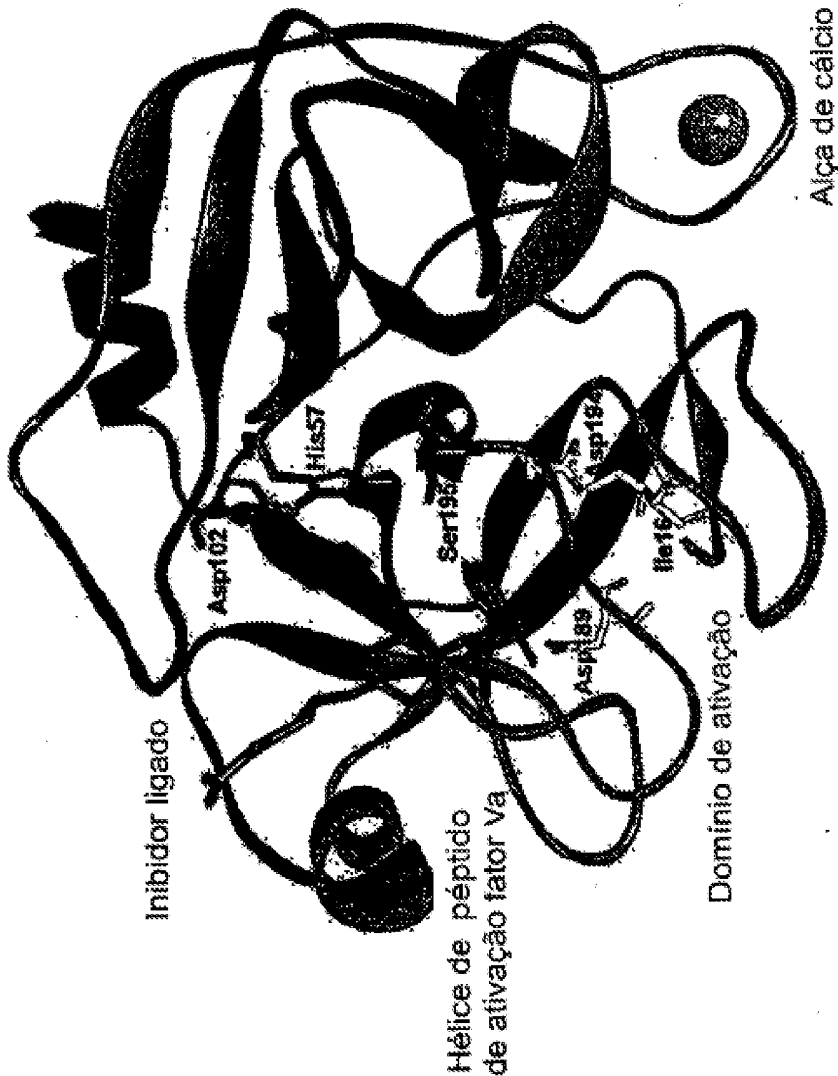


Figura 3

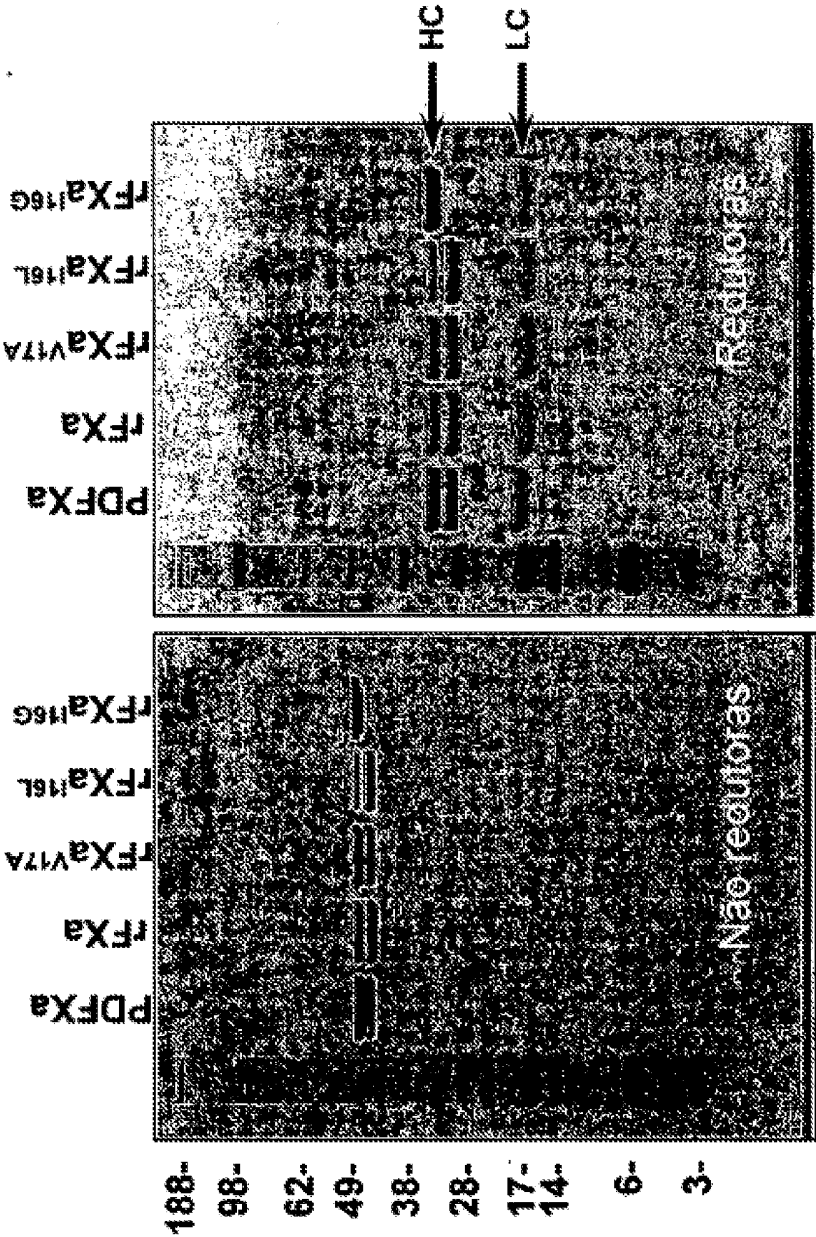


Figura 4

Figura 5A

```

MetGlyArg ProLeuHisLeu ValLeuLeu SerAlaSer LeuAlaGlyLeu LeuLeuLeu GlyGluSer
~
~
~
981 ATGGGGCGC CCACTGCACC TCGTCTGTCT CAGTGCCTCC CTGGTGGCC TCTGTCTGCT CGGGGAAAGT
TACCCCGCG GGTGACGTGG AGCAGGACGA GTCACGGAGG GACCGACCGG AGGACGACGA GCGCCCTTCA
~
~
~
LeuPheIleArg ArgGluGln AlaAsnAsn IleLeuAlaArg ValArgArg AlaAsnSer PheLeuGluGlu
~
~
~
1051 CTGTTTCATCC GCAGGGAGCA GGCCACACAC ATCCTGGCGA GGGTCAGGAG GGCCAAATCC TTCTCTGAAG
GACAGTAGG CGTCCCTCGT CCGGTGTGTG TAGGACCGCT CCCAGTCCTC CCGGTTAAGG AAGAACTTC
~
~
~
MetLysLys GlyHisLeu GluArgGluCys MetGluGlu ThrCysSer TyrGluGluAla ArgGluVal
~
~
~
1121 AGATGAAGAA AGGACACCTC GAAGAGAGT GCATGGAGA GACCTGCTCA TACGAGAGG CCCGGGAGGT
TCTACTTCTT TCTGTGGAG CTTTCTCTCA CGTACCTCT CTGGACGAGT ATGCTTCTCC GSGCGCTCCA
~
~
~
PheGluAsp SerAspLysThr AsnGluPhe TrpAsnLys TyrLysAspGly AspGlnCys GluThrSer
~
~
~
1191 CTTTGAGGAC ACCGACAAGA CGAATGAATT CTGGATATAA TACAGAGATG GCGACCAAGT TGAGACCACT
GAARCTCCCG TCGCTGTCTT GCTTACTTAA GACCTTATTT ATGTTTCTAC CGCTGGTCAC ACTCTGGTCA
~
~
~
ProCysGlnAsn GlnGlyLys CysLysAsp GlyLeuGlyGlu TyrThrCys ThrCysLeu GluGlyPheGlu
~
~
~
1261 CCTTCCACGA ACCAGGGCAA ATGTAAGAC GGCCTGGGG ANACACCTG CACCTGTTTA GAAGGATTCG
GGACGGTCT TGGTCCCGT TACATTCTCG CCGAGCCCC TTATGTGGAC GTGGACAAAT CTTCCTAAGC
~
~
~
GlyLysAsn CysGluLeu PheThrArgLys LeuCysSer LeuAspAsn GlyAspCysAsp GlnPheCys
~
~
~
1331 AAGGCAGAAA CTGTGATTTA TTCACACGGA AGCTCTGCAG CCTGGACAAC GGGGACTGTG ACCAGTCTCG
TTCCGTTTTT GACACTTAAT AAGTGTSCCT TCGAGACGTC GGACCTGTTG CCGCTGACAC TGGTCAAGAC
~
~
~
HisGluGlu GlnAsnSerVal ValCysSer CysAlaArg GlyTyrThrLeu AlaAspAsn GlyLysAla
~
~
~

```

Figura 5B

```

1401 CCACGAGGAA CAGAACTCTG TGGTGTCTCT CTGCGCCCGC GGGTACACCC TGGCTGACAA CGGCAAGGCC
    GGTGCTCCCT GTCTTGAGAC ACCACAGGAG GACGCGGGCG CCCATGTGGG ACCGACTGTT GCGGTTCGGG
    CysIleProThr GlyProTyr ProCysGly LysGlnThrLeu GluArgArg LysArgSer ValAlaGlnAla
    ~~~~~
1471 TGCATTCCCA CAGSSCCCTA CCCCTGTGGG AAACAGACCC TGGAACGCCG GAGAGGTCA GTGGCCGACG
    ACGTAAGGGT GTCCCGGGAT GGGACACCC TTTGTCTGGG ACCTTCCGTC CTCTCCAGT CACCGGGTCC
    ~~~~~
    ..ThrSerSer SerGlyGlu AlaProAspSer IleThrTrp LysProTyr AspAlaAlaAsp LeuAspPro
    ~~~~~
1541 CCACGAGCAG CACCGGGGAG GCCCTGACA GCATCACATG GAAGCCATAT GATCAGGCCG ACCTGGACCC
    GGTGTCTGTC GTGCCCCCTC CCGGACTGT CGTAGTGTAC CTTCGGTATA CTAGCTGGC TGGACCTGGG
    ~~~~~
    .ThrGluAsn ProPheAspLeu LeuAspPhe AsnGlnThr GlnProGluArg GlyAspAsn AsnLeuThr
    ~~~~~
1611 CACCGAGAAC CCCTTCGACC TGCTTCACTT CAACCCAGAG CAGCCTGAGA GGGCCGACAA CAACCTCACC
    GTGGCTCTTG GGAAGCTGG ACGAAGTGAA GTTGGTCTGC GTCGACTCT CCGCGCTGTT GTTGGAGTGC
    15 16 17 18 19
    ArgIleValGly GlyGlnGlu CysLysAsp GlyGluCysPro TrpGlnAla LeuLeuIle AsnGluGluAsn
    ~~~~~
1681 CGTATCGTGG GAGGCCAGGA ATGCAGGAC GGGGAGTCTC CCTGGCAGGC CTGTCTCATC ATGAGGAAA
    GCATAGCACC CTCGGTCTCT TACGTTCCTG CCCCTCACAG GGACCGTCCG GGACGAGTAG TTACTCCCTT
    ~~~~~
    ..GluGlyPhe CysGlyGly ThrIleLeuSer GluPheTyr IleLeuThr AlaAlaHisCys LeuTyrGln
    ~~~~~
1751 ACCAGGGTTT CTCTGGTGA ACTATCTGA GCGAGTTTA CATCCTAAGC GCAGCCCACT GTCTCTACCA
    TGCTCCCAA GACACCACCT TGATAGACT CGCTCAGAT GTAGATTGC CGTCGGTGA CAGAGATGGT
    ~~~~~
    .AlaLysArg PheLysValArg ValGlyAsp ArgAsnThr GluGlnGluGlu GlyGlyGlu AlaValHis
    ~~~~~
1821 AGCCAAGAGA TTCAGGTGA GGTAGCTGA CCGAAGCAG GAGCAGGAGG AGGCGGTGA GCGGTGCAC
    TCGGTTCTCT AAGTTCACCT CCCATCCACT GGCCTTGTGC CTCGTCTCTCC TCCCGCCACT CCGCCACGTG
    ~~~~~
    GluValGluVal ValIleLys HisAsnArg PheThrLysGlu ThrTyrAsp PheAspIle AlaValLeuArg

```

Figura 5C

```

1891 GAGGTGGAGG TGGTCATCAA GCACACCCGG TTCACAAAGG AGACCTATGA CTTCGACATC GCCGTGCTCC
CTCCACCTCC ACCAGTAGTT CGTGTGGCC AAGTGTTCC TCTGGATACT GAAGCTGTAG CGGCACGAGG
..LeuLysThr ProlleThr PheArgMetAsn ValAlaPro AlaCysLeu ProGluArgAsp TrpAlaGlu
1961 GGCTCAAGAC CCCCATCACC TTCCGCATGA AGTGGGGCC TGCCTGCCTC CCCGAGCGTG ACTGGGCCGA
CCGAGTTCTG GGGGTAGTGG AAGGCTACT TGCACCGGG ACGGACGGAG GGCTCGCCAC TGACCCGGCT
.SerThrLeu MetThrGlnLys ThrGlyIle ValSerGly PheGlyArgThr HisGluLys GlyArgGln
2031 GTCCACGCTG ATCAGGCAGA AGACGGGGAT TGTGAGCGGC TTCGGGGCGCA CCCACGAGAA GGSCCGGCAG
CAGGTGGCAC TACTGCGTCT TCTGCCCTA ACACTCGCCG AAGCCCGCGT GGTGCTCTT CCCGGCCGTC
SerThrArgLeu LysMetLeu GluValPro TyrValAspArg AsnSerCys LysLeuSer SerSerPheIle
2101 TCCACCAGGC TCAAGATGCT GGAGGTGCC TACGTGGACC GCAACAGCTG CAAGCTGTCC AGCAGCTTCA
AGTGGTCCG AGTTCTACGA CCTCCACGG ATGCACCTGG CGTTGTGCAC GTTCGACAGG TCGTCGAAGT
194
..IleThrGln AsnMetPhe CysAlaGlyTyr AspThrLys GlnGluAsp AlaCysGlnGly AspSerGly
2171 TCATCACCCA GAACATGTTT TGTGCCGGCT ACGACACCAA GCAGGAGGAT GCCTGCCAGG GGGACAGCGG
AGTAGTGGGT CTTGTACAAG ACACGGCGA TGCTGTGGTT CGTCTCTCTA CGGACGGTCC CCTGTGTGGC
.GlyProHis ValThrArgPhe LysAspThr TyrPheVal ThrGlyIleVal SerTrpGly GluGlyCys
2241 GGGCCCCGAC CTCACCCGCT TCAAGGACAC CTACTTCGTG ACAGGCATCG TCAGCTGGGG AGAGGGCTGT
CCGGGGCGTG CAGTGGGGGA AGTTCCTGTG GATGAAGCAC TGTCCGTAGC AGTCGACCCC TCTCCCCACA
AlaArgLysGly LysTyrGly IleTyrThr LysValThrAla PheLeuLys TrpIleAsp ArgSerMetLys
2311 GCCCCGTAGG GGAAGTACGG GATCTACACC AAGTCAACG CCTTCTCTCA GTGATCGAC AGTCCCATGA
CGGCAATTCC CCTTCATGCC CTAGATGTGG TTCCAGTGGG GPRAGGAGTT CACCTAGCTG TCCAGGTACT

```

Figura 5D

```
..ThrArgGly LeuProLys AlaLysSerHis AlaProGlu ValIleThr SerSerProLeu Lys
~~~~~
2381 AAACCAGGGG CTTGCCCCAAG GCCAAGAGCC ATGCCCCGGA GGTCAATAACG TCCTCTCCAT TAAAGTGA
      TTTGGTCCCC GAACGGGTTT CGETTCTCGG TACGGGGCCT CCAGTATTGC AGGAGAGGTA ATTTCAC
```

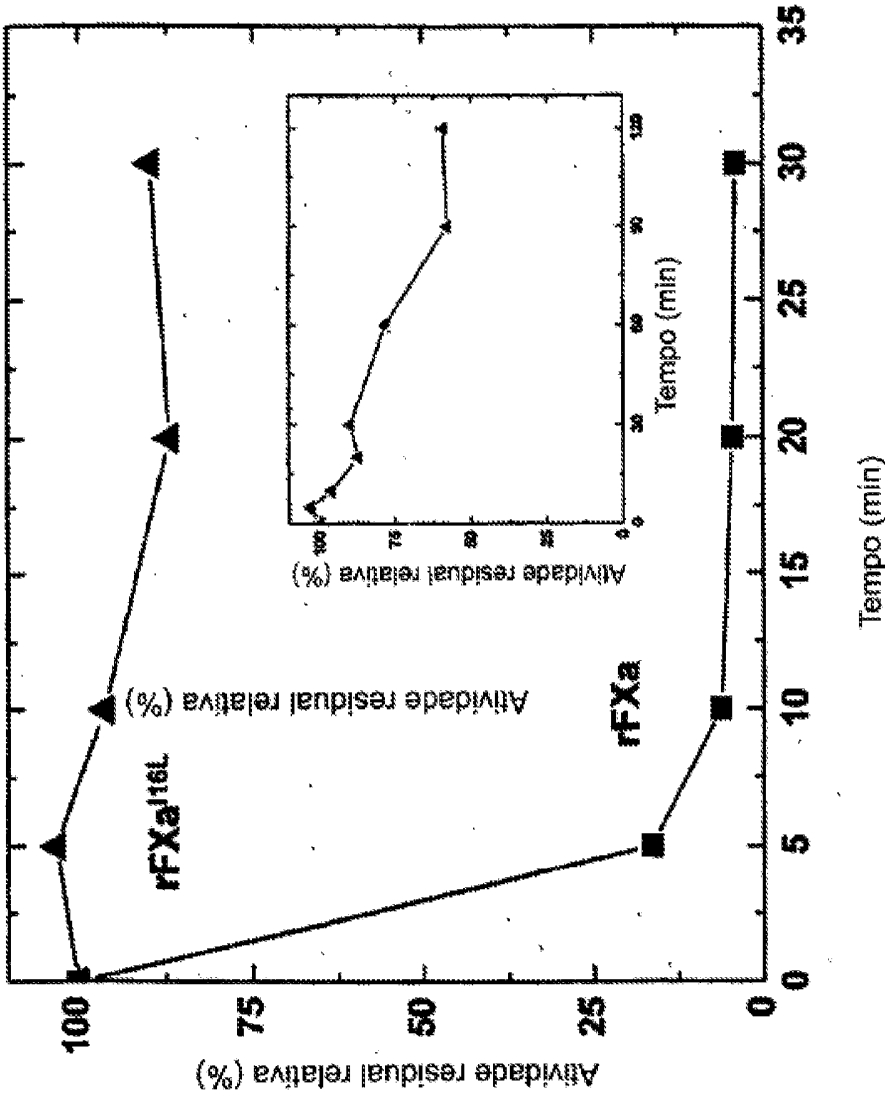


Figura 6

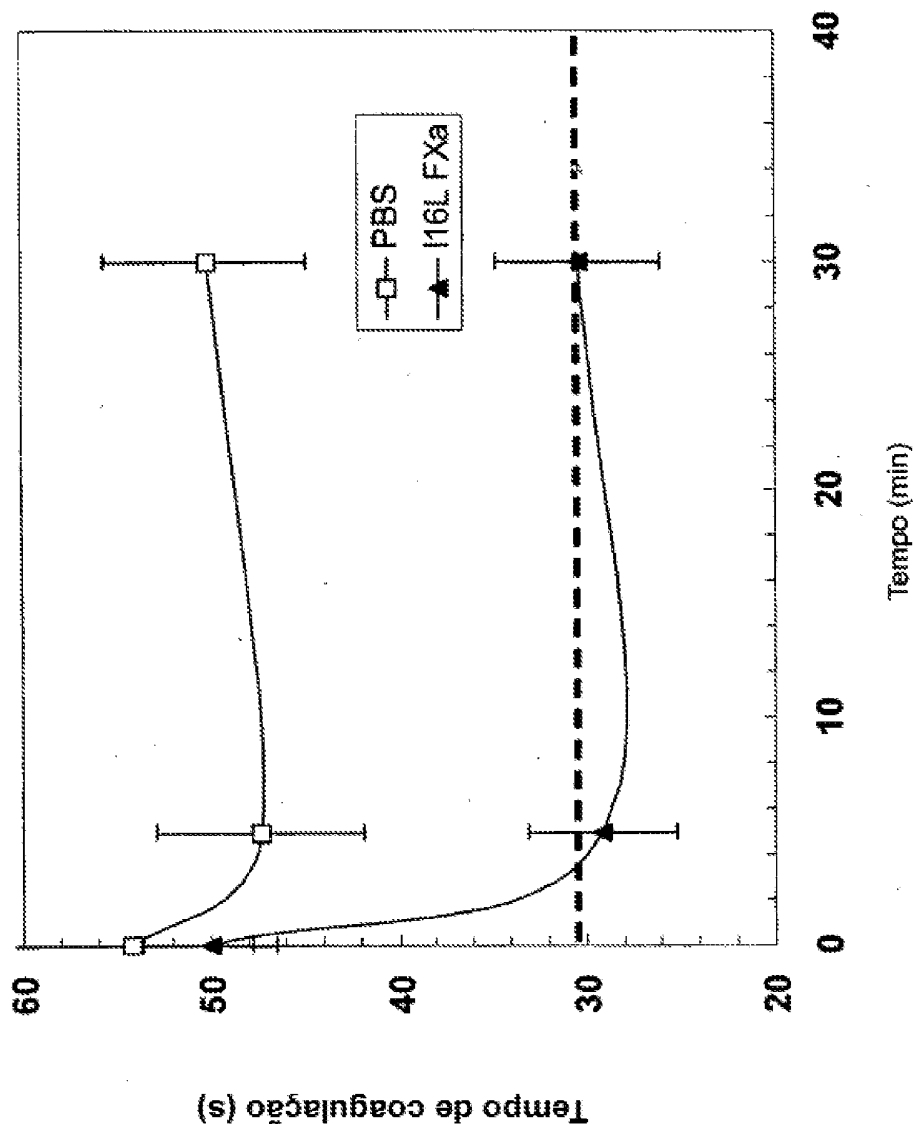


Figura 7

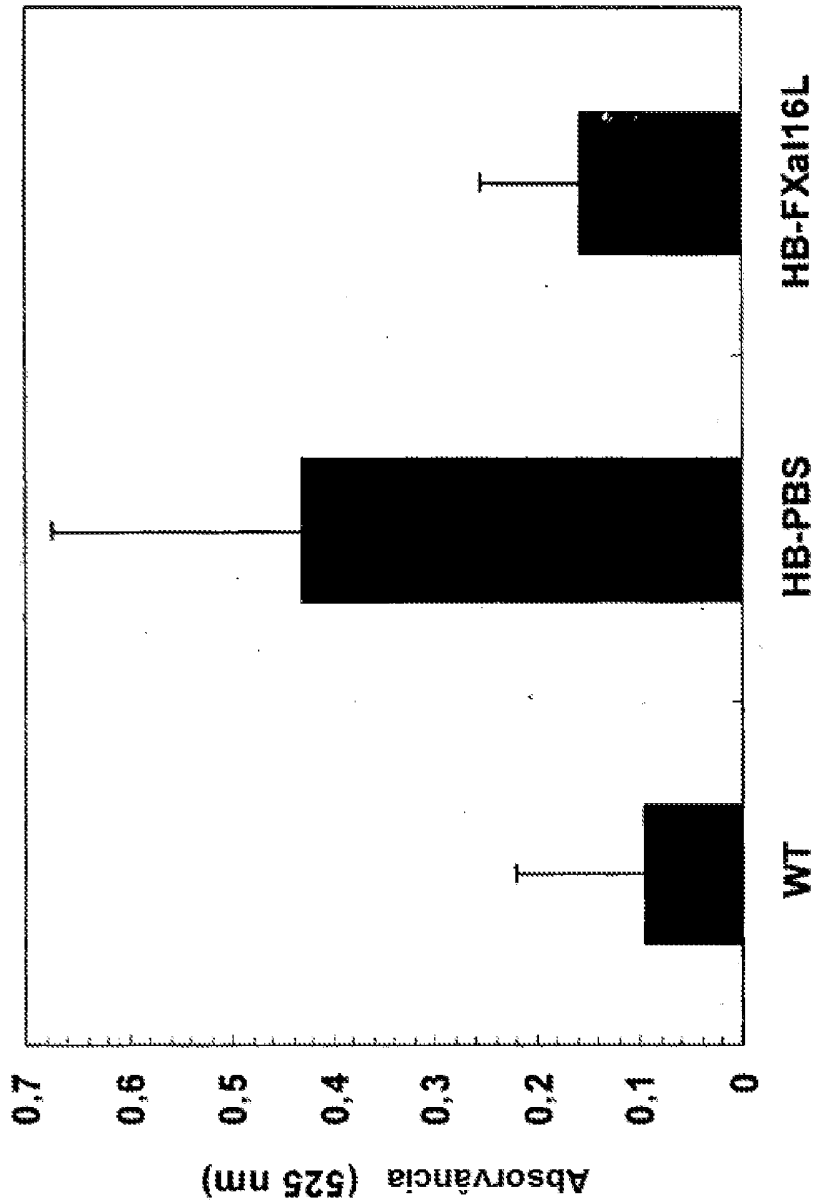


Figura 8